

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ Διευθυντής: Καθηγητής Βασίλειος Γοργούλης

Μελέτη του ρόλου του μονοπατιού Notch στη φυσιολογική ανάπτυξη και την καρκινογένεση στο ουροποιητικό σύστημα

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΓΕΝΟΠΟΥΛΟΥ Βιολόγος

Αθήνα 2017

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Δρ. Βασίλειου Γοργούλη. Το πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών κατά το χρονικό διάστημα Ιανουαρίου 2012-Ιανουαρίου 2017 στο εργαστήριο του Δρ. Απόστολου Κλινάκη.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Δρ. Βασίλειος Γοργούλης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)
- Δρ. Απόστολος Κλινάκης, Ερευνητής Β΄, ΙΙΒΕΑΑ
- Δρ. Αθανάσιος Κοτσίνας, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Δρ. Βασίλειος Γοργούλης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)
- Δρ. Απόστολος Κλινάκης, Ερευνητής Β΄, ΙΙΒΕΑΑ
- Δρ. Αθανάσιος Κοτσίνας, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Δρ. Νικόλαος Ανάγνου, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Δρ. Δημήτριος Θάνος, Ερευνητής Α΄, ΙΙΒΕΑΑ
- Δρ. Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- Δρ. Μαρία Ρουμπελάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 24/1/2012

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 29/11/2016

Ημερομηνία υποστήριξης διδακτορικής διατριβής: 20/1/2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Βασίλειο Γοργούλη για την τιμή που μου έκανε να αναλάβει την επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής, τη στήριξη και τις εποικοδομητικές υποδείξεις του, καθώς και το Δρ. Αθανάσιο Κοτσίνα για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της εργασίας μου, τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθειά του για την απρόσκοπτη ολοκλήρωσή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Νικόλαο Ανάγνου, το Δρ. Δημήτριο Θάνο, το Δρ. Ανδρέα Σκορίλα και τη Δρ. Μαρία Ρουμπελάκη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής, το ενδιαφέρον και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στο Δρ. Απόστολο Κλινάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ομάδα του ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια τον Ιούνιο του 2010 και στη συνέχεια να πραγματοποιήσω τη μεταπτυχιακή διπλωματική μου εργασία και τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριό του. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εισαγωγή μου στο «θαυμαστό καινούριο κόσμο» της έρευνας και ειδικότερα για τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα καινοτόμο θέμα-πρόκληση, τις πολύτιμες γνώσεις, τις ενδιαφέρουσες συζητήσεις καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξή του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα νυν και πρώην μέλη του εργαστηρίου Δρ. Θεόδωρο Ράμπια, Δρ. Γιώργο Παπαφωτίου, Δρ. Ευαγγελία Χαβδούλα, Δρ. Ανδριάνα Παπαδημητροπούλου, Δρ. Κωνσταντίνο Φαιδωνίδη, Ελένη Βασιλάκη, Βαρβάρα Παρασκευοπούλου, Λαμπρινή Τσούτση, Νεκταρία Λέλη, Ευγενία Κουσίδου, Δημήτρη Καραγιάννη, Λαμπρινή Τζιόγκα, Πελαγία Μελισσά καθώς και τον Δρ. Δημήτρη Στέλλα και τη Ζωή Κανάκη, οι οποίοι υπήρξαν συνοδοιπόροι κατά τη διάρκεια αυτής της πορείας και συνέβαλαν στο ευχάριστο κλίμα

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως το Δρ. Θεόδωρο Ράμπια για τη συνεργασία μας στη μελέτη του ρόλου του μονοπατιού Notch στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Επίσης, στην εργασία αυτή συνέβαλαν καθοριστικά ο Δρ. Ανδρέας Σκορίλας και ο Δρ. Κωνσταντίνος Στραβοδήμος, οι οποίοι παρείχαν τα ανθρώπινα δείγματα όγκων ουροδόχου κύστης, ο Δρ. Μαργαρίτης Αυγέρης, ο οποίος πραγματοποίησε πειραματική και στατιστική ανάλυση σε αυτά, ο Δρ. Αλέξανδρος Πολύζος, ο οποίος ανέλυσε τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών και ο Δρ. Χρήστος Βαλαβάνης, ο οποίος πραγματοποίησε την ιστολογική ανάλυση των πειραματοζώων. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Νεκταρία Λέλη, η οποία βοήθησε στη μελέτη του ρόλου του υποδοχέα RXRα στην ογκογένεση του ουροθηλίου, τη Ζωή Κανάκη, η οποία πραγματοποίησε τις ενέσεις σε βλαστοκύστες για τη δημιουργία του διαγονιδιακού ποντικιού UpII-Cre, τη Δρ. Ζωή Κούρνια και το Γιάννη Γαλδαδά για τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, τη Δρ. Μαρία Ρουμπελάκη για τη βοήθεια στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και τη Δρ. Ευαγγελία Χαβδούλα και τη Βαρβάρα Παρασκευοπούλου για την παραχώρηση πειραματοζώων και τομών αντίστοιχα. Τέλος, θερμές ευχαριστίες ανήκουν στο προσωπικό του ΙΙΒΕΑΑ και κυρίως στις Μονάδες Ζωϊκών Προτύπων, Ιστοχημείας και Βιοαπεικόνισης για την πολύτιμη τεχνική υποστήριξη.

Κλείνοντας, θα ήθελα να δηλώσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για τη συνεχή υποστήριξη, την κατανόηση και τη βοήθειά τους, χωρίς τις οποίες δε θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ПЕРІЛНΨН	1
ABSTRACT	5

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
1.1. Ιστολογικός και ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του φυσιολογικού
ανθρώπινου ουροθηλίου7
1.2. Ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ουροθηλίου10
1.3. Καρκίνος της ουροδόχου κύστης11
1.4. Γενετικές αλλοιώσεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης
1.5. Μοριακοί υπότυποι του καρκίνου της ουροδόχου κύστης
1.6. Κύτταρα έναρξης όγκων της ουροδόχου κύστης
2. O POAOS THS SHMATOΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ NOTCH STON KAPKINO THS
ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
2.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch26
2.2. Υποδοχείς Notch
2.2.1. Δομή των υποδοχέων Notch
2.2.2. Μηχανισμός ενεργοποίησης του υποδοχέα
2.3. Προσδέτες Notch
2.3.1. Δομή των προσδετών Notch
2.4. Ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch μέσω πρωτεόλυσης 34
2.4.1. Πρωτεολυτική ρύθμιση της δράσης του υποδοχέα
2.4.2. Το σύμπλεγμα της γ-σεκρετάσης35
2.4.3. Πρωτεολυτική ρύθμιση της δράσης του προσδέτη
2.5. Μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch
2.5.1. Μεταγραφική ρύθμιση μέσω CBF138
2.5.2. Μεταγραφική ενεργοποίηση και επιλογή υποκινητή-στόχου40
2.6. Ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω Notch42
2.6.1. Ενδοκυττάρωση, διακίνηση και εντοπισμός των υποδοχέων και των
προσδετών του μονοπατιού Notch

2.6.2. Αναστολή της σηματοδότησης μέσω Notch από τους κανονικούς
προσδέτες
2.7. Ο ρόλος του μονοπατιού Notch στον καρκίνο46
2.7.1. Το μονοπάτι Notch μπορεί να δρα είτε ογκογενετικά είτε
ογκοκατασταλτικά σε διάφορους τύπους καρκίνου
2.7.2. Ο ρόλος του μονοπατιού Notch στους καρκίνους του ουροποιητικού
συστήματος50
2.8. Θεραπευτικές προοπτικές στόχευσης του μονοπατιού Notch στον καρκίνο 51
3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΡΕΤΙΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ54
3.1. Τα ρετινοειδή και ο μεταβολισμός τους54
3.2. Υποδοχείς ρετινοϊκών οξέων56
3.2.1. Κατηγοριοποίηση των υποδοχέων ρετινοϊκού οξέος
3.2.2. Δομή των υποδοχέων RXR57
3.3. Σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος60
3.4. Αλληλεπίδραση του υποδοχέα RXR με άλλους υποδοχείς64
3.5. Ο ρόλος του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος στην ανάπτυξη67
3.6. Ο ρόλος του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος στον καρκίνο
3.6.1. Μηχανισμοί καρκινογένεσης μέσω του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος
3.6.2. Ο ρόλος της σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος στον καρκίνο της
ουροδόχου κύστης70
3.6.3. Μεταλλαγές στο μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος σε ασθενείς με καρκίνο
της ουροδόχου κύστης72
3.7. Θεραπεία με ρετινοειδή76
3.7.1. Θεραπευτικές εφαρμογές των ρετινοειδών76
3.7.2. Μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη θεραπεία με ρετινοειδή78
Β. ΣΚΟΠΟΣ
Г. ҮЛІКА КАІ МЕЮОДОІ
1. Ανθρώπινα δείγματα83
2. Ποντίκια

3. Κυτταροκαλλιέργειες	
4. Μοριακή κλωνοποίηση	
4.1. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	
4.2. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	
4.3. Αντίδραση συνένωσης	
4.4. Δημιουργία δεκτικών στελεχών Ε. Coli	
4.5. Μετασχηματισμός δεκτικών στελεχών <i>E.coli</i>	
4.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα	
5. Ιστολογία	
5.1. Μονιμοποίηση ιστού	
5.2. Έγκλειση ιστού και λήψη τομών	
5.2.1. Τομές παραφίνης	
5.2.2. Κρυοτομές	
5.3. Χρώση με αντίσωμα	
5.3.1. Ανοσοφθορισμός	
5.3.2. Ανοσοϊστοχημεία	90
5.4. Χρώση με X-gal	91
6. Μικροσκοπία	92
7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	92
8. Απομόνωση RNA	94
9. Αντίστροφη μεταγραφή	94
10. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	
11. Απομόνωση πρωτεϊνών	
12. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	
12.1. Πηκτώματα	
12.2. Προετοιμασία δειγμάτων	100
12.3. Ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδης	100
12.4. Μεταφορά	100
12.5. Κάλυψη	101
12.6. Πρωτοταγές αντίσωμα	
12.7. Δευτεροταγές αντίσωμα	102
12.8. Εμφάνιση	102
13. Αδενοϊικοί φορείς	103
13.1. Κατασκευή αδενοϊικών φορέων	103

13.2. Καθαρισμός ιϊκού αποθέματος104
14. Διαμόλυνση κυττάρων105
15. Δοκιμασία βιωσιμότητας ΜΤΤ106
16. Δοκιμασία λουσιφεράσης107
17. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου110
18. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης110
19. Μικροσυστοιχίες DNA111
20. Αλληλούχηση κατά Sanger113
21. Σχολιασμός ακολουθιών
22. Δοκιμασία ανάλυσης της μεταβολής του αριθμού αντιγράφων γονιδίου 113
23. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής114
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
1. Η ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ
ΟΔΗΓΕΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΟΓΚΩΝ ΣΤΟΝ ΟΥΡΗΤΗΡΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ
1.1. Η απαλοιφή του γονιδίου Ncstn οδηγεί στη δημιουργία όγκων στο
ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού115
1.2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch είναι ενεργοποιημένο στο φυσιολογικό
ουροθήλιο του ποντικιού117
1.3. Ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός των όγκων ουρητήρα ποντικιών στα οποία
το μονοπάτι Notch είναι απενεργοποιημένο119
1.4. Η αποκατάσταση της έκφρασης του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch1
αποτρέπει την εμφάνιση όγκου στον ουρητήρα ποντικιών από τα οποία λείπει η
Nicastrin
1.5. Μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων ουρητήρα ποντικιών στα οποία το
μονοπάτι Notch είναι απενεργοποιημένο121
1.6. Η απαλοιφή του γονιδίου Cbf1 οδηγεί στη δημιουργία όγκων στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού123
2. Η ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ
ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ ΚΥΣΤΗ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ 124
2.1. Δημιουργία διαγονιδιακού ποντικιού UpII-Cre-iresGFP124
2.2. Η απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch οδηγεί σε καρκίνο της ουροδόχου
κύστης σε ποντίκια127

2.3. Οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές της
δράσης του μονοπατιού Notch στο ουροθήλιο129
3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ ΜΕ
ΑΛΛΑ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ
ΚΥΣΤΗ
3.1. Η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch φαίνεται να δρα συνεργιστικά με
την ενεργοποίηση των μονοπατιών Ras και PI3K στον καρκίνο του ουροποιητικού
συστήματος σε ποντίκια141
3.2. Η απενεργοποίηση του γονιδίου $Tp53$ οδηγεί σε υπερπλασία/δυσπλασία της
ουροδόχου κύστης του ποντικιού147
4. Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ
ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
4.1. Δημιουργία κυτταρικών σειρών από όγκους ουρητήρα ποντικιών από τα οποία
απουσιάζει η Nicastrin149
4.2. Κατασκευή αδενοϊικών φορέων έκφρασης των ενδοκυτταρικών τμημάτων
των υποδοχέων NOTCH1, NOTCH2 και Notch3150
4.3. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων NOTCH1, NOTCH2 και Notch3 καταστέλλει
τον πολλαπλασιασμό καρκινικών ουροθηλιακών κυττάρων ποντικιού152
4.4. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch είναι ενεργοποιημένο στο ανθρώπινο
ουροποιητικό σύστημα
4.5. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων ΝΟΤCΗ1, ΝΟΤCΗ2 και Notch3 καταστέλλει
τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών σειρών156
4.6. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα NOTCH1 οδηγεί σε συσσώρευση των
ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών κυττάρων στη G0/G1 φάση του
κυτταρικού κύκλου
5. TO MONOΠΑΤΙ NOTCH PY@MIZEI TO MONOΠΑΤΙ MAPK ΣTO
ОҮРОӨНЛІО
5.1. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση της
Erk1/2 σε ουροθηλιακά κύτταρα ανθρώπου και ποντικιού
5.2. Η αναστολή της ΜΕΚ1/2 οδηγεί σε καταστολή του πολλαπλασιασμού και
αποφωσφορυλίωση της ERK1/2 σε ανθρώπινα ουροθηλιακά κύτταρα161
5.3. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των
DUSPs σε ανθρώπινα ουροθηλιακά κύτταρα162

5.4. Η αναστολή του μονοπατιού Notch οδηγεί σε μείωση της έκφρασης τω	v
DUSPs και αποκατάσταση της φωσφορυλίωσης της Erk1/2 σε ουροθηλιακ	ά
κύτταρα ανθρώπου και ποντικιού16	4
5.5. Η κανονική σηματοδότηση μέσω Notch ρυθμίζει την έκφραση των DUSPs κα	u
τον πολλαπλασιασμό των ουροθηλιακών κυττάρων ανθρώπου και ποντικιού 16	6
5.6. Οι DUSPs είναι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του NOTCH1 σε ανθρώπιν	α
ουροθηλιακά κύτταρα16	8
5.7. Ο άξονας NOTCH1-DUSP-ERK1/2 πιθανά παίζει ρόλο στο πλακώδε	.ς
καρκίνωμα του πνεύμονα16	9
6. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΝΟΤCΗ ΕΜΦΑΝΙΖΕΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ	
ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ 17	3
6.1. Ταυτοποίηση νέων, σωματικών μεταλλαγών σε γονίδια που συμμετέχουν στ	0
σηματοδοτικό μονοπάτι Notch σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης17	3
6.2. Οι μισοί ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης εμφανίζουν απώλει	α
αριθμού αντιγράφων του γονιδίου <i>NOTCH1</i> 17	5
6.3. Οι μεταλλαγές που ταυτοποιήθηκαν οδηγούν σε απενεργοποίηση το	υ
μονοπατιού Notch17	6
6.4. Οι μεταλλαγές στο μονοπάτι Notch δε συνυπάρχουν συχνά με μεταλλαγές στ	α
γονίδια FGFR3, HRAS/KRAS και PIK3CA17	8
7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΡΕΤΙΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟΝ	
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	1
7.1. Ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης εμφανίζουν απώλεια αριθμο	ύ
αντιγράφων του γονιδίου <i>RXRA</i> 18	1
7.2. Η αμινοξική αντικατάσταση στη θέση S427 είναι πιθανώς επιζήμια για τ	η
λειτουργικότητα του RXRα	2
7.3. Η μεταλλαγή S427F του γονιδίου RXRA είναι επικρατώς αρνητική βάσε	n
προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής18	5
7.4. Κλωνοποίηση της μεταλλαγής S427F του ανθρώπινου γονιδίου RXRA18	9
7.5. Κατασκευή λεντιϊκών φορέων του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένο	υ
ανθρώπινου υποδοχέα RXRa19	2
7.6. Η μεταλλαγή S427F του γονιδίου <i>RXRA</i> είναι επικρατώς αρνητική19	6
7.7. Ο μεταγραφικός παράγοντας Notch1 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίο	υ
RXRA μέσω του συμπλέγματος που προσομοιάζει στο COMPASS	8

7.8. Ο υποδοχέας Rxra εκφράζεται στο ουροθήλιο του ποντικιο	ύ σε όλα τα στάδια
της φυσιολογικής ανάπτυξης	
7.9. Δημιουργία κυτταρικής σειράς από όγκο ουροδόχου κύσ	της από τον οποία
απουσιάζει ο υποδοχέας RXRα	
7.10. Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα Rxra στην καρκινογένε	ση στο ουροθήλια
του ποντικιού	
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch δρα ογκοκατασταλτικά στο	ουροποιητικό
σύστημα του ποντικιού	
2. Ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχο κύστης εμφανίζουν γενετικ	ές αλλοιώσεις στο
μονοπάτι Notch	
3. Ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης στους οποίους το	μονοπάτι Notch
είναι απορρυθμισμένο παρουσιάζουν μειωμένη επιβίωση	
4. Το μονοπάτι Notch ασκεί την ογκοκατασταλτική του δράση μ	ιέσω ρύθμισης τοι
μονοπατιού ΜΑΡΚ	
5. Οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 διαμεσολαβούν την ογκοκα	τασταλτική δράσr
του μονοπατιού στο ουροθήλιο	
6. Αλληλεπίδραση του μονοπατιού Notch με άλλα ογκογονίδια κα	αι
ογκοκατασταλτικά στην ουροδόχο κύστη	
7. Η μεταλλαγή S427 του υποδοχέα RXRα δρα ως επικρατώς αρν	νητική μορφή σε
ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης	
8. Η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος οδηγεί στην ανάπτυξι	η πλακώδους
μεταπλασίας στην ουροδόχο κύστη ποντικιών	
9. Το μονοπάτι Notch ρυθμίζει το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος	στο ουροθήλιο
10. Θεραπευτικές προοπτικές	
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
ПАРАРТНМА	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί ένα εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι που είναι παρόν σε όλα τα Μετάζωα και παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και την ομοιόσταση των ιστών. Ειδικότερα, ρυθμίζει αποφάσεις κυτταρικής τύχης μέσω κυτταρικής επαφής επηρεάζοντας θετικά ή αρνητικά και με τρόπο που εξαρτάται από το περιβάλλον κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Συνεπώς, η δυσλειτουργία ή η απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων διαταραχών, από αναπτυξιακά σύνδρομα μέχρι καρκίνο, στον οποίο εμπλέκεται είτε ως ογκογονίδιο είτε ως ογκοκατασταλτικό.

Η αρχική παρατήρηση ότι η έλλειψη της Nicastrin—που έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch—οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων στον ουρητήρα του ποντικιού γέννησε την υπόθεση ότι η σηματοδότηση μέσω Notch δρα ογκοκατασταλτικά στο ουροποιητικό σύστημα. Αρχικά, διαπιστώσαμε ότι το μονοπάτι Notch είναι ενεργό στο φυσιολογικό ουροθήλιο του ποντικιού. Στη συνέχεια, ο χαρακτηρισμός των όγκων αποκάλυψε ότι πρόκειται για ουροθηλιακά καρκινώματα υψηλού βαθμού που εκφράζουν δείκτες των κυττάρων της βασικής στιβάδας και συνεπώς ανήκουν στο βασικό υπότυπο ο οποίος στους ανθρώπους συνοδεύεται από φτωχή πρόγνωση. Η αποκατάσταση της έκφρασης του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch1 καταστέλλει την εμφάνιση όγκου, υπογραμμίζοντας ότι η απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch αποτελεί το μοναδικό μεταλλαξογόνο γεγονός που οδηγεί σε ογκογένεση.

Το επόμενο βήμα μας ήταν η δημιουργία ενός διαγονιδιακού ποντικιού στο οποίο η έκφραση της ρεκομπινάσης Cre, καθώς και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, βρίσκεται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της ουροπλακίνης II (UpII-Cre-iresGFP) και συνεπώς είναι ειδική για το ουροθήλιο. Η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch στην ουροδόχο κύστη ποντικιών οδηγεί στην ανάπτυξη απλής και οζώδους υπερπλασίας, καθώς και υψηλού βαθμού δυσπλασίας και καρκινώματος *in situ* που εμφανίζουν βασικά χαρακτηριστικά. Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την επίδραση της απώλειας κάθε υποδοχέα Notch ξεχωριστά και διαπιστώσαμε ότι οι Notch1 και Notch2 αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές της ογκοκατασταλτικής δράσης του μονοπατιού στο ουροθήλιο. Συγκεκριμένα, η έλλειψη του Notch1 ή του Notch2 προκαλεί κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία σε ποντίκια που είχαν εισαχθεί σε πρωτόκολλο χημικής καρκινογένεσης. Επιπλέον, η μελέτη της αλληλεπίδρασης της απενεργοποίησης του μονοπατιού Notch με την ενεργοποίηση του Kras ή της Pi3k σε ποντίκια παρείχε κάποιες πρώτες ενδείξεις για συνεργιστική δράση.

Εύλογα προέκυψε το ερώτημα αν τα ευρήματα στο ποντίκι μεταφράζονται στον άνθρωπο. Κατ' αρχάς, παρατηρήσαμε ότι το μονοπάτι Notch είναι ενεργό στο ανθρώπινο ουροθήλιο. Έπειτα, είδαμε ότι η υπερέκφραση των υποδοχέων Notch1-3 καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών σειρών. Ο επόμενος μας στόχος ήταν η αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού δράσης του Notch στο ουροθήλιο. Διαπιστώσαμε, λοιπόν, ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) μέσω άμεσης μεταγραφικής ενεργοποίησης των DUSPs και συνεπώς αναχαιτίζει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό του μονοπατιού MAPK. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων ουρητήρα από ποντίκια επιβεβαίωσε το μηχανισμό που ταυτοποιήσαμε.

Αξιοσημείωτα, ταυτοποιήσαμε νέες, σωματικές, απενεργοποιητικές μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού Notch ή/και απώλεια αριθμού αντιγράφων του NOTCH1 στο 61% των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Επίσης, δείξαμε ότι οι γενετικές αλλοιώσεις στο μονοπάτι Notch δε συνυπάρχουν συχνά με μεταλλαγές στα γονίδια FGFR3, HRAS/KRAS και PIK3CA και συσχετίζονται με χειρότερη επιβίωση.

Τέλος, καθώς έχει συσσωρευτεί πλήθος στοιχείων που υποδεικνύει ότι το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την καρκινογένεση στο ουροποιητικό σύστημα, στραφήκαμε στη μελέτη του ρόλου του. Πρώτα από όλα, χαρακτηρίσαμε τη μεταλλαγή «θερμού σημείου» στη θέση S427F του υποδοχέα RXRa, που εντοπίζεται στο 5% των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ως επικρατούς αρνητικής, δεδομένου ότι εμποδίζεται η δέσμευση του υποδοχέα και κατ' επέκταση η ενεργοποίηση της μεταγραφής, ενώ παράλληλα διατηρείται η ικανότητα ετεροδιμερισμού. Εξετάσαμε ακόμη την επίδραση της έλλειψης του RXRa κατά τη χημική καρκινογένεση στο ουροθήλιο του ποντικιού και διαπιστώσαμε ότι οδηγεί στην ανάπτυξη πλακώδους υπερπλασίας. Καθότι δείχθηκε ότι ο Notch1 προσδένεται στον υποκινητή του *RXRA*, συμπεραίνουμε ότι το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος βρίσκεται καταρροϊκά του Notch και διαμεσολαβεί μέρος της ογκοκατασταλτικής του δράσης στο ουροθήλιο.

Εν κατακλείδι, με την ερευνητική αυτή εργασία αποδείξαμε τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch στο ουροποιητικό σύστημα και αποσαφηνίσαμε τους μοριακούς μηχανισμούς που τον διέπουν τόσο *in vitro* σε ανθρώπινα καρκινικά ουροθηλιακά

κύτταρα όσο και *in vivo* σε μοντέλα ποντικιού, ανοίγοντας έτσι το δρόμο για την ανάπτυξη καινοτόμων στοχευμένων θεραπειών με απώτερο στόχο την αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

ABSTRACT

The Notch signaling pathway is evolutionarily conserved and present in all Metazoans and plays a crucial role in embryonic development and tissue homeostasis. Specifically, it controls cell fate decisions through interactions between neighboring cells by positively or negatively affecting the processes of proliferation, differentiation and apoptosis in a context-dependent manner. Therefore, dysregulation or loss of Notch signaling leads to a wide spectrum of human disorders, from developmental syndromes to cancer, where it has been implicated both as an oncogene and a tumor suppressor.

An initial observation that mice lacking Nicastrin—which leads to Notch pathway inactivation—develop ureteral tumors led to the hypothesis that Notch signaling acts as a tumor suppressor in the urinary tract. First, we showed that Notch pathway is active in normal mouse urothelium. Next, the characterization of the tumors revealed that they are high grade urothelial carcinomas expressing basal cell markers. Therefore, they are classified in the basal subtype which is associated with poor prognosis in humans. Re-expression of the intracellular domain of Notch1 receptor suppresses tumor onset, underlying the fact that Notch signaling loss is a "single hit" driver tumorigenic event.

In a following step, we generated a urothelial-specific transgenic line expressing recombinase Cre, and also the green fluorescent protein, under the transcriptional control of the UroplakinII gene promoter (UpII-Cre-iresGFP). Notch pathway inactivation in the mouse bladder leads to the development of tumors that consist of simple and nodular hyperplasia, as well as high-grade dysplasia and carcinoma *in situ* showing basal characteristics. In addition, we studied the effect of the loss of each Notch receptor individually and we found that Notch1 and Notch2 are the main mediators of the pathway's tumor suppressor role in the urothelium. In particular, Notch1 or Notch2 loss induces the phenotype of keratinizing squamous metaplasia in mice introduced in a chemical carcinogenesis protocol. Furthermore, the study of the interaction between Notch pathway inactivation and Kras or Pi3k activation in mice offered some indications towards a synergistic action.

As expected, soon arose the question whether these findings in mice can be translated to humans. First, we observed that Notch pathway is active in normal human urothelium. Subsequently, we showed that Notch1-3 overexpression suppresses the growth of human bladder cancer cell lines. Our next goal was the elucidation of the molecular mechanism of Notch action in the urothelium. We indicated that Notch pathway activation regulates ERK1/2 phosphorylation through direct transcriptional activation of DUSPs and thereby restrains the proliferative output of the MAPK pathway. Molecular characterization of mouse ureter tumors corroborated the identified mechanism.

Surprisingly, we identified novel somatic loss-of-function mutations in Notch pathway components and/or copy number loss in the *NOTCH1* locus in 61% of the bladder cancer patients studied. Also, we demonstrated that Notch pathway genetic alterations do not often coexist with *FGFR3*, *HRAS/KRAS* or *PIK3CA* mutations and they correlate with worse survival.

Last, since there is a plethora of data indicating that retinoic acid signaling is implicated in the development and tumorigenesis of the urinary tract, we delved into the study of its role. Initially, we characterized the mutation in the hotspot S427F of the RXR α receptor, occurring in 5% of bladder cancer patients, as dominant-negative, given that ligand binding and therefore transcription activation is impaired while the heterodimerization capacity is retained. We also examined the effect of RXR α loss during chemical carcinogenesis in the mouse bladder and found that it leads to squamous metaplasia development. Based on the fact that Notch1 binds to the *RXRA* promoter, we concluded that the retinoic acid pathway acts downstream of Notch mediating part of its tumor suppressor role.

In conclusion, this research established the Notch signaling pathway as a tumor suppressor in the urinary tract and elucidated the mechanistic aspects of its role both *in vitro* by using human cancer cell lines and *in vivo* by using mouse models, paving the way for the development of novel targeted therapies with the aim of treating effectively bladder cancer.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

1.1. Ιστολογικός και ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του φυσιολογικού ανθρώπινου ουροθηλίου

Η ουροδόχος κύστη αποτελείται από ένα εξειδικευμένο επιθήλιο-το ουροθήλιο-το οποίο περικλείεται από το χόριο του βλεννογόνου (lamina propria) το οποίο με τη σειρά του περιβάλλεται από μία παχιά στιβάδα λείου μυός, του εξωστήρα μυός (muscularis propria), o οποίος σχηματίζει το τοίχωμα της κύστης. Ο όρος ουροθήλιο περιγράφει το επιθήλιο που καλύπτει την ουροποιητική οδό που περιλαμβάνει τη νεφρική πύελο, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα και χρησιμεύει ως φραγμός μεταξύ των ούρων και του αίματος αποτρέποντας της ανταλλαγή νερού και τοξικών ουσιών. Πρόκειται για ένα ψευδοστρωματοποιημένο επιθήλιο με 3-7 στιβάδες, το οποίο προέρχεται από το ενδόδερμα και αποτελείται από τρεις κυτταρικούς τύπους: τα κύτταρα της βασικής στιβάδας (basal cells), τα ενδιάμεσα κύτταρα (intermediate cells) και τα επιφανειακά (superficial/umbrella cells) κύτταρα. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας είναι μικρά, κυβοειδή, με υπερχρωματικό πυρήνα και επικάθονται στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου. Τα ενδιάμεσα κύτταρα, που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του ουροθηλίου, είναι προσανατολισμένα κάθετα στη βασική μεμβράνη και χαρακτηρίζονται από διαυγές, αμφίφιλο κυτταρόπλασμα και στρογγυλό/οβάλ πυρήνα. Τα επιφανειακά κύτταρα είναι παράλληλα στη βασική μεμβράνη και καλύπτουν αρκετά ενδιάμεσα κύτταρα, ιδιότητα από την οποία προέκυψε η ονομασία «umbrella cells». Διαθέτουν ηωσινόφιλο, εκτεταμένο κυτταρόπλασμα, μεγάλο στρογγυλό πυρήνα, ο οποίος συχνά παρουσιάζει δι- ή και πολυπυρήνωση, και έχει χαρακτηριστικούς πυρηνίσκους (Castillo-Martin et al., 2010).

Οι τρεις κυτταρικοί τύποι του ουροθηλίου εκφράζουν διαφορετικούς βιοδείκτες. Κατ' αρχάς, όλες οι στιβάδες παρουσιάζουν έντονη και ομοιογενή έκφραση της κυτταροκερατίνης 7 (Cytokeratin 7, CK7), μίας κυτταροκερατίνης χαμηλού μοριακού βάρους που δεν είναι ειδική για το ουροθήλιο και τους όγκους του, αλλά εκφράζεται σε μεγάλο εύρος ανθρώπινων επιθηλίων και των αντίστοιχων νεοπλασμάτων τους (Moll et al., 2008). Οι υψηλού μοριακού βάρους κυτταροκερατίνης κυτταροκερατίνας στη βασική ή/και την

ενδιάμεση στιβάδα του ουροθηλίου και απουσιάζουν από την επιφανειακή, ενώ οι CK18 και CK20 είναι χαμηλού μοριακού βάρους κυτταροκερατίνες που είναι παρούσες μόνο στα επιφανειακά κύτταρα. Επιπλέον, τα ώριμα A και B αντιγόνα των ομάδων αίματος εκφράζονται στα κύτταρα της βασικής και της ενδιάμεσης στιβάδας, ενώ ο πρόδρομος καθοριστής Lewis X εντοπίζεται στα επιφανειακά κύτταρα. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι ουροπλακίνες (uroplakins, Ups), οι οποίες σχηματίζουν μία αδιάβροχη και ανθεκτική στις βλάβες κρυσταλλική πλάκα που δημιουργεί το ουροθηλιακό φράγμα διαπερατότητας, εκφράζονται αποκλειστικά στα επιφανειακά κύτταρα (Wu et al., 2009). Επιπρόσθετα, τα κύτταρα της βασικής και της ενδιάμεσης στιβάδας, ενώ τα επιφανειακά ρ63⁻ (Di Como et al., 2002).

Συγκεντρωτικά, τα τρία στάδια διαφοροποίησης που συναντώνται τόσο κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη όσο και στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι ο βασικός τύπος που εκφράζει κυτταροκερατίνες $K14^{+}K5^{+}K20^{-}$ τις και τους επιφανειακούς δείκτες CD90⁺CD44⁺CD49f⁺, (K14⁻K5⁺K20⁻/CD90⁻CD44⁺CD49f⁺) 0 ενδιάμεσος και 0 διαφοροποιημένος (K14⁻K5⁻K20⁺/CD90⁻CD44⁻CD49f⁺) [Volkmer et al., 2012]. Σύμφωνα με μία πιο πρόσφατη μελέτη, οι τρεις κυτταρικοί τύποι του ουροθηλίου είναι οι εξής: τα CK5⁺ κύτταρα της βασικής στιβάδας (K5-BCs) τα οποία έχουν το προφίλ Upk⁻ P63⁺ Shh⁺ Krt5⁺, τα κύτταρα I που γαρακτηρίζονται ως Upk⁺ P63⁺ Shh⁺ Krt5⁻ και τα κύτταρα S που είναι Upk⁺ P63⁻ Shh⁻ Krt5⁻ (Gandhi et al., 2013). Τέλος, στο φυσιολογικό ουροθήλιο τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικιού, ο πολλαπλασιασμός δεν αποτελεί αποκλειστικό χαρακτηριστικό των κυττάρων της βασικής στιβάδας, καθώς και κάποια ενδιάμεσα ή επιφανειακά κύτταρα είναι θετικά για την πρωτεΐνη Ki67, η οποία αποτελεί δείκτη πολλαπλασιασμού (Εικόνα 1).

Κλείνοντας, να σημειωθεί ότι η ουροδόχος κύστη του ποντικιού εμφανίζει ιστολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με της ανθρώπινης, με την πιο κύρια διαφορά τους να είναι το ότι το ουροθήλιο του ποντικιού διαθέτει μόνο τρεις στιβάδες, οι οποίες περιλαμβάνουν τους ίδιους κυτταρικούς τύπους και εμφανίζουν συγκρίσιμα ανοσοϊστοχημικά προφίλ (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικών τύπων των που αποτελούν ουροθήλιο, το των μονοπατιών διαφοροποίησής τους δεικτών καθώς και των που εκφράζουν (Ho et al., 2012).





Εικόνα 2: Μικροσκοπική εικόνα του φυσιολογικού ουροθηλίου ανθρώπου (www.webpathology.com) [αριστερά] και ποντικιού (δεξιά).

1.2. Ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ουροθηλίου

Το ουροθήλιο αποτελεί σχετικά εφησυχασμένο επιθήλιο, καθώς ανανεώνεται φυσιολογικά κάθε 6-12 μήνες. Ωστόσο, μπορεί να μεταπέσει σε μία κατάσταση έντονου πολλαπλασιασμού ως απόκριση σε οξεία βλάβη, όπως ουρολοίμωξη ή έκθεση σε φάρμακα και τοξίνες. Η διαφοροποίηση του ουροθηλίου θεωρείται ότι παρουσιάζει ομοιότητες με τη διαφοροποίηση της επιδερμίδας, κατά την οποία η βασική επιθηλιακή στιβάδα περιέχει προγονικά κύτταρα και αρχικά διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία μέσω ωρίμανσης σχηματίζουν τα ενδιάμεσα κύτταρα και τελικά τα πιο διαφοροποιημένα ακανθώδη κύτταρα. Έτσι, σύμφωνα με το σχήμα που έχει προταθεί για το ουροθήλιο, η βασική στιβάδα περιέχει προγονικά και διαφοροποιούμενα ουροθηλιακά κύτταρα τα οποία ωριμάζουν σε ενδιάμεσα κύτταρα και δίνουν γένεση στα πιο ώριμα επιφανειακά κύτταρα.

Τα ποντίκια με γονότυπο p63^{-/-} έχουν μικρή ουροδόχο κύστη, η οποία καλύπτεται από μία λεπτή μονοκυτταρική στιβάδα από επιφανειακά κύτταρα (Urist et al., 2002). Από αυτό προκύπτει η υπόθεση ότι η απουσία της p63 εμποδίζει την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων της βασικής στιβάδας χωρίς να έχει κάποια επίδραση στα επιφανειακά προγονικά κύτταρα. Επίσης, η παρουσία επιφανειακών κυττάρων, τα οποία εκφράζουν CK18 και ουροπλακίνη ΙΙ, παρατηρείται την εμβρυϊκή ημέρα E17. Κατά την εμβρυϊκή ζωή, παρουσιάζουν πολύ υψηλό πολλαπλασιασμό, ο οποίος διατηρείται μέχρι και τις πρώτες 24 ώρες μετά τη γέννηση. Ωστόσο, από αυτό το σημείο και έπειτα Ki67⁺ κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στη βασική στιβάδα. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα ενισχύουν την εναλλακτική υπόθεση ότι τα βλαστικά/προγονικά κύτταρα του ουροθηλίου δίνουν γένεση σε δύο διακριτές κυτταρικές γενεαλογίες: τα κύτταρα της βασικής/ενδιάμεσης στιβάδας και τα επιφανειακά κύτταρα.

Επίσης σε αντίθεση με τη θεωρία ότι από ένα βλαστικό κύτταρο προκύπτουν και οι τρεις κυτταρικοί τύποι του ουροθηλίου βρίσκεται μελέτη που υποστηρίζει ότι τα κύτταρα της ενδιάμεσης στιβάδας δίνουν γένεση τόσο σε ενδιάμεσα όσο και σε επιφανειακά κύτταρα, ενώ από τα CK5⁺ κύτταρα της βασικής στιβάδας προκύπτουν μόνο θυγατρικά CK5⁺ κύτταρα (Gandhi et al., 2013). Επιπρόσθετα, ταυτοποιήθηκαν τα προγονικά κύτταρα του εμβρυϊκού ουροθηλίου ως Foxa2⁺ P63⁺ Shh⁺ Upk⁻ κύτταρα (P cells). Τέλος, η έρευνα αυτή υποστηρίζει ότι το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος είναι απαραίτητο κατά την ανάπτυξη και την αναγέννηση του ουροθηλίου.

Από την άλλη μεριά, μία μελέτη έδειξε ότι τα κύτταρα της βασικής στιβάδας περιλαμβάνουν βλαστικά κύτταρα ικανά να αναγεννήσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους του ουροθηλίου και χαρακτηρίζονται από την έκφραση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης Sonic hedgehog (Shh). Έπειτα από βλάβη, η έκφραση της Shh στα κύτταρα της βασικής στιβάδας αυξάνεται και διεγείρει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt στο στρώμα, το οποίο με τη σειρά του επάγει τον πολλαπλασιασμό τόσο των ουροθηλιακών κυττάρων όσο και των κυττάρων του στρώματος. Αυτό το κύκλωμα θετικής ανατροφοδότησης και ο επακόλουθος πολλαπλασιασμός είναι απαραίτητοι για την αποκατάσταση της λειτουργίας του ουροθηλίου (Shin et al., 2011). Επιπλέον, μία άλλη μελέτη πρότεινε ότι τα ΔΝp63⁺ κύτταρα του ουρογεννητικού κόλπου δίνουν γένεση σε όλους τους επιθηλιακούς κυτταρικούς τύπους του προστάτη και της ουροδόχου κύστης και συνεπώς αποτελούν τα βλαστικά/προγονικά κύτταρα των συγκεκριμένων επιθηλίων κατά την ανάπτυξη (Pignon et al., 2012).

Πρόσφατα, δείχθηκε ότι ένας μικρός υποπληθυσμός κυττάρων της βασικής στιβάδας, τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση της κυτταροκερατίνης 14 (CK14⁺), διαθέτουν ικανότητας αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης προς όλους τους κυτταρικούς τύπους του ουροθηλίου κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη και την επαγόμενη από βλάβη αναγέννηση της ουροδόχου κύστης και συνεπώς αποτελούν τα βλαστικά κύτταρα του συγκεκριμένου ιστού (Papafotiou et al., 2016). Τα CK14⁺ κύτταρα αποτελούν το 30% των ουροθηλιακών κυττάρων κατά τη γέννηση του ποντικιού και ο αριθμός του φθίνει σταδιακά αποτελώντας το 4% των ουροθηλιακών κυττάρων στους δύο μήνες και το 1% στον ένα χρόνο ζωής.

1.3. Καρκίνος της ουροδόχου κύστης

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί την πέμπτη πιο συχνή κατά τη διάγνωση μη δερματική συμπαγή κακοήθεια και τη δεύτερη πιο συχνή κακοήθεια του γεννητικούουροποιητικού συστήματος μετά τον καρκίνο του προστάτη. Η ηλικία αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης και η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση είναι ~70 έτη. Επιπλέον, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι πιο συχνός στους άντρες από ό,τι στις γυναίκες (3:1). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το κάπνισμα, την έκθεση σε αρωματικές αμίνες και πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες, την κατανάλωση νερού που έχει μολυνθεί με αρσενικό, τη χρόνια μόλυνση με *Schistosoma* spp., την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία και την κατάχρηση αναλγητικών που περιέχουν φαινακετίνη.

Πάνω από το 90% των κακοήθων όγκων της ουροδόχου κύστης αποτελούν τα ουροθηλιακά καρκινώματα, περίπου το 4% ανήκουν στα πλακώδη καρκινώματα και το 2% αφορά αδενοκαρκινώματα. Ακόμα πιο σπάνιες μορφές καρκίνου της ουροδόχου κύστης αποτελούν το σάρκωμα, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα, το μικροθηλώδες καρκίνωμα και το πλασματοκυτταροειδές καρκίνωμα. Οι όγκοι της ουροδόχου κύστης κατηγοριοποιούνται ως προς το στάδιο, το οποίο περιγράφει το βαθμό της διήθησης (Tis-T4), σύμφωνα με το σύστημα TNM (Tumor-Node-Metastasis) [Πίνακας 1], και ως προς το βαθμό, με βάση τα κυτταρικά χαρακτηριστικά, σύμφωνα με το σύστημα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) του 1973 (1973 WHO) ή με το σύστημα του WHO και της Διεθνούς Κοινότητας Ουρολογικής Παθολογίας (International Society of Urological Pathology, ISUP) του 2004 (2004 WHO/ISUP) [Εικόνα 3, Εικόνα 4]. Κατά τη διάγνωση, η πλειοψηφία των όγκων της ουροδόχου κύστης (~60%) είναι μη διηθητικοί (στάδιο Τα), θηλώδεις όγκοι χαμηλού βαθμού. Οι υψηλού βαθμού όγκοι περιλαμβάνουν τους όγκους σταδίου Τ1, οι οποίοι έχουν διαπεράσει την επιθηλιακή βασική μεμβράνη αλλά δεν έχουν διηθήσει στο μυ, καθώς και τους μυοδιηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστης (~20% κατά τη διάγνωση) [Knowles & Hurst, 2015].

Οι μη διηθητικοί ουροθηλιακοί καρκίνοι συχνά υποτροπιάζουν (50-70%) αλλά σπάνια εξελίσσονται σε διηθητικούς (10-15%) και η πενταετής επιβίωση είναι ~90%. Η θεραπεία αφορά χειρουργική αφαίρεση του όγκου που ακολουθείται από χημειοθεραπεία, η οποία καθυστερεί την υποτροπή, και παρακολούθηση με κυστεοσκόπηση. Αντίθετα, οι μυοδιηθητικοί όγκοι (σταδίου T2 και πάνω) έχουν κακή πρόγνωση, καθώς η εξέλιξη σε μεταστατικό καρκίνο είναι συχνή (50%) και η πενταετής επιβίωση ή ραδιοθεραπεία και χημειοθεραπεία χορηγείται πριν ή μετά την κυστεκτομή. Δυστυχώς, εδώ και δεκαετίες δεν έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στις θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με το σύστημα ΤΝΜ

Στάδιο	Χαρακτηριστικά
Та	Μη διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
Tis	Μη διηθητικό επίπεδο καρκίνωμα (επίπεδο καρκίνωμα in situ ή CIS)
T1	Ο όγκος έχει διαπεράσει το συνδετικό ιστό κάτω από τη στιβάδα των
	κυττάρων που καλύπτουν την ουροδόχο κύστη, αλλά όχι το μυ.
T2	Ο όγκος αναπτύσσεται μέσα στη μυϊκή στιβάδα.
T3	Ο όγκος έχει διαπεράσει τη μυϊκή στιβάδα και το λιπώδη ιστό που την περιβάλλει.
T4	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί πέρα από το λιπώδη ιστό στα κοντινά όργανα ή δομές. Μπορεί να αναπτύσσεται στο στρώμα του προστάτη, τα σπερματικά κυστίδια, τη μήτρα, τον κόλπο, το πυελικό ή το κοιλιακό τοίχωμα.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων και των βαθμών του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Απεικονίζεται η σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM (πάνω) και η ταξινόμηση σε βαθμούς με βάση τα κριτήρια του 1973 WHO και του 2004 WHO/ISUP (Knowles & Hurst, 2015).



Εικόνα 4: Τομές ουροθηλίου διαφορετικής ιστολογικής εμφάνισης. Α) επιφανειακός όγκος Τα από ουροδόχο κύστη που δεν περιβάλλεται από CIS, B) επιφανειακός όγκος Τα από ουροδόχο κύστη που περιβάλλεται από CIS, C) μυοδιηθητικός όγκος T2, D) βιοψία από αλλοίωση CIS από ουροδόχο κύστη που έχει αφαιρεθεί με κυστεκτομή, E) βιοψία ουροθηλιακών κυττάρων που μοιάζουν φυσιολογικά από ουροδόχο κύστη με αλλοίωση CIS που αφαιρέθηκε με κυστεκτομή και F) βιοψία από φυσιολογικό ουροθήλιο φυσιολογικής ουροδόχου κύστης ενός ασθενή χωρίς ιστορικό καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Dyrskjøt et al., 2004).

1.4. Γενετικές αλλοιώσεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Πλήθος στοιχείων υπογραμμίζει το ρόλο των μεταλλαγών σε ογκογονίδια, όπως τα HRAS, FGFR3 (Fibroblast growth factor receptor 3) και PIK3CA (phosphatidylinositol 3-kinase), στην έναρξη των θηλωδών επιφανειακών (Ta) όγκων. Επιπλέον, η έλλειψη υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα οποία χαρτογραφούνται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9, όπως τα TSC1, PTCH και DBC1 φαίνεται να σχετίζεται με την έναρξη ορισμένων θηλωδών μη διηθητικών νεοπλασμάτων. Αντίθετα με τα θετικά ογκογενετικά γεγονότα που χαρακτηρίζουν την έναρξη των όγκων χαμηλού βαθμού, τα υψηλού βαθμού καρκινώματα *in situ* και τα ουροθηλιακά καρκινώματα φέρουν μεταλλαγές σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το

RB, το *TP53* και το *PTEN* και τα *CDKN2A* και *CDKN2B* που εδράζονται στο μικρό βραχίονά του χρωμοσώματος 9. Η γενετική αστάθεια που προκαλείται από αυτές τις αλλοιώσεις, καθώς και η απώλεια κρίσιμων φυσιολογικών λειτουργιών, καθοδηγούν τη συσσώρευση πολλαπλών μεταλλαγών. Ορισμένα ογκογονίδια, τα περισσότερα εκ των οποίων σχετίζονται με τα τρία προαναφερθέντα μονοπάτια, όπως τα *E2F*, *HDM2* και *AKT* που επηρεάζουν τα Rb, p53 και Pten αντίστοιχα, παίζουν ρόλο στην εξέλιξη αυτών των νεοπλασμάτων (Cordon-Cardo, 2008).

Η απώλεια του ενός ομόλογου χρωμοσώματος 9 αποτελεί χαρακτηριστικό του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και μάλιστα έχει περιγραφεί ως η μόνη μεταβολή του καρυοτύπου σε κατά τα άλλα διπλοειδείς όγκους. Πάνω από τους μισούς όγκους της ουροδόχου κύστης ανεξαρτήτως βαθμού και σταδίου εμφανίζουν LOH για το χρωμόσωμα 9. Συνεπώς, είναι σημαντική η ταυτοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εδράζονται σε αυτή την περιοχή και ο ρόλος τους στην ανάπτυξη όγκων στο ουροθήλιο. Υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 9 αποτελούν τα CDKN2A, CDKN2B, PTCH1, DBC1 και TSC1.

Σταθμό στην κατανόηση των μοριακών χαρακτηριστικών του ανθρώπινου ουροθηλιακού καρκινώματος αποτέλεσε η μελέτη που διεξήχθη πρόσφατα από το ερευνητικό δίκτυο TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network) κατά την οποία έγινε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος από 131 ασθενείς με υψηλού βαθμού μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του αριθμού μεταγράφων, της έκφρασης mRNA και microRNA, πρωτεϊνών και φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, της μεθυλίωσης του DNA, των εναλλακτικών μεταγράφων, των γονιδιακών συντήξεων, της ιϊκής ενσωμάτωσης, των διαταραχών σε μονοπάτια, των κλινικών και ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών που διαλεύκανε το μοριακό τοπίο του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Πίνακας 2, 3).

H ′ A O (C)	<u> </u>	,	S. (
Πίνακας 2. Ογκογονίδια που	ο εμπλέκονται στοι	ι καρκίνο της οι	υροδόχου κύστης

Γονίδιο	Αλλοίωση στον χαμηλού βαθμού σταδίου Τα καρκίνο της ουροδόχου κύστης	Συχνότητα	Αλλοίωση στο μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (≥T2)	Συχνότητα	Λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται
NRAS	Σημειακή μεταλλαγή	1-2%	Σημειακή μεταλλαγή	1-2%	Κυτταροπλασματική GTPάση
PIK3CA	Σημειακή μεταλλαγή	25%	Σημειακή μεταλλαγή	9-20%	Καταλυτική υπομονάδα-α της ΡΙ3Κ (p110α)
FGFR3	Σημειακή μεταλλαγή Αυξημένη έκφραση	60-70% 80%	Σημειακή μεταλλαγή	5-20% 40% (πρωτεΐνη)	Υποδοχέας αυξητικών παραγόντων πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης
E2F3	Επέκταση Αυζημένη έκφραση	10%	Επέκταση Αυξημένη έκφραση	9-14% 20% (πρωτεΐνη)	Μεταγραφικός παράγοντας Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου Ενεργότητα πρόσδεσης της RB
EGFR	Αυξημένη έκφραση	~20%	Αυξημένη έκφραση	~50% (πρωτεΐνη)	Υποδοχέας αυξητικών παραγόντων πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης
FGFR1	Επέκταση Αυζημένη έκφραση	1% ~50% (RNA)	Επέκταση Αυξημένη έκφραση και εναλλαγή ισομορφής	6% ~80% (mRNA)	Υποδοχέας αυξητικών παραγόντων πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης
RXRA*	NI	NI	Μεταλλαγή	9%	Υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος Μεταγραφικός παράγοντας
HRAS	Σημειακή μεταλλαγή	5-10%	Σημειακή μεταλλαγή	5-6%	Κυτταροπλασματική GTΡάση
CCND1	Επέκταση	20%	Επέκταση	20%	Κυκλίνη
KRAS	Σημειακή μεταλλαγή	5%	Σημειακή μεταλλαγή	5%	Κυτταροπλασματική GTPάση
ERBB3*	NI	NI	Σημειακή μεταλλαγή	11%	Υποδοχέας αυξητικών

					παραγόντων πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης
MDM2	Σημειακή μεταλλαγή	3%	Επέκταση	4-5%	E3 λιγάση ουβικιτίνης που στοχεύει την p53
AKY1	Σημειακή μεταλλαγή	1-3%	Σημειακή μεταλλαγή	1-3%	Πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης
ERBB2*	NI	NI	Επέκταση Αυξημένη έκφραση Μεταλλαγή	5-14%; 42% στο μικρο- θηλώδη τύπο 8-30% 8%	Υποδοχέας αυξητικών παραγόντων πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης

NI (no information): καμία πληροφορία. *Γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί ως σημαντικά μεταλλαγμένα σε >5% των περιπτώσεων στη μελέτη του δικτύου TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) [Knowles & Hurst, 2015]

Πίνακας 3. Υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια που εμφανίζουν απώλεια λειτουργίας στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Γονίδιο	Αλλοίωση στον χαμηλού βαθμού σταδίου Τα καρκίνο της ουροδόχου κύστης	Συχνότητ α	Αλλοίωση στο μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (≥T2)	Συχνότητα	Λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται
RUNX3	Υπερμεθυλίωση υποκινητή Απενεργοποιητική μεταλλαγή	65% 1-2%	Υπερμεθυλίωση υποκινητή Απενεργοποιητική μεταλλαγή	85% 1-2%	Μεταγραφικός παράγοντας επικράτειας Runt
ARID1A*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	25%	Συστατικό του συμπλόκου αναδόμησης χρωματίνης SWI/SNF
TXNIP*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	7%	Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη θειορεδοξίνη Ρυθμιστής οξειδοαναγωγής
ELF3*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	8%	Μεταγραφικός παράγοντας επικράτειας ETS

					Εμπλέκεται στην ουροθηλιακή
					διαφοροποίηση
NFE2L2*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	8%	Μεταγραφικός παράγοντας Ρύθμιση αντιοξειδωτικού προγράμματος
CTNNB1	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	~2%	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	~2%	Σύμπλοκο ενώσεων προσκόλλησης Αγκυροβόληση κυτταροσκελετού ακτίνης Συστατικό του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT
FBXW7*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	10%	Πρωτεΐνη της οικογένειας F-box Ουβικιτινυλίωση πρωτεϊνών
PIK3R1	Μεταλλαγή	5%	Μεταλλαγή	5%	Ρυθμιστική υπομονάδα της ΡΙ3Κ (p85)
APC	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	2-4%	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	9-16%	Ανταγωνιστής της σηματοδότησης μέσω WNT και άλλες λειτουργίες
CDKN1A*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	14%	p21 Αναστολέας κυκλινο- εξαρτώμενων κινασών
CDKN2A	Ημίζυγη έλλειψη Ομόζυγη έλλειψη Μεθυλίωση υποκινητή Μεταλλαγή	50-60% 15% Αντι- κρουόμενα δεδομένα NI	Ημίζυγη έλλειψη Ομόζυγη έλλειψη Μεθυλίωση υποκινητή Μεταλλαγή	50-60% 20-30% Αντι- κρουόμενα δεδομένα 5%	Κωδικοποιεί για την p16 και την p14 ^{ARF} Αναστολέας κυκλινο- εξαρτώμενων κινασών
PTCH1	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	7%	Υποδοχέας της Sonic hedgehog
TSC1	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	11-16%	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	11-16%	Αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης μέσω mTORC1 σε

					σύμπλοκο με την TSC2
PTEN	Ημίζυγη έλλειψη Ομόζυγη έλλειψη	6-8% 0%	Ημίζυγη έλλειψη Ομόζυγη έλλειψη	25-58% 4-6%	Φωσφατάση πρωτεϊνών και λιπιδίων Αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης μέσω ΑΚΤ
ATM*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	14%	Κινάση σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου
MLL2*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	27%	Μεθυλο- τρανσφεράση ιστονών
MDM2	Επέκταση	3%	Επέκταση	4-5%	Ε3 λιγάση ουβικιτίνης που στοχεύει την p53
RB1	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	11-13%	Αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου Σταθερότητα ετεροχρωματίνης Ογκοκατασταλτικό γονίδιο
KLF5*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	8%	Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας που προσομοιάζει στον Krüppel
TSC2	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	2%	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	2%	Αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης μέσω mTORC1 σε σύμπλοκο με την TSC1
<i>TP53</i>	Απενεργοποιητική μεταλλαγή Αυξημένη έκφραση	0-14% ≤10%	Απενεργοποιητική μεταλλαγή Αυξημένη έκφραση	24-56% 30-50%	Μεταγραφικός παράγοντας Κυτταρικός κύκλος και απόκριση στο στρες Επάγει απόπτωση
ERCC2*	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	12%	Λειτουργίες στην επιδιόρθωση μέσω εκτομής νουκλεοτιδίων

<i>EP300</i>	NI	NI	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	15%	Ακετυλο- τρανσφεράση ιστονών Μεταγραφικός συνενεργοποιητής
KDM6A*	NA	NA	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	24%	Απομεθυλάση ιστονών
STAG2	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	32-36	Απενεργοποιητική μεταλλαγή	9-13%	Σύμπλοκο κοχεσίνης Επιδιόρθωση DNA Μεταγραφικός έλεγχος

NI (no information): καμία πληροφορία, NA (not applicable): μη εφαρμόσιμο. *Γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί ως σημαντικά μεταλλαγμένα σε >5% των περιπτώσεων στη μελέτη του δικτύου TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) [Knowles & Hurst, 2015]

Η συγκεντρωτική ανάλυση των μεταλλαγών καθώς και των μεταβολών αριθμού αντιγράφων (copy number alterations, CNA) αποκάλυψε τρία κύρια μονοπάτια που απορρυθμίζονται συχνότερα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης τα οποία αφορούν τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (μεταβολή στο 93% των περιπτώσεων), τη σηματοδότηση μέσω PI3K (72%) και την αναδόμηση της χρωματίνης που περιλαμβάνει τις τροποποιήσεις των ιστονών (89%) και το σύμπλοκο αναδόμησης των νουκλεοσωμάτων SWI/SNF (64%) [Εικόνα 5]. Περίπου οι μισοί ασθενείς έφεραν μεταλλαγές στο TP53 (49%), οι οποίες ήταν αμοιβαίως αποκλειόμενες με την επέκταση (9%) και την υπερέκφραση (29%) του MDM2, συνεπώς το μονοπάτι της p53 ήταν απενεργοποιημένος στο 76% των δειγμάτων. Οι μεταλλαγές στο RB ήταν απενεργοποιητικές και αμοιβαίως αποκλειόμενες με τις ελλείψεις στο CDKN2A. Όσον αφορά τις μεταλλαγές στο FGFR3 (12%) βρέθηκαν σε γνωστές θέσεις ενεργοποίησης κινάσης, ενώ οι μεταλλαγές στο PIK3CA (20%) συγκεντρώνονταν κοντά στο «θερμό σημείο» Ε545. Μεταξύ των επιγενετικών ρυθμιστών, συχνότερες ήταν οι μεταλλαγές στα γονίδια MLL2, ARID1A, KDM6A και EP300, πολλές από τις οποίες δημιουργούσαν κομμένες μορφές (truncating mutations). Αξιοσημείωτα, οι μεταλλαγές σε γονίδια που ρυθμίζουν τη χρωματίνη είναι πιο συχνές στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης σε σχέση με όλους τους τύπους καρκίνου, γεγονός που ανοίγει νέες θεραπευτικές οδούς. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν συχνές ενεργοποιητικές συντήξεις FGFR3-TACC3 καθώς και έκφραση ή ενσωμάτωση αρκετών ιών, συμπεριλαμβανομένου του HPV16, που σχετίζονται με απενεργοποίηση γονιδίων.



Εικόνα 5: Συγκεντρωτική απεικόνιση των γενετικών αλλοιώσεων που εμφανίζονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Μεταλλαγές (αριστερά) και μεταβολές αριθμού αντιγράφων (δεξιά) σε συστατικά των μονοπατιών p53/Rb, RTK/RAS/PI3K, στο σύστημα των τροποποιήσεων ιστονών και στο σύμπλοκο SWI/SNF. Οι ενεργοποιητικές γενετικές αλλοιώσεις εμφανίζονται με κόκκινο, ενώ οι απενεργοποιητικές με μπλε. Τα ποσοστά που αναγράφονται υποδεικνύουν ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση σε τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο γονίδιο (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετά συχνές (32%) είναι και οι αλλοιώσεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην ένωση και το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων (STAG2, ESPL1) [Guo et al., 2013]. Απενεργοποιητικές μεταλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA και με τον έλεγχο των βλαβών του DNA, όπως για παράδειγμα στα ERCC2, ATM, FANCA,

είναι συχνές στο μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ο οποίος χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμικές αλλοιώσεις.

1.5. Μοριακοί υπότυποι του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Με βάση τόσο ιστοπαθολογικά όσο και μοριακά χαρακτηριστικά έχουν προταθεί δύο κύρια μονοπάτια παθογένεσης για τους όγκους της ουροδόχου κύστης. Οι χαμηλού βαθμού θηλώδεις όγκοι προέρχονται από απλή υπερπλασία και δυσπλασία και χαρακτηρίζονται σε μοριακό επίπεδο από απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH) του χρωμοσώματος 9 και ενεργοποιητικές μεταλλαγές στα γονίδια FGFR3, PIK3CA και STAG2. Αυτοί οι μη διηθητικοί όγκοι υποτροπιάζουν συχνά αλλά είναι γενετικά σταθεροί. Από την άλλη, ο διηθητικός καρκίνος θεωρείται ότι προκύπτει από επίπεδη δυσπλασία και καρκίνωμα *in situ* (carcinoma *in situ*, CIS) και χαρακτηρίζεται από απενεργοποιητικές μεταλλαγές στο FGFR3. Οι διηθητικοί όγκοι είναι γενετικά ασταθείς και συγκεντρώνουν πολλές γενετικές αλλοιώσεις (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Παθογενετικά μονοπάτια που οδηγούν στις διάφορες ομάδες όγκων της ουροδόχου κύστης. Τα δύο κύρια μονοπάτια με διακριτά ιστοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά που έχουν αναγνωριστεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες απεικονίζονται με μπλε και καφέ. Αναγράφονται τα ποσοστά τους κατά τη διάγνωση καθώς και σημαντικές κοινές γενετικές αλλοιώσεις. Τα διακεκομμένα βέλη υποδεικνύουν υποθετικά μονοπάτια (Knowles & Hurst, 2015).
Πιο πρόσφατες μελέτες του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης όγκων ουροδόχου κύστης αποκάλυψαν την ετερογένεια στην κλινική συμπεριφορά και την ύπαρξη περισσότερων μοριακών τύπων πέρα από τους δύο κλασικούς, οι οποίοι ξεπερνούν την κατηγοριοποίηση σε στάδια και βαθμούς.

Ανάλυση της έκφρασης του mRNA σε όγκους όλων των σταδίων και των βαθμών ταυτοποίησε πέντε υποτύπους: UroA, UroB, γονιδιωματικά ασταθείς (genomically unstable, GU), προσομοιάζοντες σε πλακώδες καρκίνωμα (squamous cell carcinoma-like, SCCL) και όγκους με υψηλή διείσδυση μη καρκινικών κυττάρων ("infiltrated") [Sjödahl et al., 2012]. Οι UroA και UroB εκφράζουν FGFR3, CCND1 και TP63, οι GU εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα ERBB2 και Ε-καδερίνη και οι SCCL εκφράζουν EGFR, P-καδερίνη, KRT5, KRT6, KRT14 και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κερατινοποίηση. Οι UroA όγκοι εμφανίζουν τη χειρότερη πρόγνωση, οι GU και οι "infiltrated" μέτρια, ενώ οι SCCL και οι UroB παρουσιάζουν τη χειρότερη πρόγνωση. Οι όγκοι της ομάδας SCCL παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τους όγκους βασικού τύπου του μαστού. Παρόλο που οι όγκοι UroB φέρουν μεταλλαγές στο TP53 και πολλοί είναι μυοδιηθητικοί, εμφανίζουν επιθηλιακά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλαγών στο FGFR3, γεγονός το οποίο υποδεικνύει πιθανώς εξέλιξη από τους όγκους της ομάδας UroA.

Στη συνέχεια, μία άλλη ομάδα ταξινόμησε τους μυοδιηθητικούς όγκους υψηλού βαθμού της ουροδόχου κύστης σε όγκους από βασικά κύτταρα (basal) και όγκους από κύτταρα του αυλού (luminal), οι οποίοι παρουσιάζουν ομοιότητες με τους αντίστοιχους υποτύπους του καρκίνου του μαστού και εκφράζουν τις κερατίνες και τους επιφανειακούς δείκτες που χαρακτηρίζουν τα κύτταρα των αντίστοιχων στιβάδων (Damrauer et al., 2014). Επόμενη μελέτη πρότεινε την κατηγοριοποίηση των ουροθηλιακών όγκων σε αυτές τις δύο ομάδες και επιπλέον μία τρίτη, η οποία χαρακτηρίζει επίσης όγκους από κύτταρα του αυλού κι επίσης φέρει μία γονιδιακή υπογραφή ενεργοποιημένης p53 φυσικού τύπου, χαμηλά επίπεδα δεικτών πολλαπλασιασμού και κυτταρικού κύκλου και εμπλουτισμό σε δείκτες μυοϊνοβλαστών και δείκτες εξωκυττάριας μήτρας που πιθανά υποδεικνύει διείσδυση στρώματος και ινοβλαστών (p53-like) [Choi et al., 2014]. Αυτός ο τύπος παρουσιάζει ομοιότητες με τον "infiltrated" τύπο όγκων που προαναφέρθηκε. Τέλος, το δίκτυο TCGA χώρισε τους μυοδιηθητικούς όγκους σε 4 ομάδες (Cluster I-IV) με βάση το μοριακό τους προφίλ όπως αυτό προέκυψε από την ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Ο τύπος Ι (προσομοιάζων σε θηλωματώδη) αποτελείται από όγκους με θηλωματώδη μορφολογία, μεταλλαγές στο *FGFR3*, κέρδος αριθμού αντιγράφου και υψηλή έκφραση του FGFR3. Οι όγκοι της ομάδας ΙΙ, όπως και αυτοί της ομάδας Ι, εκφράζουν υψηλά επίπεδα ERBB2 και φέρουν γονιδιακή υπογραφή σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων β (estrogen receptor β, ESR2). Οι όγκοι της ομάδας ΙΙΙ (βασικοί/προσομοιάζοντες σε πλακώδεις) εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τους όγκους του μαστού βασικού τύπου και με τα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου και πνεύμονα. Εκφράζουν χαρακτηριστικά γονίδια της επιθηλιακής γενεαλογίας, όπως τα KRT14, KRT5, KRT6A και EGFR. Από την άλλη, οι όγκοι των ομάδων Ι και ΙΙ προσομοιάζουν τους όγκους του μαστού τύπου και εκφράζουν δείκτες διαφοροποίησης όπως οι GATA3 και FOXA1, καθώς και επιθηλιακούς δείκτες, όπως η Ε-καδερίνη. Οι όγκοι της ομάδας ΙV προσομοιάζουν στους όγκους της ομάδας ΙΙΙ με τη διαφορά ότι έχουν χαμηλή έκφραση FGFR3 και ενδιάμεση έκφραση επιθηλιακών γονιδίων. Σε κάθε περίπτωση, οι όγκοι βασικού τύπου ήταν αυτοί που είχαν τη χειρότερη πρόγνωση (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Κατηγοριοποίηση των όγκων της ουροδόχου κύστης σε μοριακούς υποτύπους με βάση τέσσερις μελέτες του προφίλ έκφρασης mRNA: a) Sjödahl et al., 2012, b) Damrauer et al., 2014, c) Cancer Genome Atlas Research Network, 2014, d) Choi et al., 2014. Οι θερμικοί χάρτες δείχνουν τα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που χαρακτηρίζουν τον μοριακό υποτύπο κάθε μελέτης (μπλε: χαμηλή έκφραση, σκούρο κόκκινο: υψηλή έκφραση, ανοιχτό κόκκινο: ενδιάμεση έκφραση, ετερογενής έκφραση ή έκφραση σε ορισμένες μόνο στιβάδες του ουροθηλίου). Τα γκρι πλαίσια υποδεικνύουν παρουσία μεταλλαγής, μεταβολής αριθμού αντιγράφου ή ιστολογικού χαρακτηριστικού. Επίσης, αναγράφονται πληροφορίες σχετικά με μεταλλαγές, μεταβολές αριθμού αντιγράφων, ιστολογικά χαρακτηριστικά, πρόγνωση και απόκριση στη θεραπεία. DSS (disease-specific survival): ειδική της νόσου επιβίωση, MI (muscle-invasive): μυοδιηθητικός, NAC (neoadjuvant chemotherapy): προεγχειρητική χημειοθεραπεία, OS (overall survival): συνολική επιβίωση.

1.6. Κύτταρα προέλευσης όγκων της ουροδόχου κύστης

Σε μία πρόσφατη μελέτη, περιγράφηκε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός υποπληθυσμού κυττάρων από τα οποία ξεκινούν οι όγκοι (tumor-initiating cells, T-ICs) από πρωτογενείς ανθρώπινους καρκίνους της ουροδόχου κύστης (Chan et al., 2009). Πρόκειται για τα Lin⁻CD44⁺CK5⁺CK20⁻ κύτταρα, τα οποία εκφράζουν δείκτες παρόμοιους με αυτούς των φυσιολογικών κυττάρων της βασικής στιβάδας της ουροδόχου κύστης. Επιπλέον, δείχτηκε ότι τα T-ICs από διαφορετικούς ασθενείς εμφανίζουν ετερογένεια ως προς τα ενεργοποιημένα ογκογενετικά μονοπάτια. Τέλος, υποστηρίχθηκε ότι η πρωτεΐνη CD47, η οποία παρέχει ανασταλτικό σήμα για τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα, παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα T-ICs σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κύτταρα του όγκου.

Έπειτα, μία άλλη ερευνητική ομάδα ταυτοποίησε ένα ιδιαίτερα ογκογενετικό κυτταρικό υποσύνολο του ουροθηλίου, το οποίο προσομοιάζει στα καλοήθη ουροθηλιακά βλαστικά κύτταρα (κύτταρα της βασικής στιβάδας), εκφράζει τον υποδοχέα της λαμινίνης των 67 kDa και την ειδική για τη βασική στιβάδα CK17, ενώ από αυτό απουσιάζει το CEA-CAM6 (CD66c) μέλος της οικογένειας καρκινοεμβρυϊκών αντιγόνων (He et al., 2009). Αυτός ο υποπληθυσμός εδράζεται στη διεπιφάνεια όγκου-στρώματος και διαθέτει τις ιδιότητες σχηματισμού όγκου του πατρικού ξενομοσχεύματος. Επιπλέον, τα εν λόγω κύτταρα είναι εμπλουτισμένα σε συστατικά των μονοπατιών που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου, όπως τα Notch (Dll1, Manic Fringe), Wnt, mTOR, Jak-STAT και EGFR.

Πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα ενδιάμεσα κύτταρα είναι τα κύτταρα από τα οποία ξεκινούν οι θηλώδεις όγκοι, ενώ από τα CK5⁺ κύτταρα της βασικής στιβάδας ξεκινούν τα καρκινώματα *in situ*, τα ουροθηλιακά καρκινώματα και τα πλακώδη καρκινώματα της ουροδόχου κύστης σε ένα μοντέλο χημικής καρκινογένεσης σε ποντίκια (van Batavia et al., 2014). Χρησιμοποιώντας το ίδιο μοντέλο, μία άλλη ομάδα φανέρωσε ότι το CIS καθώς και το μυοδιηθητικό καρκίνωμα ξεκινά αποκλειστικά από Shh⁺ βλαστικά κύτταρα της βασικής στιβάδας (Shin et al., 2014). Παρόλο που τα Shh⁺ κύτταρα αποτελούν τα κύτταρα προέλευσης των όγκων, η έκφραση της Shh χάνεται στον όγκο που προκύπτει. Τέλος, δεδομένα του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα CK14⁺ κύτταρα αποτελούν τα κύτταρα από τα οποία προέρχεται όλο το φάσμα των όγκων που παρατηρούνται σε αυτό το μοντέλο χημικής καρκινογένεσης σε ποντίκια (Papafotiou et al., 2016). Ο σημαντικός ρόλος των CK14⁺ κυττάρων στην καρκινογένεση υπογραμμίζεται από μελέτη που δείχνει ότι τα εφησυχασμένα CK14⁺ καρκινικά βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και εποικίζουν τον υπολειπόμενο όγκο ως απόκριση στην κυτταροτοζική χημειοθεραπεία και συνεπώς είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη θεραπεία (Kurtova et al., 2015).

2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ NOTCH ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

2.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί ένα εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι που είναι παρόν σε όλα τα Μετάζωα και παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και την ομοιόσταση των ιστών. Ειδικότερα, ρυθμίζει αποφάσεις κυτταρικής τύχης μέσω κυτταρικής επαφής επηρεάζοντας θετικά ή αρνητικά και με τρόπο που εξαρτάται από το περιβάλλον κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Συνεπώς, η δυσλειτουργία ή η απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων διαταραχών, από αναπτυξιακά σύνδρομα μέχρι καρκίνο.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch περιλαμβάνει μία ακολουθία πρωτεολυτικών γεγονότων, τα οποία υφίστανται αυστηρή ρύθμιση. Αρχικά, ο νεοσυντεθιμένος υποδοχέας (Notch1-4 για τα θηλαστικά) γλυκοζυλιώνεται, έτσι ώστε να καταστεί πλήρως λειτουργικός, και

πρωτεολύεται στη θέση 1 (site 1, S1) από κονβερτάσες τύπου φουρίνης (furin-like convertases) με αποτέλεσμα την παρουσίασή του στην επιφάνεια του κυττάρου ως ετεροδιμερές που συγκρατείται από μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Η αλληλεπίδραση με τον προσδέτη (Delta-like1, Delta-like3, Delta-like4, Jagged1, Jagged2) που βρίσκεται στην επιφάνεια γειτονικού κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του ετεροδιμερούς λόγω ενδοκυττάρωσης του εξωκυτταρικού τμήματός του από το κύτταρο που στέλνει το σήμα. Με αυτό τον τρόπο, παρέχεται η μηχανική δύναμη που χρειάζεται για την επαγωγή στερεοδιαταξικής αλλαγής που επιτρέπει την πρωτεόλυση στην S2 από μεταλλοπρωτεάσες ADAM. Στη συνέχεια, η γ-σεκρετάση πρωτεολύει τον υποδοχέα Notch προοδευτικά στην S3 και την S4 απελευθερώνοντας το ενδοκυτταρικό τμήμα του (Notch Intracellular Domain, NICD) και τα πεπτίδια Νβ.

Έπειτα, το NICD μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με τη DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη CBF1 (CSL/RBPjk) και το μεταγραφικό ενεργοποιητή MAML1 (Mastermind-like) με αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του Notch. Τα γονίδια-στόχοι του μονοπατιού Notch παίζουν ρόλο στη μεταγραφική καταστολή (*HES1*, *HEY1*), σε ογκογενετικά μονοπάτια (*NF*-κ*B*, *MYC*), στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (*CCND1/3*, *CDKN1A*), την αναστολή της απόπτωσης (*BCL2*) και την κυτταρική μετανάστευση/μετάσταση (*CCR7*). Η δέσμευση του Notch στο DNA αποτελεί μία γρήγορη και δυναμική διαδικασία που ρυθμίζεται από την κινάση CDK8 και την λιγάση ουβικιτίνης Fbxw7 και ακολουθείται από φωσφορυλίωση, ουβικιτινυλίωση και αποικοδόμηση του Notch από το πρωτεάσωμα με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του μονοπατιού (Kopan & Ilagan, 2009) [**Εικόνα 8**].



Εικόνα 8: Επισκόπηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (Kopan & Ilagan, 2009).

2.2. Υποδοχείς Notch

2.2.1. Δομή των υποδοχέων Notch

Οι υποδοχείς Notch είναι μεγάλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου Ι, που διαπερνούν μία φορά την κυτταρική μεμβράνη. Μεταδίδουν σήματα έπειτα από τη δέσμευση διαμεμβρανικών προσδετών που βρίσκονται στην επιφάνεια παρακείμενων κυττάρων, συνεπώς η σηματοδότηση μέσω Notch βασίζεται στην κυτταρική επαφή. Η εξελικτική απόκλιση μεταξύ ασπόνδυλων και σπονδυλωτών συνοδεύτηκε από τουλάχιστον δύο γύρους γονιδιακού διπλασιασμού, καθώς οι μύγες διαθέτουν έναν υποδοχέα Notch, οι σκώληκες δύο (GLP-1 και LIN-12), που δρουν πλεονασματικά, και τα θηλαστικά τέσσερις (NOTCH1-4), που εμφανίζουν τόσο πλεονασματικές όσο και μοναδικές λειτουργίες.

Κατ' αρχάς, οι υποδοχείς Notch αποτελούνται από αυτοτελείς δομικές επικράτειες (domains), οι οποίες επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες. Το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων Notch περιλαμβάνει επαναλήψεις τύπου EGF (Epidermal Growth Factor: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας), 36 για τους Notch1 και 2, 34 για τον Notch3 και 29 για τον Notch4. Η παραγωγική αλληλεπίδραση με έναν προσδέτη στην επιφάνεια γειτονικού κυττάρου (transαλληλεπιδράσεις) διαμεσολαβείται από τις επαναλήψεις 11 και 12, ενώ η ανασταλτική αλληλεπίδραση με προσδέτη που συνεκφράζεται στο ίδιο κύτταρο (cis-αλληλεπιδράσεις) πραγματοποιείται μέσω των επαναλήψεων 24-29 (de Celis & Bray, 2000). Πολλές επαναλήψεις τύπου EGF προσδένουν ασβέστιο, γεγονός που παίζει ρόλο στον καθορισμό της δομής και της συγγένειας του Notch με τους προσδέτες του. Ακολουθεί μία περιοχή αρνητικής ρύθμισης, η NRR (Negative Regulation Region), που αποτελείται από τρεις περιογές LNR (cysteine-rich Lin12-Notch repeats) και μία επικράτεια ετεροδιμερισμού (Heterodimerization Domain, HD). Ο ρόλος της περιοχής NRR είναι κρίσιμος, καθώς εμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα απουσία προσδέτη. Οι περισσότερες επιφανειακές πρωτεΐνες Notch έχουν διαχωριστεί στη θέση S1, η οποία βρίσκεται μέσα σε ένα βρόχο που στερείται δομής και προεξέχει από την υποπεριοχή HD, από κονβερτάσες τύπου φουρίνης κι έτσι το πολυπεπτίδιο Notch μετατρέπεται στο ετεροδιμερές NECD-NTMIC (Notch Extracellular Domain-Notch Transmembrane and Intracellular Domain), το οποίο συγκρατείται από μη ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ του αμινο- και του καρβοξυτελικού μισού της HD.

Σειρά έχει η διαμεμβρανική επικράτεια (Transmembrane Domain, TMD), η οποία τελειώνει σε ένα σήμα τερματισμού της μετατόπισης ("stop translocation"), που αποτελείται από 3-4 κατάλοιπα αργινίνης/λυσίνης. Το ενδοκυτταρικό τμήμα ξεκινά με την περιοχή RAM (RBPjk Association Module), η οποία σχηματίζει μία υψηλής συγγένειας υπομονάδα πρόσδεσης από 12-20 αμινοξέα γύρω από ένα συντηρημένο μοτίβο WxP (Lubman et al., 2007). Η περιοχή RAM ενώνεται με έναν επιμήκη, χωρίς δομή συνδέτη που περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) με επτά επαναλήψεις αγκυρίνης (επικράτεια ANK). Ακολουθεί ένα ακόμη NLS και η επικράτεια *trans*-ενεργοποίησης (Transactivation Domain, TAD). Τέλος, στο καρβοζυτελικό άκρο εδράζεται μία επικράτεια PEST), η οποία ρυθμίζει τη σταθερότητα του NICD, καθώς περιλαμβάνει αμινοξικά μοτίβα που αποτελούν σημεία έναρξης της αποικοδόμησης (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των αυτοτελών δομικών επικρατειών του υποδοχέα Notch της Drosophila (dNotch), καθώς και των ομόλογων υποδοχέων Notch1-4 των θηλαστικών (mNotch1-4). Για τους υποδοχείς Notch1 και Notch2 απεικονίζεται το συναινετικό πρότυπο φουκοζυλίωσης από την O-Fut και γλυκοζυλίωσης από τη Rumi. Οι κοινές θέσεις για τους δύο υποδοχείς χρωματίζονται με πράσινο, ενώ οι μοναδικές θέσεις φουκοζυλίωσης φαίνονται με γαλάζιο και οι μοναδικές θέσεις γλυκοζυλίωσης με ροζ (Kopan & Ilagan, 2009).

2.2.2. Μηχανισμός ενεργοποίησης του υποδοχέα

Το σημείο-κλειδί στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος μέσω Notch είναι η πρωτεόλυση στη θέση S2 που επάγεται από τον προσδέτη και διαμεσολαβείται από μεταλλοπρωτεάση. Η δομή της περιοχής NRR αντιπροσωπεύει την απενεργοποιημένη κατάσταση του υποδοχέα και επιβεβαιώνει ότι η αυτο-αναστολή είναι ενδογενές χαρακτηριστικό των μορίων Notch. Όταν σημειακές μεταλλαγές ή ιϊκή ενσωμάτωση διασπούν την NRR, πραγματοποιείται ανεξέλεγκτη σηματοδότηση προκαλώντας T-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (T-acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) στους ανθρώπους και λεμφώματα στα ποντίκια.

Ο μηχανισμός που κρατάει το μονοπάτι Notch σε ανενεργή κατάσταση απουσία προσδέτη φαίνεται να είναι συντηρημένος. Σύμφωνα με το μοντέλο αλλαγής στερεοδιάταξης, η μηχανική τάση που προκαλείται από την *trans*-ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από το κύτταρο που λαμβάνει

το σήμα ακυρώνει την NRR, εκθέτοντας έτσι την S2 για πρωτεόλυση. Δεδομένου ότι τα μόρια Notch που είναι κατειλημμένα από προσδέτη έχουν ήδη κοπεί στην S1 είτε στην πορεία προς τη μεμβράνη είτε κατά τη διάρκεια ανακύκλωσης του υποδοχέα, η μηχανική δύναμη που δημιουργείται κατά την *trans*-ενδοκυττάρωση απλώς διευκολύνει το διαχωρισμό του ετεροδιμερούς NECD/NTMIC και την επακόλουθη έκθεση της θέσης S2.

Η αποκάλυψη της δομής της περιοχής NRR σε υψηλή ανάλυση (Gordon et al., 2007) παρείχε τις μοριακές λεπτομέρειες και αποτέλεσε τη βάση για το προτεινόμενο μοντέλο: η επικράτεια HD σχηματίζει μία σφαιρική πτυχωτή περιοχή η οποία δημιουργεί εκτεταμένες επαφές με τις τρεις υπομονάδες LNR που προσδένουν ασβέστιο (LNR-A, LNR-B και LNR-C). Η θέση S1 βρίσκεται μέσα σε ένα βρόγο χωρίς δομή που δε συνεισφέρει στη σταθερότητα της επικράτειας HD. Αντίθετα, η S2 εδράζεται σε μία β-αλυσίδα βυθισμένη μέσα σε μία απρόσιτη θήκη. Έτσι, παρεμποδίζεται η πρόωρη πρωτεόλυση του υποδοχέα απουσία προσδέτη από τη μία λόγω της άμεσης στερεοταξικής παρεμπόδισης (από το συνδέτη LNR-AB) και από την άλλη λόγω της σταθεροποίησης της σφαιρικής επικράτειας (μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της LNR-B και της έλικας HD-C). Συνεπώς, οι περιοχές LNR-A, LNR-B, καθώς και ο συνδέτης LNR-AB πρέπει και οι τρεις να απομακρυνθούν για την παραγωγή μορίων με συνεχή σηματοδοτική δράση. Δεδομένου ότι το ενεργό κέντρο της ADAM17/TACE βρίσκεται σε βαθιά θήκη (Maskos et al., 1998), εικάζεται πως για την ενεργοποίηση του υποδοχέα όχι μόνο χρειάζεται η ισχυρή ανύψωση τουλάχιστον δύο εκ των τριών επαναλήψεων LNR, αλλά επίσης είναι απαραίτητη η απεμπλοκή της σταθεροποιητικής έλικας στην περιοχή HD από την αλυσίδα που περιέχει την S2 -πιθανόν μέσω μερικού ξετυλίγματος της έλικας- για να επιτραπεί η πρόσβαση στον εύκοπτο δεσμό στη θέση S2. Η γήλωση ιόντων ασβεστίου πιθανόν ξετυλίγει και τις επαναλήψεις LNR πέρα από την επικράτεια HD υποδεικνύοντας ότι η ανύψωση θα μπορούσε συγγρόνως να επάγει τον πλήρη διαχωρισμό του υποδοχέα (Εικόνα 10).

Συνεπώς, η NRR αποτελεί μία δυναμική δομική περιοχή, που εναλλάσσεται μεταξύ μιας κλειστής και μίας ανοιχτής κατάστασης και κάποιες μεταλλαγές που προκαλούν καρκίνο μετατοπίζουν την ισορροπία προς την ανοιχτή. Ο σχεδιασμός αγωνιστικών και ανταγωνιστικών αντισωμάτων που προσδένονται σε επιτόπους στην NRR του Notch3 και δρουν είτε ως αγωνιστές είτε ως ανταγωνιστές (Li et al., 2008) άνοιξε το δρόμο για το χειρισμό του μονοπατιού χρησιμοποιώντας την πρωτεόλυση στην S2 ως διακόπτη προσφέροντας έτσο μία εναλλακτική προσέγγιση πέρα από τους αναστολείς της γ-σεκρετάσης (Gamma-Secretase Inhibitors, GSI).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της αρνητικής ρυθμιστικής περιοχής του ανθρώπινου υποδοχέα Notch2 σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική της ανάλυση. Η NRR διπλώνει έτσι ώστε να προστατεύσει τη θέση πρωτεόλυσης S2, η οποία βρίσκεται σε μία θήκη που περιβάλλεται από την περιοχή LNR-A, την έλικα HD-C και το συνδέτη LNR-A/B. Η δέσμευση ιόντων Ca²⁺ από τις επαναλήψεις LNR οδηγεί σε διαχωρισμό του υποδοχέα και ενεργοποίηση της σηματοδότησης (Kopan & Ilagan, 2009).

2.3. Προσδέτες Notch

2.3.1. Δομή των προσδετών Notch

Οι κανονικοί προσδέτες που ενεργοποιούν τους υποδοχείς Notch είναι ενιαίες επιφανειακές πρωτεΐνες και κατά συνέπεια η σηματοδότηση μέσω Notch εξαρτάται από την άμεση κυτταρική επαφή. Η επαγωγή του μονοπατιού Notch πραγματοποιείται, στις περισσότερες περιπτώσεις, από προσδέτες οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας περιοχής DSL (Delta, Serrate και Lag2). Οι προσδέτες DSL των θηλαστικών ταξινομούνται ως προσομοιάζοντες στον Delta (Delta-like) [Dll1, Dll3, Dll4] και ως προσομοιάζοντες στον Serrate (Jagged1, Jagged2) με βάση την ομολογία τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς της *Drosophila*.

Οι προσδέτες DSL είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου Ι και μοιράζονται κοινή αρθρωτή διάταξη στο εξωκυτταρικό τμήμα τους: η αμινοτελική περιοχή (NT) ακολουθείται από την περιοχή DSL και από πολλαπλές επαναλήψεις EGF. Η συντηρημένη περιοχή NT υποδιαιρείται στην N1, η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνη, και στην N2, η οποία δεν περιέχει κυστεΐνη (Parks et al., 2006). Στην περιοχή N2 έχει ταυτοποιηθεί ένα συντηρημένο μοτίβο πρόσδεσης γλυκοσφιγγολιπιδίων (GBM) το οποίο ίσως ρυθμίζει τη σύνδεση του προσδέτη στη μεμβράνη και την ενδοκυττάρωσή του (Hamel et al., 2010). Ακολουθεί η περιοχή DSL που αποτελεί μία εκφυλισμένη επανάληψη EGF η οποία είναι αναγκαία αλλά όχι και επαρκής για τις αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα Notch (Shimizu et al., 1999). Στη συνέχεια, το συντηρημένο μοτίβο DOS (Delta και OSM-11-like) εντοπίζεται μέσα στις δύο πρώτες επαναλήψεις EGF και συνεργάζεται με την περιοχή DSL για την πρόσδεση του Notch και τη σηματοδότηση (Komatsu et al., 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν χαρτογραφηθεί μεταλλαγές τόσο στην περιοχή DSL όσο και την DOS του Jagged1, οι οποίες προκαλούν το σύνδρομο Alagille (Warthen et al., 2006). Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι Dll3 και Dll4 δε διαθέτουν το μοτίβο DOS και έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch από προσδέτες που φέρουν μόνο την περιοχή DSL απαιτεί συνεργατική πρόσδεση μη κανονικών προσδετών που περιέχουν την περιοχή DOS. Επιπρόσθετα, οι προσδέτες Jagged περιέχουν μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη στο τέλος του εξωκυτταρικού τμήματός τους (**Εικόνα 11**).

Τα ενδοκυτταρικά τμήματα (ICD) των προσδετών DSL παρουσιάζουν πολύ χαμηλά επίπεδα ομολογίας στην ακολουθία τους (Pintar et al., 2007). Με εξαίρεση τον Dll3, περιέχουν πολλαπλά κατάλοιπα λυσίνης τα οποία αποτελούν πιθανά σημεία τροποποίησης από E3 λιγάσες ουβικιτίνης. Η ουβικιτινυλίωση των προσδετών ρυθμίζει τα επίπεδά τους στην κυτταρική επιφάνεια και είναι απαραίτητη για τη σηματοδοτική δράση τους. Από πλήθος στοιχείων προκύπτει ότι η ουβικιτινυλίωση δεν είναι απαραίτητη για την ενδοκυττάρωση του προσδέτη, αλλά για να τον κατευθύνει σε ένα ειδικό μονοπάτι ανακύκλωσης όπου θα αποκτήσει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα. Τέλος, οι προσδέτες Dll1, Dll4 και Jagged1 περιέχουν ένα καρβοξυτελικό μοτίβο PDZ, το οποίο προωθεί τις αλληλεπιδράσεις με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Αυτό το μοτίβο είναι απαραίτητο για την κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση και τον ογκογόνο μετασχηματισμό.

Κλείνοντας, να σημειωθεί ότι ο Dll3 αποτελεί τον πιο αποκλίνοντα δομικά προσδέτη DSL, καθώς περιέχει μία εκφυλισμένη περιοχή DSL και στερείται τόσο το μοτίβο DOS όσο και τα κατάλοιπα λυσίνης στο ICD. Επιπλέον, δεν προσδένεται στον υποδοχέα Notch *in trans* ούτε τον ενεργοποιεί και το μεγαλύτερο μέρος του βρίσκεται στο σύστημα Golgi, ενώ η έκφρασή του στην κυτταρική επιφάνεια είναι πολύ μικρή (Ladi et al., 2005). Συνεπώς, ο Dll3 λειτουργεί αποκλειστικά ως ανταγωνιστής της σηματοδότησης μέσω Notch.



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των προσδετών Serrate και Delta της *Drosophila* (dSerrate, dDelta), καθώς και των ομόλογων προσδετών Delta-like1, 3 και 4 και Jagged1 και 2 αντίστοιχα των θηλαστικών (mJagged1, 2, mDll1, 3, 4). Οι προσδέτες Jagged1, Jagged2 και Dll1 διαθέτουν τις περιοχές DSL και DOS, ενώ οι Dll3 και Dll4 φέρουν μόνο την περιοχή DSL. Επίσης, απεικονίζονται οι θέσεις πρωτεόλυσης S2 και S3 από ADAM μεταλλοπρωτεάσες και τη γ-σεκρετάση αντίστοιχα (Kopan & Ilagan, 2009).

2.4. Ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch μέσω πρωτεόλυσης

2.4.1. Πρωτεολυτική ρύθμιση της δράσης του υποδοχέα

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch διαμεσολαβείται από μία σειρά πρωτεολυτικών γεγονότων. Αρχικά, η αλληλεπίδραση με τον προσδέτη οδηγεί στην πρωτεόλυση του Notch από μεταλλοπρωτεάσες ADAM στη θέση 2 (S2), η οποία βρίσκεται 12 αμινοξέα πριν την TMD και είναι βαθιά θαμμένη μέσα στην NRR. Δεν είναι ξεκάθαρο ποιο ένζυμο καταλύει την αντίδραση, καθώς από τη μία μόνο η ADAM17/TACE έχει την ικανότητα να πρωτεολύει υποστρώματα Notch *in vitro* (Brou et al., 2000), αλλά από την άλλη τα ποντίκια με γονότυπο TACE^{-/-} δεν εμφανίζουν Notch φαινότυπο (Peschon et al., 1998). Αντίθετα, η Kuzbanian/ADAM10/Sup-17 είναι απαραίτητη για τη δράση του Notch σε όλα τα φύλα (Hartmann et al., 2002).

Η απώλεια του εξωκυτταρικού τμήματος του Notch δημιουργεί ένα ενδιάμεσο, προσδεδεμένο στη μεμβράνη (Notch Extracellular Truncation, NEXT), το οποίο αποτελεί υπόστρωμα της γ-σεκρετάσης, ενός πολυσύνθετου μέλους της οικογένειας των I-CLiPs (Intramembrane Cleaving Proteases). Η γ-σεκρετάση πρωτεολύει το NEXT προοδευτικά μέσα στην TMD, ξεκινώντας κοντά στο εσώτερο φύλλο στην S3 και καταλήγοντας στη μέση του TMD στην S4. Έτσι, το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch είναι ελεύθερο να μετακινηθεί στον πυρήνα, όπου αρχικά αλληλεπιδρά με τη DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη CBF1 μέσω της RAM περιοχής του. Στη συνέχεια, η επικράτεια ANK σχετίζεται με τη CBF1 και βοηθάει στη στρατολόγηση του συνενεργοποιητή MAML1. Τέλος, η MAML1 προσελκύει το σύμπλεγμα του μεσολαβητή MED8 επάγοντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων.

2.4.2. Το σύμπλεγμα της γ-σεκρετάσης

Το σύμπλεγμα της γ-σεκρετάσης αποτελείται από τέσσερις μεμβρανικές πρωτεΐνες σε στοιχειομετρία 1:1:1:1. Η καταλυτική της υπομονάδα, η Psen (Presenilin), και οι τρεις συμπαράγοντες, Ncstn (Nicastrin), Pen-2 (Presenilin enhancer-2) και Aph-1 (Anterior pharynx defective homolog-1), είναι αναγκαίες και επαρκείς για τη σύσταση της ενζυμικής ενεργότητας. Οι Psen1 και 2 αποτελούνται από εννέα διαμεμβρανικά τμήματα και η καταλυτική περιοχή τους περιλαμβάνει δύο συντηρημένα κατάλοιπα ασπαρτικού που βρίσκονται στα TM6 και TM7. Η Nestn είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι, 130 kDa, με μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή, η οποία περιέχει το συντηρημένο μοτίβο DYIGS. Ενώ αρχικά είχε προταθεί ότι η Nestn παίζει ρόλο στην αναγνώριση του υποστρώματος, πλέον θεωρείται ότι είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση και τη σταθεροποίηση του ενζυμικού συμπλόκου (Zhao et al., 2010). Τέλος, η Aph-1 διαθέτει επτά διαμεμβρανικά τμήματα και δρα ως ικρίωμα για το σύμπλοκο, ενώ η Pen-2 δύο και παίζει ρόλο στην ενδοπρωτεόλυση και την επακόλουθη ενεργοποίηση και σταθεροποίηση της Psen στο σύμπλεγμα (Εικόνα 12). Τα ποντίκια από τα οποία έχει εξαλειφθεί η Ncstn, η Aph-1 ή η Psen1 και η Psen2 συγγρόνως παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο με το ζώο από το οποίο απουσιάζει ο υποδογέας Notch. Γενικά, η εξάλειψη οποιασδήποτε από τις τέσσερις πρωτεΐνες είτε με RNAi είτε γενετικά έχει ως αποτέλεσμα την αστάθεια και την απουσία ωρίμανσης των άλλων μελών και τελικά την απώλεια της λειτουργίας της γ-σεκρετάσης. Καθώς υπάρχουν δύο πρωτεΐνες Psen και δύο Aph (τρεις στα ποντίκια), στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά συμπλέγματα, τα οποία μπορεί να έχουν διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες και να παίρνουν μέρος σε διαφορετικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Shirotani et al., 2007). Έτσι, προστίθεται ένα ακόμη επίπεδο ρύθμισης στη σηματοδότηση μέσω Notch που αφορά την ενδομεμβρανική πρωτεόλυση.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας των υπομονάδων του συμπλέγματος της γ-σεκρετάσης στη μεμβράνη. Οι αστερίσκοι στο αμινοτελικό άκρο της Nestn (Net) αντιπροσωπεύουν το σύνθετο πρότυπο γλυκοζυλίωσης της ώριμης μορφής της, ενώ με ψαλίδι υποδεικνύεται η θέση ενδοπρωτεόλυσης της Psen (Jorissen & De Strooper, 2010).

Η γ-σεκρετάση πρωτεολύει τα υποστρώματά της σε πολλαπλές ενδομεμβρανικές θέσεις βήμα-βήμα. Παρόλο που όλες οι συνδεδεμένες στη μεμβράνη μορφές του Notch μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη γ-σεκρετάση στο εκκριτικό μονοπάτι, μόνο τα μόρια με ελεύθερο αμινοτελικό άκρο μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματά της. Έτσι, το μήκος της εξωκυτταρικής περιοχής είναι κρίσιμο για την αποτελεσματικότητα της πρωτεόλυσης, με τα πιο επιμήκη μόρια να κόβονται λιγότερο αποτελεσματικά. Η αρχική τομή στην S3 απελευθερώνει το NICD, ενώ η τελευταία τομή στην S4 απελευθερώνει το πεπτίδιο Nβ. Λόγω του ότι η θέση πρωτεόλυσης S3 στο Notch είναι ετερογενής, in vivo συναντώνται διάφορες ισομορφές του NICD με διαφορετικά αμινοτελικά άκρα (NICD-V, NICD-L, NICD-S), ωστόσο τα δύο τελευταία αποικοδομούνται ταχύτατα στο κύτταρο από το 26S πρωτεάσωμα, με αποτέλεσμα να καθίστανται ιδιαιτέρως βραχύβια in cellulo. Έτσι, η κυρίαρχη μορφή NICD, η οποία ασκεί το μεγαλύτερο μέρος της δράσης του Notch1 λόγω της σταθερότητάς της, είναι αυτή που ξεκινά από τη Val1744 (Εικόνα 13). Φαίνεται ότι τα ασταθή NICD παράγονται κυρίως στα ενδοσώματα, ενώ τα σταθερά στην κυτταρική επιφάνεια (Tagami et al., 2008). Αυτή η παρατήρηση εγείρει την πιθανότητα η σηματοδότηση μέσω Notch να ρυθμίζεται και σε αυτό το επίπεδο συνδέοντας τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεολυτικής διαδικασίας με τη διάρκεια του σήματος.



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών θέσεων πρωτεόλυσης S3 και S4 από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης που παράγει διάφορες ισομορφές του NICD και πεπτιδίων Nβ (Kopan & Ilagan, 2009).

2.4.3. Πρωτεολυτική ρύθμιση της δράσης του προσδέτη

Εκτός από τους υποδοχείς Notch, και οι προσδέτες DSL υφίστανται πρωτεόλυση από τις ADAMs και τη γ-σεκρετάση, ωστόσο αυτή μπορεί είτε να ενεργοποιήσει είτε να αναστείλει τη σηματοδότηση μέσω Notch. Η αποκοπή του εξωκυτταρικού τμήματος του προσδέτη από την ADAM έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνσή του από την κυτταρική επιφάνεια. Αυτό το μη μεμβρανοσυνδεδεμένο τμήμα δρα ανταγωνιστικά στις *trans*-αλληλεπιδράσεις με τον Notch, καθώς μπορεί να προσδεθεί στον υποδοχέα, αλλά είναι ανίκανο να τον ενεργοποιήσει (Shimizu et al., 2002). Σημειώνεται ότι οι ανασυνδυασμένοι διαλυτοί προσδέτες μπορούν να επάγουν βιολογικές αποκρίσεις μόνο αν είναι προ-ομαδοποιημένοι ή ακινητοποιημένοι. Από την άλλη μεριά, η πρωτεόλυση του προσδέτη μειώνει τις *cis*-αλληλεπιδράσεις, αυξάνοντας τους διαθέσιμους υποδοχείς για ενεργοποίηση. Συνολικά, η πρωτεόλυση του προσδέτη αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης της σηματοδοτικής πολικότητας, αλλά και της έντασης και της διάρκειας της σηματοδότησης μέσω Notch.

Όσον αφορά το μεμβρανοσυνδεδεμένο τμήμα του προσδέτη (TMICD), αυτό υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία από τη γ-σεκρετάση στα κύτταρα των θηλαστικών. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το απελευθερωμένο ICD του προσδέτη μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τη μεταγραφή (La Voie et al., 2003), ωστόσο υπάρχουν πολλές ενστάσεις και το θέμα αυτό δεν έχει διαλευκανθεί ακόμη.

2.5. Μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch

2.5.1. Μεταγραφική ρύθμιση μέσω CBF1

Έπειτα από την απελευθέρωσή του μέσω της γ-σεκρετάσης, το NICD μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου είναι ανίκανο να προσδεθεί στο DNA από μόνο του, ωστόσο επάγει τη μεταγραφή με τη βοήθεια της πρωτεΐνης CBF1. Αυτή κατευθύνει το NICD σε συγκεκριμένους στόχους, η αναγνώριση των οποίων είναι ανεξάρτητη από το Notch (Kovall, 2007). Το σύμπλεγμα NICD/CBF1 επηρεάζει επιπρόσθετα τα πυρηνικά γεγονότα μέσω του ανταγωνισμού με άλλους παράγοντες για το συνενεργοποιητή MAML1. Το περιβάλλον στον πυρήνα πριν την άφιξη του NICD υπαγορεύει ποιοι στόχοι είναι διαθέσιμοι στη CBF1 και, κατά συνέπεια, ενεργοποιούνται από το Notch.

Η δυνατότητα της CBF1 να δρα ως ενεργοποιητής ή καταστολέας της μεταγραφής εξαρτάται από το αν προσδένονται σε αυτήν μεταγραφικοί συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς αντίστοιγα. Στα κύτταρα των θηλαστικών, η CBF1 δρα ως καταστολέας και η ενεργοποιημένη μορφή του Notch την μετατρέπει σε ενεργοποιητή της μεταγραφής. Η πρόσδεση του NICD και των συγκαταστολέων στη CBF1 είναι αμοιβαίως αποκλειόμενη και κατά συνέπεια η σχέση τους είναι ανταγωνιστική. Στον πυρήνα, η CBF1 μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με πολλούς ευρέως διαδεδομένους συγκαταστολείς, όπως οι CIR, FLH1C/KyoT2 και NCoR/SMRT, ωστόσο ο κρίσιμος καταστολέας είναι ο SHARP/MINT/SPEN (Oswald et al., 2005). Οι συγκαταστολείς συνδέουν τη CBF1 με αποακετυλάσες ιστονών, κρατώντας έτσι ανενεργά τα γονίδια-στόχους του Notch. Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές η CBF1 ανιγνεύεται συνεγώς στον υποκινητή του HES1 απουσία του NICD (Fryer et al., 2004). Στο δέρμα, ο φαινότυπος της απώλειας του γονιδίου CBF1 δεν είναι τόσο σοβαρός όσο ο φαινότυπος της απώλειας των Notch υποδοχέων ή της γ-σεκρετάσης, γεγονός που συνηγορεί στην ιδέα της αποκαταστολής των στόγων του Notch σε ζώα CBF1^{-/-} (Demehri et al., 2008). Ωστόσο, η απομάκρυνση του CBF1 από ποντίκια που φέρουν μεταλλαγές στο Notch ή την πρεσενιλίνη δε βελτιώνει το φαινότυπό τους, υποδεικνύοντας ότι στο δέρμα η αποκαταστολή των στόχων δεν παίζει σημαντικό ρόλο και το Notch δρα με τρόπο ανεξάρτητο από τη CBF1.

Ενώ σύμφωνα με την κλασική θεωρία, η CBF1 είναι συνεχώς προσδεδεμένη στο DNA στον πυρήνα των κυττάρων, όπου λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή μεταξύ συγκαταστολέων και

NICD, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ένα πιο δυναμικό μοντέλο. Σύμφωνα με αυτό, υπάρχει ισορροπία μεταξύ προσδεδεμένων και ελεύθερων κατασταλτικών συμπλεγμάτων CBF1 και η πρόσδεση του NICD μπορεί να γίνει ακόμη και σε ελεύθερα συμπλέγματα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch αυξάνεται η κατάληψη των υποκινητών-στόχων από τη CBF1. Συνεπώς, η ανταλλαγή αφορά διαφορετικά σύμπλοκα CBF1, κατασταλτικά ή ενεργοποιητικά, και επιπρόσθετοι μηχανισμοί συνεργατικής πρόσδεσης απαιτούνται για τη στρατολόγηση και τη σταθεροποίησή τους στο DNA (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Κλασικό και δυναμικό μοντέλο της μεταγραφικής ενεργοποίησης που επάγεται από το NICD και διαμεσολαβείται από τη DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη CBF1 και το μεταγραφικό συνενεργοποιητή MAML1 (Bray & Bernard, 2010).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τη σηματοδότηση που εξαρτάται από την CBF1 (κανονικό μονοπάτι), υπάρχει και η μη κανονική σηματοδότηση η οποία μπορεί να περιλαμβάνει ενεργοποίηση ανεξάρτητη από προσδέτες DSL, αλληλεπιδράσεις με μη DSL σηματοδότηση

ανεξάρτητη από την CBF1, μεταγωγή σήματος χωρίς πρωτεόλυση, διαφοροποιημένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και ανταγωνισμό ή προστασία ως προς κάποιο συμπαράγοντα.

2.5.2. Μεταγραφική ενεργοποίηση και επιλογή υποκινητή-στόχου

Ασχέτως αν λαμβάνει χώρα ενεργή καταστολή ή όχι, η πρόσδεση του NICD στη CBF1 μετατοπίζει το μεταγραφικό διακόπτη στην ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου. Σημειώνεται ότι η αλληλεπίδραση του NICD με τη CBF1 επάγει μία ασθενή μεταγραφική ενεργοποίηση και χρειάζεται έναν επιπρόσθετο ιστοειδικό μεταγραφικό ενεργοποιητή, όπως τις πρωτεΐνες bHLH ή τον GATA, για να διαμεσολαβήσει την ισχυρή γονιδιακή έκφραση των στόχων. Το σύμπλοκο ενεργοποίησης σχηματίζεται βήμα-βήμα: η υψηλής συγγένειας πρόσδεση της περιοχής RAM στη CBF1 αυξάνει την τοπική συγκέντρωση της επικράτειας ANK, επιτρέποντάς της έτσι να προσδεθεί στη CBF1 και να προωθήσει την αποδέσμευση των μεταγραφικών καταστολέων. Στη συνέχεια, η διεπιφάνεια ANK/CBF1 αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη MAML και αυτό το τριμερές σύμπλεγμα στρατολογεί ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών, παράγοντες αναδόμησης της χρωματίνης και το σύμπλεγμα του μεσολαβητή για να συγκροτήσουν ένα ενεργό σύμπλοκο μεταγραφής στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch.

Στους υποκινητές που διαθέτουν περιοχές κεφαλή με κεφαλή (Su(H) paired sites, SPS) με ευνοϊκό διάστημα παρατηρείται συνεργατική πρόσδεση *in vitro*, η οποία διαμεσολαβείται από αλληλεπιδράσεις ANK/ANK μεταξύ δύο συμπλεγμάτων CBF1/RAM-ANK/MAM (Nam et al., 2007) [**Εικόνα 15**]. Αξιοσημείωτα, τα αμινοξέα που παίρνουν μέρος σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι συντηρημένα και στους τέσσερις υποδοχείς Notch εγείροντας την υπόθεση ότι οι ετεροτυπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών παράλογων Notch εκλεπτύνουν τη ρύθμιση της μεταγραφής από αυτούς τους υποδοχείς. Επιπλέον, πολλοί χαρακτηρισμένοι ενισχυτές που είναι ευαίσθητοι στο Notch είναι συνδυαστικοί. Δηλαδή, η ιστοειδική έκφραση στόχων ρυθμίζεται από την ικανότητα διαφορετικών παράλογων Notch να αλληλεπιδρούν με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που είναι προσδεδεμένοι σε γειτονικούς ενισχυτές. Ωστόσο, ο πολυμερισμός των περιοχών πρόσδεσης της CBF1 αρκεί για να προκαλέσει εξαρτώμενη από Notch ενεργοποίηση *in vivo* σε κάποιες περιοχές όπου η σηματοδότηση μέσω Notch είναι ενεργή. Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πολλά γονίδια που περιέχουν SPS στους υποκινητές τους δεν αποκρίνονται στη σηματοδότηση μέσω Notch και ακόμη και το *Hes1*, το αρχετυπικό γονίδιο-στόχος του Notch που περιέχει SPS, δεν αποκρίνεται πάντα στο Notch1.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της συνεργατικής συγκρότησης δύο τριμερών συμπλεγμάτων CBF1-NICD-MAML1 σε περιοχή SPS στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου *Hes1* (Kovall & Blacklow, 2010).

Το εάν ένα γονίδιο-στόχος θα αποκριθεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch εξαρτάται από τον ιστό ή τον κυτταρικό τύπο και η ειδικότητα αυτή οφείλεται στη συνδυαστική ρύθμιση από ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των ειδικών για το συγκεκριμένο περιβάλλον παραγόντων αφορούν την άμεση επαφή με τη CBF1 ή το NICD ώστε να σταθεροποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις στον ενισχυτή, την επαφή με ενδιάμεσους στόχους, όπως τη βασική μεταγραφική μηχανή, επιτρέποντας μεγαλύτερη ποικιλία στις θέσεις σχηματισμού των συμπλόκων CBF1, και τη στρατολόγηση συμπαραγόντων που τροποποιούν τη χρωματίνη και επιτρέπουν την πρόσβαση στο NICD/CBF1 μέσω αλλαγής της δομής της χρωματίνης (Bray & Bernard 2010) [**Εικόνα 16**].



2.6. Ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω Notch

2.6.1. Ενδοκυττάρωση, διακίνηση και εντοπισμός των υποδοχέων και των προσδετών του μονοπατιού Notch

αναδόμησης

της

γρωματίνης

και

Παρόλο που κάθε μόριο Notch σηματοδοτεί μόνο μία φορά γωρίς ενίσχυση από καταρράκτη δεύτερων μηνυμάτων, η σηματοδότηση μέσω Notch είναι ιδιαίτερα σθεναρή στους περισσότερους ιστούς. Δεδομένου ότι κάθε μόριο Notch υφίσταται πρωτεόλυση για να παράγει σήμα, η ρύθμιση της διαθεσιμότητας του υποδοχέα και του προσδέτη στην κυτταρική επιφάνεια παίζουν ρόλο-κλειδί στον έλεγγο της ενεργοποίησης μέσω Notch. Ένας τρόπος ρύθμισης της διαθεσιμότητας είναι ο περιορισμός της έκφρασης υποδοχέα και προσδέτη χρονικά και χωρικά και πράγματι διαφορετικοί υποδοχείς και προσδέτες μπορούν να έχουν επικαλυπτόμενα ή και διακριτά πρότυπα έκφρασης κατά την ανάπτυξη και επίσης ελέγχονται από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Επιπλέον, η ρύθμιση της διακίνησης και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αποτελούν σημαντικούς μηχανισμούς ελέγχου της διαθεσιμότητας του υποδοχέα και του προσδέτη και της παραγωγικής μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.

Κατ' αρχάς, αρκετές Ε3 λιγάσες ουβικιτίνης, όπως για παράδειγμα η Deltex και η Nedd4, ελέγχουν τη διακίνηση του υποδοχέα είτε προς λυσοσωμική αποικοδόμηση είτε προς ανακύκλωση επηρεάζοντας έτσι την ημιζωή του (Le Borgne et al., 2005). Επιπλέον, η πρωτεΐνη Numb, σε συνεργασία με την α-adaptin και τη NAK (AP2- ή Numb-associated kinase), προωθεί την αποικοδόμηση του Notch στα θυγατρικά κύτταρα ενός ασύμμετρα διαιρούμενου κυττάρου. Όμως, η Numb δεν είναι ενεργή κατά την πλευρική σηματοδότηση μέσω Notch που λαμβάνει χώρα μεταξύ δύο κυττάρων σε εφησυχασμό. Ο περιορισμός στα διαιρούμενα κύτταρα αντανακλά την παρουσία ενός συνεργατικού παράγοντα που είναι παγιδευμένος στο σύστημα Golgi, της πρωτεΐνης ABCD3 (Zhou et al., 2007). Έτσι, ενώ ο φυσικός διαχωρισμός αποτρέπει την αλληλεπίδραση Numb-ABCD3 με αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται το Notch στα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση εφησυχασμού, ο θρυμματισμός του Golgi κατά τη μίτωση επιτρέπει το σχηματισμό αυτών των συμπλεγμάτων.

Πέρα από τη ρύθμιση της ωρίμανσης του υποδοχέα και των επιπέδων του στην κυτταρική επιφάνεια, η ενδοσωμική διαλογή παίζει σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της ακατάλληλης, ανεξάρτητης από προσδέτη ενεργοποίησης του υποδοχέα Notch. Η δυσλειτουργία του συστήματος αυτού μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση του Notch σε όψιμα ενδοσωμικά κυστίδια, η οποία επιτρέπει την εκτοπική ενεργοποίηση μέσω πρωτεόλυσης από τη γ-σεκρετάση, ή τον εντοπισμό του Notch σε ένα διαμέρισμα όπου η πρωτεόλυση μπορεί να συμβεί πιο εύκολα (π.χ. λόγω μετάπτωσης της NRR σε ανοιχτή διαμόρφωση σε χαμηλότερο pH). Συμπερασματικά, η ενδοσωμική διαλογή εξασφαλίζει ότι η ενεργοποίηση θα λάβει χώρα πάνω ή δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη.

Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι ο ολιγομερισμός παίζει ρόλο στην αποτελεσματική πρόσδεση υποδοχέα-προσδέτη, όπως για παράδειγμα η ικανότητά τους να σχηματίζουν ομοδιμερή μέσω των επαναλήψεων τύπου EGF, η συσσώρευση υποδοχέων Notch στην κυτταρική επιφάνεια στα σημεία επαφής με κύτταρα που εκφράζουν προσδέτη και η προϋπόθεση να είναι ομαδοποιημένοι οι διαλυτοί προσδέτες για να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Ο ολιγομερισμός των υποδοχέων και των προσδετών μπορεί να ενισχύει την πρόσδεση και αυτό ίσως εξηγεί τις ισχυρές δυνάμεις προσκόλλησης μεταξύ κυττάρων που εκφράζουν Delta-like και κυττάρων που εκφράζουν Notch.

2.6.2. Αναστολή της σηματοδότησης μέσω Notch από τους κανονικούς προσδέτες

Οι υποδοχείς Notch και οι προσδέτες DSL εκφράζονται ευρέως κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και, σε πολλές περιπτώσεις, τα κύτταρα που αλληλεπιδρούν εκφράζουν και τους δύο συγχρόνως. Όμως, τα κύτταρα υιοθετούν διαφορετική τύχη, διότι η σηματοδότηση μέσω Notch ενεργοποιείται μόνο στο ένα από τα δύο αλληλεπιδρώντα κύτταρα. Έτσι, τα σχετικά επίπεδα υποδοχέων και προσδετών εγκαθιδρύουν την πολικότητα της σηματοδότησης και υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση έτσι ώστε το κύτταρο που στέλνει το σήμα να διατηρεί υψηλή επιφανειακή έκφραση προσδετών, ενώ το κύτταρο που δέχεται το σήμα να διατηρεί υψηλή επιφανειακή έκφραση υποδοχέων. Στην πραγματικότητα, οι αναπτυξιακές διαδικασίες είναι ευαίσθητες στη γονιδιακή δόση των υποδοχέων Notch και των προσδετών τους, υπογραμμίζοντας τη σημασία των επιπέδων της έκφρασής τους για τη φυσιολογική ανάπτυξη (Εικόνα 17).

Lateral signalling



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της πλευρικής σηματοδότησης κατά την οποία δύο ισοδύναμα κύτταρα που αρχικά εκφράζουν ίσες ποσότητες υποδοχέα (Ν) και προσδέτη (L), σταδιακά εκφράζουν μόνο τον ένα από τους δύο. Το κύτταρο που εκφράζει Notch λαμβάνει σήματα ενεργοποίησης από το γειτονικό κύτταρο που εκφράζει τον προσδέτη με αποτέλεσμα αυτά τα δύο κύτταρα να αποκτήσουν διαφορετική κυτταρική τύχη (A ή B) [Radtke & Raj, 2003]. Εκτός από τις trans-αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα και αυτών που φέρουν τον προσδέτη, οι οποίες ενεργοποιούν τη σηματοδότηση, οι cisαλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη στο ίδιο κύτταρο έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησης. Αυτή η διαδικασία αποτελεί σημαντικό μηχανισμό για την εγκαθίδρυση και τη διατήρηση της σηματοδοτικής πολικότητας που είναι απαραίτητη για τον καθορισμό συγκεκριμένης κυτταρικής τύχης που εξαρτάται από το μονοπάτι Notch. Ενώ η transαλληλεπίδραση επάγει στερεοδιαταξικές αλλαγές που διευκολύνουν την πρωτεολυτική ενεργοποίηση που απαιτείται για τη σηματοδότηση, οι *cis*-αλληλεπιδράσεις την παρεμποδίζουν (Fiuza et al., 2010) [**Εικόνα 18**].



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση των *trans*-αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποδοχέα Notch και του προσδέτη στην επιφάνεια ενός γειτονικού κυττάρου που οδηγούν στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης (αριστερά) και των *cis*-αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη που βρίσκονται στο ίδιο κύτταρο έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της (δεξιά) [D'Souza et al., 2010].

2.7. Ο ρόλος του μονοπατιού Notch στον καρκίνο

2.7.1. Το μονοπάτι Notch μπορεί να δρα είτε ογκογενετικά είτε ογκοκατασταλτικά σε διάφορους τύπους καρκίνου

Ο καρκίνος μπορεί να θεωρηθεί ως μια ασθένεια δυσλειτουργικής κυτταρικής σηματοδότησης. Όπως είναι αναμενόμενο, λοιπόν, πολλά αναπτυξιακά μονοπάτια-κλειδιά που εμπλέκονται στην κυτταρική επικοινωνία και την ενδοκυτταρική σηματοδότηση, όπως τα Wnt, Notch, TGF-β, Hedgehog, συνδέονται ποικιλοτρόπως με ογκογενετικές διαδικασίες. Συνεπώς, η συνδυαστική δράση διάφορων απορρυθμισμένων μονοπατιών που συγκροτούν ένα σηματοδοτικό δίκτυο μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφορετικών όγκων σε διαφορετικές ανατομικές περιοχές. Δεδομένου ότι η απορρύθμιση αντανακλά μία μορφή προϋπάρχοντος φυσιολογικού ελέγχου που εκφράζει τις ιδιαιτερότητές της σε ιστούς συγκεκριμένης γενεαλογίας, το υπόβαθρο του ιστού είναι κάτι που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψιν. Ειδικότερα, στους ιστούς στους οποίους προωθεί την ογκογένεση, ο φυσιολογικός ρόλος του Νοtch αφορά την αυτο-ανανέωση και την επιβίωση των βλαστικών/προγονικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη ή την ομοιόσταση. Αντιθέτως, σε ορισμένους ιστούς, η ενεργοποίηση του Νotch επάγει την τελική διαφοροποίηση και συνεπώς ασκεί ογκοκατασταλτική δράση. Αξιοσημείωτα, το μονοπάτι Notch χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στη δόση, καθώς τόσο η υπο- όσο και η υπερενεργοποιημένη σηματοδότηση μπορεί να έχει επιβλαβή αποτελέσματα (Mazzone et al., 2010).

Το ογκογενετικό δυναμικό των μεταλλαγών σε συστατικά του μονοπατιού Notch πρωτοπαρατηρήθηκε στην ανθρώπινη T-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL), όπου μία σπάνια μετατόπιση t(7;9) σχηματίζει μία συνεχώς ενεργή, κομμένη μορφή του υποδοχέα Notch1 *in vivo*, η οποία προκαλεί τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T-λεμφοειδών προγονικών κυττάρων (Ellisen et al., 1991). Σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτή η χρωμοσωμική μετατόπιση εντοπίζεται σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις T-ALL (<1%), ωστόσο περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς φέρουν μεταλλαγές που αφορούν τις επικράτειες HD ή PEST με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch1 (Weng et al., 2004). Ενώ είναι πλέον γνωστό ότι η σηματοδότηση μέσω Notch μπορεί να έχει ογκογενετική ή ογκοκατασταλτική δράση ανάλογα με τον ιστό στον οποίο ενεργοποιείται, πρόσφατα δείχθηκε ότι μπορεί να εξασκεί διττό ρόλο ακόμη και μέσα στον ίδιο ιστό. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν μεταλλαγές που απενεργοποιούν το μονοπάτι Notch σε μία μερίδα ασθενών με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Myelomonocytic Leukemia, CMML) [Klinakis et al., 2011]. Η απενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω Notch σε HSCs ποντικιού είχε ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική συσσώρευση προγονικών κοκκιοκυττάρων/ μονοκυττάρων, την εξωμυελική αιμοποίηση και την επαγωγή μιας ασθένειας παρόμοιας με τη CMML.

Τα πρώτα στοιχεία που απέδειξαν την αιτιακή σχέση μεταξύ της δυσλειτουργίας στη σηματοδότηση μέσω Notch και της ανάπτυξης συμπαγών όγκων προέκυψαν από την παρατήρηση ότι η ενσωμάτωση του ιού που προκαλεί όγκους στους μαστούς του ποντικιού (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV) στο γονίδιο *Notch4* οδηγεί στο σχηματισμό όγκων στο μαστό (Gallahan et al., 1987). Η έκφραση μίας κομμένης, επικρατούς ενεργούς μορφής του N4ICD υπό τον έλεγχο μαστοειδικών ρυθμιστικών στοιχείων, είτε των μακρών τελικών επαναλήψεων του MMTV είτε της πρωτεΐνης του γάλακτος WAP, έδειξε ότι η ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω Notch οδηγεί στο σχηματισμό όγκων ποντικιών (Gallahan et al., 1987). Το γονίδιο *Νοτο* του μαστό στο 100% των θηλυκών ποντικιών του μάσω Νοτο μαστό στο μαστό στο 100% των θηλυκών ποντικιών (Gallahan et al., 1996). Όσον αφορά το Notch1, η μεταλλαξιγένεσή του μέσω ενσωμάτωσης του MMTV επιτάχυνε την ανάπτυξη όγκων που επάγεται από το διαγονίδιο MMTV-ErbB2, ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης ήταν μικρότερη σε σύγκριση με τους όγκους που επάγονται από το N4ICD (Diévart et al., 1999).

Ο πρώτος ιστός στον οποίο περιγράφηκε ογκοκατασταλτικός ρόλος του μονοπατιού Notch ήταν το δέρμα. Συγκεκριμένα, δείχτηκε ότι η εξάλειψη του υποδοχέα Notch1 σε ποντίκια οδηγεί σε υπερπλασία της επιδερμίδας και του κερατινοειδούς χιτώνα που ακολουθείται από την ανάπτυξη όγκων στο δέρμα που προσομοιάζουν το ανθρώπινο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Nicolas et al., 2003). Αργότερα, ταυτοποιήθηκαν απενεργοποιητικές μεταλλαγές στους υποδοχείς Notch1 ή/και Notch2 σε ασθενείς με πλακώδη καρκινώματα δέρματος, πνεύμονα (Wang et al., 2011) και κεφαλής και τραχήλου (Agrawal et al., 2011, Stransky et al., 2011), υπογραμμίζοντας ότι το μονοπάτι Notch δεν δρα ογκοκατασταλτικά κατ' εξαίρεση αλλά ασκεί διττό ρόλο στην καρκινογένεση που εξαρτάται από το περιβάλλον (**Πίνακας 4**). **Πίνακας 4**: Ογκογενετικοί και ογκοκατασταλτικοί ρόλοι του μονοπατιού Notch σε ανθρώπινους καρκίνους (Ntziachristos et al., 2014a)

ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ/	% ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΚΑΙ
	ΟΙΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟ	AAAEZ HAPATHPHZEIZ
Ι-οζεια λεμφοβλαστικη λευχαιμία (T-ALL)	Ογκογονιδιο	50-60% <i>NOTCH1</i> , 30% <i>FBXW</i> /
		Ρόλος στην έναρξη και συντήρηση του καρκίνου
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL)	Ογκογονίδιο	5-12% <i>NOTCH1</i>
		Ρόλος στην έναρξη και την επιβίωση του καρκίνου
Μελάνωμα	Ογκογονίδιο	~50% υπερέκφραση του NOTCH1 σε ανθρώπινα δείγματα Πιθανός ρόλος στη μετάσταση
Χολαγγειοκαρκίνωμα (ССС)	Ογκογονίδιο	35% FBXW7
		Ο Notch1 προωθεί την έναρξη και τη συντήρηση του όγκου
Καρκίνος του παχέος εντέρου	Ογκογονίδιο	8-9% FBXW7
		Αλληλεπίδραση με τα μονοπάτια Wnt και Hippo
Αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα	Ογκογονίδιο	10% NOTCH1
		Ρόλος στην έναρξη και συντήρηση του όγκου (Notch1) και τη μετάσταση (Jagged2)
		Ειδικός ρόλος του Notch3 στην εξάπλωση του όγκου
Γλοιοβλά στ ωμα	Ογκογονίδιο	Ρόλος στην εξάπλωση του όγκου και τη ραδιοανθεκτικότητα
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα	Ογκογονίδιο	Ρόλος στην εξέλξη και τη συντήρηση του όγκου
Καρκίνος των ωοθηκών	Ογκογονίδιο	Ρόλος στη συντήρηση του όγκου και την απόκριση στη θεραπεία

Καρκίνος του προστάτη	Ογκογονίδιο	Συσχέτιση της ενεργοποίησης του μονοπατιού με την εξέλιξη,
		τη μετάσταση και την
		επανεμφάνιση του όγκου
Καρκίνος του μαστού	Κυρίως ογκογονίδιο	Συντήξεις του ΝΟΤCΗ1 και του ΝΟΤCH4
		Πιθανώς επικρατής αρνητική κομμένη μορφή από μεταλλαγή στο NOTCH2
		Άλλες αλλοιώσεις ενεργοποιούν το μονοπάτι Notch, ωστόσο η υπερενεργοποιημένη σηματοδότηση μέσω Notch μπορεί να αναστείλει την αύξηση του όγκου
Πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος (PDAC)	Κυρίως ογκογονίδιο	Η απώλεια του Notch2 αναστέλλει την εξέλιξη και τη συντήρηση του όγκου
Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	Κυρίως ογκογονίδιο	Ενεργοποίηση του μονοπατιού σε ανθρώπινους όγκους με δοσοεξαρτώμενα αποτελέσματα
		Πιθανός ρόλος στα κύτταρα προέλευσης του όγκου
Πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC)	Κυρίως ογκογονίδιο	Πιθανώς διτροπικό πρότυπο αλλοιώσεων στο μονοπάτι Notch με μικρό ποσοστό όγκων με απενεργοποιητικές μεταλλαγές στο NOTCH1 και μεγάλο ποσοστό όγκων με ενεργοποίηση του μονοπατιού
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)	Ογκογονίδιο και ογκοκατασταλτικό	Αποτελέσματα που εξαρτώνται από τις συνθήκες ίσως σχετίζονται με διάφορους μοριακούς υποτύπους
Μυελοβλάστωμα	Ογκογονίδιο και ογκοκατασταλτικό	Αντίθετοι ρόλοι των Notch1 και Notch2
Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (B-ALL)	Ογκοκατασταλτικό	Απουσία μεταλλαγών

	Ουκοκατασταλτικό	Ρόλος στη συντήρηση του όγκου (η ενεργοποίηση οδηγεί σε διακοπή της αύξησης και θάνατο)
Οζεια μυεκυεισης κευχαιμια	Ογκοκατασταλτικο	Οι Νοιεπτ και Νοιεπ2 εκφράζονται αλλά το μονοπάτι δεν είναι ενεργό
		Ρολος στην εναρζη και συντήρηση του όγκου
Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC)	Ογκοκατασταλτικό	25% σε διάφορα γονίδια του μονοπατιού
		Αναστολή της συντήρησης του όγκου (πιθανώς παρόμοιος ρόλος και σε άλλους νευροενδοκρινείς τύπους καρκίνου)
Πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (SqCC)	Ογκοκατασταλτικό	5-12,5% <i>NOTCH1</i> και <i>NOTCH2</i>
Πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος (SqCC)	Ογκοκατασταλτικό	60-75% <i>NOTCH1</i> και <i>NOTCH2</i>
Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML)	Ογκοκατασταλτικό	12% σε διάφορα γονίδια του μονοπατιού (NCSTN, APH1, MAML1 και NOTCH2) Ρόλος στην έναρξη του όγκου

2.7.2. Ο ρόλος του μονοπατιού Notch στους καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος

Παρόλο που ο ρόλος του μονοπατιού Notch έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας σε πολλούς τύπους καρκίνου, ελάχιστα είναι γνωστά για το ρόλο του στους καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος. Ωστόσο, κάποια πρώτα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η σηματοδότηση μέσω Notch εμπλέκεται στην ογκογένεση στον προστάτη, την ουροδόχο κύστη και το νεφρό. Η ανάλυση πρωτογενών όγκων προστάτη στο ενδοκυτταρικό επίπεδο υποδεικνύει ότι το μονοπάτι Notch παίζει τόσο ογκογενετικό όσο και ογκοκατασταλτικό ρόλο στο συγκεκριμένο ιστό (Leong et al., 2008). Αυτά τα φαινομενικά αντιφατικά ευρήματα πιθανόν αντανακλούν την ετερογένεια των προστατικών καρκίνων με το Notch να εμφανίζει διαφορετική δράση σε διαφορετικούς καρκινικούς κυτταρικούς τύπους σε διαφορετικά στάδια της εξέλιξης του όγκου.

Η σηματοδότηση μέσω Notch φαίνεται να παίζει ρόλο στα θηλώδη (pTa) και τα διηθητικά (pT1-pT3) ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης. Μία μελέτη υποστηρίζει ότι το Notch έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο, καθώς δείχνει μειωμένη έκφραση των υποδοχέων Notch 1-3 και των προσδετών Dll1 και Jagged1 σε δείγματα όγκων της ουροδόχου κύστης σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό (Shi et al., 2008). Επιπλέον, η έκφραση των πέντε αυτών γονιδίων είναι χαμηλότερη στους θηλώδεις όγκους από ό,τι στους διηθητικούς. Επίσης, το Notch στους θηλώδεις όγκους από ό,τι στους διηθητικούς. Επίσης, το Notch στους θηλώδεις όγκους από ό,τι στους διηθητικούς επίσης των οποίων βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, ο Notch1 και ο Jagged1 προτείνονται ως πιθανοί δείκτες των οποίων η χαμηλή έκφραση σχετίζεται με μικρότερη επιβίωση στο θηλώδες καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση του DLL4 στα ενδοθηλιακά κύτταρα συσχετίζεται με τη διαφοροποίηση των αγγείων στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και συνεπώς ο DLL4 αποτελεί ενθαρρυντικό θεραπευτικό στόχο για αντιαγγειογενετική θεραπεία (Patel et al., 2006).

Επιπλέον, ο Notch1 έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη νεφροκυτταρικού καρκινώματος (Renal Cell Carcinoma, RCC), το οποίο προέρχεται από τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια, η φυσιολογική ανάπτυξη των οποίων καθοδηγείται από το ίδιο μονοπάτι (Sjölund et al., 2008). Επίσης, το NOTCH3 παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στο RCC. Τέλος, η σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης φυσιολογικού και καρκινικού νεφρού έδειξε ότι το μονοπάτι Notch παίζει κάποιο ρόλο σε συνεργασία με άλλα γονίδια (Rae et al., 2000).

2.8. Θεραπευτικές προοπτικές στόχευσης του μονοπατιού Notch στον καρκίνο

Μέχρι σήμερα, καμία θεραπεία που να στοχεύει το μονοπάτι Notch δεν έχει εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA). Οι στρατηγικές παρέμβασης στη σηματοδότηση μέσω Notch για θεραπευτικούς σκοπούς που μελετώνται αφορούν α) ανασταλτικά αντισώματα ή μόρια-δολώματα έναντι συγκεκριμένων υποδοχέων ή προσδετών με σκοπό την παρεμπόδιση ειδικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη, β) ανασταλτικά ή ενεργοποιητικά αντισώματα που εμποδίζουν την πρωτεόλυση στη θέση S2 συγκεκριμένου υποδοχέα, γ) αναστολείς γ-σεκρετασών, που αποτρέπουν την πρωτεόλυση στην

S3 και συνεπώς την ενεργοποίηση όλων των υποδοχέων Notch και δ) πεπτιδίων που παρεμβαίνουν στο σχηματισμό λειτουργικών μεταγραφικών συμπλόκων NICD-MAML1 (Εικόνα 19).

Καθώς ο άξονας Notch1-Dll4 βρίσκεται καταρροϊκά της σηματοδότησης μέσω VEGF τόσο στη φυσιολογική όσο και στην παθολογική αγγειογένεση, η αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης αποτελεί στόχο για την αντιαγγειογενετική θεραπεία του καρκίνου. Για αυτό το σκοπό, έχουν παραχθεί μονοκλωνικά αντισώματα (Ridgway et al., 2006) και μόρια-δολώματα για τον υποδοχέα ή τον προσδέτη που παρεμποδίζουν ειδικά την αλληλεπίδραση Notch1-Dll4. Επίσης, έχουν αναπτυχθεί αντισώματα έναντι του Dll4 που προκαλούν μειωμένη έναρξη και ανάπτυξη όγκων (Hoey et al., 2009). Όσον αφορά τη δεύτερη προσέγγιση, έχουν παραχθεί αλλοστερικά αντισώματα—ενεργοποιητικά ή ανασταλτικά—τα οποία προσδένονται στην περιοχή NRR των Notch 1, 2 ή 3 (Li et al., 2008).

Ένα παράδειγμα της τρίτης στρατηγικής αποτελεί ο αναστολέας MK-0752, ο οποίος βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης Ι για τη θεραπεία της T-ALL και του προχωρημένου καρκίνου του μαστού. Η ειδικότητα, επιλεκτικότητα και στρατηγική δοσολογίας των αναστολέων γ-σεκρετασών βελτιώνονται σταδιακά, ωστόσο υπάρχουν παρενέργειες κυρίως λόγω της αναστολής της σηματοδότησης μέσω Notch σε άλλους ιστούς. Δεδομένης της διαφορικής δράσης διαφορετικών υποδοχέων ή προσδετών, η γενική αναστολή του μονοπατιού μέσω GSI εγείρει προβληματισμούς ως προς την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά της. Επιπρόσθετα, έχει συντεθεί ένα αμινοτελικό πεπτίδιο του ανθρώπινου MAML1 με δομή α-έλικας το οποίο δρα ως επικρατής αρνητικός αναστολέας της σηματοδότησης μέσω Notch, καθώς ανταγωνίζεται με το ενδογενές για την πρόσδεση στο NICD (Moellering et al., 2009). Ένα μειονέκτημα αυτής της στρατηγικής είναι ότι ορισμένες φορές η σηματοδότηση μέσω Notch λαμβάνει χώρα μέσω του μη κανονικού μονοπατιού το οποίο είναι ανεξάρτητο από τη CBF1.

Τελευταία, κερδίζουν έδαφος προσεγγίσεις όπως η συνδυαστική θεραπεία που στοχεύει το μονοπάτι Notch παράλληλα με κάποια άλλη σηματοδοτική οδό, καθώς με αυτό τον τρόπο η δόση του καθενός φαρμάκου μπορεί να είναι μικρότερη και άρα οι παρενέργειες μειωμένες και η επιγενετική θεραπεία, όπως για παράδειγμα η χρήση αναστολέων της απομεθυλίωσης της H3K27me3 στην T-ALL όπου έχει δειχθεί ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ της πρόσδεσης του NOTCH1 και της στρατολόγησης της PRC2 στους υποκινητές-στόχους (Ntziachristos et al., 2012). Τέλος, είναι απαραίτητο να εξερευνηθούν εξίσου στρατηγικές ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch σε όγκους όπου παίζει ογκοκατασταλτικό ρόλο, για παράδειγμα μέσω χορήγησης προσδετών, ενεργοποιητικών αντισωμάτων ή επιγενετικών ρυθμιστών σε περιπτώσεις απώλειας έκφρασης των υποδοχέων ή άλλων συστατικών του. Σε κάθε περίπτωση, το κλειδί για επιτυχημένη θεραπεία είναι η ειδικότητα, καθώς πρόκειται για ένα μονοπάτι με πλειοτροπικές και αντικρουόμενες δράσεις που αφορούν σχεδόν κάθε κυτταρικό τύπο του οργανισμού.



Εικόνα 19: Στρατηγικές παρέμβασης στη σηματοδότηση μέσω Notch για θεραπευτικούς σκοπούς (Koch & Radtke, 2010).

3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΡΕΤΙΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

3.1. Τα ρετινοειδή και ο μεταβολισμός τους

Τα ρετινοειδή αποτελούν μια οικογένεια σηματοδοτικών μορίων τα οποία σχετίζονται με τη βιταμίνη A (ρετινόλη) όσον αφορά τη χημική δομή τους. Συγκροτούνται από μια κυκλική τελική ομάδα (ένα β-ιονικό δακτύλιο), μία πολυενική πλευρική αλυσίδα και μια πολική τελική ομάδα. Τα ρετινοειδή ασκούν ευρύ φάσμα σημαντικών λειτουργιών σε κάθε κύτταρο και όργανο του οργανισμού, κυρίως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την ανοσολογική και νευρική λειτουργία, την όραση και τον καθορισμό του προτύπου σώματος κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης. Η έλλειψη βιταμίνης A προκαλεί διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως απώλεια όρασης, καθυστέρηση, μείωση του μήκους και αύξηση του πάχους των οστών, ατροφία των όρχεων, εμβρυϊκή απορρόφηση και ανοσοανεπάρκεια, ενώ το πλεόνασμά της μπορεί να προκαλέσει τερατογένεση.

Τα θηλαστικά δεν έχουν την ικανότητα σύνθεσης βιταμίνης Α. Αυτή απορροφάται από ζωϊκές πηγές τροφής ή/και προέρχεται από το β-καροτένιο, το οποίο βρίσκεται στα φυτά (Tang and Gudas, 2011). Στις ζωϊκές πηγές τροφής, η βιταμίνη Α ανευρίσκεται ως εστέρας, το παλμιτικό ρετινύλιο. Οι διατροφικοί ρετινυλικοί εστέρες υδρολύονται σε ρετινόλη στον αυλό του εντέρου από υδρολάσες ρετινυλικών εστέρων (retinyl ester hydrolases, REHs). Στο αίμα, η ρετινόλη προσδένεται στην προσδένουσα-ρετινόλη πρωτεΐνη του ορού (retinol-binding protein 4, RBP4) και εισάγεται στα κύτταρα μέσω ενός κυτταρικού μεμβρανικού υποδοχέα για την RBP4, τον STRA6 (Kawaguchi et al., 2007). Επιπρόσθετα, η ακυλοτρανσφεράση λεκιθίνης:ρετινόλης (lecithin:retinol acyltransferase, LRAT), η οποία εστεροποιεί τη ρετινόλη σε ρετινυλικούς εστέρες, αυξάνει την πρόσληψη ρετινόλης.

Η συγκέντρωση της ρετινόλης στα κύτταρα ρυθμίζεται κυρίως από τις πρωτεΐνες STRA6, LRAT και REHs. Μείωση ή απώλεια της εστεροποίησης της ρετινόλης, όπως για παράδειγμα στο μοντέλο ποντικιού από το οποίο απουσιάζει η LRAT, οδηγεί σε μείωση της συνολικής συγκέντρωσης ρετινόλης και ρετινυλικών εστέρων στα κύτταρα και καθιστά τα ζώα πιο επιρρεπή στην έλλειψη βιταμίνης A (Liu and Gudas, 2005). Οι ρετινυλικοί εστέρες αποτελούν την ενδοκυτταρική μορφή αποθήκευσης της ρετινόλης. Συνεπώς, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ρετινοειδών ρυθμίζεται από τη δράση αρκετών μεταβολικών ενζύμων, τα επίπεδα των οποίων ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων και σταδίων διαφοροποίησης και μεταβάλλονται ως απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα. Για παράδειγμα, διάφοροι ανθρώπινοι καρκίνοι, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας, του δέρματος, της ουροδόχου κύστης, του νεφρού, του προστάτη και του μαστού εμφανίζουν μη φυσιολογικά χαμηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα ρετινυλικών εστέρων και μειωμένη έκφραση της LRAT.

Οι αφυδρογονάσες της ρετινόλης (retinol dehydrogenases, ADHs) οξειδώνουν την alltrans ρετινόλη σε all-trans ρετιναλδεΰδη (ρετινάλη), η οποία στη συνέχεια μεταβολίζεται σε alltrans ρετινοϊκό οξύ (all-trans retinoic acid, atRA, γνωστό και ως tretinoin, τρετινοΐνη) από αφυδρογονάσες της ρετιναλδεΰδης (retinaldehyde dehydrogenases, ALDHs). Παράλληλα, η alltrans ρετινόλη μπορεί να ισομεριστεί σε 9-cis ρετινόλη, η οποία με τη σειρά της μεταβολίζεται σε 9-cis ρετιναλδεΰδη και 9-cis ρετινοϊκό οξύ (9-cis retinoic acid, 9-cis RA, γνωστό και ως alitretinoin, αλιτρετινοΐνη) [**Εικόνα 20**]. Αντίστροφα, η ρετιναλδεΰδη μπορεί να μετατραπεί σε ρετινόλη από τις αφυδρογονάσες/ρεδουκτάσες ρετινόλης βραχείας αλυσίδας (retinol short-chain dehydrogenase/reductases) [Haeseleer et al., 1998]. Το ρετινοϊκό οξύ οξειδώνεται σε πιο πολικούς μεταβολίτες από μέλη της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, όπως τα CYP26A1, -B1 και -C1 (Abu-Abed et al., 1998). Η ρετινόλη έχει έξι βιολογικά ενεργές ισομορφές: all-trans, 11-cis, 13cis, 9, 13-di-cis, 9-cis, και 11, 13-di-cis, με το all-trans να αποτελεί την κυρίαρχη φυσιολογική μορφή. Τα ενδογενή ρετινοειδή με βιολογική δράση περιλαμβάνουν τα atRA, 9-cis RA, 11-cis ρετινόλη. β,4-δι-αφυδρο RA και πιθανώς τα 14-υδροζυ-4, 14-ρετρο ρετινόλη, 4-οξο RA και 4-οξο ρετινόλη. Πέρα από τα φυσικά ρετινοειδή, υπάρχει πλέον και πλήθος συνθετικών.

Ενδοκυτταρικά, η all-*trans* ρετινόλη και το προϊόν της οξείδωσής της, all-*trans* ρετινάλη, σχετίζονται με διαφορετικές ισομορφές των κυτταρικών πρωτεϊνών που προσδένουν ρετινόλη (cellular retinol-binding proteins, CRBPs), ενώ το atRA προσδένεται σε ισομορφές των κυτταρικών πρωτεϊνών που προσδένουν ρετινοϊκό οξύ (cellular retinoic acid-binding proteins, CRABPs) που διευκολύνουν την πρόσληψη και τη μεταφορά του στα κύτταρα στόχους του. Από την άλλη, το CYP26 ξεκινά την περαιτέρω οξείδωση του RA που οδηγεί στην αποικοδόμηση και την απέκκρισή του από κύτταρα που δεν αποτελούν στόχους του (**Εικόνα 21**). Τέλος, ο κύριος χώρος αποθήκευσης της βιταμίνης Α είναι το ήπαρ (Duester, 2008).





Εικόνα 20: Χημικοί τύποι δύο κοινών ρετινοειδών: του all-*trans* ρετινοϊκού οξέος (atRA) και του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος (9-*cis* RA) [Tang & Gudas, 2010].



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού σύνθεσης, μεταφοράς και αποικοδόμησης του ρετινοϊκού οξέος (Duester, 2008).

3.2. Υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος

3.2.1. Κατηγοριοποίηση των υποδοχέων ρετινοϊκού οξέος

Τα ρετινοϊκά οξέα ασκούν τις φυσιολογικές τους δράσεις κυρίως μέσω πρόσδεσης σε ετεροδιμερή RAR-RXR. Οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος ανήκουν στους πυρηνικούς υποδοχείς οι οποίοι αποτελούν μία συντηρημένη υπεροικογένεια κατά την εξέλιξη των Μεταζώων, ωστόσο απουσιάζουν από τα πρωτόζωα, τους μύκητες και τα φυτά (Owen & Zelent, 2000). Ειδικότερα, αποτελούν μέλη της οικογένειας ενδοκυτταρικών ή πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών/ θυρεοειδών/βιταμίνης D/υποδοχέων που ενεργοποιούνται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) που λειτουργούν ως προσδετοεξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντες. Δύο είδη υποδογέων ρετινοϊκού οξέος έχουν αναφερθεί: οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptors, RARs) και οι υποδοχείς Χ ρετινοειδών (retinoid X receptors, RXRs). Οι RARs ενεργοποιούνται από το atRA και το 9-cis RA, ενώ οι RXRs μόνο από το 9-cis RA (Heyman et al., 1992). Υπάρχουν τρεις ισότυποι υποδοχέων RAR, οι RARα, RARβ και RARγ, και τρεις ισότυποι RXR, οι RXRα, RXRβ και RXRy, ο καθένας από τους οποίους κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο και εμφανίζεται σε πολυάριθμες ισομορφές (variants) μέσω της χρήσης εναλλακτικών υποκινητών, εναλλακτικού ματίσματος και εναλλακτικών περιοχών με polyA αλληλουχίες. Ο RARa εκφράζεται στο ρομβοειδή εγκέφαλο, τη σπονδυλική στήλη και το μάτι, ο RARβ εντοπίζεται ευρέως στον εγκέφαλο, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το έντερο, το ήπαρ, το νεφρό και τα άκρα και ο RARy εκφράζεται πιο ισχυρά στο δέρμα. Όσον αφορά τους υποδοχείς RXR, ο RXRa ανευρίσκεται κυρίως στο ήπαρ, τον πνεύμονα, το μυ, το νεφρό, την επιδερμίδα, το έντερο και το δέρμα, ο RXRβ έχει καθολική έκφραση και ο RXRy εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο, τον καρδιακό και το σκελετικό μυ. Τουλάχιστον ένας υποδογέας RXR (α, β ή γ) εκφράζεται σε κάθε κύτταρο του οργανισμού. Οι τρεις υποδοχείς είναι υψηλά συντηρημένοι και εμφανίζουν πλεοναστικές λειτουργίες. Η έκφραση των υποδοχέων ρετινοϊκού οξέος ρυθμίζεται από τους ίδιους τους υποδοχείς, άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας οιστρογόνων α (Estrogen Receptor α, ERα) ή από άλλους υποτύπους της ίδιας οικογένειας.

3.2.2. Δομή των υποδοχέων RXR

Οι υποδοχείς RXR, όπως και όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς, διαθέτουν μία επικράτεια δέσμευσης προσδέτη (ligand-binding domain, LBD) καθώς και μία DNA-προσδένουσα επικράτεια (DNA-binding domain, DBD) και συνεπώς δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από προσδέτες.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούνται από έξι δομικές επικράτειες αποκαλούμενες A-F. Η αμινοτελική περιοχή A/B διαθέτει λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής ανεξάρτητη από προσδέτη κι επιπλέον περιέχει αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης για κινάσες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases, CDKs) και οι

κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) [Bastien & Rochette-Egly, 2004].

Η DBD είναι η πιο συντηρημένη επικράτεια των πυρηνικών υποδοχέων, καθώς όλοι εμφανίζουν σχεδόν την ίδια τρισδιάστατη δομή: δύο λούπες που προσδένουν ψευδάργυρο και ένα ζεύγος α-ελίκων τοποθετημένων κάθετα μεταξύ τους. Η μία από αυτές τις έλικες διαμεσολαβεί την ειδική για την αλληλουχία αναγνώριση του προτύπου AGGTCA μέσω επαφών με τη μεγάλη αύλακα του DNA (Huang et al., 2014).

Η περιοχή D λειτουργεί ως σύνδεσμος (hinge) μεταξύ της επικράτειας DBD και της LBD που επιτρέπει την περιστροφή της DBD κι επίσης περιέχει σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS).

Η επικράτεια LBD εμφανίζει ενδιάμεση συντηρητικότητα μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων, ωστόσο έχει παρόμοια αρχιτεκτονική αναδίπλωση (fold). Συγκροτείται από 12 αέλικες, μία β-στροφή και μικρές συνδετικές λούπες και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό όλων των πρωτεϊνικών επαφών με τα ρετινοϊκά οξέα ή τα συνθετικά τους ανάλογα. Η δέσμευση του προσδέτη γίνεται σε έναν εσωτερικό υδρόφοβο θύλακα ο οποίος σχηματίζεται από ένα σάντουιτς τριών στιβάδων α-ελίκων. Εκτός από την περιοχή δέσμευσης του προσδέτη, η επικράτεια LBD περιέχει ακόμη την κύρια επικράτεια διμερισμού καθώς και την προσδετοεξαρτώμενη λειτουργία trans-ενεργοποίησης.

Τέλος, η περιοχή F απουσιάζει στους RXR και ο ρόλος της στους RAR παραμένει άγνωστος (Εικόνα 22).


Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών επικρατειών των πυρηνικών υποδοχέων (πάνω). Τρισδιάστατη δομή της DNA-προσδένουσας επικράτειας (DBD) και της επικράτειας που δεσμεύει τον προσδέτη (LBD) των πυρηνικών υποδοχέων. Οι υπόλοιπες επικράτειες αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές, καθώς οι δομές τους δεν έχουν περιγραφεί. Οι δομές που απεικονίζονται είναι από τον υποδοχέα οιστρογόνων (Commons.wikimedia.org, "File:Nuclear Receptor Structure.Png ". N.p., 2016).

Η πρόσδεση του αγωνιστή 9-cis RA επάγει αλλαγή στη στερεοδιάταξη του υποδοχέα RXR που διαμεσολαβείται από την έλικα 12. Απουσία προσδέτη, η έλικα 12 είναι τοποθετημένη μακριά από το κέντρο της επικράτειας LBD, ενώ έπειτα από τη δέσμευσή του μετακινείται πλησιέστερα και κλείνει πάνω από τον προσδέτη παγιδεύοντάς τον (μοντέλο ποντικοπαγίδας, mouse trap model) [Wurtz et al., 1996]. Τη μετακίνηση αυτή ακολουθεί η τοποθέτηση του βρόχου ωμέγα κάτω από τις έλικες 3 και 6 και η δημιουργία μιας επιφάνειας που ευνοεί την πρόσδεση συνενεργοποιητών. Το 9-cis RA εισέρχεται στον υδροφοβικό θύλακα που σχηματίζεται από κατάλοιπα των ελίκων 4, 5, 7, 11 και της περιοχής β-στροφής της επικράτειας LBD (**Εικόνα 23**). Η μεγάλη συγγένεια του 9-cis RA οφείλεται στις συμπληρωματικές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων με την ισοπρενική αλυσίδα του προσδέτη (**Εικόνα 24**).



Εικόνα 23: α) Υπέρθεση της επικράτειας LBD του υποδοχέα RXRα στη μορφή χωρίς (apo) [γκρι, PDB ID: 1LBD] και με 9-cis RA (holo) [κόκκινο, PDB ID: 1FBY] στο θύλακα. Ο προσδέτης απεικονίζεται με πράσινο. Τα τέσσερα ροζ βέλη δείγνουν τις κινήσεις των ελίκων που επάγονται από τη δέσμευση του προσδέτη. β) Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου ποντικοπαγίδας δείχνει πώς αλληλεπιδρούν που συγκαταστολείς, συνενεργοποιητές και προσδέτες με την επικράτεια LBD των πυρηνικών υποδογέων (Huang et al., 2014).



Εικόνα 24: Θέση πρόσδεσης και ειδικές αλληλεπιδράσεις του 9-*cis* RA με τον υποδοχέα RXR. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν δεσμούς van der Waals ενώ οι κόκκινες γραμμές δεσμούς υδρογόνου. Οι συντεταγμένες είναι βάσει του PDB ID 1FBY (Huang et al., 2014).

3.3. Σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος

Το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος ενεργοποιείται έπειτα από δέσμευση των ρετινοϊκών οξέων σε ετεροδιμερή RAR/RXR, τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων τους μέσω πρόσδεσης στο DNA σε στοιχεία απόκρισης στο ρετινοϊκό οξύ (RA response elements, RAREs). Απουσία προσδέτη, τα ετεροδιμερή RAR/RXR δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων τους. Υπό αυτές τις συνθήκες, το ετεροδιμερές προσδένει ένα σύμπλοκο συγκαταστολέων που περιλαμβάνει τον N-CoR ή τον SMRT κι επιπλέον πρωτεΐνες, μία ή περισσότερες από τις οποίες διαθέτουν ενεργότητα αποακετυλάσης ιστονών (histone deacetylase, HDAC). Η πρόσδεση του ρετινοϊκού οξέος αλλάζει τις αλληλεπιδράσεις του ετεροδιμερούς με τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, το οποίο παρουσία προσδέτη αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές με μεγαλύτερη συγγένεια από ό,τι με συγκαταστολείς. Οι συνενεργοποιητές περιλαμβάνουν πρωτεΐνες της οικογένειας p160 στεροειδών υποδοχέων, όπως οι SRC-1, -2 και -3, καθώς και πρωτεΐνες με ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών (histone acetyltransferase, HAT), όπως η p300, μεθυλοτρανσφεράσης ιστονών (histone methyltransferase, HMT), κινάσης καθώς και σύμπλοκα αναδόμησης της χρωματίνης εξαρτώμενα από ATP (SWI/SNF) και έχουν ως αποτέλεσμα την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Στη συνέχεια, οι συνενεργοποιητές απομακρύνονται και συγκροτείται το σύμπλοκο του μεσολαβητή SMCC το οποίο με τη σειρά του διευκολύνει την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης ΙΙ και των γενικών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής. Το παραπάνω μοντέλο δράσης των RAR και RXR μέσω πρόσδεσης σε RAREs θεωρείται το κλασικό ή γονιδιωματικό μονοπάτι σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος (**Εικόνα 25**). Η ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού οδηγεί σε κυτταρική διαφοροποίηση, διακοπή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση. Ως απόκριση στα ρετινοειδή, οι υποδοχείς που συγκροτούν το ετεροδιμερές αποικοδομούνται από το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Μέσω αυτού του μηχανισμού ρυθμίζεται η ένταση και η διάρκεια της μεταγραφής που επάγεται από ρετινοειδή (Bastien & Rochette-Egly, 2004).

Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί εκατοντάδες γονίδια-στόχοι του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος, πολλά από τα οποία είναι εξελικτικά συντηρημένα στα Μετάζωα. Αυτά συμπεριλαμβάνουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τους τρεις υποδοχείς RAR, καθώς και γονίδια της οικογένειας Hox τα οποία αποτελούν σημαντικούς αναπτυξιακούς ρυθμιστές του εμβρυϊκού προτύπου σώματος. Άλλα γονίδια που ρυθμίζονται από το ρετινοϊκό οξύ αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι C/EBP, Statl, Oct4, Pit-1, HNF1a, ETs1, EGr1 και Foxa1, ενώ άλλα είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό, την αποικοδόμηση και τη μεταφορά των ρετινοειδών στον οργανισμό. Τέλος, γονίδια-στόχους του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος αποτελούν πρωτεΐνες προσκόλλησης/εξωκυτταρικής μήτρας, εκκρινόμενες πρωτεΐνες/ σηματοδοτικοί παράγοντες, μεμβρανικοί υποδοχείς, υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και ένζυμα.



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση του κλασικού μονοπατιού σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος (Bastien & Rochette-Egly, 2004)

Τα ρετινοϊκά οξέα και οι υποδοχείς τους συμμετέχουν σε πολλά σημαντικά μονοπάτια πέρα από το κλασικό. Έχει δειχθεί ότι το ρετινοϊκό οξύ ρυθμίζει τον NF-κB (Cras et al., 2012), την IFN-γ (Papi et al., 2012), τον TGF-β (Ying et al., 2011), τον VEGF (Lu et al., 2012), τη MAPK (Piskunov & Rochette-Egly, 2012) καθώς και την αναδόμηση της χρωματίνης (Dilworth & Chambon, 2001). Επιπλέον, οι υποδοχείς RAR και RXR μπορούν να σχηματίσουν ετεροδιμερή με άλλους τύπους υποδοχέων που περιλαμβάνουν τον ERα (Hua et al., 2009, Ross-Innes et al., 2010), τον AP-1 (Lefevbre et al., 2005), τον PPAR (Schug et al., 2007), τους ηπατικούς υποδοχείς X (liver X receptors, LXRs) [Willy et al., 1995] και τον υποδοχέα βιταμίνης D (vitamin D receptor, VDR) [Wang et al., 2001]. Όταν οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος ετεροδιμερίζονται με τους προαναφερθέντες υποδοχείς, συμμετέχουν στη ρύθμιση των μονοπατιών των τελευταίων. Αυτές οι δράσεις αποτελούν το μη κλασικό/μη γονιδιωματικό μονοπάτι σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος. Αξιοσημείωτα, τα μονοπάτια αυτά μπορούν να ρυθμίζουν διαδικασίες με αντίθετη λειτουργία από αυτή του κλασικού μονοπατιού. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιών των προωθούν την επιβίωση και αναστέλλουν την απόπτωση, σε αντίθεση με τη λειτουργία των RAR και RXR σε απόκριση στο ρετινοϊκό οξύ που οδηγεί σε διαφοροποίηση και αναστολή της αύξησης (Schug et al., 2007) [Εικόνα 26]. Πιστεύεται ότι το κλασικό και το μη κλασικό μονοπάτι παίζει κυρίαρχο ρόλο σε σχέση με το μη κλασικό, καθώς το RA έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τους RARs από ό,τι για τους άλλους υποδοχείς.



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση του κλασικού και του μη κλασικού μονοπατιού σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος (Connolly et al., 2013)

3.4. Αλληλεπίδραση του υποδοχέα RXR με άλλους υποδοχείς

Ο RXR διαδραματίζει κύριο ρόλο στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, καθώς σχηματίζει ετεροδιμερή εκτός του RAR και με τον υποδοχέα της θυρεοειδικής ορμόνης (thyroid hormone receptor, TR), με τον VDR, με τον LXR, με τους PPARs, τον υποδοχέα X φαρνεσοειδών (farnesoid X receptor, FXR), τον υποδοχέα X πρεγνανίου (pregnane X receptor, PXR) και τον συστατικό υποδοχέα ανδροστάνιου (constitutive androstane receptor, CAR), τον ΕR και τον υποδοχέα ανδρογόνων (androgen receptor, AR) μεταξύ άλλων. Συνεπώς, οι πλειοτροπικές δράσεις του ρετινοϊκού οξέος αφορούν το ρεπερτόριο όλων αυτών των πυρηνικών υποδοχέων με τους οποίους συζεύγνυται ο RXR.

Τα ετεροδιμερή RXR/TR είναι υπεύθυνα για πλήθος φυσιολογικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη ρύθμιση του μεταβολικού ρυθμού καθώς και καρδιακών και πεπτικών λειτουργιών. Οι λειτουργίες του VDR αφορούν τη ρύθμιση της πρόσληψης, της μεταφοράς και της ομοιόστασης ασβεστίου και φωσφορικών για τη μεταλλοποίηση των οστών, καθώς επίσης και την κυτταρική διαφοροποίηση και ανοσοποιητικές λειτουργίες. Επιπρόσθετα, τα ετεροδιμερή του RXR με τον LXR, που αποτελεί αισθητήρα των οξυστερολών, ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης. Η συσχέτιση του RXR με τους PPARs επιτρέπει στα κύτταρα να αντιλαμβάνονται και να αποκρίνονται γενετικά στα μόρια των λιπαρών οξέων, ενώ η αλληλεπίδραση με τον FXR ρυθμίζει το μεταβολισμό των χολικών οξέων. Τέλος, ο PXR και ο CAR είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών και ξενοβιοτικών από τον οργανισμό (Evans & Mangelsdorf, 2014) [**Εικόνα 27**].



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση των υποδοχέων με τους οποίους σχηματίζει ετεροδιμερή ο υποδοχέας RXR, καθώς και των αντίστοιχων προσδετών και των λειτουργιών που ρυθμίζουν (Evans & Mangelsdorf, 2014)

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των ετεροδιμερών στα οποία συμμετέχει ο RXR είναι ότι αυτός μπορεί να έχει είτε σιωπηλό είτε ενεργό ρόλο στη μεταγραφή. Ορισμένα ετεροδιμερή (RXR-PPAR, RXR-LXR, RXR-FXR, RXR-PXR, RXR-CAR) μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή έπειτα από δέσμευση προσδέτη είτε στον RXR είτε στον άλλο υποδοχέα (επιτρεπτά ετεροδιμερή, permissive heterodimers). Η ταυτόχρονη παρουσία προσδετών και στους δύο υποδοχείς οδηγεί σε συνεργατική, συνεργιστική απόκριση σε σύγκριση με αυτή που προκύπτει από την παρουσία ενός μόνο προσδέτη (Leblanc and Stunnenberg, 1995). Αντίθετα, για την ενεργοποίηση άλλων ετεροδιμερών (RXR-RAR, RXR-VDR, RXR-TR) δεν αρκεί η πρόσδεση αγωνιστή μόνο στον RXR αλλά είναι απαραίτητη η παρουσία προσδέτη στον άλλο υποδοχέα (μη επιτρεπτά ετεροδιμερή, non-permissive heterodimers) [Kurokawa et al., 1993]. Ωστόσο, η προσθήκη αγωνιστών και στους δύο υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα τη συνεργιστική και πιο αποτελεσματική ενεργοποίηση της μεταγραφής. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ανικανότητα απομάκρυνσης των συγκαταστολέων, ενώ η παρουσία προσδετών και στους δύο υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα τη συνεργιστική πρόσδεση συνενεργοποιτών. Η ικανότητα απελευθέρωσης των συγκαταστολέων ως απόκριση στη δέσμευση προσδέτη από τον RXR είναι αυτή που καθορίζει το αν το ετεροδιμερές που σχηματίζει είναι επιτρεπτό ή μη (Lammi et al., 2008).

Τα ετεροδιμερή στα οποία συμμετέχει ο RXR αναγνωρίζουν στοιχεία απόκρισης στο DNA στα οποία δύο ημιθέσεις πρόσδεσης AGGTCA οργανωμένων ως συνεχόμενες επαναλήψεις (Umesono et al., 1991). Η επιλογή των θέσεων-στόχων από τα διάφορα ζεύγη γίνεται με βάση τον αριθμό των βάσεων (1-5) που μεσολαβούν μεταξύ των δύο επαναλήψεων (direct repeats, DR). Για παράδειγμα, τα ετεροδιμερή RXR-PPAR αναγνωρίζουν στοιχεία DR2, ενώ τα RXR-RAR στοιχεία DR5. Προσθέτοντας ένα ακόμη επίπεδο πολυπλοκότητας, ο RXR έχει την ικανότητα να προσδένεται είτε στην αναρροϊκή είτε στην καταρροϊκή ημιθέση σε ορισμένα DRs, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετική απόκριση κάθε φορά.

Εκτός από ετεροδιμερή, ο υποδοχέας RXR σχηματίζει και ομοδιμερή. Όμως ο σχηματισμός ετεροδιμερών είναι προτιμότερος από το σχηματισμό ομοδιμερών όταν υπάρχουν διαθέσιμοι κι άλλοι υποδοχείς, καθώς η επιφάνεια ετεροδιμερισμού είναι μεγαλύτερη από την επιφάνεια ομοδιμερισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο RXR διαθέτει τη μοναδική μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων ικανότητα να σχηματίζει ομοτετραμερή (Εικόνα 28). Μελέτες έχουν δείξει ότι η επικράτεια LBD του RXR μπορεί να αυτοσυγκροτηθεί σε τετραμερή με μεγάλη συγγένεια, τα οποία διαχωρίζονται σε μονομερή και διμερή έπειτα από πρόσδεση 9-cis RA. Συνεπώς, το τετραμερές αποτελεί μια ανενεργή μορφή του υποδοχέα. Επιπλέον, τα RXR τετραμερή μπορούν να προσδένονται στο DNA με μεγαλύτερη συγγένεια από ό,τι τα διμερή και η πρόσδεση αγωνιστή σε αυτά οδηγεί στο διαχωρισμό τους σε διμερή (Kersten et al., 1997).



Εικόνα 28: Δομή του τετραμερούς της επικράτειας LBD του υποδοχέα RXRa απουσία προσδέτη. Οι τέσσερις υπομονάδες απεικονίζονται με διαφορετικό χρώμα, αλλά σε κάθε περίπτωση η έλικα 12 φαίνεται με κόκκινο (Gampe et al., 2000) [PDB ID 1G1U].

3.5. Ο ρόλος του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος στην ανάπτυξη

Οι πρώτες μελέτες του ρόλου του ρετινοϊκού οξέος στην εμβρυογένεση έγιναν λόγω των τερατογενετικών αποτελεσμάτων που είχε η εκτοπική έκφρασή του. Πλέον, μέσω των μοντέλων ποντικιών από τα οποία λείπουν οι υποδοχείς του έχουμε μάθει περισσότερα για τις συνέπειες της απώλειάς τους. Συγκεκριμένα, η απώλεια της λειτουργίας του υποδογέα RXRa είναι θνησιγόνος κατά την εμβρυογένεση λόγω της υποπλαστικής ανάπτυξης του κοιλιακού θαλάμου της καρδιάς (Kastner et al., 1997). Η απώλεια της λειτουργίας του RXRβ επίσης οδηγεί σε θνησιμότητα πριν τη γέννηση στα μισά περίπου ποντίκια από αυτά που εξετάστηκαν, ενώ όσα αρσενικά επέζησαν ήταν στείρα (Kastner et al., 1996). Από την άλλη, η έλλειψη του RXRy δεν οδήγησε σε θάνατο ή προφανείς φαινοτυπικές αλλαγές στα ζώα, πιθανότατα λόγω του ότι στους περισσότερους ιστούς, ο υποδοχέας RXRa αναπληρώνει τη λειτουργία του (Krezel et al., 1996). Όσον αφορά τους υποδοχείς RAR, η απώλεια λειτουργίας του RARα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας κατά το ήμισυ, αναπτυξιακά προβλήματα, στειρότητα στα αρσενικά ποντίκια και άλλες δυσμορφίες. Τα ποντίκια από τα οποία απουσιάζει ο υποδοχέας RARβ εμφανίζουν διαμερισματοποίηση των ραβδοσωμάτων στο ραμφοειδές ραβδωτό σώμα, κινητικές ανωμαλίες και βλάβες στα μονοπάτια που ρυθμίζονται από ντοπαμίνη στον εγκέφαλο (Krezel et al., 1998), ενώ αυτά από τα οποία λείπει ο RARy παρουσιάζουν ανωμαλίες στην ανάπτυξη, πρώιμη θνησιμότητα και στειρότητα στα αρσενικά λόγω πλακώδους μεταπλασίας στα σπερματικά κυστίδια και τον προστάτη (Krust et al., 1989).

Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, το ενδόδερμα διαμορφώνεται κατά μήκος του κεφαλουριαίου άξονα προκειμένου να σχηματιστούν διάφορα όργανα, όπως ο θυρεοειδής και ο θύμος αδένας, οι πνεύμονες, το έντερο, το πάγκρεας και η ουροδόχος κύστη. Τα ρετινοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των παραπάνω οργάνων από το ενδόδερμα ρυθμίζοντας τη διαφοροποίηση προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Bayha et al. 2009). Στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου, το ρετινοϊκό οξύ δρα ως μορφογόνο, δηλαδή ως ένα σηματοδοτικό μόριο το οποίο επιδρά στα κύτταρα ρυθμίζοντας την κυτταρική απόκριση σύμφωνα με την τοπική συγκέντρωσή του. Ο καθορισμός του κεφαλουραίου άξονα και ο σχηματισμός των σωμιτών καθορίζονται από το RA το οποίο ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων Hox.

3.6. Ο ρόλος του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος στον καρκίνο

3.6.1. Μηχανισμοί καρκινογένεσης μέσω του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος

Πληθώρα στοιχείων έχει δείξει ότι το ρετινοϊκό οξύ καταστέλλει καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, προστάτη, μαστού, ωοθηκών, τραχήλου της μήτρας, ουροδόχου κύστης, κεφαλής και τραχήλου, παγκρέατος, ήπατος και δέρματος. Τα ρετινοειδή ασκούν τον αντικαρκινικό τους ρόλο κυρίως μέσω τριών μηχανισμών: της επαγωγής της διαφοροποίησης, της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της επαγωγής κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα. Κατ' αρχάς, τα ρετινοειδή αποτελούν ισχυρούς επαγωγείς της κυτταρικής διαφοροποίησης και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να ανατρέψουν την παρεμπόδιση της διαφοροποίησης, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (βλ. κεφ. 3.7.). Τα ρετινοειδή μέσω διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών αναστέλλουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου σε ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μέσω άμεσης ή έμμεσης ρύθμισης κυκλινών, CDKs και αναστολέων του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, το ρετινοϊκό οξύ ενεργοποιεί τη μεταγραφή του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF1/CIP1} μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης του ετεροδιμερούς RAR-RXR στον υποκινητή του (Liu et al., 1996) κι επιπλέον οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των p16 και p21, γεγονότα που έγουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του Rb και την επακόλουθη απενεργοποίηση του E2F1. Με αυτό τον τρόπο, παρεμποδίζει την ολοκλήρωση της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0/G1 και τη μείωση του αυτών που βρίσκονται στη φάση S. Αξιοσημείωτα, γαμηλές συγκεντρώσεις RA (20nM) οδηγούν σε αύξηση του πολλαπλασιασμού κυτταρικών σειρών πλακώδους καρκινώματος μέσω ενεργοποίησης της ERK1 από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση κυκλινών και CDKs της S και της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου, αυξημένη φωσφορυλίωση του Rb και αυξημένη πρόσδεση στο DNA του E2F1. Από την άλλη, υψηλές δόσεις RA (40nM-1mM) αναστέλλουν την έκφραση της ERK1 και καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό μέσω της αντίστροφης πορείας (Crowe et al., 2003). Συνηθέστερα, χαμηλές δόσεις ρετινοϊκού οξέος οδηγούν σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου, ενώ υψηλές δόσεις επάγουν απόπτωση.

Είναι γνωστό ότι τα ρετινοειδή επάγουν απόπτωση σε πλήθος ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Επίσης, το RA ενισχύει σημαντικά την απόπτωση που επάγεται από τριοξείδιο του

αρσενικού ή cisplatin σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων. Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι τα ρετινοειδή έχουν την ικανότητα να επάγουν σηματοδότηση που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο ειδικά στα καρκινικά κύτταρα μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης του IRF1 (IFN-regulatory factor 1) που με τη σειρά του οδηγεί στην έκφραση του TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) και των υποδοχέων θανάτου DR4 (death receptor 4) και DR5 τα οποία δρουν ογκοκατασταλτικά καθώς είναι ικανά να θανατώσουν καρκινικά κύτταρα χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά τα φυσιολογικά κύτταρα (Altucci et al., 2007).

Πέρα από το κλασικό μονοπάτι και το μη γονιδιωματικό μονοπάτι του υποδοχέα RXR έχει ρόλο στον καρκίνο. Το RXRα μπορεί να δράσει στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζοντας σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως η εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια απόπτωση, η φλεγμονή και η κυτταρική επιβίωση που διαμεσολαβείται από το μονοπάτι PI3K/AKT (Zhang et al., 2015). Ειδικότερα, έχει βρεθεί μία κομμένη μορφή του RXRα σε ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών και πρωτογενών όγκων, η οποία αλληλεπιδρά με την p85α υπομονάδα της PI3K ή άλλων παραγόντων που σχετίζονται με τον TNF-R1—ενώ η φυσιολογική μορφή του RXRα όχι—και ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση, τη φλεγμονή και την απόπτωση (Zhou et al., 2010). Επιπρόσθετα, το RXRα μέσω ετεροδιμερισμού με τον Nur77 ρυθμίζει την απόπτωση που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια.

Το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος συχνά υπολειτουργεί στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τον περιβάλλοντα φυσιολογικό επιθηλιακό ιστό. Η απώλεια της απόκρισης στα ρετινοειδή στα καρκινικά κύτταρα δυσχεραίνει τη θεραπεία σε περιπτώσεις όπου η χορήγηση φαρμακολογικής δόσης RA θα ήταν ωφέλιμη. Μεταξύ των RARs, ο RARβ2 είναι επαγόμενος από ρετινοϊκό οξύ και αποτελεί τον κυρίαρχο διαμεσολαβητή της ανασταλτικής δράσης του ρετινοϊκού οξέος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Faria et al., 1999). Το γονίδιο του υποδοχέα RARβ2 συχνά χάνεται ή αποσιωπάται επιγενετικά στους ανθρώπινους καρκίνους και κλινικά στοιχεία δείχνουν ότι η έκφρασή του συχνά σχετίζεται αντίστροφα με το βαθμό του όγκου. Επιπλέον, η απώλεια ή μειωμένη έκφραση του RARβ2 κατά την καρκινογένεση συσχετίζεται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα ρετινοειδή, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο υποδοχέας RARβ2 διαμεσολαβεί τη δράση του ρετινοϊκού οξέος και δρα ως ογκοκαταστολέας. Η καταστολή της αύξησης και η απόπτωση που επάγονται από τον RARβ διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα RARβ οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του RARβ, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και αύξηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του που μεσολαβούν την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, ο RARβ2 οδηγεί στην επαγωγή αναστολέων του κυτταρικού κύκλου όπως οι p21^{CIP1} (Suzui et al., 2004) και p27^{KIP1} (Li et al., 2004). Πέρα από την απώλεια έκφρασης του γονιδίου RARβ2 κατά την επιθηλιακή καρκινογένεση, συχνά παρατηρείται και απώλεια της δράσης του RARα (**Εικόνα 29**).



Εικόνα 29: Μηχανισμοί με τους οποίους τα ρετινοειδή εμπλέκονται στην καρκινογένεση. α) Παρεμπόδιση της εξέλιξης της χημικής καρκινογένεσης, β) επαγωγή της διαφοροποίησης, γ) διακοπή του κυτταρικού κύκλου, ε) επαγωγή κυτταρικού θανάτου, στ) επαγωγή απόπτωσης (Altucci & Gronemeyer, 2001)

3.6.2. Ο ρόλος της σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Η έρευνα σχετικά με το ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στη φυσιολογική και παθολογική λειτουργία του επιθηλίου της ουροδόχου κύστης είναι περιορισμένη. Οι πρώτες μελέτες που σημειώθηκαν αφορούσαν στο ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στην ανάπτυξη του ουροθηλίου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση τροφής ανεπαρκούς σε βιταμίνη Α σε αρουραίους οδηγεί σε αλλαγή της μορφολογίας του ουροθηλίου η οποία προσομοιάζει στο επιθήλιο της επιδερμίδας (Wolbach & Howe, 1933, Hicks, 1968). Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια όπου παρατηρήθηκε έντονη μορφολογική αλλοίωση του ουροθηλίου της ουροδόχου κύστης και των ουρητήρων. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικές στιβάδες ξεπερνούσαν τις 10-15—ενώ στο φυσιολογικό ουροθήλιο είναι τρεις—και τα επιφανειακά κύτταρα έχασαν τον πυρήνα τους, άρχισαν να υπερεκφράζουν κερατίνες και η δομή τους άλλαξε σε φαινοτυπικά παρόμοια με αυτή των κυττάρων της επιδερμίδας (Molloy & Laskin, 1988). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η βιταμίνη A από την οποία προέρχονται τα ρετινοϊκά οξέα είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του ουροθηλίου στα ποντίκια και η απουσία της οδηγεί σε κερατινοποίηση του επιθηλίου. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η χορήγηση atRA έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικιού προς την ουροθηλιακή γενεαλογία μέσω διαδικασιών που εξαρτώνται από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4/6 (Mauney et al., 2010). Επίσης, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος στα προγονικά ουροθηλιακά κύτταρα είναι απαραίτητη για τον καθορισμό και την αναγέννηση του ουροθηλίου (Gandhi et al., 2013).

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι σε πειραματόζωα που χορηγείται Ν-βουτυλ-Ν-(4υδροξυβουτυλ)νιτροζαμίνη (BBN), η οποία χρησιμοποιείται για την επαγωγή χημικής καρκινογένεσης σε τρωκτικά, τα ρετινοειδή εμποδίζουν την καρκινογένεση στο ουροθήλιο (Becci et al., 1978). Ακόμη, έχει σημειωθεί ότι η χορήγηση ρετινοειδών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης οδηγεί σε αναστολή της αύξησης, αλλαγή στην κατανομή των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή απόπτωσης (Clifford et al., 2001). Τα ρετινοειδή ενεργοποιούν γονίδια-στόχους μέσω RAR και RXR, αλλά αυτό δε συμβαίνει στην καρκινική σειρά βαθμού I RT4 ούτε σε αθανατοποιημένα φυσιολογικά ουροθηλιακά κύτταρα (Hurst et al., 1999). Ενώ στη φυσιολογική ουροδόχο κύστη εκφράζονται όλοι οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος, σε ασθενείς με καρκίνο χάνεται η έκφραση του RARα (23%), του RARβ2 (54%), του RARγ (8%) και του RXRα (15%) [Boorjian et al., 2005]. Όλα αυτά τα δεδομένα συνηγορούν στο ότι το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξεός εμφανίζει ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Κλινική δοκιμή φάσης ΙΙ σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο που είχε αφαιρεθεί χειρουργικά μέχρι 3 χρόνια πριν στους οποίους χορηγήθηκε το συνθετικό παράγωγο ρετινοειδών fenretinide ή 4-HPR για ένα χρόνο από στόματος δεν έδειξε διαφορά στο ποσοστό των ανευπλοειδών ιστογραμμάτων DNA μεταξύ αυτών και της ομάδας στην οποία δε χορηγήθηκε φάρμακο (Decensi et al., 1992). Άλλη κλινική μελέτη που αφορούσε στη χορήγηση 13-*cis* RA σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπής σταδίου Τα και Τ1 διακόπηκε πρόωρα λόγω έλλειψης θετικών αποτελεσμάτων και υψηλής συχνότητας και σοβαρότητας εμφάνισης τοξικότητας (Prout & Barton, 1992). Σε μία προοπτική τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή δοκιμή σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης σταδίου Τα και Τ1 δείχθηκε ότι οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε το συνθετικό ρετινοειδές etretinate εμφάνισαν μεγαλύτερο μέσο διάστημα υποτροπής από ό,τι οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε εικονικό φάρμακο (20,3 μήνες έναντι 12,7) [Studer et al., 1995]. Σε μία πιο πρόσφατη κλινική δοκιμή, η θεραπεία με Keto-atRA σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού υποτροπής και την αύξηση του χρόνου επιβίωσης μέσω της μείωσης των επιπέδων του VEGF και του TGF-α οι οποίοι αποτελούν κύριους αγγειογενετικούς και μιτογόνους παράγοντες (Hameed & el-Metwally, 2008). Té λo_{ζ} , η συνδυαστική χορήγηση cisplatin και atRA σε ασθενείς με υψηλού βαθμού (T1-2) ουροθηλιακό καρκίνωμα αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική από τη μονοθεραπεία με cisplatin καθώς το atRA αναστέλλει τον Oct4 ο οποίος ευνοεί την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην αγωγή (Lu et al., 2016). Αξιοσημείωτα, στο 87,8% των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνωμα το γονίδιο RARB είναι μεθυλιωμένο (Chan et al., 2002). Η μεθυλίωση του RARβ2 μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο βιοδείκτη στα ούρα, καθώς εμφανίζει 68% ευαισθησία—σε σύγκριση με την κυτταρολογία που έχει 46%—και ειδικότητα 76% (Chan et al., 2002).

3.6.3. Μεταλλαγές στο μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Πρόσφατες μελέτες υψηλής απόδοσης (high throughput) ταυτοποίησαν μια μεταλλαγή «θερμού σημείου» (hotspot), την S427, στον υποδοχέα RXRα σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014, Guo et al., 2013, Van Allen et al., 2014) [Εικόνα 30]. Η συχνότητα της μεταλλαγής είναι 5-8%, ανάλογα με τη μελέτη, και οι μεταλλαγές στη θέση S427 αποτελούν πάνω από τις μισές μεταλλαγές (58-100%) που απαντώνται στο γονίδιο *RXRA*. Η σερίνη αντικαθίσταται από φαινυλαλανίνη στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ωστόσο αρκετά συχνή είναι και η αμινοξική αντικατάσταση σε τυροσίνη.



Εικόνα 30: Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών στο γονίδιο RXRA που ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης στις μελέτες υψηλής απόδοσης που αναγράφονται. Αναφέρεται ο αριθμός και το ποσοστό του συνόλου των μεταλλαγών στο RXRA καθώς και ο αριθμός των μεταλλαγών που εντοπίζονται στη θέση S427 για κάθε μελέτη. Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε έναν ασθενή. Απεικονίζονται μόνο οι ασθενείς στους οποίους βρέθηκαν μεταλλαγές στο υπό μελέτη γονίδιο. Όλες αφορούν παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές (missense mutation) [δεδομένα από την πλατφόρμα cBioPortal, Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013].

Με βάση δεδομένα από την πλατφόρμα cBioPortal (Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013), η μεταλλαγή S427 στο γονίδιο *RXRA* έχει ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (Cancer Genome Atlas Research Network, Pancreatic Adenocarcinoma, provisional), ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Cancer Genome Atlas Research Network, Liver Hepatocellular Carcinoma, provisional), σάρκωμα (Cancer Genome Atlas Research Network, Sarcoma, provisional) και αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (Giannakis et al., 2016), ωστόσο τα ποσοστά εμφάνισής της είναι αρκετά μικρότερα από αυτά που απαντώνται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (**Πίνακας 5**). Επίσης, πέρα από την αμινοξική αντικατάσταση από σερίνη σε φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη, παρατηρήθηκε και η μετατροπή σε κυστεΐνη.

Μελέτη	% S427	# S427	# ασθενείς	Αντικατάσταση σε
Pancreatic Adenocarcinoma	0,7%	1	150	F
Liver Hepatocellular Carcinoma	0,5%	2	373	F
Sarcoma	0,4%	1	247	Y
Colorectal Adenocarcinoma	2,4%	15	619	С

Πίνακας 5: Εμφάνιση της μεταλλαγής S427 σε άλλους τύπους καρκίνου

Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόκειται για τη δεύτερη πιο συχνή μεταλλαγή «θερμού σημείου» στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης μετά από τη μεταλλαγή E545K του γονιδίου *PIK3CA* με συχνότητα 10% (Chang et al., 2016), καθώς και για την πιο συχνά απαντώμενη μεταλλαγή του γονιδίου *RXRA* σε όλους τους τύπους καρκίνου (**Εικόνα 31**). Μεταλλαγές στο γονίδιο *RXRA* έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, μεγαλύτερη όμως συχνότητα εμφανίζεται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και ακολουθούν το μελάνωμα, το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, το καρκινοσάρκωμα της μήτρας, το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου (**Εικόνα 32**). Πέρα από τις μεταλλαγές στο *RXRA* σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (9%), μεταλλαγές έχουν ανιχνευτεί και στους υποδοχείς RXRγ (4%), RARa (2%), RARβ (2%) και RARγ (7%), οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις δε συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) [**Εικόνα 33**].



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών που απαντώνται στο γονίδιο του υποδοχέα RXRα σε όλες τις μελέτες και σε όλους τους τύπους καρκίνου (δεδομένα από την πλατφόρμα cBioPortal, Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013).



Εικόνα 32: Διάγραμμα της συχνότητας εμφάνισης μεταλλαγών στο γονίδιο *RXRA* σε όλες τις μελέτες και σε όλους τους τύπους καρκίνου (δεδομένα από την πλατφόρμα cBioPortal, Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013).



Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών στους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος που ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με τη μελέτη του δικτύου TCGA. Αναφέρεται ο αριθμός και το ποσοστό του συνόλου των μεταλλαγών στο *RXRA* καθώς και ο αριθμός των μεταλλαγών που εντοπίζονται στη θέση S427 για κάθε μελέτη. Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε έναν ασθενή.

Απεικονίζονται μόνο οι ασθενείς στους οποίους βρέθηκαν μεταλλαγές στα υπό μελέτη γονίδια. Με πράσινο αναπαρίστανται οι παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές και με μαύρο οι μεταλλαγές που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής του γονιδίου (δεδομένα από την πλατφόρμα cBioPortal, Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013).

3.7. Θεραπεία με ρετινοειδή

3.7.1. Θεραπευτικές εφαρμογές των ρετινοειδών

Στην κλινική πράξη, τα ρετινοειδή χορηγούνται θεραπευτικά σε ένα ευρύ φάσμα δερματικών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της ψωρίασης, των διαταραχών κερατινοποίησης και διαταραχών παρόμοιων με ακμή (acneiform) [Connolly et al., 2013]. Επιπλέον, η συστηματική χορήγηση ρετινοειδών έχει εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του δερματικού Τ-κυτταρικού λεμφώματος (Duvic et al., 2001) και της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (acute promyelocytic leukemia, APL) [Tallman et al., 1997]. Στην πρώτη περίπτωση, οι μισοί περίπου ασθενείς αποκρίνονται στη θεραπεία με bexarotene (Targretin®), το οποίο είναι ένα ρετινοειδές ειδικό για τον υποδοχέα RXR. Όσον αφορά την APL, η χορήγηση atRA βελτιώνει την ελεύθερη νόσου και τη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία, καθώς εμφανίζεται ύφεση της νόσου στο 70% των ασθενών. Το θεραπευτικό αυτό σχήμα βασίζεται στην ικανότητα του atRA να επάγει διαφοροποίηση και αναστολή αύξησης στα προμυελοκυτταρικά λευχαιμικά κύτταρα ασθενών που φέρουν τη χρωμοσωμική μετατόπιση PML/RARα. Επιπρόσθετα, η χορήγηση 9-*cis* RA έχει εγκριθεί για την τοπική θεραπεία των δερματικών βλαβών στο σάρκωμα του Kaposi.

Πλήθος επιδημιολογικών και πειραματικών μελετών έχει δείξει ότι τα ρετινοειδή μπορούν να ελαττώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου καθώς αναστέλλουν την εξέλιξη από το προνεοπλασματικό στο νεοπλασματικό στάδιο. Τα κλασικά ρετινοειδή είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία τριών προκαρκινικών βλαβών—της λευκοπλακίας, της ακτινικής κεράτωσης και της δυσπλασίας της μήτρας—και μπορούν να καθυστερήσουν την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος σε ασθενείς με μελαγχρωματική ξηροδερμία. Επίσης, τα ρετινοειδή συμβάλλουν στη μείωση των δευτερογενών όγκων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, του ήπατος και κεφαλής και τραχήλου. Επιπλέον, το RA επάγει διαφοροποίηση και αναστολή πολλαπλασιασμού σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος και η θεραπεία με 13-*cis* RA αυξάνει την επιβίωση παιδιών με νευροβλάστωμα μέσω της καταστολής καρκινικών κυττάρων που παραμένουν έπειτα από χημειοθεραπεία (Matthay et al., 1999).

Πολυάριθμες προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν επιστρατεύσει τα ρετινοειδή—RA αλλά και νέα, συνθετικά ρετινοειδή—, μόνα ή σε συνδυαστικά θεραπευτικά σχήματα, για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών, του νεφρού, της κεφαλής και του τραχήλου, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη και του μελανώματος. Δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο αν τα ρετινοειδή προωθούν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικό θάνατο, κυτταρική διαφοροποίηση ή όλους αυτούς τους μηχανισμούς ως ένα βαθμό σε αυτές τις αντικαρκινικές θεραπευτικές αγωγές, όμως έχουν παρατηρηθεί θετικά αποτελέσματα. Ωστόσο, η απόκριση στα ρετινοειδή περιορίζεται σε μικρό ποσοστό των ασθενών λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

Οι κλινικές δοκιμές που αφορούν τη φαρμακευτική χορήγηση ρετινοειδών σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα έχουν παρουσιάσει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ειδικότερα, μία μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση 9-*cis* RA σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για καρκίνο του πνεύμονα οδήγησε σε αποκατάσταση της έκφρασης του *RARB* και μείωση της μεταπλασίας (Kurie et al., 2003), ενώ άλλες έδειξαν ότι δεν προκύπτει κάποιο όφελος από τη χορήγηση ρετινοειδών. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στο ότι πρόσφατα βρέθηκε πως ο RARβ ασκεί διττό ρόλο στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα προωθώντας ή αναστέλλοντας την αύξηση (Pappas et al., 2011). Όσον αφορά την ικανότητα των ρετινοειδών να ενισχύουν την κυτταροτοξικότητα που επάγεται από τη χημειοθεραπεία, τυχαιοποιημένη μελέτη σταδίου ΙΙΙ σε ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα έδειξε ότι ο ρυθμός απόκρισης καθώς και η επιβίωση ελεύθερη εξέλιξης νόσου εμφανίζονται σημαντικά βελτιωμένοι σε ασθενείς που έλαβαν atRA μαζί με cisplatin και paclitaxel σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους χορηγήθηκε μόνο χημειοθεραπεία (Arrieta et al., 2010).

Επιπρόσθετα, ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχουν προκύψει από μία δοκιμή φάσης ΙΙΙ για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού όπου η χορήγηση fenretinide παρουσίασε πολύ ισχυρή τάση μείωσης της εμφάνισης δευτερευόντων νεοπλασιών του μαστού σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, το οποίο επιβεβαιώθηκε και σε επαναληπτική εξέταση 15 χρόνια μετά (Bonnani et al., 2009). Από την άλλη, κλινικές δοκιμές της χορήγησης ρετινοειδών ως μονοθεραπεία του μετασταστικού καρκίνου του μαστού δεν οδήγησαν σε υποσχόμενα αποτελέσματα.

77

Επίσης, πρώιμα θετικά αποτελέσματα που αφορούν τη χορήγηση ρετινοειδών μόνα ή σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά σχήματα έχουν αναφερθεί στις λεμφοειδείς κακοήθειες, το μεταστατικό νεφρικό καρκίνωμα, τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, τον καρκίνο του θυρεοειδούς, το γλοιοβλάστωμα και τον ορμονοανθεκτικό καρκίνο του προστάτη.

Τέλος, μελετάται η χρήση ρετινοειδών ειδικών για τον υποδοχέα RXR τα οποία ενεργοποιούν επιλεκτικά συγκεκριμένα ετεροδιμερή ως θεραπευτικών στόχων έναντι μεταβολικών ασθενειών, στις οποίες τα μονοπάτια μέσω των υποδοχέων PPAR και LXR παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο.

3.7.2. Μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη θεραπεία με ρετινοειδή

Παρόλο που η χορήγηση φαρμακολογικής δόσης ρετινοειδών έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη θεραπεία ορισμένων αιματολογικών κακοηθειών, οι κλινικές δοκιμές που αφορούν στην πρόληψη και τη θεραπεία συμπαγών όγκων δεν έχουν αποφέρει ανάλογη επιτυχία μέχρι τώρα. Η έλλειψη ενός αξιόπιστου βιοδείκτη απόκρισης στη θεραπεία αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον οποίο οφείλεται αυτή η αποτυχία.

Κατ' αρχάς, η επιγενετική αποσιώπηση του *RARβ* αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη θεραπεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές, δεν είχε προηγηθεί εξέταση της κατάστασης του *RARβ*. Συνεπώς, η χορήγηση επιγενετικών τροποποιητών όπως π.χ. αναστολέων HDAC σε συνδυασμό με ρετινοειδή με στόχο την επανενεργοποίηση του υποδοχέα RARβ σε όγκους όπου η έκφρασή του έχει χαθεί ίσως είναι απαραίτητη για την αναστολή της αύξησης, Έχει δειχθεί ότι η συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα HDAC entinostat, atRA και χαμηλής δόσης χημειοθεραπείας παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναστολή αύξησης σε καρκινικά κύτταρα *in vitro* και σε ξενομοσχεύματα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού *in vivo* (Nguyen et al., 2010).

Εναλλακτικό μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη θεραπεία αποτελεί η παρουσία καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Και σε αυτή την περίπτωση, η χορήγηση αναστολέων HDAC παράλληλα με ρετινοειδή και κλασική χημειοθεραπεία μπορεί να αποβεί ωφέλιμη, καθώς οι HDAC διαθέτουν την ικανότητα επαγωγής διαφοροποίησης στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα η οποία μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Επιπρόσθετα, η απώλεια έκφρασης του υποδοχέα RARβ μπορεί να συμβεί και μέσω άλλων μηχανισμών πέραν της επιγενετικής ρύθμισης όπως π.χ. η απώλεια συνενεργοποιητών, ο αυξημένος μεταβολισμός του RA, η μειωμένη διαθεσιμότητά του ή η ανεπαρκής σηματοδότηση μέσω RARα. Προς αυτή την κατεύθυνση, μελετώνται καινοτόμοι αναστολείς του μεταβολισμού του RA (retinoic acid metabolism blocking agents, RAMBA).

Τέλος, η δράση των ρετινοϊκών οξέων μέσω μη κλασικών μονοπατιών πιθανότατα παρέχει την ευκαιρία στα καρκινικά κύτταρα να αναπτύξουν ανθεκτικότητα έναντι στη θεραπεία με ρετινοϊκά οξέα.

Β. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch στη φυσιολογική ανάπτυξη και τον καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος. Η αρχική παρατήρηση ότι η έλλειψη της Nicastrin—που έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch—οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων στον ουρητήρα των γενετικά τροποποιημένων ποντικιών αποτέλεσε τη βάση για το σχηματισμό της υπόθεσης ότι η σηματοδότηση μέσω Notch ασκεί ογκοκατασταλτική δράση στο ουροθήλιο. Αρχικά, μελετήσαμε την κατάσταση ενεργοποίησης του μονοπατιού στο φυσιολογικό ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού και στη συνέχεια ασχοληθήκαμε με τον ανοσοϊστοχημικό και μοριακό χαρακτηρισμό των όγκων του ουρητήρα. Επιπλέον, εξετάσαμε αν η έκφραση του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch1 είναι ικανή να αναστείλει την ογκογένεση. Το επόμενο βήμα μας ήταν η δημιουργία ενός διαγονιδιακού ποντικιού που εκφράζει τη ρεκομπινάση Cre υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ουροπλακίνης ΙΙ (UpII-Cre) και η μελέτη της επίδρασης της απενεργοποίησης του μονοπατιού Notch ειδικά στο ουροθήλιο. Στη συνέχεια, διερευνήσαμε το ρόλο κάθε υποδοχέα Notch ξεχωριστά, καθώς και την αλληλεπίδραση του μονοπατιού Notch με άλλα μονοπάτια που συμμετέχουν στην ογκογένεση στην ουροδόχο κύστη του ποντικιού.

Σειρά είχε η αποσαφήνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου το μονοπάτι Notch δρα ογκοκατασταλτικά στο ουροποιητικό σύστημα. Έτσι, μελετήσαμε την επίδραση της υπερέκφρασης των υποδοχέων Notch στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών σειρών, τη γονιδιακή έκφραση και την κατάσταση φωσφορυλίωσης της ERK1/2. Έπειτα, εξετάσαμε αν ο μηχανισμός που ταυτοποιήσαμε *in vitro* έχει ισχύ και *in vivo* σε ποντίκια αλλά και σε κυτταρικές σειρές άλλων τύπων καρκίνου.

Το επόμενο ερώτημα που μας απασχόλησε ήταν αν τα ευρήματα στο ποντίκι μεταφράζονται στον άνθρωπο. Συνεπώς, αφού αρχικά εξετάσαμε την κατάσταση ενεργοποίησης του μονοπατιού στο φυσιολογικό ανθρώπινο ουροθήλιο, πραγματοποιήσαμε αλληλούχηση σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης με στόχο να διαπιστώσουμε αν ανιχνεύονται μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού Notch ή μεταβολή του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *NOTCH1*. Ακολούθησε λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγές στα *FGFR3*, RAS και *PIK3CA*.

Τέλος, πλήθος στοιχείων υποδεικνύει τη συμμετοχή του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος στη φυσιολογική ανάπτυξη και την ογκογένεση στο ουροποιητικό σύστημα και επομένως στραφήκαμε στη μελέτη της υπόθεσης ότι η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος δρα ογκοκατασταλτικά στην ουροδόχο κύστη. Δεδομένου ότι έχει αναφερθεί η μεταλλαγή «θερμού σημείου» S427F/Y στον υποδοχέα RXRa σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ασχοληθήκαμε με το λειτουργικό χαρακτηρισμό της. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε την επίδραση της μεταλλαγής στη μεταγραφική ικανότητα και τη δομή του υποδοχέα. Επιπλέον, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος με το μονοπάτι Notch. Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την έκφραση του υποδοχέα RXRa στο φυσιολογικό ουροθήλιο του ποντικιού και την επίδραση της ελλειψής του στην ογκογένεση. Συνολικά, λοιπόν, στόχος μας ήταν η ανακάλυψη νέων σηματοδοτικών μορίων με ρόλο-κλειδί στην καρκινογένεση του ουροθηλίου και η

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ανθρώπινα δείγματα

Λήφθηκαν δείγματα ιστού ουροδόχου κύστης από 72 ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης στους οποίους είχε πραγματοποιηθεί διουρηθρική χειρουργική αφαίρεση όγκου κύστης για πρωτοπαθή μη μυοδιηθητικό καρκίνο ουροδόγου κύστης (Ta, T1) ή ριζική κυστεκτομή για πρωτοπαθή μυοδιηθητικό καρκίνο ουροδόχου κύστης (T2-T4) στο Λαϊκό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών στην Ελλάδα (Παράρτημα II, Supplementary Table 1). Επιπλέον, συμπεριλήφθηκε στη μελέτη φυσιολογικός παρακείμενος ιστός από κάθε ασθενή ως δείγμα αναφοράς έπειτα από αξιολόγηση παθολογοανατόμου για απουσία καρκινώματος in situ (CIS) και δυσπλασίας. Όλοι οι ασθενείς διαγνώσθηκαν με ουροθηλιακό καρκίνωμα με βάση ιστοπαθολογικά κριτήρια και κανείς από αυτούς δεν είχε λάβει θεραπεία πριν τη χειρουργική επέμβαση. Έπειτα από την αξιολόγηση του παθολογοανατόμου του δείγματος ιστού-ειδώλου, τα δείγματα καταψύχθηκαν απευθείας σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι να χρειαστεί περαιτέρω επεξεργασία. Ασθενείς που είγαν λάβει ορμονοθεραπεία ή ραδιοθεραπεία πριν την επέμβαση δε συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Κανένα άλλο κριτήριο ένταξης ή αποκλεισμού δεν χρησιμοποιήθηκε πέρα από την ποιότητα του ιστού μετά την απόψυξη. Η μελέτη μας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα Πρότυπα Ηθικής της Διακήρυξης του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκαν το 2008, και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Ηθικής του Λαϊκού Γενικού Νοσοκομείου. Εμπεριστατωμένη συναίνεση δόθηκε από όλους τους συμμετέγοντες ασθενείς.

2. Ποντίκια

Τα πειραματόζωα στεγάστηκαν σε αυτόνομα εξαεριζόμενους κλωβούς σε συνθήκες ελεύθερες ειδικών παθογόνων (Specific Pathogen Free, SPF) σε πλήρη συμμόρφωση με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Εταιρειών Ζώων Εργαστηρίου (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA) στη στη Μονάδα Ζωϊκών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA, Ελλάδα). Η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος διατηρούνταν σταθερές και η εναλλαγή ημέρας και νύχτας ήταν προγραμματισμένη ανά 12 ώρες. Η πρόσβαση σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη.

Όλες οι διαδικασίες για τη φροντίδα και τη θεραπεία των πειραματοζώων εγκρίθηκαν από τη Θεσμική Επιτροπή για την Ηθική των Πειραμάτων σε Ζώα και το ελληνικό Υπουργείο Γεωργίας. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια μικτής γενεαλογίας και των δύο φύλων ηλικίας από έμβρυα ως ενός έτους. Κανένα από τα ποντίκια με τον κατάλληλο γονότυπο δεν αποκλείστηκε από τη μελέτη. Η ιστολογική ανάλυση των όγκων των ποντικιών πραγματοποιήθηκε από παθολογανατόμο και ήταν τυφλή.

Η χορήγηση δοξυκυκλίνης (Doxycycline hyclate, #D9891, Sigma-Aldrich) στα πειραματόζωα έγινε μέσω προσθήκης της στο πόσιμο νερό τους σε συγκέντρωση 2 mg/ml και διήρκεσε 7 ημέρες. Η χορήγηση Tamoxifen (Sigma-Aldrich) σε δόση 10 mg/ml σε καλαμποκέλαιο (Sigma-Aldrich) έγινε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση για 5 συνεχόμενες ημέρες. Η χημική καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη πραγματοποιήθηκε μέσω προσθήκης 0,05% Ν-βουτυλ-Ν- (4-υδροξυβουτυλ)νιτροζαμίνης (BBN, #B8061, Sigma-Aldrich) στο πόσιμο νερό για χρονικό διάστημα μέχρι και 6 μηνών.

3. Κυτταροκαλλιέργειες

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, καθώς και τα πρωτογενή κύτταρα ποντικιού, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Pen/Strep, Gibco). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με χρήση Trypsin-0,05% EDTA (Gibco).

4. Μοριακή κλωνοποίηση

4.1. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Τα εκάστοτε ενθέματα (insert) απομονώθηκαν είτε μέσω πέψης με περιοριστικά ένζυμα από πλασμιδιακές κατασκευές είτε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών. Στην πρώτη περίπτωση, ο φορέας και τα ενθέματα υφίστανται πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (NEB), έτσι ώστε να αποκτήσουν συμβατά άκρα. Μετά την πέψη (30 λεπτά – 3 ώρες), ακολουθεί απενεργοποίηση των ενζύμων μέσω θέρμανσης στους 65 °C για 20 λεπτά. Αν θέλουμε τα κολλώδη άκρα να γίνουν λεία, πραγματοποιούμε αντίδραση γεμίσματος (fill-in) με την T4 DNA πολυμεράση (#M0203, NEB). Στη δεύτερη περίπτωση, η PCR πραγματοποιείται με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Q5 high-fidelity polymerase, #M0491, NEB), για την αποφυγή λαθών, πράγμα το οποίο επιβεβαιώνεται στη συνέχεια με αλληλούχηση. Στη συνέχεια, ακολουθούν πέψεις όπως και στην πρώτη περίπτωση.

4.2. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Στη συνέχεια, πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1% αγαρόζης (AppliChem) με σκοπό τον καθαρισμό του δείγματος από άλατα και ένζυμα (gel extraction) με τη χρήση του kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

4.3. Αντίδραση συνένωσης

Στην αντίδραση συνένωσης (ligation) χρησιμοποιούμε τις κατάλληλες ποσότητες φορέα και ενθέματος έτσι ώστε να έχουμε τον επιθυμητό λόγο των μεγεθών τους. Επίσης, εκτελούμε και μία αντίδραση αυτο-συνένωσης (self-ligation), στην οποία δεν προσθέτουμε ένθεμα, για να εκτιμήσουμε στη συνέχεια τον αριθμό των αποικιών που προκύπτουν από τη συνένωση των άκρων του φορέα χωρίς την πρόσληψη ενθέματος (Πίνακας 1). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 16 °C (30 λεπτά – ολονύκτια).

	Συνένωση	Αυτο-συνένωση
Φορέας	x μl	x μl
Ένθεμα	y µl	-
Τ4 λιγάση (ΝΕΒ)	0,5 μl	0,5 µl
Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10x	1,5 μl	1,5 µl
dH ₂ O	(15-x-y) μl	(15-x) µl
Σύνολο	15 μl	15 µl

Πίνακας 1: Α	Αντίδραση	συνένωσης
--------------	-----------	-----------

4.4. Δημιουργία δεκτικών στελεχών Ε. Coli

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *Ε. Coli* NM522 ή DH5α. Για τη δημιουργία δεκτικών στελεχών ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας σε 100 ml LB (Luria Broth).
- Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση στις 230 στροφές ανά λεπτό (revolutions per minute, rpm) μέχρι να η OD_{600nm} να γίνει ~0,4 (εκθετική φάση).
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Συλλέγουμε τα βακτήρια με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 12 ml φρέσκου και παγωμένου 0,1 M CaCl₂ (Fisher Scientific).
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C.
- Επαναδιαλύουμε σε 4 ml CaCl₂ 0,1 M και προσθέτουμε γλυκερόλη (Carlo Erba) σε τελική συγκέντρωση 15%.
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Αποθήκευση στους -80 °C.

<u>Βακτηριακό μέσο αύξησης LB</u>

5 g/L yeast extract (Fluka)

10 g/L NaCl (Sigma-Aldrich)

10 g/L tryptone extract (Fluka)

4.5. Μετασχηματισμός δεκτικών στελεχών E.coli

- Αφού αποψύξουμε ένα σωλήνα eppendorf με χημειοδεκτικά βακτήρια *E.coli* στον πάγο, προσθέτουμε το πλασμίδιο της επιλογής μας.
- Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Στη συνέχεια, μεταφέρουμε το σωλήνα eppendorf για 45 δευτερόλεπτα στους 42 °C (θερμικό σοκ).
- Έπειτα, επωάζουμε για 2 λεπτά στον πάγο.

- Προσθέτουμε LB (Luria Broth).
- Έπεται επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση.
- Τέλος, επιστρώνουμε τα βακτήρια σε τρυβλίο με ανθεκτικότητα σε κατάλληλο αντιβιοτικό.

<u>LB άγαρ</u>

LB

14 g/L άγαρ (AppliChem)

4.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (Maxi prep) πραγματοποιείται με τη χρήση του αντίστοιχου kit (Plasmid purification maxi kit) της QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5. Ιστολογία

5.1. Μονιμοποίηση ιστού

Έπειτα από την απομόνωση ιστού από ένα πειραματόζωο, είναι απαραίτητη η μονιμοποίησή του. Εάν πρόκειται να ακολουθήσει έγκλειση σε παραφίνη, τοποθετούμε τον ιστό σε διάλυμα 10% φορμόλης (37-40% φορμαλδεΰδη [Formaldehyde, Fischer Scientific]) ολονύκτια και έπειτα τον μεταφέρουμε σε 70% αιθανόλη (Ethanol absolute, Fischer Scientific). Για έγκλειση σε κρυοπροστατευτικό μέσο OCT (Optimal Cutting Temperature compound), ακολουθούμε διαφορετική διαδικασία: μονιμοποιούμε σε 4% παραφορμαλδεΰδη (Paraformaldehyde, PFA, Sigma-Aldrich) για 2 ώρες, πραγματοποιούμε 4 εκπλύσεις των 15 λεπτών με PBS και αφήνουμε ολονύκτια σε σουκρόζη (Fischer Scientific).

<u>PBS 10x</u>1,37 M NaCl (Sigma-Aldrich)27 mM KCl (Mallinckrodt)

100 mM Na₂HPO₄ (AppliChem)20 mM KH₂PO₄ (Fischer Scientific)

5.2. Έγκλειση ιστού και λήψη τομών

5.2.1. Τομές παραφίνης

Η έγκλειση ιστού σε παραφίνη, όπως και η λήψη τομών σε μικροτόμο (Leica RM 2125) και η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Ιστοχημείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, σύμφωνα με τα πρότυπα πρωτόκολλα. Οι ιστοί παραδόθηκαν σε ειδικά εκμαγεία εμποτισμένα σε 70% αιθανόλη.

5.2.2. Κρυοτομές

Μετά τη μονιμοποίηση, ο ιστός τοποθετείται σε εκμαγείο όπου καλύπτεται με μέσο έγκλεισης OCT (Tissue-Tek, Sakura). Το OCT είναι ένας σχηματισμός υδατοδιαλυτών γλυκολών και ρητινών που παρέχει μία κατάλληλη μήτρα για τη λήψη κρυοτομών σε θερμοκρασίες από -10 °C και κάτω. Το εκμαγείο τοποθετείται στους -80 °C. Όταν στερεοποιηθεί, μπορεί να πραγματοποιηθεί η λήψη τομών σε κρυοτόμο (Leica CM 1950) στο επιθυμητό πάχος (5-10 μm). Χρησιμοποιούμε αντικειμενοφόρους πλάκες κατάλληλες για κρυοτομές (Superfrost slides) και αποθηκεύουμε τα δείγματά μας στους -80 °C.

5.3. Χρώση με αντίσωμα

5.3.1. Ανοσοφθορισμός

Ένα τυπικό πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού έχει ως εξής:

 Αν έχουμε κρυοτομές, φέρνουμε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου και τις εμποτίζουμε σε PBS για 5 λεπτά για να ενυδατωθούν και να καθαριστούν από το OCT. Αν έχουμε τομές παραφίνης, ακολουθούμε τα πρότυπα πρωτόκολλα για την αποπαραφίνωση και αφυδάτωση του ιστού.

- Για μερικά αντισώματα, χρειάζεται να πραγματοποιήσουμε ανάκτηση των αντιγόνων (antigen retrieval), η οποία επιτυγχάνεται με θέρμανση των πλακών στους 80 °C σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (10mM Sodium Citrate, 0,05% Tween 20, pH 6,0 [Carlos Erba]) για 20 λεπτά.
- Επωάζουμε σε διάλυμα κάλυψης (blocking solution) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε το πρωτοταγές αντίσωμα σε διάλυμα κάλυψης στην κατάλληλη αραίωση και επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4 °C. Οι συνθήκες επώασης εξαρτώνται από το εκάστοτε αντίσωμα (Πίνακας 2). Για τη χρώση έναντι του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch1 (N1ic), χρησιμοποιήθηκε το Tyramide Signal Amplification kit (TSA Cyanine 3, Perkin Elmer) για την ενίσχυση του σήματος.
- Στη συνέχεια, πραγματοποιούμε 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με PBS.
- Προσθέτουμε το δευτεροταγές αντίσωμα (IgG έναντι του ζώου στο οποίο παράχθηκε το πρωτοταγές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα, Jackson Immunoresearch/ BioLegend, αραίωση 1:500) σε διάλυμα κάλυψης στην κατάλληλη αραίωση και επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με PBS.
- Προσθέτουμε 1 μg/ml DAPI (AppliChem) και επωάζουμε για 5 λεπτά στο σκοτάδι.
- Εκπλένουμε σε PBS για 1 λεπτό.
- Μονιμοποιούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα απλώνοντας με την καλυπτρίδα μία σταγόνα Vectashield (Vector). Η πλάκα είναι έτοιμη προς παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης	Κωδικός	Εταιρεία	Ζώο στο οποίο παράχθηκε	Αραίωση
CK5	PRB-160P	Covance	rabbit	1:500
CK5	905501	BioLegend	rabbit	1:500
Pankeratin	Z0622	DAKO	rabbit	1:250
N1ic	4147	Cell Signaling	rabbit	1:100
Notch1	3608	Cell Signaling	rabbit	1:150
Notch2	4530	Cell Signaling	rabbit	1:150
Jag1	sc-8303	Santa Cruz	rabbit	1:150
CK14	sc-17104	Santa Cruz	goat	1:250
CK14	906001	BioLegend	chicken	1:250
UpIII	sc-15186	Santa Cruz	rabbit	1:500
CK10	GP-K10	Progen Biotechnik	guinea pig	1:200
Ki67	ab15580	Abcam	rabbit	1:150
RXRa	sc-553	Santa Cruz	rabbit	1:500

Πίνακας 2: Πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού

Διάλυμα κάλυψης

PBS

1% BSA (Albumin Fraction V, AppliChem)

0,1% Triton X-100 (Fischer Scientific)

5.3.2. Ανοσοϊστοχημεία

Ακολουθούμε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού με κάποιες τροποποιήσεις. Προστίθεται ένα βήμα επώασης με 0,3% H₂O₂ για 20 λεπτά στο σκοτάδι για να παρεμποδιστεί η ενδογενής υπεροξειδάση πριν ή μετά την επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα (**Πίνακας 3**). Μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP) [Jackson Immunoresearch/ Cell Signaling, αραίωση 1:5000], προστίθεται το διάλυμα του υποστρώματος DAB-Υπεροξειδάσης (Vector) στις τομές σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ακολουθεί επώαση μέχρι να παρατηρήσουμε την εμφάνιση χαρακτηριστικού καφέ χρώματος (brown staining). Τότε σταματάμε την αντίδραση με νερό βρύσης. Ακολουθεί αφυδάτωση των ιστών και έγκλειση σε DPX (VWR). Οι πλάκες παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης	Κωδικός	Εταιρεία	Ζώο στο οποίο παράχθηκε	Αραίωση
pErk1/2	4376	Cell Signaling	rabbit	1:150
cyclin D1	IR083	DAKO	rabbit	1:150
Ki67	ab15580	Abcam	rabbit	1:150
Pankeratin	Z0622	DAKO	rabbit	1:150
CK5	PRB-160P	Covance	rabbit	1:500
p63	NCL-p63	Novocastra	mouse	1:250
RXRa	sc-553	Santa Cruz	rabbit	1:500

Πίνακας 3: Πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας

5.4. Χρώση με X-gal

Αφού ενυδατώσουμε την τομή, αρχικά πραγματοποιούμε 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με το Wash buffer. Στη συνέχεια, προεπωάζουμε τις τομές με το X-gal buffer, στο οποίο δεν έχει προστεθεί το X-gal, για μισή ώρα στους 37 °C. Τέλος, προσθέτουμε 1 mg/ml X-gal και επωάζουμε μέχρι να εμφανιστεί το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα (μισή ώρα-ολονύκτια).

<u>Wash buffer</u> 0,02% NP-40 (AppliChem) 0,01% δεοξυχολικό νάτριο (Fischer Scientific) 2 mM MgCl₂ (Fischer Scientific) σε PBS

<u>X-gal buffer</u>
5 mM K₃Fe(CN₆) (Sigma-Aldrich)
5 mM K₄Fe(CN₆)*3H₂0 (Sigma-Aldrich)
1 mg/ml X-gal (AppliChem)
σε Wash buffer

6. Μικροσκοπία

Η παρατήρηση των χρώσεων σε τομές ιστών και η λήψη φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Βιοαπεικόνισης του ΙΙΒΕΑΑ σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 σε ανάστροφο μικροσκόπιο DMI6000, σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού Leica DM IRE2, σε ορθό μικροσκόπιο φθορισμού Leica DM RA2 και σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DM LS2. Χρησιμοποιήθηκε η μονόχρωμη κάμερα Leica DFC 350 FX (1,3 Mpixel) και η έγχρωμη κάμερα Leica DFC 500 (12 Mpixel). Για την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό της Leica LAS AF.

7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε με Ταq πολυμεράση από την Kapa και dNTPs από την Invitrogen σύμφωνα με τα πρότυπα πρωτόκολλα στα μηχανήματα της Applied Biosystems 2720 και Thermal Cycler Gene Amp PCR System 9700. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση των ποντικιών παραθέτονται παρακάτω (Πίνακας 4).

Εκκινητής	Προϊόν	Αλληλουχία
Cre 1	Cre	CTGCCACGACCAAGTGACAGC
Cre 2		CTTCTCTACACCTGCGGTGCT
UP2B F	UroplakinII	CTCAGGCTACAGTGCCCA
Cre R	-	GCTAAGTGCCTTCTCTACACC
ROSA 1	Rosa26	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
ROSA 2		GCGAAGAGTTTGTCCTCAACC
ROSA 3		GGAGCGGGAGAAATGGATATG
TmWT F	Tomato	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA
TmWT R		CCGAAAATCTGTGGGAAGTC
TmMT F		GGCATTAAAGCAGCGTATCC
TmMT R		CTGTTCCTGTACGGCATGG
Ncstn F6	Nicastrin	GTCCCTCTGCAGCATACTTTAGGTATC
Ncstn F7		GACTAATCGTTACTCCAGGGGCAG
Ncstn R4		AGCTGGAACAGCAGAAGATAGGAAAG
Cbf F1	Cbf1	GTTCTTAACCTGTTGGTCGGAAAC
Cbf R1		GCTTGAGGCTTGATGTTCTGTATTGC
Cbf R2		GCGGGGCTGCTAAAGCGCATGCTCC
hN1ic 1	Notch1 (ic)	AAGGCACGGAGGAAGAAGTC
hN1ic 2		CGCATTGACCATTCAAACTG
N1 F	Notch1	CTGAGGCCTAGAGCCTTGAA
N1 R		CTCGGAATCCCACTGCTTAC
N2 F	Notch2	GCTCAGCTAGAGTGTTGTTCTTG
N2 R		TTTGTGGCCGTAACTTTCTCATG
N3 F	Notch3	GGGGTACCTGCTTCAACCTA
N3 R1		AAGAAAAGGGCCACTCACCT
N3 R2		CTTCCATTTGTCACGTCCTG
N1 F	Notch1 (rec)	CTGAGGCCTAGAGCCTTGAA
N1 Rev3		CCCACGCCATCTTAAAGAGC
N2 F	Notch2 (rec)	GCTCAGCTAGAGTGTTGTTCTTG
N2 Rev3		GAGCCTTTTCCCCATATTCC
LSL116	Kras G12V	TCCGAATTCAGTGACTACAGATG
LSL117		CTAGCCACCATGGCTTGAGT
LoxP F	PI3K E545K	CTTCGTATAATGTATGCTATACGA
9Rec R		CCACTTCTTGGCCCTGGTGAGAA
p53 1	p53	GAGACGCTGAGTCCGGTTCCCTCC
p53 2		GCAAGAGGTGACTTTGGGGTGAAGCTC
RXRa F2	RXRα	GGGAGGCTCATGAGATAAGG
RXRa R2		GTAGGCTAACAGGTAACCCT
RXRa F2	RXRa (rec)	GGGAGGCTCATGAGATAAGG
RXRa R3		GTCACCTGGACTTGTCACCT

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση των πειραματοζώων

rec: recombined, προϊόν ανασυνδυασμού, ic: intracellular, ενδοκυτταρικό τμήμα.

8. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση RNA από κύτταρα που αναπτύσσονται σε μονή στιβάδα ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα:

- Εκπλένουμε τα κύτταρα με PBS, τα συλλέγουμε και τα φυγοκεντρούμε στις 1500 rpm για 5 λεπτά.
- Αναδιαλύουμε τα κύτταρα στον κατάλληλο όγκο (1 ml/τρυβλίο 100mm²) αντιδραστηρίου Trizol (Tri Reagent, MRC) και επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 0,2 ml χλωροφόρμιο (AppliChem)/1 ml Trizol και, έπειτα από έντονη ανάδευση των δειγμάτων και 2-3 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, τα φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 2-8 °C.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, το μίγμα διαχωρίζεται στην κάτω κόκκινη φάση φαινόληςχλωροφορμίου, τη μεσόφαση και την πάνω άχρωμη υδατική φάση στην οποία βρίσκεται το RNA. Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf.
- Προσθέτουμε 0,5 ml ισοπροπανόλης/1ml Trizol, αναδεύουμε ισχυρά, επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml 70% αιθανόλης/1 ml Trizol και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C.
- Αφού το ίζημα αποξηρανθεί στον αέρα, το αναδιαλύουμε σε νερό απαλλαγμένο από RNάσες (RNase-free water, QIAGEN).

Για την απομόνωση RNA από ιστό, προηγείται ένα βήμα ομογενοποίησης σε Trizol στον πάγο και στη συνέχεια ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία.

9. Αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription) πραγματοποιήθηκε με την αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Invitrogen) ή την Superscript II (Invitrogen) και oligo-dT (σε δείγματα από όγκους) ή τυχαίους εκκινητές (σε κυτταρικές σειρές και δείγματα ποντικιού) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
10. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Οι αντιδράσεις ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time qPCR) πραγματοποιήθηκαν στο 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ή στο LightCycler®96 (Roche) και χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο λογισμικό. Το μίγμα της αντίδρασης των 10μl περιλαμβάνει το Kapa SYBR Fast Universal 2× qPCR Master Mix (Kapa Biosystems). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου σχετικής ποσοτικοποίησης 2-ΔΔCT (Livak & Schmittgen, 2001). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο αντίγραφα για κάθε δείγμα που εξετάστηκε και υπολογίστηκε το μέσο CT για την ποσοτική ανάλυση. Ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *HPRT1*, το *GAPDH* ή το *ACTB* (β-ακτίνη). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις Real-time qPCR για την ποσοτικοποίηση cDNA ανθρώπου και ποντικιού παραθέτονται παρακάτω (**Πίνακας 5, 6**).

Εκκινητής	Αλληλουχία
hHES1 F	CCTGTCATCCCCGTCTACAC
hHES1 R	CACATGGAGTCCGCCGTAA
hHEY1 F	GGGAGGGGAACTATATTGAATTTT
hHEY1 R	ATTTGTGAATTTGAGATCCGTGT
hHEY2 F	TTGAAGATGCTTCAGGCAACAGGG
hHEY2 R	TCAGGTACCGCGCAACTTCTGTTA
hDUSP1.1	CAACGAGGCCATTGACTTCATAG
hDUSP1.2	CAAACACCCTTCCTCCAGCA
hDUSP2.1	AAAACCAGCCGCTCCGAC
hDUSP2.2	CCAGGAACAGGTAGGGCAAG
hDUSP3.1	GCGCTTACTTTGAAAGGGCTG
hDUSP3.2	TGCCGCATCATGAGGTAG
hDUSP4.1	CTGGTTCATGGAAGCCATAGAGT
hDUSP4.2	CGCCCACGGCAGTCC
hDUSP5.1	CCGCGGGTCTACTTCCTC
hDUSP5.2	GGGTTTTACATCCACGCAACA
hDUSP6.1	CTGCCGGGCGTTCTACCT
hDUSP6.2	CCAGCCAAGCAATGTACCAAG
hDUSP7.1	GTGCTCGGCCTGCTCCT
	Eκκινητής hHES1 F hHES1 R hHEY1 F hHEY1 R hHEY2 F hHEY2 R hDUSP1.1 hDUSP1.2 hDUSP2.1 hDUSP2.2 hDUSP3.1 hDUSP3.2 hDUSP3.1 hDUSP3.2 hDUSP4.1 hDUSP4.2 hDUSP4.1 hDUSP5.1 hDUSP5.1 hDUSP5.1 hDUSP5.1 hDUSP5.2 hDUSP5.1

Πίνακας 5: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις Real-time qPCR για την ποσοτικοποίηση ανθρώπινων cDNA

hDUSP7.2	GAAGAGCTGTCCACGTTGGTC		
hDUSP8.1	GCATCCTGCCTCACCTCTACC		
hDUSP8.2	CCATTTTGCGTCATCAGATCC		
hDUSP9.1	CTGCTGCAGAAGCTGCGA		
hDUSP9.2	CCTGGAATCTGCTGAAGCCT		
hDUSP10.1	GCCAGCCACTGACAGCAA		
hDUSP10.2	TCCCACACTGGTGAGCTTCC		
hDUSP11.1	AAGACTATCTCCCAGTTGGACAGC		
hDUSP11.2	GGAAAAGCATTCTTCTGGAGCA		
hDUSP12.1	TGGAATCTGCTTTGTTGGGAG		
hDUSP12.2	GAAGGAACCCAACTTGGCACT		
hDUSP13.1	CACACTGAACCATATCGATGAGG		
hDUSP13.2	AGCTGGATCAGCTTGCTCTTG		
hDUSP14.1	GATCCGGACCCAGGCAG		
hDUSP14.2	GGCGGCAAGACCAGAGTG		
hDUSP15.1	CTATCCATGAGTCACCCCAGC		
hDUSP15.2	GTGCTTTTTGATGGGTACCTCAG		
hDUSP16.1	TCACTGTACTTCTGGGTAAACTGGAG		
hDUSP16.2	AAGGCTGAGAAATGCAGGTAGG		
hDUSP18.1	CTCTCCCGAAGAACCTTGCC		
hDUSP18.2	GTCAGCAGTCAGCGAAGCAC		
hDUSP19.1	TGCAGGACCTTAGCTCGGAC		
hDUSP19.2	TGTATCCAAATCATGAGCAGCATC		
hDUSP22.1	CGCTAGCGTTCGCTTTCA		
hDUSP22.2	GCTCAATTGTTCCGCGTCTC		
hRXRa F2	ATGGACACCAAACATTTCCTGC		
hRXRa R2	GGGAGCTGATGACCGAGAAAG		
hRARa F2	GCAGCCTGAGTTGAGTACCTT		
hRARa R2	GGCACGGACTTCTTAGGGAG		
hPPARy F	TACTGTCGGTTTCAGAAATGCC		
hPPARy R	GTCAGCGGACTCTGGATTCAG		
hGAPDH F	TGCACCACCAACTGCTTAGC		
hGAPDH R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG		
hb-actin F	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA		
hb-actin R	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG		

Πίνακας 6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις Real-time qPCR για την ποσοτικοποίηση cDNA ποντικιού

Εκκινητής	Αλληλουχία		
mHey1 F	ATGGTGGAGATAAGTGCCTGG		
mHey1 R	GGCTCTGAATCAGGTATGCCA		
mDusp1 F	GTTGTTGGATTGTCGCTCCTT		
mDusp1 R	TTGGGCACGATATGCTCCAG		
mDusp2 F	ATGGTGGAGATAAGTGCCTGG		
mDusp2 R	GGCTCTGAATCAGGTATGCCA		
mDusp3 F	TCTGTGGCTCAGGACATCAC		
mDusp3 R	GGCCCTTTCAAAGTAAGCACTG		
mDusp4 F	CGTGCGCTGCAATACCATC		
mDusp4 R	CTCATAGCCACCTTTAAGCAGG		
mDusp5 F	GAAGTGCCTACCACGCATCC		
mDusp5 R	TCCGGCGGGAAACATTCAG		
mDusp6 F	ATAGATACGCTCAGACCCGTG		
mDusp6 R	ATCAGCAGAAGCCGTTCGTT		
mDusp7 F	GGTTGGTAGAGTCCTTGGCA		
mDusp7 R	CTCTGACTGCTCAGACGGC		
mDusp8 F	CCGAGGAAGGTGATGGACG		
mDusp8 R	CACCAGCTTTGAACAGCAGATA		
mDusp9 F	AGAGTCTGAGTCGGTCATGC		
mDusp9 R	ACTGCTACCCTGGTCGTACA		
mDusp10 F	CCATCTCCTTTAGACGACAGGG		
mDusp10 R	GCTACCACTACCTGGGCTG		
mDusp11 F	AACCAGCATTATGGCCGACAT		
mDusp11 R	GGAGATAGTCTTTCCACCTTTCG		
mDusp12 F	TCATGCAGGAGTCAGTCGC		
mDusp12 R	GGTAAGCTGGTCGGTCTTCATTA		
mDusp14 F	TCGGCCACCCTCTGTATTG		
mDusp14 R	GCTGGCTCTCGTAGTCTATCAG		
mDusp16 F	AAGGAAAGTCCACTCTAGTCCC		
mDusp16 R	GCAGGAAGTGAGATTCAGGTATG		
mDusp18 F	CTTCCCAGTTCAGATCCCCCA		
mDusp18 R	AGTAGGAGCTTGTTGTTGGCA		
mDusp19 F	GGTGACCACGCTAACTGGAAA		
mDusp19 R	CACATAGCCACAACCACCC		
mDusp22 F	ACGCAAGAGATGCAGAACAGT		
mDusp22 R	GCCGCTGGAATACACAGGT		
mDusp23 F	ATCGACCAATTTGTGAAGATCGT		

mDusp23 R	TCCTGTTCATACGTCTCAATGGA
mRXRa F	ATGGACACCAAACATTTCCTGC
mRXRα R	CTCGACCCGTTGGAGAGTT
mRARα F	TCCGAAGAGATAGTACCCAGC
mRARα R	AGCCGGATGATTTGTCTTGAC
mPPARγ F	GGAAGACCACTCGCATTCCTT
mPPARγ R	GTAATCAGCAACCATTGGGTCA
mHPRT F	TGTTGTTGGATATGCCCTTG
mHPRT R	ACTGGCAACATCAACAGGACT

11. Απομόνωση πρωτεϊνών

Για κύτταρα που αναπτύσσονται σε μονή στιβάδα, ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

- Τα κύτταρα εκπλένονται με PBS, συλλέγονται και επωάζονται για 5 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά.
- Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται στον κατάλληλο όγκο διαλύματος RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer), στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς φωσφατασών (NaF, Na₃VO₄) και αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors cocktail, Roche diagnostics [1 ταμπλέτα/10 ml διαλύματος RIPA]) και επωάζεται για 10 λεπτά στον πάγο.
- Στη συνέχεια, καταψύχεται στους -20 °C για 20 λεπτά.
- Έπειτα, αφήνεται να ξεπαγώσει στον πάγο και φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C.
- Τέλος, κρατάμε το υπερκείμενο, το οποίο φυλάσσουμε στους -20 °C.

<u>Διάλυμα RIPA</u>

150 mM NaCl (Sigma-Aldrich)
50 mM Tris, pH 7,4 (Trizma base, Sigma-Aldrich)
1% NP-40 (AppliChem)
0,5% δεοξυχολικό νάτριο (Fischer Scientific)
0,1% SDS (AppliChem)

12. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

12.1. Πηκτώματα

Το πρώτο βήμα κατά την ανοσοαποτύπωση Western (Western blot) είναι η παρασκευή των πηκτωμάτων. Με τη χρήση συσκευής της Bio-Rad, παρασκευάζουμε πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) ακρυλαμίδης (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad) κατάλληλης πυκνότητας, ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Μόλις πήξει, προσθέτουμε το πήκτωμα επιστίβαξης και προσαρμόζουμε το χτένι 10 θέσεων για να σχηματιστούν τα φρεάτια. Παρακάτω αναγράφεται η συνταγή για την παρασκευή δύο μικρών πηκτωμάτων (Πίνακας 7, 8).

Πίνακας 7: Συνταγή για την παρασκευή δύο μικρών πηκτωμάτων διαχωρισμού 6% και 10% για Western blot

Πήκτωμα διαχωρισμού	6%	10%
H ₂ O	5,3 ml	4,0 ml
Μίγμα ακρυλαμίδης 30%	2,0 ml	3,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,008 ml	0,004 ml
Σύνολο	10 ml	10 ml

Πίνακας 8: Συνταγή για την παρασκευή δύο μικρών πηκτωμάτων επιστίβαξης 5% για Western blot

Πήκτωμα επιστίβαξης	5%
H ₂ O	3,4 ml
Μίγμα ακρυλαμίδης 30%	0,83 ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,63 ml
10% SDS	0,05 ml
10% APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml
Σύνολο	5 ml

12.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Σε κατάλληλη ποσότητα από τα εκχυλίσματα πρωτεϊνών που έχουμε απομονώσει προσθέτουμε χρωστική Laemmli 3x και θερμαίνουμε στους 100 °C για 5 λεπτά.

<u>Χρωστική Laemmli 3x</u>
0,0625 M Tris pH 6,8 (Trizma base, Sigma-Aldrich)
2% SDS (AppliChem)
10% γλυκερόλη (Carlo Erba)
4% β-μερκαπτοαιθανόλη (AppliChem)
0,01% μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma-Aldrich)

12.3. Ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδης

Τα πηκτώματα τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και, αφού τη γεμίσουμε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer), απομακρύνουμε το χτένι και επιστιβάζουμε τα δείγματά μας, καθώς και έναν πρωτεϊνικό δείκτη με γνωστά μεγέθη (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad). Η ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) λαμβάνει χώρα στα 100 V, 300 mA και 100 W για 1,5-2 ώρες.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης
25 mM Tris pH 8,0 (Trizma base, Sigma-Aldrich)
190 mM γλυκίνη (Sigma-Aldrich)
0,1% SDS (AppliChem)

12.4. Μεταφορά

Σε ειδική συσκευή τοποθετούμε ένα σφουγγαράκι, 3 φύλλα Whatman, το πήκτωμα, μία μεμβράνη PVDF (Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad), τρία φύλλα Whatman και ένα σφουγγαράκι, τα οποία έχουν εμποτιστεί σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer), και στη συνέχεια την τοποθετούμε στο δοχείο όπου θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά, το οποίο έχουμε

γεμίσει με διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά λαμβάνει χώρα στα 100 V, 300 mA και 100 W στους 4 °C για 1,5 ώρα.

Διάλυμα μεταφοράς

25 mM Tris pH 8,0 (Trizma base, Sigma-Aldrich)
190 mM γλυκίνη (Sigma-Aldrich)
20% μεθανόλη (Lachner

12.5. Κάλυψη

H μεμβράνη τοποθετείται σε ένα δοχείο με διάλυμα κάλυψης (Blocking solution [1% BSA {Albumin Fraction V, AppliChem}]) σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 ώρα, υπό ανάδευση. <u>TBS</u> 20 mM Tris pH 7,5 (Trizma base, Sigma-Aldrich) 100 mM NaCl (Sigma-Aldrich)

<u>TBS-T</u> 20 mM Tris pH 7,5 100 mM NaCl 0,1% Tween-20 (Fischer Scientific)

12.6. Πρωτοταγές αντίσωμα

Προσθέτουμε το πρωτοταγές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα κάλυψης και το επωάζουμε στους 4 °C για 18 ώρες ή σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ώρες, ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες για κάθε αντίσωμα (Πίνακας 9). Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιούμε 3 εκπλύσεις των 15 λεπτών με TBS-T.

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης	Κωδικός	Εταιρεία	Ζώο στο οποίο παράχθηκε	Αραίωση
Nicastrin	9447	Cell Signaling	rabbit	1:500
Notch1	3608	Cell Signaling	rabbit	1:1000
Notch2	4530	Cell Signaling	rabbit	1:1000
N1ic	4147	Cell Signaling	rabbit	1:1000
JAG1	sc-8303	Santa Cruz	rabbit	1:1000
β-actin	sc-1616	Santa Cruz	goat	1:1000
pERK1/2	4376	Cell Signaling	rabbit	1:1000
ERK1/2	9102	Cell Signaling	rabbit	1:1000
pMEK1/2	9154	Cell Signaling	rabbit	1:1000
MEK1/2	9126	Cell Signaling	rabbit	1:1000
DUSP1	2857	Cell Signaling	rabbit	1:1000
DUSP5	sc-46927	Santa Cruz	goat	1:1000
DUSP6	3058	Cell Signaling	rabbit	1:1000
DUSP10	3483	Cell Signaling	rabbit	1:1000
PP2A	2039	Cell Signaling	rabbit	1:1000

Πίνακας 9: Πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε Western blot

12.7. Δευτεροταγές αντίσωμα

Προσθέτουμε το συζευγμένο με HRP δευτεροταγές αντίσωμα (Jackson Immunoresearch/ Cell Signaling, αραίωση 1:5000) στην κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα κάλυψης και το επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, εκτελούμε 2 εκπλύσεις των 15 λεπτών με TBS-T και μία με TBS.

12.8. Εμφάνιση

Αναμιγνύουμε 500 μl αντιδραστηρίου 1 (Detection Reagent 1, Peroxide) και 500 μl αντιδραστηρίου 2 (Detection Reagent 2, Luminol) ECL (Enhanced chemiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια) [Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific], εντός των οποίων εμποτίζουμε τη μεμβράνη για 5 λεπτά. Τέλος, τη μεταφέρουμε σε κασετίνα και εμφανίζουμε σε σκοτεινό θάλαμο, χρησιμοποιώντας φιλμ FUJI.

13. Αδενοϊικοί φορείς

13.1. Κατασκευή αδενοϊικών φορέων

Η κατασκευή αδενοϊικών φορέων (AdN1ic, AdN2ic, AdN3ic, AdGFP, AdCre) έγινε με τη χρήση του φορέα pAd/PL-DEST και του αντίστοιχου συστήματος αδενοϊικής έκφρασης της Invitrogen (pAd/PL-DEST Gateway Vector και ViraPower Adenoviral Expression System) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (**Εικόνα 1**). Ο φορείς AdLacZ και AdJAG1 παραχωρήθηκαν από τον Dr. M. Post (Maastricht University). Σε όλα τα πειράματα, κύτταρα συλλέχθηκαν 72 ώρες μετά τη μόλυνση με αδενοϊοιύς και η αυξανόμενη πολλαπλότητα μόλυνσης (multiplicity of infection, MOI) ήταν 10.



Εικόνα 1: Επισκόπηση της πειραματικής πορείας που ακολουθείται κατά τη χρήση του αδενοϊικού συστήματος έκφρασης.

 Κατασκευάζουμε τον αδενοϊικό κλώνο έκφρασης που περιέχει την αλληλουχία της επιλογής μας. Πραγματοποιούμε πέψη του πλασμιδιακού DNA που απομονώσαμε με Pac I για να εκθέσουμε τις ITRs.

 Διαμολύνουμε την κυτταρική σειρά παραγωγής HEK293A με τον αδενοϊικό κλώνο έκφρασης. Συλλέγουμε τα κύτταρα και παρασκευάζουμε το αρχικό ϊικό εναιώρημα.

 Ενισχύουμε τον αδενοϊό μολύνοντας κύτταρα ΗΕΚ293Α το αρχικό ϊικό εναιώρημα. Καθορίζουμε τον τίτλο του αδενοϊικού αποθέματος.



4. Προσθέτουμε το ιϊκό εναιώρημα στην κυτταρική σειρά που μας ενδιαφέρει.

5. Πραγματοποιούμε δοκιμασία ανίχνευσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει.

13.2. Καθαρισμός ιϊκού αποθέματος

Ο καθαρισμός ιϊκού αποθέματος γίνεται με τη χρήση κορεσμένου CsCl σε συνδυασμό με υπερφυγοκέντρηση. Για τον καθαρισμό απαιτείται μεγάλη ποσότητα ιϊκού αποθέματος, άρα και μεγάλος αριθμός κυττάρων HEK293A. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Μολύνουμε 30 πιάτα 100mm², τα οποία έχουμε επιστρώσει με ΗΕΚ293Α, με ιό.
- Μόλις τα ΗΕΚ293Α εμφανίσουν κυτταροπαθολογικό φαινότυπο, συλλέγουμε τα κύτταρα μαζί με το υπερκείμενο σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon και φυγοκεντρούμε στις 1500 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε συνολικά 3ml 0,1 M Tris HCl pH 8 και αναδεύουμε χρησιμοποιώντας σύριγγα 18G για τη διάλυση πιθανών συσσωματωμάτων.
- Τοποθετούμε το σωλήνα στους -80 °C για 30 λεπτά κι έπειτα τον αφήνουμε σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C για 15 λεπτά έτσι ώστε να αποψυχθεί. Επαναλαμβάνουμε το βήμα κατάψυξης-απόψυξης δύο ακόμη φορές. Οι διαδοχικοί κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης αποσκοπούν στη λύση των κυττάρων και την επακόλουθη απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών ιϊκών σωματιδίων.
- Προσθέτουμε 2,2 ml κορεσμένου CsCl (Fisher Scientific) και 0,1 M Tris HCl pH 8 έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 6ml.

- Τοποθετούμε το μίγμα σε ειδικά πλαστικά δοχεία υπερφυγοκέντρου τα οποία σφραγίζουμε αεροστεγώς και φυγοκεντρούμε στις 60000 rpm για 18 ώρες στους 4 °C υπό κενό.
- Το μίγμα κυτταρικών θραυσμάτων, ιού και θρεπτικού διαχωρίζεται σύμφωνα με τη διαβάθμιση συγκέντρωσης. Αφαιρούμε προσεκτικά τη φάση του ιού (λεπτή άσπρη νεφώδης φάση) με χρήση σύριγγας 21G των 5 ml τρυπώντας το δοχείο κάτω ακριβώς από τη φάση του ιού.
- Ο καθαρισμός του ιού γίνεται με τη χρήση στήλης καθαρισμού Sephadex G50 (Sigma-Aldrich).
- Φορτώνουμε στη στήλη την ιϊκή φάση και αφήνουμε να αδειάσει μέσω ροής λόγω βαρύτητας.
- Συλλέγουμε το εκλουόμενο προϊόν και το αναδιαλύουμε σε τελική συγκέντρωση 10% γλυκερόλη και 0,1M Tris-HCl pH 8.

14. Διαμόλυνση κυττάρων

Για τη διαμόλυνση (transfection) κυττάρων με λεντιϊκό φορέα με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) σε ένα τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας 100mm² χρειαζόμαστε:

- 10 μg από το πλασμίδιο της επιλογής μας
- 9,2 μg από το πλασμίδιο πακεταρίσματος R891
- 2,3 μg από το πλασμίδιο του φακέλου pMD2.G
- 43,4 μl από CaCl₂ 2,5M

Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα από τα τρία προαναφερθέντα πλασμίδια και το CaCl₂ και συμπληρώνουμε με φιλτραρισμένο dH₂O μέχρι τα 500 μl. Στη συνέχεια, προσθέτουμε σε σταγόνες 500 μl HBS 2x (Hepes Buffered Saline 2X, Fluka) ενώ παράλληλα αναδεύουμε και επωάζουμε για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, προσθέτουμε το μίγμα σε σταγόνες στο τρυβλίο, το οποίο καλύπτεται κατά 70% με κύτταρα HEK293T (κυτταρική σειρά ικανή να παράγει υψηλούς τίτλους μολυσματικών λεντιϊών), στα οποία έχει προστεθεί φρέσκο θρεπτικό υλικό πριν τη διαμόλυνση. Την επόμενη ημέρα, αντικαθιστούμε το θρεπτικό υλικό. Μετά από ακόμη 24 ώρες, συλλέγουμε το θρεπτικό της καλλιέργειας στο οποίο βρίσκονται ιοσωμάτια. Έπειτα από φυγοκέντρηση (1500 rpm, 5 λεπτά) για να απομακρυνθούν κυτταρική σειρά της επίλογής μας.

Μετά τη μόλυνση, ακολουθεί επιλογή των κυττάρων στα οποία έχει ενσωματωθεί ο λεντιϊκός φορέας καθώς αυτά φέρουν ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό.

Για τη διαμόλυνση κυττάρων με οποιοδήποτε πλασμίδιο ακολουθούμε την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιώντας 20 μg από το πλασμίδιο της επιλογής μας και 43,4 μl από CaCl₂ 2,5M για ένα τρυβλίο 100mm². Την επόμενη ημέρα, αντικαθιστούμε το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και μπορούμε να πραγματοποιήσουμε τη δοκιμασία που μας ενδιαφέρει.

Η διαμόλυνση κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης (Lipofectamine 2000, Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

15. Δοκιμασία βιωσιμότητας ΜΤΤ

Κατά τη δοκιμασία βιωσιμότητας ΜΤΤ, ακολουθούμε την παρακάτω πορεία:

- Σε πλάκες των 48 φρεατίων, επιστρώνουμε σε πολύ χαμηλή πυκνότητα τις κυτταρικές σειρές που θα εξετάσουμε.
- Στα φρεάτια που θα εξεταστούν κάθε φορά προσθέτουμε MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, #M5655, Sigma-Aldrich,) συγκέντρωσης 5 mg/ml (σε PBS) στο 1/10 του όγκου του θρεπτικού υλικού (π.χ. 20 μl MTT σε 200 μl θρεπτικού) και αφήνουμε στον επωαστικό κλίβανο για 2 ώρες.
- Μετά το πέρας των 2 ωρών, προσθέτουμε 100 μl DMSO (Dimethyl sulfoxide, AppliChem) για να τερματιστεί η αντίδραση (Εικόνα 2).
- Αφού έχουμε ανακατέψει καλά, μεταφέρουμε το περιεχόμενο κάθε φρεατίου σε ένα αντίστοιχο μίας πλάκας 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα. Επιπλέον, προσθέτουμε 100 μl DMSO σε ένα φρεάτιο ως τυφλό.
- Φωτομετρούμε στα 570 και τα 650 nm (BioTek ELx800) και αφαιρούμε τη δεύτερη τιμή απορρόφησης (θόρυβος) από την πρώτη.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα κατά τη δοκιμασία MTT. Το κίτρινο άλας του τετραζολίου, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), των μεταβολικά ενεργών κυττάρων ανάγεται σχηματίζοντας φορμαζάνη μωβ χρώματος. Η επακόλουθη φωτομέτρηση επιτρέπει την ακριβή μέτρηση της δραστηριότητας του μιτοχονδριακού κύκλου του Krebs στο σύνολο της κυτταρικής καλλιέργειας και κατά συνέπεια τη βιωσιμότητα.

16. Δοκιμασία λουσιφεράσης

Αρχικά, πραγματοποιείται διαμόλυνση των κυττάρων τα οποία είναι επιστρωμένα σε τρυβλία 12 θέσεων με τους εκάστοτε φορείς:

α) πλασμιδιακός φορεάς έκφρασης της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του ρυθμιστικού στοιχείου που μελετάμε

β) πλασμιδιακός φορέας έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης, που χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση των μετρήσεων λουσιφεράσης

 γ) πλασμιδιακός φορέας έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα του οποίου επιθυμούμε να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση με το ρυθμιστικό στοιχείο.

Χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο αναφοράς CSL (TP1-Luc) και πλασμίδια pcDNA3 που έφεραν τα cDNAs των *NOTCH1*, *NOTCH2*, *MAML1* ή *NCSTN* τα οποία είτε ήταν φυσικού τύπου είτε εξέφραζαν την υπό μελέτη μεταλλαγή. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pCDNA3 χωρίς ένθεμα. Για τους υποδοχείς Notch1 και Notch2, οι μεταλλαγές που ταυτοποιήθηκαν στο ενδοκυτταρικό τους τμήμα εισήχθησαν σε φορέα pCDNA3 που εξέφραζε μόνο το ενδοκυτταρικό τμήμα. Η δοκιμασία λουσιφεράσης (luciferase assay) πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HEK293T, εκτός από τις περιπτώσεις μεταλλαγές αυτές εισήχθησαν στο αντίστοιχο πλήρες cDNA και πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των φορέων έκφρασης σε πρωτογενείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες πουτικιού (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) από ζώα ομόζυγα για την κατά συνθήκη έλλειψη των *Notch1* και *Notch2* και την έλλειψη του *Notch3* (*Notch1*^{flox/flox}; *Notch3^{-/-}*). Πριν από τη διαμόλυνση, οι MEFs διαμολύνθηκαν με αδενοϊικό φορέα της ρεκομπινάσης Cre (AdCre) και του προσδέτη JAG1 (AdJAG1) για να μειωθεί το ενδογενές υπόβαθρο και να αυξηθεί η κατάσταση ενεργοποίησης του μονοπατιού.

Για τη μελέτη της επίδρασης της μεταλλαγής S427F στον υποδοχέα RXRa, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο αναφοράς RXRE (DR1-tk-luc, Dr. Noa Noy, Case Western

Reserve University) και πλασμίδια pENTR.GD.for-GFP που έφεραν το φυσικού τύπου (WT) και το μεταλλαγμένο (MUT) υποδοχέα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pENTR.GD.for-GFP χωρίς ένθεμα. Για τη μείωση του ενδογενούς υποβάθρου, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε 0,5% FBS με ή χωρίς προσθήκη 9-*cis* RA (1-10 μM) [Santa Cruz].

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη δοκιμασία λουσιφεράσης έχει ως εξής:

- Συλλογή κυττάρων από την καλλιέργεια 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, αφού προηγηθούν τρεις εκπλύσεις με παγωμένο PBS.
- Προσθήκη 500 μl παγωμένου PBS και απόξεση των κυττάρων από την επιφάνεια προσκόλλησης του τρυβλίου.
- Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 4 λεπτά.
- Αναδιάλυση των κυττάρων σε 140 μl διαλύματος RLB (Reporter Lysis Buffer, Promega) ανά δείγμα.
- Έντονη ανάδευση (vortex) και επώαση για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Επανάληψη αυτού του βήματος άλλες δύο φορές.
- Φυγοκέντρηση στις 13500 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα eppendorf και διατήρηση του στον πάγο μέχρι το τέλος της διαδικασίας.
- Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο. Προετοιμασία ειδικών γυάλινων σωλήνων με 5 μl δείγματος στα οποία προστίθενται στη συνέχεια 100 μl υποστρώματος (Πίνακας 10). Η μέτρηση διαρκεί 10 δευτερόλεπτα (Εικόνα 3).
- Μέτρηση δραστικότητας β-γαλακτοσιδάσης. Πρόσθεση 25 μl δείγματος στο διάλυμα της αντίδρασης (Πίνακας 11, 12) και επώαση στους 37 °C μέχρι να αναπτυχθεί χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Στο τυφλό προστέθηκαν 25 μl RLB αντί για κυτταρικό εκχύλισμα. Το υπόστρωμα ONPG προστέθηκε στο τέλος σε όλα τα δείγματα ταυτόχρονα. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 500 μl Na₂CO₃ 1 M (Carlo Erba) ανά δείγμα και ακολουθεί φωτομέτρηση σε OD_{420nm} (Εικόνα 4).
- Τέλος, διαιρούμε την τιμή της ενεργότητας λουσιφεράσης με την τιμή της δραστικότητας της β-γαλακτοσιδάσης κάθε δείγματος έτσι ώστε να προκύψουν κανονικοποιημένες τιμές.
 Οι τιμές προέκυψαν από το μέσο όρο τριών αντιγράφων για κάθε δείγμα.

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος	Εταιρία
dH ₂ O		84,05 μl	
Tris HCl pH 8	1 M	2,1 μl	Sigma-Aldrich
MgSO4	0,15 M	1,87 μl	Fisher Scientific
EDTA	0,5 M	0,02 µl	Fisher Scientific
DTT	1 M	3,5 µl	Fisher Scientific
СоА	0,05 M	0,57 μl	Applichem
D-luciferine	0,004 M	12,34 µl	Promega
rATP	0,1 M	0,56 µl	Promega
Σύνολο		105 µl	

Πίνακας 10: Διάλυμα λουσιφεράσης



Εικόνα 3: Κατά την αντίδραση της λουσιφερίνης με ATP, η οποία καταλύεται από τη λουσιφεράση, παράγεται οξυλουσιφερίνη και εκπέμπεται φως (βιοφωταύγεια).

Πίνακας 11: Διάλυμα μαγνησίου

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος	Εταιρία
MgCl ₂	1 M	0,63 µl	Fisher Scientific
β-μερκαπτοαιθανόλη	100%	1,98 µl	AppliChem
dH ₂ O		3,69 µl	
Σύνολο		6,3 µl	

Πίνακας 12: Διάλυμα β-γαλακτοσιδάσης

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος	Εταιρία
Διάλυμα μαγνησίου	100%	3 µl	
Διάλυμα	0,1 M	201 µl	Carlo Erba
φωσφορικού νατρίου pH 7,5			
Δείγμα		25 μl	
ONPG	0,0132 M	66 µl	Sigma-Aldrich
Σύνολο		295 µl	



Εικόνα 4: Κατά την υδρόλυση του υποστρώματος ONPG (ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) από τη β-γαλακτοσιδάση παρουσία ιόντων καλίου ή μαγνησίου παράγεται β-D-γαλακτόζη και ο-νιτροφαινόλη η οποία δίνει το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα.

17. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Αρχικά, συλλέγουμε και μονιμοποιούμε τα κύτταρα σε 70% αιθανόλη στους 4 °C (1 ώρα έως μέρες). Στη συνέχεια, αφού ξεπλύνουμε με PBS, αναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 0,25% Triton X-100 (Fischer Scientific) σε PBS και επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά. Στη συνέχεια αναδιαλύουμε τα κύτταρα σε PBS που περιέχει 10 μg/ml RNase A (Applichem) και 50 μg/ml προπιούχο ιωδίδιο (Biotium) και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Έπειτα, ακολουθεί χρώση με 1 μg/ml DAPI (AppliChem) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Η ανάλυση του φθορισμού των κυττάρων για την κατανομή τους στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής στο Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) στο IIBEAA και η ανάλυση έγινε με το αντίστοιχο λογισμικό.

18. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης

Οι κυτταρικές σειρές T24 και HTB9 υπέστησαν μεταγωγή είτε με έναν ανασυνδυασμένο αδενοϊόμάρτυρα που εκφράζει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης της *Escherichia coli* (AdLacZ) είτε με έναν ανασυνδυασμένο αδενοϊό που εκφράζει το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα Notch1 (AdN1ic) για 72 ώρες και ακολούθησε διασύνδεση (crosslinking) με 1% φορμαλδεΰδη σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Η δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin immuno-precipitation, ChIP) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του SimpleChIP enzymatic ChIP kit (#9003, Cell Signaling Technology) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης ανοσοκατακρημνίστηκαν χρησιμοποιώντας 5 μg του ειδικού αντισώματος έναντι του Notch1 (sc-6014, Santa Cruz) ή του φυσιολογικού IgG του κουνελιού (sc-2027, Santa Cruz) ως αρνητικού μάρτυρα. Τα προσδεδεμένα τμήματα DNA υποβλήθηκαν σε Real-time PCR.

19. Μικροσυστοιχίες DNA

Αρχικά απομονώθηκε ολικό RNA από όγκους ουρητήρα ποντικιών R26rtTA; tetO-Cre; $Ncstn^{flox/flox}$ και από φυσιολογικούς ουρητήρες ποντικιών C57Bl/6 ίδιας ηλικίας με το Macherev Nagel NucleoSpin RNA kit (#740955). Η ανάλυση μικροσυστοιχιών (expression microarrays) για τη μέτρηση των διαφορών στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση γονιδιακών τσιπ της Affymetrix (GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array), τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου 34.000 καλά χαρακτηρισμένα γονίδια του ποντικιού, στη Μονάδα Γονιδιωματικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Κάθε ομάδα περιελάμβανε δύο ανεξάρτητα βιολογικά αντίγραφα. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος MAS5.0 για τη διόρθωση του υποβάθρου και πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση της διαμέσου ανά chip για κάθε συστοιχία. Για να θεωρηθεί ότι ένα γονίδιο εκφράζεται, πρέπει να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια: (i) σύμφωνα με το MAS5.0 πρέπει να είναι παρόν (present, P) ή οριακό (marginal, M) σε τουλάχιστον ένα από τα δύο αντίγραφα και (ii) η ένταση των γονιδίων πρέπει να είναι πάνω από 50 σε τουλάχιστον ένα από τα δείγματα της ομάδας μελέτης (όγκος ή φυσιολογικό). Πραγματοποιήθηκε Student's t test για τη σύγκριση των ομάδων (όγκος έναντι φυσιολογικού). Τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση γονιδίων με διαφορική έκφραση ήταν η μεταβολή έκφρασης να είναι τουλάχιστον 1,5 φορά και η τιμή σημαντικότητας (P value) κάτω από 0,10 (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας κατά την ανάλυση μικροσυστοιχιών DNA με τη χρήση γονιδιακών τσιπ της Affymetrix. Οι μικροσυστοιχίες παράγονται έπειτα από σύνθεση αρκετών ζευγών 25μερών ολιγονουκλεοτιδίων ανά γονίδιο μέσω φωτολιθογραφίας πάνω σε δίσκο πυριτίου. Για κάθε δείγμα (πειραματικό δείγμα και δείγμα αναφοράς) χρησιμοποιείται ένα τσιπ. Αρχικά, απομονώνεται ολικό RNA από τα υπό εξέταση κύτταρα. Στη συνέχεια, με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription) σχηματίζεται δίκλωνο cDNA το οποίο περιέχει θέση αναγνώρισης για την T7 πολυμεράση. Το cDNA αυτό χρησιμοποιείται σε μία αντίδραση μεταγραφής *in vitro* (*in vitro* transcription, IVT) παρουσία βιοτινυλιωμένων νουκλεοτιδίων έτσι ώστε να συντεθεί cRNA. Μετά από θρυμματισμό, το cRNA υβριδοποιείται στη μικροσυστοιχία, εκπλένεται και σημαίνεται με μία φθορίζουσα χρωστική συζευγμένη με τη στρεπταβιδίνη. Ο φθορισμός ανιχνεύεται μέσω σάρωσης από laser και οι μικροσυστοιχίες συγκρίνονται μεταξύ τους για να ανιχνευθούν τα σχετικά επίπεδα mRNA μεταξύ των δύο δειγμάτων. Τέλος, χρησιμοποιούνται διάφορα πακέτα λογισμικού που περιέχουν αρκετούς αλγόριθμους για την ανάλυση των δεδομένων.

20. Αλληλούχηση κατά Sanger

Πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή σε RNA από φυσιολογικό και καρκινικό ιστό με τυχαίους εκκινητές (random primers) που ακολουθήθηκε από αντιδράσεις PCR έτσι ώστε να ληφθούν αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα cDNA (amplicons) μεγέθους 600-800 bp τα οποία να καλύπτουν όλη την κωδική περιοχή των υπό μελέτη γονιδίων. Παρατίθενται οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν (Παράρτημα II, Supplementary Table 10). Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση και στις δύο αλυσίδες των θραυσμάτων PCR με τις πρότυπες διαδικασίες αλληλούχησης κατά Sanger. Για τους ασθενείς που έφεραν πάνω από μία μεταλλαγή στο ίδιο γονίδιο, οι μεταλλαγές πολλαπλασιάστηκαν με PCR στο ίδιο τμήμα (amplicon) στις περιπτώσεις όπου η απόσταση το επέτρεπε και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα TOPO (Life Technologies). Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση σε ανεξάρτητους κλώνους έτσι ώστε να εξεταστεί αν οι μεταλλαγές εδράζονται σε διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου.

21. Σχολιασμός ακολουθιών

Οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις που περιγράφονται στο Συπληρωματικό Πίνακα 1 (Παράρτημα II, Supplementary Table 1) αναφέρονται στις παρακάτω καταχωρήσεις από βάσεις δεδομένων: *NOTCH1*, NM_017617 και NP_060087.3, *NOTCH2*, NM_024408.3 και AAG37073.1, *NOTCH3*, U97669.1 και NP_000426.2, *MAML1*, NM_014757.4 και NP_055572.1 και *NCSTN*, NM_015331 και NP_056146.1.

22. Δοκιμασία ανάλυσης της μεταβολής του αριθμού αντιγράφων γονιδίου

Οι μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *NOTCH1* εκτιμήθηκαν με το kit TaqMan copy number assays (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας τον ιχνηθέτη (probe) Hs03708325_cn που εδράζεται στο εσώνιο 22 (χρωμόσωμα 9: 139388896–1394402) του γενετικού τόπου του ανθρώπινου *NOTCH1*. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του kit RNase P TaqMan copy number reference assays (Applied Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή στο 7500 Real-Time PCR system. Για την ανάλυση της μεταβολής του αριθμού αντιγράφων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό CopyCaller (Applied Biosystems).

23. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Για τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics simulations) που πραγματοποιήθηκαν για τη μεταλλαγή S427F του υποδοχέα RXRa, αρχικά ταυτοποιήθηκαν οι κρυσταλλογραφικές δομές με βάση τις οποίες έγινε η ανάλυση (PDB ID: 3A9E για το ετεροδιμερές RXRα-RARα και PDB ID: 1G1U για το ομοτετραμερές του RXRα) και εισήχθη η μεταλλαγή στις δομές (Maestro, Schrödinger, LLC, NY). Στη συνέχεια, παράχθηκαν ρεαλιστικές πρωτεϊνικές δομές από τις κρυσταλλογραφικές δομές, δηλαδή ταυτοποιήθηκαν περιοχές που έλειπαν από τις κρυσταλλογραφικές δομές (Thr251-Ser264) και ταυτοποιήθηκαν άλλες δομές του RXRa από τις οποίες συμπληρώθηκαν αυτές οι περιοχές με Homology modeling (Prime 4.2, Schrödinger, LLC, NY) έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η επιθυμητή δομή, προστέθηκαν υδρογόνα στις δομές, διορθώθηκε η κατάσταση πρωτονίωσης (αλγόριθμος PROPKA), αριθμήθηκαν ξανά τα αμινοξέα της δομής ώστε να συμπίπτουν με την αρίθμηση της φυσικής πρωτεΐνης και απομακρύνθηκαν ανεπιθύμητες στερεοχημικές συγκρούσεις. Έπειτα, παράχθηκαν ρεαλιστικές πρωτεϊνικές δομές από κρυσταλλογραφικές δομές για τους προσδέτες, δηλαδή προστέθηκαν υδρογόνα και διπλοί δεσμοί, υπολογίστηκαν τα φορτία (RED server) καθώς και εμπειρικές παράμετροι για την έκταση των δεσμών (ACPYPE) και εκτελέστηκαν οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής των προσδετών στο κενό για να εξασφαλιστεί ότι θα διατηρηθεί η σωστή χημική γεωμετρία καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (NVE ensemble). Τέλος, προετοιμάστηκε το σύμπλοκο πρωτεΐνης-προσδέτη σε υδατικό περιβάλλον μέσω εισαγωγής του συστήματος πρωτεΐνης-προσδέτη σε υδάτινο κουτί, απομάκρυνσης των ανεπιθύμητων στερεογημικών συγκρούσεων μεταξύ πρωτεΐνης και νερού και εξισορρόπησης του συστήματος σε θερμοκρασία δωματίου. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό σταθερή θερμοκρασία και πίεση (NPT ensemble) και χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Amber ff 99SB-ILDN του πεδίου δυνάμεων και το ΤΙΡ3Ρ μοντέλο νερού.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Η ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ ΟΔΗΓΕΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΟΓΚΩΝ ΣΤΟΝ ΟΥΡΗΤΗΡΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ

1.1. Η απαλοιφή του γονιδίου Nestn οδηγεί στη δημιουργία όγκων στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού

Η αρχική παρατήρηση που γέννησε την υπόθεση ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch σχετίζεται με τον καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος έγινε σε ποντίκια με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; Ncstn^{flox/flox}. Στα αυτά τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, τα οποία προέκυψαν από διασταυρώσεις μεταξύ των στελεγών R26rtTA (Yu et al., 2005), tetO-Cre (Perl et al., 2002) και $Ncstn^{flox/flox}$ (Klinakis et al., 2011), έπειτα από τη χορήγηση δοξυκυκλίνης (Dox), εκφράζεται η ρεκομπινάση Cre με αποτέλεσμα την απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη Nicastrin (Nestn). Η πρωτεΐνη Nicastrin αποτελεί μία από τις τέσσερις υπομονάδες του ενζυμικού συμπλέγματος της γ-σεκρετάσης και η λειτουργία της είναι απαραίτητη για τη δράση του ενζύμου. Καθώς ο γενετικός τόπος ROSA26 εκφράζει rtTA καθολικά, ο ανασυνδυασμός αναμένεται να πραγματοποιηθεί σε όλους τους ιστούς. Ωστόσο, αυτό δε συμβαίνει, διότι το διαγονίδιο tetO-Cre, το οποίο επάγεται έντονα σε απόκριση στο rtTA στο αρχικό στέλεχος στο οποίο εισήχθη (FVB), κατά τη διασταύρωση και συντήρησή του σε ποντίκια μικτής γεναλογίας αλλά κυρίως C57Bl/6 παραμένει σιωπηλό σχεδόν εξ ολοκλήρου. Η πληροφορία αυτή προέκυψε όταν διασταυρώσαμε ποντίκια R26rtTA; tetO-Cre με ζώα που έφεραν το γονίδιο αναφοράς lacZ για να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης της Cre. Η έκφραση του δείκτη εξαρτάται από την απαλοιφή μιας αλληλουχίας "stop" που βρίσκεται μεταξύ LoxP θέσεων και μεσολαβείται από τη ρεκομπινάση Cre με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή σήμανση των κυττάρων στα οποία εκφράζεται η ROSA26. Με αυτό τον τρόπο παρατηρήσαμε ότι ανασυνδυασμός συμβαίνει μόνο στην ουροδόχο κύστη, τον ουρητήρα και τη νεφρική πύελο από όσους ιστούς εξετάσαμε (Εικόνα Έτσι, ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε Dox ανέπτυξαν ψηλαφητή, αμφίπλευρη υδρονέφρωση μέσα σε 2 εβδομάδες από την προσθήκη Dox στο πόσιμο νερό τους (Εικόνα 2). Ειδικότερα, χορηγήθηκε Dox σε 18 ποντίκια (10 αρσενικά και 8 θηλυκά), 12 εκ των οποίων (7 αρσενικά και 5 θηλυκά) εμφάνισαν μονόπλευρη ή αμφίπλευρη υδρονέφρωση όταν θυσιάστηκαν δύο μήνες



μετά. Σύμφωνα με τη βιοψία, η υδρονέφρωση προκλήθηκε λόγω απόφραξης από μάζες όγκων στην περιοχή της νεφρικής πυέλου και του ουρητήρα.

Εικόνα 1: Χρώση X-gal, καθώς και αιματοξυλίνης-ηωσίνης (hematoxylin-eosin, H&E) σε τομές παραφίνης από διάφορους ιστούς των ποντικιών R26rtTA; tetO-Cre; R26^{lacZ/+}, τα οποία εκφράζουν βγαλακτοσιδάση έπειτα από χορήγηση Dox με εξαρτώμενο από την Cre τρόπο. Ο ανασυνδυασμός περιορίζεται στα ουροθηλιακά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, του ουρητήρα και της νεφρικής πυέλου. Αντιθέτως, σε κύτταρα του πνεύμονα, του σπλήνα, του ήπατος, του δέρματος, του νεφρού και του εντέρου δεν παρατηρήθηκε χρώση X-gal. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.





Εικόνα 2: α) Ανατομία ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} στο οποίο έχει χορηγηθεί Dox και εμφανίζει χαρακτηριστική υδρονέφρωση (αριστερά). β) Στα αριστερά απεικονίζεται ο υπερμεγέθης νεφρός που πάσχει από υδρονέφρωση από ποντίκι με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} έπειτα από χορήγηση Dox, ενώ στα δεξιά παρατίθεται για λόγους σύγκρισης ένας φυσιολογικός νεφρός.

1.2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch είναι ενεργοποιημένο στο φυσιολογικό ουροθήλιο του ποντικιού

Μετά από αυτή την εντυπωσιακή παρατήρηση γεννήθηκε η υπόθεση ότι το μονοπάτι Notch έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Το πρώτο μας βήμα στη μελέτη αυτής της υπόθεσης ήταν να εξετάσουμε την κατάσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch στο φυσιολογικό ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού. Πολύτιμα πειραματικά εργαλεία για τη μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των 4 υποδοχέων Notch στο φυσιολογικό ουροθήλιο αποτέλεσαν τα ποντίκια N1-CreERT2^{SAT}, N2-CreERT2^{SAT}, N3-CreERT2^{SAT} και N4-CreERT2^{SAT} (Fre et al., 2011) τα οποία διασταυρώθηκαν με ποντίκια R26^{tdTomato/+}, έτσι ώστε να χρησιμοποιήσουμε ως πειραματόζωα τους απογόνους εκείνους που φέρουν και τα δύο γονίδια (παραχώρηση του Δρ. Αρταβάνη-Τσάκωνα [Harvard University]). Σε αυτά τα ποντίκια, έπειτα από τη χορήγηση Tamoxifen, η έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης tdTomato αντικατοπτρίζει την έκφραση του αντίστοιχου υποδοχέα Notch. Έτσι διαπιστώσαμε ότι ο υποδοχέας Notch1 εκφράζεται σε όλες τις στιβάδες του ουροθηλίου του ποντικιού (**Εικόνα 3**). Αντιθέτως, δεν παρατηρήσαμε έκφραση των υποδοχέων Notch 2-4 στην ουροδόχο κύστη των αντίστοιχων πειραματοζώων. Επιπρόσθετα, διαπιστώσαμε ότι υπάρχει πυρηνική έκφραση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch1, καθώς και κυτταροπλασματική/μεμβρανική έκφραση του προσδέτη Jagged1 στα φυσιολογικά ουροθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 4).



Εικόνα 3: Ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές από ποντίκια 8 εβδομάδων με γονότυπο N1-CreERT2^{SAT}; R26^{tdTomato/+} που έχουν ενεθεί με Tamoxifen για 5 συνεχόμενες ημέρες (1 mg ανά ένεση). Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με αντίσωμα έναντι της κυτταροκερατίνης 5 (CK5), καθώς και με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.



Εικόνα 4: Ανοσοφθορισμός σε τομές παραφίνης από ουροδόχο κύστη φυσιολογικού ποντικιού που έχει σημανθεί με αντισώματα έναντι του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch1 (N1ic) και του προσδέτη Jagged1 (Jag1). Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με αντίσωμα έναντι της Pankeratin, η οποία σημαίνει τα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.

1.3. Ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός των όγκων ουρητήρα ποντικιών στα οποία το μονοπάτι Notch είναι απενεργοποιημένο

Στη συνέχεια, ασχοληθήκαμε με το χαρακτηρισμό των όγκων ουρητήρα των ποντικιών με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox}. Πρόκειται για ουροθηλιακά καρκινώματα υψηλού βαθμού που αναπτύσσονται κυρίως με στερεό (μη αδενοειδές) πρότυπο, εμφανίζουν κυτταρική ατυπία και εστιακή αδενοειδή διαφοροποίηση και διηθούν τη βασική μεμβράνη και το μυ. Διαπιστώσαμε ότι οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν τη φωσφορυλιωμένη μορφή της Erk1/2 (pErk1/2)—η οποία αποτελεί κοινό καρκινικό δείκτη σε διάφορους τύπους όγκων—, που σημαίνει ότι το μονοπάτι MAPK είναι ενεργό, και Ki67 και κυκλίνη D1, που αποτελούν δείκτες πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 5**). Επιπλέον, από όλους τους όγκως απουσίαζε η έκφραση του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch (**Εικόνα 6δ**). Τα κύτταρα του όγκου ήταν θετικά για CK5 και p63, πρωτεΐνες που χαρακτηρίζουν τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του

ουροθηλίου (Εικόνα 5ζ, 6β). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι όγκοι αυτοί πιθανότατα προέρχονται από κύτταρα της βασικής ή της ενδιάμεσης στιβάδας και συνεπώς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως βασικού τύπου (basal).



Εικόνα 5: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε ουρητήρα **α**) φυσιολογικού και **β**) ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} στο οποίο έχει χορηγηθεί Dox. γ) Χρώση έναντι της Pankeratin, **δ**) της pErk1/2, **ε**) της Ki67, **στ**) της κυκλίνης D1 και ζ) της p63 σε όγκο ουρητήρα ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} οποίο έχει χορηγηθεί Dox. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.

1.4. Η αποκατάσταση της έκφρασης του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch1 αποτρέπει την εμφάνιση όγκου στον ουρητήρα ποντικιών από τα οποία λείπει η Nicastrin

Σε επόμενη φάση, διερευνήσαμε αν η ταυτόχρονη υπερέκφραση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch1 σε ποντίκια από τα οποία λείπει η Nicastrin είναι δυνατό να καταστείλει την ογκογένεση στον ουρητήρα. Έτσι, χορηγήσαμε Dox σε ποντίκια με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; $Ncstn^{flox/flox}$ και σε ποντίκια με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; $Ncstn^{flox/flox}$; Ef1/N1ic και διαπιστώσαμε ότι μετά από 6 μήνες κανένα ποντίκι της δεύτερης ομάδας (0/7) δεν ανέπτυξε υδρονέφρωση, ενώ τα περισσότερα ποντίκια της πρώτης ομάδας (12/18) εμφάνισαν τον εν λόγω φαινότυπο. Όπως διαπιστώθηκε με ανοσοφθορισμό, στους ουρητήρες αυτούς είχε αποκατασταθεί η έκφραση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch1 (**Εικόνα 6**).





Εικόνα 6: α) Σύγκριση νεφρού ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} και ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox}; *Ef1*/N1ic στα οποία έχει χορηγηθεί Dox. Στην πρώτη περίπτωση, εμφανίστηκε υδρονέφρωση (12/18 ποντίκια), ενώ στη δεύτερη όλα τα ποντίκια (7/7) είχαν φυσιολογικούς νεφρούς. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 10 mm. **β**) Ανοσοφθορισμός σε όγκο ουρητήρα ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} με χρώση έναντι της CK5, γ) σε ουρητήρα φυσιολογικού ποντικιού με χρώση έναντι του N1ic, **δ**) σε όγκο ουρητήρα ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} με χρώση έναντι της CK5, γ) σε ουρητήρα φυσιολογικού ποντικιού με χρώση έναντι του N1ic, και ε) σε ουρητήρα ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} με χρώση έναντι του N1ic. Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με αντίσωμα έναντι της Pankeratin, καθώς και με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ένα μοναδικό μεταλλαξογόνο γεγονός, που προκαλεί απώλεια της δράσης της γ-σεκρετάσης και κατ' επέκταση απενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης Notch επαρκεί για την εμφάνιση νεοπλασματικού φαινοτύπου στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού.

1.5. Μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων ουρητήρα ποντικιών στα οποία το μονοπάτι Notch είναι απενεργοποιημένο

Σειρά είχε η μοριακή ανάλυση των ουροθηλιακών όγκων από ποντίκια στα οποία το μονοπάτι Notch είναι απενεργοποιημένο. Η ανάλυση έκφρασης μικροσυστοιχιών σε φυσιο-

λογικούς και νεοπλασματικούς ουρητήρες από ποντίκια R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} στα οποία είχε χορηγηθεί Dox έδειξε μείωση της έκφρασης γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch και των μελών της οικογένειας φωσφατασών διπλής ειδικότητας (Dual specificity phosphatases, DUSPs) που αποφωσφορυλιώνουν την Erk1/2 (βλ. κεφ. 5) και αύξηση της έκφρασης δεικτών του κυτταρικού κύκλου στην δεύτερη ομάδα (**Εικόνα 7**). Επιπλέον, η σύγκριση του προφίλ έκφρασης των όγκων ουρητήρα ποντικιού με τους 4 υποτύπους ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με την ταξινόμηση του ερευνητικού δικτύου The Cancer Genome Atlas (TCGA, 2014) έδειξε ότι οι όγκοι των ποντικιών προσομοιάζουν αυτούς που ανήκουν στο βασικό/τύπου πλακώδη υπότυπο (BLCA3).



Εικόνα 7: Μη εποπτευόμενη ιεραρχική συσταδοποίηση (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson) κανονικοποιημένων τιμών από μικροσυστοιχίες έκφρασης σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ουρητήρες ποντικιού. Παρουσιάζονται **α**) μία ομάδα γονιδίων με λειτουργία στον κυτταρικό κύκλο και **β**) επιλεγμένες ομάδες γονιδίων (γονίδια που παίζουν ρόλο στον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση, στόχοι του μονοπατιού Notch, μέλη της οικογένειας Dusp). Οι χάρτες και η συσταδοποίηση πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό TmeV. γ) Θερμικοί χάρτες που απεικονίζουν τη συσχέτιση των όγκων ουρητήρα ποντικιών R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} με τους 4 υποτύπους ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης που έχουν περιγραφεί από το δίκτυο TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

1.6. Η απαλοιφή του γονιδίου Cbf1 οδηγεί στη δημιουργία όγκων στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού

Παρόλο που έχει δειχθεί ότι τα ποντίκια από τα οποία απουσιάζει η Nicastrin εμφανίζουν παρόμοιο φαινότυπο με ποντίκια από τα οποία λείπει το Notch1, καθώς και ότι η απουσία της Nicastrin καταστέλλει την παραγωγή του N1ic (Li et al., 2003), παραμένει το γεγονός ότι η Nicastrin έχει και άλλα υποστρώματα, το γνωστότερο εκ των οποίων είναι η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein, APP). Θελήσαμε λοιπόν να εξετάσουμε επιπρόσθετα ένα διαφορετικό μοντέλο ποντικιού στο οποίο το μονοπάτι Notch είναι απενεργοποιημένο. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε τα ποντίκια με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; $CbfI^{flox/flox}$, στα οποία έπειτα από γορήγηση Dox απαλείφεται η DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη Cbf1 που είναι απαραίτητη για την κανονική σηματοδότηση μέσω Notch. Τα ποντίκια αυτά, τα οποία προέκυψαν από διασταυρώσεις μεταξύ των στελεχών R26rtTA (Yu et al., 2005), tetO-Cre (Perl et al., 2002) και Cbf1^{flox/flox} (Han et al., 2002) θυσιάστηκαν δύο μήνες μετά τη χορήγηση Dox. Παρατηρήσαμε ότι 20/25 πειραματόζωα εμφάνισαν υδρονέφρωση (αμφίπλευρη σε 13 από αυτά) λόγω ανάπτυξης όγκου στον ουρητήρα (Εικόνα 8α). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των δύο φύλων ως προς την καρκινογένεση. Οι όγκοι ουρητήρα που προέκυψαν από την απαλοιφή του γονιδίου Cbf1 εμφάνισαν παρόμοια μορφολογία με αυτούς που αναπτύχθηκαν έπειτα από την απαλοιφή του γονιδίου Nestn και ήταν επίσης βασικού τύπου (CK5⁺), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι και στις δύο περιπτώσεις ο φαινότυπος που παρατηρήθηκε οφείλεται στην απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch (Εικόνα 8β, γ).



Εικόνα 8: *α*) Υδρονέφρωση που αναπτύχθηκε σε ποντίκι με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Cbf1*^{flox/flox} στο οποίο έχει χορηγηθεί Dox σε σύγκριση με φυσιολογικό νεφρός από ποντίκι-μάρτυρα. β) Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και γ) χρώση έναντι της CK5 σε τομή παραφίνης από όγκο ουρητήρα ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Cbf1*^{flox/flox}. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.

2. Η ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ ΚΥΣΤΗ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ

2.1. Δημιουργία διαγονιδιακού ποντικιού UpII-Cre-iresGFP

Η έλλειψη ενός εργαλείου για την ειδική για το ουροθήλιο γονιδιακή απαλοιφή με βάση το σύστημα Cre-LoxP (conditional knock-out) οδήγησε στη δημιουργία ενός διαγονιδιακού ποντικιού (transgenic mouse) στο οποίο η έκφραση της ρεκομπινάσης Cre, καθώς και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP), βρίσκεται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου UroplakinII (UpII-Cre-iresGFP). Οι ουροπλακίνες (Ia, Ib, II, και III) είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, χαρακτηριστικές του ουροθηλίου των θηλαστικών, με φυσιολογικό ρόλο στη σταθεροποίηση και τη διαπερατότητα της μεμβράνης των επιφανειακών κυττάρων. Με εξαίρεση την UpIb, η οποία ανιχνεύεται και στο επιθήλιο του κερατοειδούς, όλες οι άλλες ουροπλακίνες είναι ειδικές για το ουροθήλιο. Για τη διαγονιδιακή έκφραση της Cre ειδικά στο ουροθήλιο κατασκευάστηκε ένα χιμαιρικό γονίδιο που περιέχει (από την 5΄ προς την 3΄ κατεύθυνση) την αναρροϊκή αλληλουχία μεγέθους 3,6 kb του υποκινητή του UpII του ποντικιού, η οποία αρκεί για να προσδώσει ειδικότητα για την έκφραση στο ουροθήλιο (Lin et al., 1995), το γονίδιο Cre με μέγεθος 1,1 kb και το GFP έπειτα από μία εσωτερική θέση εισαγωγής του ριβοσώματος (internal ribosome entry site, IRES) με μέγεθος 1,6 kb (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Διαγονιδιακή κατασκευή UpII-Cre-iresGFP για τη δημιουργία ποντικιών που εκφράζουν ειδικά στο ουροθήλιο τη ρεκομπινάση Cre και το δείκτη GFP από ένα ενιαίο δισιστρονικό μήνυμα. Αυτή προέκυψε έπειτα από τη συνένωση των 4 τμημάτων DNA, στα οποία είχαν πραγματοποιηθεί οι παρακάτω πέψεις στα αντίστοιχα αρχικά πλασμίδια:

pBluescript SK (φορέας): NotI-EcoRI

UpII-Cre: NotI-ClaI (από pUpII-Cre)

Cre: ClaI-XhoI (από pSp73-Cre)

ires-GFP: SalI-EcoRI (από pAKH9/MP29)

Έπειτα από μικροένεση του διαγονιδίου στους προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων ποντικιών με γενετικό υπόβαθρο C57Bl6/CBA, τα έμβρυα μεταφέρθηκαν στη μήτρα ψευδοεγκύων θηλυκών από τους απογόνους των οποίων αποκτήσαμε έναν ιδρυτή (founder), ο οποίος μετέδιδε το γονίδιο στους απογόνους του με Μεντελιανή κληρονομικότητα. Η ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του ιδρυτή επιβεβαιώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) [**Εικόνα 10**].





Εικόνα 10: Γονοτύπηση ποντικιών που φέρουν τη διαγονιδιακή κατασκευή UpIICre-iresGFP. **α**) Στη σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής απεικονίζεται η θέση πρόσδεσης των εκκινητών Upk2F: ctcaggctacagtgccca και CreR: gctaagtgccttctctacacc. **β**) Η ζώνη που προκύπτει έχει μέγεθος ~750bp.

Στη συνέχεια, διασταυρώσαμε διαγονιδιακά ποντίκια UpII-Cre-iresGFP με ποντίκια που έφεραν τα γονίδια αναφοράς tdTomato ή lacZ (Εικόνα 11) για να μελετήσουμε το πρότυπο ανασυνδυασμού του γονιδίου αναφοράς ως αποτέλεσμα της δράσης της Cre. Με αυτό τον τρόπο, διαπιστώσαμε ότι η ρεκομπινάση Cre εκφράζεται καθολικά στο ουροθήλιο, όπως αναμενόταν, σε αυξανόμενα επίπεδα από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας προς τα επιφανειακά, ωστόσο υπάρχει έκφραση και σε άλλους ιστούς, όπως το δέρμα, ο σπλήνας, το ήπαρ κ.ά.



Εικόνα 11: Πρότυπο έκφρασης της Cre στην ουροδόχο κύστη και τον ουρητήρα ποντικιών UpII-CreiresGFP (πάνω αριστερά και κέντρο) και στην ουροδόχο κύστη ποντικιών UpII-Cre; R26^{LacZ/+} (πάνω δεξιά) και στην ουροδόχο κύστη ποντικιών UpII-Cre; R26^{tdTomato/+} (κάτω). Με GFP απεικόνίζεται η χρώση με αντίσωμα έναντι της κερατίνης 5 (CK5), η οποία σημαίνει τα κύττεαρα της βασικής στιβάδας. Με κίτρινα

βέλη απεικονίζονται τα CK5⁺ κύτταρα στα οποία η ρεκομπινάση Cre είναι ενεργή και ο ανασυνδυασμός έχει λάβει χώρα, ενώ με πράσινα βέλη απεικονίζονται τα CK5⁺ κύτταρα στα οποία δεν έλαβε χώρα ανασυνδυασμός. Τα κόκκινα βέλη απεικονίζουν CK5⁻ κύτταρα στα οποία έχει συμβεί ανασυνδυασμός, όπως φαίνεται από την έκφραση της tdTomato. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν κύτταρα της βασικής στιβάδας στα οποία δεν έχει λάβει χώρα ανασυνδυασμός όπως φαίνεται από την απουσία χρώσης X-gal. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.

2.2. Η απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch οδηγεί σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης σε ποντίκια

Σε επόμενη φάση, μελετήσαμε την επίδραση της έλλειψης σηματοδότησης μέσω Notch στο ουροποιητικό σύστημα με τη βοήθεια των πειραματοζώων UpII-Cre; *Ncstn*^{flox/flox}. Τα ποντίκια αυτά εμφάνισαν κακοήθη φαινότυπο στο δέρμα, καθώς το Notch είναι γνωστό ογκοκατασταλτικό σε αυτό τον ιστό, δεν ήταν γόνιμα και είχαν μικρή βιωσιμότητα. Παρά τα μειονεκτήματα αυτά, διαπιστώσαμε ότι τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν απλή και οζώδη υπερπλασία, καθώς και υψηλού βαθμού δυσπλασία και καρκίνωμα *in situ* στην ουροδόχο κύστη μετά την πάροδο 2-7 μηνών. Σε κάποιες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε υδρονέφρωση λόγω όγκου στον ουρητήρα (**Εικόνα 12, 13**). Οι κακοήθειες αυτές εκφράζουν δείκτες πολλαπλασιασμού (Ki67, pErk1/2, κυκλίνη D1), καθώς και δείκτες κυττάρων της βασικής στιβάδας (p63, CK5) [**Εικόνα 13, 14**]. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα καρκινικά κύτταρα είναι CK5⁺/CK14⁺, γεγονός που υποδεικνύει ότι προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 12: Ηλικία (σε μήνες, m) και ιστολογικά ευρήματα στην ομάδα ποντικιών με γονότυπο UpII-Cre; *Ncstn*^{flox/flox}. Κάθε βέλος αντιστοιχεί σε ένα ποντίκι. Bl-SH: bladder simple hyperplasia, απλή υπερπλασία ουροδόχου κύστης, Bl-CIS: bladder carcinoma in situ, καρκίνωμα *in situ* ουροδόχου κύστης, Bl-NH: bladder nodular hyperplasia, οζώδης υπερπλασία ουροδόχου κύστης, UrCa: Ureter cancer, καρκίνος ουρητήρα.



Εικόνα 13: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε φυσιολογική ουροδόχο κύστη και σε ουροδόχο κύστη από ποντίκι με γονότυπο UpII-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} που εμφανίζει απλή υπερπλασία, οζώδη υπερπλασία και καρκίνωμα *in situ* (πάνω). Χρώση έναντι των κυτταροκερατινών (Pankeratin) σε ουροδόχο κύστη με οζώδη υπερπλασία, του Ki67 σε ουροδόχο κύστη με καρκίνωμα *in situ*, της pErk σε ουροδόχο κύστη με απλή υπερπλασία και της p63 σε ουροδόχο κύστη με απλή υπερπλασία από ποντίκια με γονότυπο UpII-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} (κάτω). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.



Εικόνα 14: Ανοσοφθορισμός έναντι της κερατίνης 5 (CK5) σε φυσιολογική ουροδόχο κύστη και σε ουροδόχο κύστη από ποντίκι με γονότυπο UpII-Cre; *Ncstn^{flox/flox}* που εμφανίζει απλή υπερπλασία και έναντι του N1ic σε ουροδόχο κύστη από ποντίκι με γονότυπο UpII-Cre; *Ncstn^{flox/flox}* που εμφανίζει απλή υπερπλασία και καρκίνωμα ουρητήρα Οι τομές έχουν επίσης σημανθεί με την πυρηνική χρώση DAPI και την επιθηλιακή χρώση Pankeratin. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.



Εικόνα 15: Ανοσοφθορισμός **a**) έναντι της CK5 (πράσινο) και της ουροπλακίνης III (UpIII) [κόκκινο] και **β**) έναντι της CK14 (κόκκινο) σε καρκινική εξαλλαγή στην ουροδόχο κύστη ποντικιού με γονότυπο UpII-Cre; *Ncstn*^{flox/flox}. Οι τομές έχουν επίσης σημανθεί με την πυρηνική χρώση DAPI. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.

2.3. Οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές της δράσης του μονοπατιού Notch στο ουροθήλιο

Η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch *in vivo* έγινε με τη βοήθεια του ποντικιού *Ncstn*^{flox/flox}, στο οποίο η απουσία της υπομονάδας Nicastrin από το ενζυμικό σύμπλεγμα της γσεκρετάσης έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας και των 4 υποδοχέων Notch συγχρόνως. Συνεπώς, ανακύπτει το ερώτημα ποιος ή ποιοι υποδοχείς διαμεσολαβούν την ογκοκατασταλτική δράση που παρατηρήσαμε στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού. Δεδομένου ότι έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλαγές σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης και στους τέσσερις υποδοχείς Notch (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) είναι πλέον απαραίτητη η μελέτη του ρόλου του καθενός ξεχωριστά στην ογκογένεση. Για να μελετήσουμε την επίδραση της έλλειψης κάθε υποδοχέα Notch μεμονωμένα (ή συνδυασμών τους) χρησιμοποιήσαμε τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια *Notch1*^{flox/flox} (Radtke et al., 1999), *Notch2*^{flox/flox} (McCright et al., 2006), *Notch3^{-/-}* (Leighton et al., 2001) και *Notch4^{-/-}* (Krebs et al., 2000).

Αρχικά, εξετάσαμε ποντίκια από τα οποία απουσιάζει ο υποδοχέας Notch1 (UpII-Cre; Notch1^{flox/flox}, n=5), o Notch2 (UpII-Cre; Notch2^{flox/flox}, n=10), o Notch3 (Notch3^{-/-}, n=11) ή o Notch4 (Notch4^{-/-}, n=3), καθώς και πειραματόζωα με συνδυαστική έλλειψη των υποδοχέων Notch1 και Notch2 (UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox}; *Notch2*^{flox/flox}, n=4), Notch1 και Notch3 (UpII-Cre; Notch1^{flox/flox}; Notch3^{-/-}, n=1) και Notch2 και Notch3 (UpII-Cre; Notch2^{flox/flox}; Notch3^{-/-}, n=6), καθώς και ετερόζυγα για τους υποδοχείς Notch1, Notch2 και Notch3 (UpII-Cre; Notch1^{flox/+}; $Notch2^{flox/+}$; $Notch3^{+/-}$, n=4) σε ηλικία 6 μηνών στις περισσότερες περιπτώσεις (με εύρος ηλικίας 4-17 μήνες) και διαπιστώσαμε ότι είχαν φυσιολογική ουροδόχο κύστη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήσαμε την ύπαρξη πολλαπλών στιβάδων στο ουροθήλιο (Εικόνα 16), καθώς και μεγάλο αριθμό κυττάρων που εκφράζουν το δείκτη προγονικών κυττάρων CK14 και το δείκτη πολλαπλασιασμού Κί67 (Εικόνα 17). Συγκεκριμένα, σχεδόν όλα τα κύτταρα της βασικής στιβάδας ήταν θετικά για CK14, ενώ σε ποντίκια φυσικού τύπου αντίστοιχης ηλικίας CK14+ κύτταρα απαντώνται σπάνια (Papafotiou et al., 2016) [Εικόνα 17β, δ]. Επιπλέον, ένα ποντίκι με συνδυαστική έλλειψη των υποδοχέων Notch1 και Notch2 εμφάνισε θηλωματοποίηση στον ουρητήρα (Εικόνα 17ζ). Τέλος, εξετάσαμε δύο ποντίκια με ενεργοποιημένο υποδοχέα Notch1 (UpII-Cre; *Ef1*/N1ic), τα οποία, όπως αναμενόταν, είχαν φυσιολογική ουροδόχο κύστη. Ωστόσο, ένα από αυτά εμφάνισε υδρονέφρωση, φαινότυπος που μέχρι τώρα είχε παρατηρηθεί σε ποντίκια με απενεργοποιημένο μονοπάτι Notch.




Εικόνα 16: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές ουροδόχου κύστης από ποντίκια ηλικίας 6-12 μηνών με γονότυπο α) UpII-Cre; Notch2^{flox/flox}, β) UpII-Cre; Notch1^{flox/flox}; Notch2^{flox/flox}, γ) Notch3^{-/-}, δ) UpII-Cre; Notch1^{flox/+}; Notch2^{flox/+}; Notch3^{+/-} και ε) Notch4⁻ /- που εμφανίζουν πολλαπλές στιβάδες. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.





Εικόνα 17: Ανοσοφθορισμός σε τομές ουροδόχου κύστης ποντικιού **α**), **β**) 8 μηνών από το οποίο απουσιάζει ο υποδοχέας Notch1 (UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox}), **γ**), **δ**), **στ**) 7 μηνών από το οποίο απουσιάζει ο υποδοχέας Notch2 (UpII-Cre; *Notch2*^{flox/flox}), **ε**) 4 μηνών από το οποίο απουσιάζουν οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 (UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox}), **ε**) 4 μηνών από το οποίο απουσιάζουν οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 (UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox}) και και **ζ**) σε τομές ουρητήρα ποντικιού 4 μηνών από το οποίο απουσιάζουν οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 (UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox}) και και **ζ**) σε τομές ουρητήρα ποντικιού 4 μηνών από το οποίο απουσιάζουν οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 (UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox}) και και **ζ**) σε τομές ουρητήρα ποντικιού 4 μηνών από το οποίο απουσιάζουν οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 (UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox}) και εμφανίζει θηλωματοποίηση με χρώση έναντι της CK5 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο) [αριστερά] και με χρώση έναντι του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 (πράσινο χρώμα) και της CK14 (κόκκινο) [δεξιά]. Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI (μπλε). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν στις τιμές που αναγράφονται.

Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήξαμε χρησιμοποιώντας και μια δεύτερη, ειδική για το ουροθήλιο, Cre σειρά, την CK5-CreER (Indra et al., 1999), στην οποία η ρεκομπινάση Cre εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα της βασικής στιβάδας όπου ανευρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης (Papafotiou et al., 2016), για να μελετήσουμε το ρόλο του υποδοχέα Notch1 στην καρκινογένεση στο ουροποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε ποντίκια από τα οποία απουσιάζει ο υποδοχέας Notch1 (CK5-CreER; *Notch1*^{flox/flox}, n=4) και διαπιστώσαμε ότι όλα παρουσίαζαν φυσιολογική μορφολογία στην ουροδόχο κύστη 6 μήνες μετά την επαγωγή της έκφρασης της ρεκομπινάσης Cre με χορήγηση Tamoxifen. Αντίστροφα, μελετήσαμε και την υπερέκφραση του υποδοχέα Notch1 στην ίδια σειρά Cre. Από τα 4 ποντίκια με γονότυπο CK5-CreER; *Ef1*/N1ic που εξετάσαμε, δύο (2 και 7 μηνών) εμφάνισαν πολλαπλές στιβάδες στην ουροδόχο κύστη και αυξημένο αριθμό προγονικών CK14⁺ κυττάρων (**Εικόνα 18, 19**).



Εικόνα 18: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές ουροδόχου κύστης από ποντίκια CK5-CreER; *Ef1*/N1ic **a**) 2 μηνών και **β**) 7 μηνών που εμφανίζουν πολλαπλές κυτταρικές στιβάδες στην ουροδόχο κύστη. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.



Εικόνα 19: Ανοσοφθορισμός σε τομές ουροδόχου κύστης ποντικιού 2 μηνών με γονότυπο CK5-CreER; *Ef1*/N1ic **a**) με χρώση έναντι της CK5 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο) και **β**) με χρώση έναντι της CK14 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο). Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI (μπλε). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 75 μm.

Συνεπώς, η απενεργοποίηση ενός μόνο υποδοχέα—ή και δύο—δεν αρκεί για την εμφάνιση νεοπλασματικού φαινοτύπου στην ουροδόχο κύστη ποντικιών τουλάχιστον στο χρονικό διάστημα που τα μελετήσαμε, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι εναπομείναντες υποδοχείς αναπληρώνουν τη λειτουργία των απόντων και άρα οι τέσσερις υποδοχείς Notch δρουν συνεργιστικά.

Το επόμενο βήμα μας ήταν να μελετήσουμε την επίδραση της απώλειας των υποδοχέων Notch σε ένα μοντέλο χημικής καρκινογένεσης στο ποντίκι. Προσθέσαμε λοιπόν στο πόσιμο νερό των πειραματοζώων 0,05% BBN (Ν-βουτυλ-Ν-(4-υδροξυβουτυλ)νιτροζαμίνη, η οποία είναι ουσία παρόμοια με αυτές που εμπεριέχονται σε προϊόντα καπνού. Πρόκειται για έναν ισχυρό DNA αλκυλιωτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την επαγωγή καρκίνου σε τρωκτικά και συγκεκριμένα ουροθηλιακών καρκινωμάτων χωρίς επίδραση στα νεφρά, τους ουρητήρες ή το γαστρεντερικό σύστημα. Το φάσμα των ουροθηλιακών αλλοιώσεων που προκαλείται από τη BBN είναι παρεμφερές με αυτό που παρατηρείται στους ανθρώπους. Η BBN τείνει να προκαλεί μεταλλαγές που αφορούν μεταξύ άλλων τα γονίδια *Tp53* και *Ras* (Vasconcelos-Nóbrega et al., 2012).

Παρατηρήσαμε ότι μετά από 2-3 μήνες χορήγησης BBN, ποντίκια από τα οποία έλειπε ο υποδοχέας Notch1 ή ο υποδοχέας Notch2 ειδικά στο ουροθήλιο (UpII-Cre; Notch1 flox/flox και UpII-Cre; $Notch2^{flox/flox}$ αντίστοιγα) εμφανίζουν κυρίως κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία, ενώ τα ποντίκια φυσικού τύπου παρουσιάζουν επί το πλείστον υπερπλασία/δυσπλασία (Πίνακας 1, Εικόνα 20α-δ). Συνεπώς, ο φαινότυπος της εστιακής κερατινοποιητικής πλακώδους μεταπλασίας που εμφανίζεται αποκλειστικά σχεδόν σε όλα τα πειραματόζωα από τα οποία απουσιάζει ο Notch1 (5/6) ή ο Notch2 (8/10), είναι αρκετά σπάνιος στα φυσιολογικά ζώα (2/10). Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν τους χαρακτηριστικούς δείκτες της κερατινοποιητικής πλακώδους μεταπλασίας CK5, CK14 και CK10 (Εικόνα 21). Όσον αφορά τα ποντίκια από τα οποία λείπει ο υποδοχέας Notch3 (Notch3-/-), αυτά είναι φυσιολογικά ή εμφανίζουν εστιακή δυσπλασία χαμηλού βαθμού και μεμονωμένα περιστατικά πλακώδους μεταπλασίας (1/5) [Πίνακας 1, Εικόνα 20ε]. Επιπλέον, είδαμε ότι τα ποντίκια από τα οποία απουσιάζει ο Notch4 (Notch4-'-) παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα με τα ζώα φυσικού τύπου, καθώς χαρακτηρίζονται κυρίως από εστιακή δυσπλασία χαμηλού βαθμού, ενώ λίγα παρουσιάζουν εστιακή πλακώδη μεταπλασία (2/9) [Πίνακας 1, Εικόνα 20στ]. Επιπρόσθετα, ποντίκι που είχε συνδυαστική έλλειψη των υποδογέων Notch1 και Notch2, καθώς και άλλο από το οποίο έλειπαν συγχρόνως οι Notch2 και Notch3 εμφάνισαν επίσης εστιακή κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία. Έπειτα, παρατηρήσαμε ότι ποντίκι από τα οποίο απουσιάζουν και οι 4 υποδοχείς Notch (UpII-Cre; Nestnflox/flox) παρουσίασε διηθητικό πλακώδες καρκίνωμα και in situ μετά από 3 μήνες σε BBN (Εικόνα 20ζ). Είδαμε ακόμη ότι ποντίκι με

ετερόζυγη απώλεια των υποδοχέων Notch1 και Notch2 εμφάνισε εστιακό πλακώδες καρκίνωμα και δυσπλασία υψηλού βαθμού, γεγονός που υποδηλώνει συνέργεια μεταξύ των δύο υποδοχέων. Τέλος, δύο ποντίκια με ενεργοποιημένο υποδοχέα Notch1 (UpII-Cre; *Ef1*/N1ic) παρέμειναν υγιή στο αντίστοιχο χρονικό διάστημα έκθεσης σε BBN (**Εικόνα 20η**). Έπειτα από 6 μήνες χορήγησης BBN, ποντίκια με γονότυπο UpII-Cre; *Ef1*/N1ic εμφάνισαν διηθητικό πλακώδες καρκίνωμα (n=4) χαμηλής ή μέτριας διαφοροποίησης, δηλαδή το φαινότυπο που επικρατεί και στα ποντίκια φυσικού τύπου, ωστόσο σε μεγαλύτερη συχνότητα (**Πίνακας 2**). Τρία από αυτά εμφάνισαν επίσης υδρονέφρωση και το τέταρτο παρουσίασε ακόμη απλή και οζώδη υπερπλασία.

Πίνακας 1: Αλλοιώσεις στην ουροδόχο κύστη ποντικιών από τα οποία απουσιάζει ο υποδοχέας Notch1, 2, 3 ή 4 έπειτα από 2 μήνες χορήγησης BBN

	wt	UpIICre; Notch1 ^{flox/flox}	UpIICre; Notch2 ^{flox/flox}	Notch3-/-	Notch4-/-
Φυσιολογική			1	2	
Ουροθηλιακή υπερπλασία	1				
Οζώδης υπερπλασία		1			
Εστιακή δυσπλασία χαμηλού βαθμού			1	2	5
Ουροθηλιακή υπερπλασία/ Δυσπλασία χαμηλού βαθμού	6				1
Οζώδης υπερπλασία/ Εστιακή δυσπλασία χαμηλού- υψηλού βαθμού					1
Δυσπλασία υψηλού βαθμού	1				
προς εστιακό καρκίνωμα in situ					
Ουροθηλιακή υπερπλασία/ Δυσπλασία χαμηλού βαθμού – Εστιακή κερατινοποιητική πλακώδης μεταπλασία	2				
Οζώδης υπερπλασία/ Εστιακή δυσπλασία χαμηλού βαθμού– Κερατινοποιητική πλακώδης μεταπλασία					1
Εστιακή δυσπλασία υψηλού βαθμού – Κερατινοποιητική πλακώδης μεταπλασία					1

Πλακώδης μεταπλασία -Εστιακή δυσπλασία υψηλού βαθμού – καρκίνωμα in situ Εστιακή κερατινοποιητική πλακώδης μεταπλασία ΣΥΝΟΛΟ

			1	
	5	8		
10	6	10	5	9

Πίνακας 2: Αλλοιώσεις στην ουροδόχο κύστη ποντικιών φυσικού τύπου έπειτα από 6 μήνες χορήγησης BBN

	wt
Φυσιολογική	2
Εστιακή ουροθηλιακή υπερπλασία	1
Οζώδης υπερπλασία	1
Οζώδης υπερπλασία /	1
Πλακώδης μεταπλασία	
Διηθητικό αδενοκαρκίνωμα μέτριας	1
διαφοροποίησης	
Διηθητικό κερατινοποιητικό	8
πλακώδες καρκίνωμα μέτριας	
διαφοροποίησης	
ΣΥΝΟΛΟ	14



Εικόνα 20: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές ουροδόχου κύστης μετά από 2-3 μήνες χορήγησης BBN σε ποντίκια **α**) φυσικού τύπου (wt) που εμφανίζουν υπερπλασία και **β**) δυσπλασία, **γ**) UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox} (Notch1 KO) και **δ**) UpII-Cre; *Notch2*^{flox/flox} (Notch2 KO) που εμφανίζουν εστιακή κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία, **ε**) *Notch3*^{-/-} (Notch3 KO) και **στ**) *Notch4*^{-/-} (Notch4 KO) που εμφανίζουν εστιακή δυσπλασία χαμηλού βαθμού και **ζ**) UpII-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} (Nicastrin KO) που εμφανίζει διηθητικό και *in situ* πλακώδες καρκίνωμα και **η**) UpII-Cre; *Ef1*/N1ic (N1ic) που είναι φυσιολογικό. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.



Εικόνα 21: Ανοσοφθορισμός σε τομές ουροδόχου κύστης ποντικιού με γονότυπο UpII-Cre; *Notch1*^{flox/flox} το οποίο εμφανίζει κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία μετά από 2 μήνες χορήγησης BBN **a**) με χρώση έναντι της κυτταροκερατίνης CK5 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο), **β**) με χρώση έναντι της CK14 (πράσινο) και του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 (κόκκινο) και γ) με χρώση έναντι της CK10 (πράσινο), η οποία σημαίνει τα κερατινοποιητικά πλακώδη κύτταρα. Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI (μπλε). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 100 μm.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε ζώα της CK5-CreER σειράς, στην οποία παρατηρήσαμε πολύ πιο ήπιους φαινοτύπους. Συγκεκριμένα, ποντίκια από τα οποία απουσίαζε ο υποδοχέας Notch1 (CK5-CreER; *Notch1*^{flox/flox}, n=6) είχαν φυσιολογική ουροδόχο κύστη εκτός από ένα που εμφάνισε εστιακή κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία κι ένα με απλή και οζώδη υπερπλασία και πειραματόζωα από τα οποία απουσίαζε ο υποδοχέας Notch2 (CK5-CreER; *Notch2*^{flox/flox}, n=2) εμφάνισαν υπερπλασία και εστιακή δυσπλασία χαμηλού βαθμού μετά από 2 μήνες χορήγησης BBN (**Εικόνα 22α, β**). Επιπλέον, ένα ποντίκι από το οποίο έλειπαν και οι 4 υποδοχείς Notch (CK5-CreER; *Ncstn*^{flox/flox}) παρουσίασε πλακώδη μεταπλασία, δυσπλασία χαμηλού βαθμού και εστιακή οζώδη υπερπλασία (**Εικόνα 22**γ). Από την άλλη, ποντίκι με υπερέκφραση του υποδοχέα Notch1 (CK5-CreER; *Ef1*/N1ic) παρέμεινε υγιές έπειτα από 2 μήνες σε BBN (**Εικόνα 22δ**). Μετά από 6 μήνες χορήγησης BBN, δύο ποντίκια με ίδιο γονότυπο εμφάνισαν διηθητικό αδενοπλακώδες καρκίνωμα μέτριας διαφοροποίησης και υδρονέφρωση και διηθητικό πλακώδες καρκίνωμα αντίστοιχα, που είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι φαινότυποι και στα ποντίκια φυσικού τύπου στο ίδιο χρονικό διάστημα έκθεσης (Εικόνα 22ε, στ).



Εικόνα 22: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές ουροδόχου κύστης μετά από 2 μήνες χορήγησης BBN σε ποντίκι α) CK5-CreER; *Notch1*^{flox/flox} (Notch1 KO) που εμφανίζει εστιακή κερατινοποιητική πλακώδη

μεταπλασία, **β**) CK5-CreER; *Notch2*^{flox/flox} (Notch2 KO) που εμφανίζει υπερπλασία και εστιακή δυσπλασία χαμηλού βαθμού, γ) CK5-CreER; *Ncstn*^{flox/flox} (Nicastrin KO) που εμφανίζει πλακώδη μεταπλασία και **δ**) CK5-CreER; *Ef1*/N1ic (N1ic) που έχει φυσιολογική ουροδόχο κύστη και **ε**) μετά από 6 μήνες χορήγησης BBN σε ποντίκι CK5-CreER; *Ef1*/N1ic που εμφανίζει διηθητικό αδενοπλακώδες καρκίνωμα μέτριας διαφοροποίησης και **στ**) σε ποντίκι ίδιου γονοτύπου που εμφανίζει διηθητικό πλακώδες καρκίνωμα. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm. Τα β-ε έχουν ίδια μεγέθυνση με το α, ενώ το στ με το ε.

Συνολικά, συμπεραίνουμε ότι οι υποδοχείς Notch δρουν συνεργιστικά και ότι οι Notch1 και Notch2 αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές της δράσης του μονοπατιού Notch στο ουροθήλιο.

3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ ΜΕ ΑΛΛΑ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ ΚΥΣΤΗ

3.1. Η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch φαίνεται να δρα συνεργιστικά με την ενεργοποίηση των μονοπατιών Ras και PI3K στον καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος σε ποντίκια

Τα διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από κοινές μεταλλαγές σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα TP53, RB και PTEN. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων λειτουργούν ως δικλείδες ασφαλείας στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, ωστόσο η απουσία τους από μόνη της δεν οδηγεί σε ογκογένεση. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί *in vivo* σε μοντέλα ποντικιού, όπου έχει δειχθεί ότι η ταυτόχρονη απαλοιφή των Tp53 και Rb οδηγεί μακροπρόθεσμα σε υπερπλασία αλλά όχι σε όγκο (He et al., 2009). Προφανώς, καμία από τις δύο από μόνη της δεν αρκεί για να προκαλέσει καρκινογένεση. Μόνο η συνδυαστική απενεργοποίηση των Tp53 και Pten οδηγεί σε διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Puzio-Kuter et al., 2009).

Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι στο μοντέλο μας μία μόνο μεταλλαγή που οδηγεί στην απώλεια της δράσης της γ-σεκρετάσης και κατά συνέπεια στην απενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch επαρκεί για την εμφάνιση νεοπλασματικού φαινοτύπου. Συνεπώς, εγείρεται το ερώτημα αν το Notch έχει δεσπόζουσα ογκοκατασταλτική δράση στο ουροθήλιο ανεξάρτητα από μεταλλαγές σε άλλα γονίδια/μονοπάτια. Για να μελετήσουμε πιθανές αλληλεπιδράσεις του Notch με ογκογόνα σήματα ξεκινήσαμε ένα πρόγραμμα διασταύρωσης μεταξύ ποντικιών στα οποία απουσιάζει η σηματοδότηση μέσω Notch και ζώων που φέρουν γνωστές μεταλλαγές σε ογκογονίδια (π.χ. Kras, Pik3ca) ή ελλείψεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. Tp53) στην ουροδόχο κύστη. Άλλωστε και οι κυτταρικές σειρές από ανθρώπινα ουροθηλιακά καρκινώματα στις οποίες υπερεκφράσαμε το ενδοκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων Notch με τη βοήθεια αδενοϊικών φορέων παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα γενετικών αλλοιώσεων, πιθανότατα ανεξάρτητων από το Notch, ωστόσο σε όλες όσες εξετάσαμε παρατηρήσαμε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.

Γνωρίζουμε ότι το 24% των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης φέρει μεταλλαγές στο *PIK3CA*, εκ των οποίων το 12% αφορά στην αμινοξική αντικατάσταση E545K και το 5% φέρει μεταλλαγές στο *KRAS* και οι μισές από αυτές αφορούν στο G12D (Kompier et al., 2010). Έτσι, χρησιμοποιήσαμε πειραματόζωα στα οποία είναι ανενεργό το μονοπάτι Notch και συγχρόνως φέρουν γνωστές μεταλλαγές σε «θερμά σημεία» (hotspot) στα γονίδια *Kras* ή *Pik3ca*. Συγκεκριμένα, διασταυρώσαμε ποντίκια *Ncstn*^{flox/flox} με ποντίκια που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή του *Kras* G12D (*Kras*^{LSL-G12D}) [Jackson et al., 2001] ή τη μεταλλαγή E545K στο εξώνιο 9 της *Pik3ca* (*Pik3ca*^{E545K}) [Stratikopoulos et al., 2015] σε δύο διαφορετικές σειρές που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre στο ουροθήλιο, την την R26rtTA; tetO-Cre, η έκφραση της οποίας επάγεται έπειτα από τη χορήγηση δοξυκυκλίνης (Dox), και την UpII-Cre.

Όπως προαναφέρθηκε (βλ. κεφ. 1), τα ποντίκια από τα οποία απουσιάζει η σηματοδότηση μέσω Notch (R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox}, n=11/18) εμφανίζουν υδρονέφρωση λόγω της παρουσίας όγκου στον ουρητήρα. Κανένα όμως από αυτά, δεν παρουσίασε νεοπλασματικό φαινότυπο στην ουροδόχο κύστη, παρόλο που όπως δείξαμε ανασυνδυασμός συμβαίνει τόσο στον ουρητήρα όσο και στην ουροδόχο κύστη. Κατ' αρχάς, παρατηρήσαμε ότι τα ποντίκια τα οποία φέρουν τη μεταλλαγή G12D στο γονίδιο *Kras* (R26rtTA; tetO-Cre; *Kras*^{LSL-G12D}, n=4) ή τη μεταλλαγή E545K στο *Pik3ca* (R26rtTA; tetO-Cre; *Pik3ca*^{E545K}, n=5) ή και τις δύο μαζί (R26rtTA; tetO-Cre; *Kras*^{LSL-G12D}; *Pik3ca*^{E545K}, n=1) έχουν φυσιολογικό ουροθήλιο 6 μήνες μετά τη χορήγηση Dox. Το ίδιο ισχύει και όταν η καθεμία από αυτές τις μεταλλαγές συνδυαστεί με ετερόζυγη απώλεια της *Ncstn* (R26rtTA; tetO-Cre; *Kras*^{LSL-G12D}; *Ncstn*^{flox/+}, n=8 και R26rtTA; tetO-Cre; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/+}, n=16). Προφανώς, ούτε η ετερόζυγη απώλεια της *Ncstn* flox/+, n=11) από μόνη της οδηγεί στην εμφάνιση νεοπλασματικού φαινοτύπου στο ουροθήλιο. Ωστόσο, η ταυτόχρονη ετερόζυγη έλλειψη της *Ncstn* και έκφραση του μεταλλαγμένου *Kras* οδήγησε σε ένα ποντίκι στην εμφάνιση υδρονέφρωσης λόγω όγκου στον

ουρητήρα, έντονη ενδιάμεση νεφρίτιδα και βλάβες σπειραματοκυστικής νόσου και η ταυτόχρονη ετερόζυγη απώλεια σηματοδότησης μέσω Notch, έκφραση της μεταλλαγής G12D του Kras και έκφραση του μεταλλαγμένου *Pik3ca* (R26rtTA; tetO-Cre; Kras^{LSL-G12D}; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/+}, n=1) οδήγησε στην εμφάνιση υδρονέφρωσης λόγω ουροθηλιακού καρκινώματος στον ουρητήρα σε ποντίκι 2 μήνες μετά τη χορήγηση Dox (**Εικόνα 23**γ).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε 18 ποντίκια με απενεργοποιημένο το μονοπάτι Νοtch και ενεργοποιημένο το μονοπάτι PI3K (R26rtTA; tetO-Cre; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/flox}) και παρατηρήσαμε ότι ένα από αυτά εμφάνισε ουροθηλιακό καρκίνωμα *in situ* (carcinoma *in situ*, CIS) (**Εικόνα 23β**, **Εικόνα 24α**, **β**) κι ένα παρουσίασε υπερπλασία/ δυσπλασία 6 μήνες μετά τη χορήγηση Dox (**Εικόνα 23a**, **Εικόνα 24**γ). Έπειτα, από έξι ποντίκια από τα οποία λείπει η Nicastrin και συγχρόνως φέρουν τη μεταλλαγή G12D στο γονίδιο *Kras* (R26rtTA; tetO-Cre; *Kras*^{LSL-G12D}; *Ncstn*^{flox/flox}), κανένα δεν παρουσίασε νεοπλασματικό φαινότυπο στην ουροδόχο κύστη. Σημειώνεται ότι τα ποντίκια με απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch κι επιπλέον ενεργοποίηση του Kras ή της Pi3k εμφάνισαν υδρονέφρωση σε ποσοστά παρεμφερή με τα ποντίκια από τα οποία είναι απενεργοποιημένο το Notch. Τέλος, τρία ποντίκια που έφεραν και τις τρεις αλλοιώσεις μαζί εμφάνισαν υδρονέφρωση (στο ένα αμφίπλευρη) λόγω όγκου στον ουρητήρα ενώ η ουροδόχος κύστη ήταν φυσιολοική 2-6 μήνες μετά τη χορήγηση Dox. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ποντίκια που φέρουν το *Kras*^{LSL-G12D} συνήθως εμφανίζουν όγκους στο δέρμα με αποτέλεσμα να θυσιάζονται πολύ νωρίτερα από τους 6 μήνες μετά τη χορήγηση Dox όπως τα ποντίκια των υπόλοιπων ομάδων.



Εικόνα 23: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές ουροδόχου κύστης από ποντίκια με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/flox}, 6 μήνες μετά τη χορήγηση Dox, που εμφανίζουν **α**) υπερπλασία/δυσπλασία και **β**) ουροθηλιακό καρκίνωμα *in situ* και **γ**) σε τομή από ουροθηλιακό καρκίνωμα στον ουρητήρα ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Kras*^{LSL-G12D}; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/+}, 2 μήνες μετά τη χορήγηση Dox. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 75 μm.



Εικόνα 24: *α*) Ανοσοφθορισμός σε τομές ουροδόχου κύστης από ποντίκι με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/flox}, 6 μήνες μετά τη χορήγηση Dox, που που εμφανίζει ουροθηλιακό καρκίνωμα *in situ* με χρώση έναντι της CK5 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο) και β) με χρώση έναντι της CK14 (πράσινο χρώμα) και γ) σε ποντίκι με τον ίδιο γονότυπο που εμφανίζει υπερπλασία στην ουροδόχο κύστη με χρώση έναντι της CK5 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο). Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI (μπλε). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 75 μm.

Παρόμοια αποτελέσματα πήραμε και από πειραματόζωα της σειράς UpII-Cre. Συγκεκριμένα, ποντίκια με ετερόζυγη έλλειψη του μονοπατιού Notch (UpII-Cre; $Ncstn^{flox/+}$, n=2) έχουν φυσιολογική ουροδόχο κύστη σε ηλικία 6 μηνών. Ο συνδυασμός της ετερόζυγης απώλειας σηματοδότησης μέσω Notch με τη μεταλλαγή G12D στο γονίδιο Kras (UpII-Cre; Kras^{LSL-G12D}; $Ncstn^{flox/+}$, n=11) οδήγησε σε υπερπλασία της ουροδόχου κύστης σε δύο πειραματόζωα, ένα εκ των οποίων εμφάνισε επίσης όγκο στον ουρητήρα (Εικόνα 25ε). Επιπλέον, εξετάσαμε ποντίκια που έφεραν ετερόζυγη έλλειψη του μονοπατιού Notch ταυτόγρονα με τη μεταλλαγή E545K στο *Pik3ca* (UpII-Cre; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/+}, n=4), από τα οποία ένα παρουσίασε θηλώματα και υπερπλασία στην ουροδόχο κύστη και θηλωματοποίηση στον ουρητήρα σε ηλικία 9 μηνών (Εικόνα 25, 26β, γ). Ποντίκια με ετερόζυγη έλλειψη του μονοπατιού Notch που επιπλέον έφεραν τη μεταλλαγή E545K στο Pik3ca και τη μεταλλαγή G12D στο γονίδιο Kras (UpII-Cre: Kras^{LSL-} G12D ; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/+}, n=2), ποντίκια με παντελή έλλειψη σηματοδότησης μέσω Notch και ενεργοποιημένο μονοπάτι PI3K (UpII-Cre; Pik3ca^{E545K}; Ncstn^{flox/flox}, n=1) ή RAS (UpII-Cre; $Kras^{LSL-G12D}$; $Ncstn^{flox/flox}$, n=6) καθώς και ποντίκια που έφεραν και τις τρεις αλλοιώσεις (UpII-Cre; $Kras^{LSL-G12D}$; $Pik3ca^{E545K}$; $Ncstn^{flox/flox}$, n=1) εμφάνισαν υπερπλασία, δυσπλασία και καρκίνωμα in situ στην ουροδόχο κύστη, αλλοιώσεις που είχαμε παρατηρήσει προηγουμένως (βλ. κεφ.2) σε πειραματόζωα στα οποία είναι απενεργοποιημένο μόνο το μονοπάτι Notch. Τέλος, ένα

ποντίκι με γονότυπο UpII-Cre; Kras^{LSL-G12D}; Nestn^{flox/flox} εμφάνισε γιγαντιαία («balloon») ουροθηλιακά κύτταρα σε ηλικία 4 μηνών (Εικόνα 26δ). Αξιοσημείωτα, ένα ποντίκι που έφερε μεταλλαγή στο Kras εμφάνισε υπερπλασία (Εικόνα 26α). Αναμένεται να θυσιαστούν περισσότερα πειραματόζωα, κυρίως από αυτά που φέρουν συγχρόνως τη μεταλλαγμένη μορφή του Kras, τη μεταλλαγμένη μορφή του Pik3ca και έλλειψη του μονοπατιού Notch, ώστε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα. Ωστόσο, από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα διαφαίνεται συνέργεια του μονοπατιού Notch με τα μονοπάτια Ras και PI3K στο ουροποιητικό σύστημα.



Εικόνα 25: *α*) Ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές ουρητήρα που εμφανίζει θηλωματοποίηση (papillomatosis) με χρώση έναντι της CK5 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο) **β**) και ουροδόχου κύστης που παρουσιάζει θήλωμα με χρώση έναντι της UpIII (κόκκινο) από ποντίκι 9 μηνών με γονότυπο UpII-Cre; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/+}. Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI (μπλε). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 100 και 50 μm αντίστοιχα.



Εικόνα 26: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές παραφίνης από ουροδόχο κύστη ποντικιού **a**) με γονότυπο UpII-Cre; *Kras*^{LSL-G12D} που εμφανίζει υπερπλασία, **β**) 9 μηνών, με γονότυπο UpII-Cre; *Pik3ca*^{E545K}; *Ncstn*^{flox/+} που εμφανίζει θηλώματα και γ) υπερπλασία, **δ**) 4 μηνών, με γονότυπο UpII-Cre; *Kras*^{LSL-G12D}; *Ncstn*^{flox/flox} που εμφανίζει γιγάντια («balloon») κύτταρα και ε) 6 μηνών, με γονότυπο UpII-Cre; *Kras*^{LSL-G12D}; *Ncstn*^{flox/+} που εμφανίζει υπερπλασία. Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.

3.2. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *Tp53* οδηγεί σε υπερπλασία/δυσπλασία της ουροδόχου κύστης του ποντικιού

Δεδομένου ότι το μόνο μοντέλο ποντικιού με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης που έχει περιγραφεί είναι αυτό που προκύπτει από την ταυτόχρονη έλλειψη της p53 και της Pten, θελήσαμε να διερευνήσουμε το φαινότυπο στον οποίο θα οδηγήσει ο συνδυασμός της απενεργοποίησης της p53 και της ενεργοποίησης του Kras. Έτσι, διασταυρώσαμε ποντίκια που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή του Kras G12D (Kras^{LSL-G12D}) [Jackson et al., 2001] και ποντίκια στα οποία λείπει η p53 ($Tp53^{\text{flox/flox}}$) [Chen et al., 2005] στη σειρά UpII-Cre. Παρατηρήσαμε ότι ενώ τα ποντίκια τα οποία είναι ετερόζυγα για την έλλειψη της p53 (UpII-Cre; $Tp53^{flox/+}$) είναι φυσιολογικά (n=2) σε ηλικία 6 μηνών, τρία από τα πέντε ποντίκια από τα οποία λείπει καθολικά η p53 (UpII-Cre; Tp53^{flox/flox}) εμφανίζουν υπερπλασία και δυσπλασία εστιακά (Εικόνα 27α, β). Από την άλλη, τα ποντίκια με ετερόζυγη έλλειψη της p53 και ενεργοποίηση του *Kras* (UpII-Cre; $Tp53^{\text{flox}/+}$: *Kras*^{LSL-G12D}) είναι επί το πλείστον υγιή (n=4) ωστόσο ένα εμφάνισε γιγάντια («balloon») ουροθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 27γ) κι ένα άλλο υπερπλασία εστιακά (Εικόνα 27δ), ενώ αυτά που έχουν ομόζυγη έλλειψη της p53 και ενεργοποίηση του Kras (UpII-Cre; Tp53^{flox/flox} ; Kras^{LSL-G12D}) φέρουν τον ίδιο χαρακτηριστικό τύπο κυττάρων, ο οποίος συνοδεύεται επιπλέον από δυσπλαστικούς πυρήνες (n=1) [Εικόνα 27ε]. Να σημειωθεί ότι το τελευταίο πειραματόζωο θυσιάστηκε σε ηλικία 2 μηνών. Αναμένονται αποτελέσματα από περισσότερα ποντίκια όλων των γονοτύπων και κυρίως του (UpII-Cre; Tp53^{flox/flox}; Kras^{LSL-G12D} σε ηλικία 6 μηνών ώστε να διαπιστώσουμε αν τα δύο αυτά μονοπάτια δρουν συνεργιστικά στην καρκινογένεση στην ουροδόγο κύστη του ποντικιού.



Εικόνα 27: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές ουροδόχου κύστης **α**, **β**) ποντικιού UpII-Cre; $Tp53^{flox/flox}$, 6 μηνών, που εμφανίζει υπερπλασία/δυσπλασία υψηλού βαθμού εστιακά, **γ**) ποντικιού UpII-Cre; $Tp53^{flox/+}$; $Kras^{LSL-G12D}$, 5 μηνών, που εμφανίζει γιγάντια («balloon») ουροθηλιακά κύτταρα, **δ**) ποντικιού UpII-Cre; $Tp53^{flox/+}$; $Kras^{LSL-G12D}$, 6 μηνών, που εμφανίζει υπερπλασία και ε) ποντικιού UpII-Cre; $Tp53^{flox/flox}$; $Kras^{LSL-G12D}$, 2 μηνών, που εμφανίζει γιγάντια («balloon») ουροθηλιακά κύτταρα με δυσπλαστικούς πυρήνες. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.

4. Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΝΟΤCΗ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

4.1. Δημιουργία κυτταρικών σειρών από όγκους ουρητήρα ποντικιών από τα οποία απουσιάζει η Nicastrin

Οι κυτταρικές σειρές από όγκους ποντικιών αποτελούν πολύτιμο πειραματικό εργαλείο για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους. Στην περίπτωσή μας, κυτταρικές σειρές από τους ουροθηλιακούς όγκους ποντικιών με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox} παρέχουν ένα σύστημα από το οποίο απουσιάζει παντελώς η σηματοδότηση μέσω Notch. Συνεπώς, μπορούν να επιτρέψουν την εκτέλεση πειραμάτων ανάκτησης λειτουργίας (gain-of-function) με ενεργοποιημένες μορφές των υποδοχέων Notch. Δημιουργήσαμε, λοιπόν, κυτταρικές σειρές από όγκους ουρητήρα στις οποίες επιβεβαιώθηκε ο πλήρης ανασυνδυασμός του γενετικού τόπου του *Ncstn*, καθώς και η απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης Nicastrin (**Εικόνα 28**). Αρκετά από τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μία από αυτές, την καρκινική κυτταρική σειρά P3, η οποία προήλθε από όγκο ουρητήρα.



Εικόνα 28: *a*) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blot) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των ανθρώπινων ουροθηλιακών σειρών SvHUC1, HTB9, T24 και της ουροθηλιακής σειράς ποντικιού P3 με αντίσωμα έναντι της Nicastrin. Ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. **β**) Μικροσκοπική απεικόνιση της μορφολογίας της καρκινικής σειράς ουρητήρα P3.

4.2. Κατασκευή αδενοϊικών φορέων έκφρασης των ενδοκυτταρικών τμημάτων των υποδοχέων NOTCH1, NOTCH2 και Notch3

Το επόμενο βήμα μας ήταν η δημιουργία ενός αδενοϊικού φορέα του ενδοκυτταρικού τμήματος του NOTCH1 (AdN1ic), το οποίο δεν απαιτεί το σύμπλεγμα της γ-σεκρετάσης για τη δράση του και συνεπώς δεν επηρεάζεται από την απουσία της Nicastrin. Αρχικά, κλωνοποιήθηκε το cDNA του ανθρώπινου N1ic (NM_017617.3: 5260-7668) στον αρχικό φορέα pENTR.GD.for μεγέθους 4069 bp (Gateway pENTR Dual Selection Vectors, Invitrogen) [Παράρτημα Ι, Εικόνα 2] υπό τον υποκινητή CMV (596 bp), ενώ ο δεύτερος υποκινητής CMV απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε από το τμήμα IRES (584 bp) ακολουθούμενο από το cDNA της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (enhanced Green Fluorescent Protein, eGFP, 723 bp). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανασυνδυασμός μεταξύ των τμημάτων *att*R του αδενοϊικού φορέα pAd-PL/DEST (34,9 kb) και των *att*L του pENTR.GD.for, δημιουργώντας τον αδενοϊικό φορέα pAd-CMV-N1ic-IRES-eGFP (Εικόνα 29). Επιβεβαιώσαμε την έκφραση του N1ic μέσω ανάλυσης Western blot έπειτα από μεταγωγή κυττάρων P3 με τον AdN1ic (Eικόνα 30). Επιπλέον, κατασκευάσαμε και έναν αδενοϊό που φέρει μόνο το τμήμα IRES-eGFP για να τον χρησιμοποιήσουμε ως μάρτυρα στα επόμενα πειράματα.

Είναι γνωστό ότι στα θηλαστικά υπάρχουν τέσσερις υποδοχείς Notch, οι οποίοι εμφανίζουν τόσο πλεονασματικές όσο και μοναδικές λειτουργίες. Εύλογα, λοιπόν, δημιουργήθηκε το ερώτημα αν οι παράλογοι υποδοχείς ασκούν την ίδια δράση, αντίθετη ή δεν έχουν καμία επίδραση στο υπό μελέτη σύστημα. Έτσι, κλωνοποιήσαμε σε αδενοϊικούς φορείς το cDNA του ανθρώπινου N2ic (NM_024408.3: 5386-7713) [AdN2ic] και του N3ic του ποντικιού (NM_008716.2: 5049-7016) [AdN3ic], ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε για τον AdN1ic.



Εικόνα 29: Πλασμιδιακός χάρτης του αδενοϊικού φορέα AdN1ic. Με μπλε απεικονίζεται η αλληλουχία του hN1ic ενώ με πράσινο το GFP. Σημειώνονται οι περιοχές attB1 και attB2, οι οποίες προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό των τμημάτων attR του pAd-PL/DEST και των attL του pENTR.GD.for, καθώς και οι περιοριστικές θέσεις της Pac I, που οδηγούν στην απελευθέρωση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη (Amp^r) και της αλληλουχίας που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή σε βακτήρια (pUC ori).



N1ic 6- actin

Εικόνα 30: Western blot σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς ουρητήρα ποντικιού Ρ3 που έχει υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic με αντίσωμα έναντι του N1ic. Κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μεταγωγή (untransduced, un) ή κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με αδενοϊό που φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (AdGFP) χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

4.3. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων NOTCH1, NOTCH2 και Notch3 καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών ουροθηλιακών κυττάρων ποντικιού

Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι ο νεοπλασματικός φαινότυπος είναι αποτέλεσμα της απενεργοποίησης του μονοπατιού Notch, πραγματοποιήσαμε μεταγωγή της κυτταρικής σειράς P3 με τους αδενοϊικούς φορείς έκφρασης των ενδοκυτταρικών τμημάτων των υποδοχέων NOTCH1, NOTCH2 και Notch3 και εκτελέσαμε τη δοκιμασία βιωσιμότητας MTT. Συνολικά, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση οποιουδήποτε από τους τρεις υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού σε ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα ποντικιού (**Εικόνα 31**).



Εικόνα 31: Δοκιμασία βιωσιμότητας MTT στην κυτταρική σειρά P3, που προήλθε από όγκο ουρητήρα ποντικιού με γονότυπο R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn^{flox/flox}*, η οποία υπέστη μεταγωγή με αδενοϊικούς φορείς έκφρασης των ενδοκυτταρικών τμημάτων των υποδοχέων NOTCH1, NOTCH2 και Notch3. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε μεταγωγή (wild type, wt), καθώς και κύτταρα στα οποία έλαβε χώρα μεταγωγή με αδενοϊό που εκφράζει GFP. Στον άξονα x απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μεταγωγή, ενώ στον άξονα y αναπαρίσταται η απορρόφηση στα 570 nm από την οποία έχει αφαιρεθεί η απορρόφηση στα 650 nm ως θόρυβος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

4.4. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch είναι ενεργοποιημένο στο ανθρώπινο ουροποιητικό σύστημα

Το επόμενο κρίσιμο ερώτημα που προέκυψε ήταν αν τα ευρήματα στο ποντίκι έχουν κλινική αξία. Συνεπώς, το πρώτο βήμα μας ήταν η μελέτη της έκφρασης συστατικών του μονοπατιού Notch στο φυσιολογικό ανθρώπινο ουροποιητικό σύστημα με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Παρατηρήσαμε ότι υπάρχει ομοιόμορφη κυτταροπλασματική και πυρηνική έκφραση του υποδοχέα Notch1 και του ενδοκυτταρικού του τμήματος αντίστοιχα, καθώς και του υποδοχέα Notch2 και του προσδέτη Jag1 και στις τρεις στιβάδες κυττάρων (κύτταρα βασικής στιβάδας, ενδιάμεσα κύτταρα, επιφανειακά κύτταρα) τόσο της ουροδόχου κύστης όσο και του ουρητήρα (Εικόνα 32, 33). Αντιθέτως, ο προσδέτης Dll1 δεν ανιχνεύτηκε.



Εικόνα 32: Ανοσοφθορισμός σε τομές παραφίνης από φυσιολογική ανθρώπινη ουροδόχο κύστη που έχει σημανθεί με αντισώματα έναντι του N1ic, του υποδοχέα NOTCH1 (N1), του υποδοχέα NOTCH2 (N2) και του προσδέτη JAG1. Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με αντίσωμα έναντι της Pankeratin, η οποία εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI. Τέλος, απεικονίζεται και η υπέρθεσή τους (merge). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 μm.



Εικόνα 33: Ανοσοφθορισμός σε τομές παραφίνης από φυσιολογικό ανθρώπινο ουρητήρα που έχει σημανθεί με αντισώματα έναντι του υποδοχέα NOTCH1 (N1), του N1ic, του υποδοχέα NOTCH2 (N2) και του προσδέτη JAG1. Επιπρόσθετα, έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI. Τέλος, απεικονίζεται και η υπέρθεσή τους (merge). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 50 mm.

4.5. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων NOTCH1, NOTCH2 και Notch3 καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών σειρών

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch εμπλέκεται στον ανθρώπινο καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Το πρώτο μας βήμα προς αυτή την κατεύθυνση ήταν η μελέτη του ρόλου του μονοπατιού Notch σε ανθρώπινες ουροθηλιακές καρκινικές κυτταρικές σειρές (urothelial cell carcinoma, UCC). Έτσι, πραγματοποιήσαμε μεταγωγή με αδενοϊικούς φορείς του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch1 (AdN1ic), του Notch2 (AdN2ic) και του Notch3 (AdN3ic), καθώς και με έναν αδενοϊό που φέρει το γονίδιο *lacZ* που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση (AdLacZ) ως μάρτυρα, σε κυτταρικές σειρές που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα σταδίων, βαθμών και γενετικών αλλοιώσεων (Πίνακας 3) και εκτελέσαμε τη δοκιμασία βιωσιμότητας MTT.

Η SvHUC1 προέρχεται από πρωτογενή ουροθηλιακά κύτταρα ουρητήρα αθανατοποιημένα με το μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40, ενώ η RT4 είναι μια σειρά βαθμού Ι που έχει προέλθει από θήλωμα και υπερεκφράζει *FGFR3* και η RT112 είναι βαθμού Ι. Η ΗTB9 αποτελεί μία σειρά καρκινώματος της ουροδόχου κύστης βαθμού ΙΙ, η T24 είναι βαθμού ΙΙΙ, φέρει τη μεταλλαγή *HRAS*^{G12V} και παρουσιάζει χαμηλή διαφοροποίηση και τέλος η TCCSUP είναι βαθμού ΙV και φέρει τη μεταλλαγή E545K στο γονίδιο *PIK3CA*. Επιπλέον, η κυτταρική σειρά RT112 είναι ετερόζυγη για το γονίδιο *TP53*, ενώ οι HTB9, T24 και TCCSUP χαρακτηρίζονται από απουσία έκφρασης της p53. Τέλος, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *RB* (Retinoblastoma) απουσιάζει από τις σειρές HTB9 και TCCSUP.

Πίνακας 3: Μεταλλαγές και βαθμός των ουροθηλιακών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν

Κυτταρική σειρά	Μονοπάτι Notch	FGFR3	RAS	<i>РІКЗСА</i>	<i>TP53</i>	RB	Βαθμός
RT112					Het		Ι
RT4	N3 ^{P844S} ; N4 ^{C733S}	Overexpression					Ι
HTB9					Null	Null	II
T24			HRAS ^{G12V}		Null		III
TCCSUP				E545K	Null	Null	IV
SvHUC-1 ^a							

Απεικονίζονται μόνο οι γνωστές μεταλλαγές.

Με τη δοκιμασία ΜΤΤ διαπιστώσαμε ότι, και στις έξι σειρές που εξετάστηκαν, η ενεργοποίηση καθενός εκ των τριών υποδοχέων αναστέλλει την ανάπτυξη των ουροθηλιακών κυττάρων *in vitro* (Εικόνα 34). Κάτι τέτοιο υποστηρίζει τα ευρήματα στο ποντίκι, καθώς και την υπόθεση ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch παίζει ρόλο-κλειδί στο έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο ουροθήλιο.



157



Εικόνα 34: Δοκιμασία βιωσιμότητας MTT στις κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης HTB9, RT4, RT112, T24, TCCSUP και ουρητήρα SvHUC1, οι οποίες υπέστησαν μεταγωγή με αδενοϊικούς φορείς έκφρασης των ενδοκυτταρικών τμημάτων των υποδοχέων **a**) Notch1, **β**) Notch2 και **γ**) στις κυτταρικές σειρές HTB9, RT4, T24, και SvHUC1, οι οποίες υπέστησαν μεταγωγή με αδενοϊικό φορέα έκφρασης του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch3. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε μεταγωγή (wild type, wt), καθώς και κύτταρα στα οποία έλαβε χώρα μεταγωγή με αδενοϊό που εκφράζει LacZ ή GFP. Στον άξονα x απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μεταγωγή, ενώ στον άξονα y αναπαρίσταται η απορρόφηση στα 570 nm από την οποία έχει αφαιρεθεί η απορρόφηση στα 650 nm ως θόρυβος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

4.6. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα NOTCH1 οδηγεί σε συσσώρευση των ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών κυττάρων στη G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου

Το επόμενο ερώτημα που μας απασχόλησε ήταν αν η μείωση στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ουροθηλιακών κυττάρων που παρατηρήσαμε ως επακόλουθο της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch οφείλεται σε καταστολή του πολλαπλασιασμού ή σε επαγωγή της απόπτωσης. Έτσι, πραγματοποιήσαμε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής και ειδική χρώση για ιωδιούχο προπίδιο, το οποίο σημαίνει τα ζωντανά κύτταρα, και αννεξίνη V, που σημαίνει τα αποπτωτικά κύτταρα, σε κύτταρα που είχαν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic ή τον AdLacZ. Δεν παρατηρήσαμε έναρξη αποπτωτικού προγράμματος, ωστόσο διαπιστώσαμε ότι τα κύτταρα συσσωρεύονται στη G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (**Εικόνα 35**).

158



Εικόνα 35: Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής έπειτα από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο σε κύτταρα T24 που έχουν υποστεί μεταγωγή με AdLacZ (δύο ημέρες μετά τη μεταγωγή) ή AdN1ic (δώδεκα ώρες και δύο ημέρες μετά τη μεταγωγή). Στον άξονα x αναπαρίσταται η ένταση του φθορισμού του ιωδιούχου προπιδίου, ενώ στον άξονα y ο αριθμός των κυττάρων. Επιπλέον, αναγράφονται τα ποσοστά των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου.

5. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΝΟΤCΗ ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΑΡΚ ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΟ

5.1. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση της Erk1/2 σε ουροθηλιακά κύτταρα ανθρώπου και ποντικιού

Είναι γνωστό ότι η υπερέκφραση του *FGFR3* και του RAS προωθούν την ογκογένεση στην ουροδόχο κύστη μέσω της φωσφορυλίωσης της ERK1/2. Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης που χρησιμοποιούμε φέρουν ένα ευρύ φάσμα γενετικών αλλοιώσεων (Πίνακας 3). Συνεπώς, θελήσαμε να εξετάσουμε αν το μονοπάτι MAPK είναι ενεργοποιημένο σε αυτές, καθώς και στην καρκινική σειρά ουρητήρα ποντικιού P3, και την επίδραση της υπερέκφρασης του μονοπατιού Notch στην κατάσταση φωσφορυλίωσης της Erk1/2.

Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί μεταγωγή με αδενοϊό που φέρει το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα Notch1 (AdN1ic) ή του Notch2 (AdN2ic) ή με έναν αδενοϊό-μάρτυρα που φέρει τη βγαλακτοσιδάση (AdLacZ) [**Εικόνα 36α**, β]. Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε κανονική ενεργοποίηση του μονοπατιού με μεταγωγή με αυξανόμενη πολλαπλότητα μόλυνσης (multiplicity of infection, MOI) με έναν αδενοϊό που φέρει τον προσδέτη JAG1 (AdJAG1) [**Εικόνα 36γ**]. Σε κάθε περίπτωση, παρατηρήσαμε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch οδηγεί στη —μερική ή πλήρη— αποφωσφορυλίωση της Erk1/2. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ανάλυση Western blot για να εξετάσουμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης της Mek1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2), η οποία βρίσκεται αναρροϊκά της Erk1/2 στο MAPK (Mitogen-activated protein kinase) μονοπάτι, στα ίδια πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Όπως είδαμε, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της Mek1/2 παραμένουν ανεπηρέαστα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch ακυρώνει αναρροϊκά θετικά σήματα που προωθούν τη φωσφορυλίωση της Erk1/2 ακόμα και σε κύτταρα με μεταλλαγές που ενεργοποιούν το RAS (π.χ. T24).



Εικόνα 36: Western blot σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των αναγραφόμενων ουροθηλιακών σειρών που έχουν υποστεί μεταγωγή *a*) με τον AdN1ic, *β*) με τον AdN2ic και γ) με τον AdJAG1 με αυξανόμενη πολλαπλότητα μόλυνσης (multiplicity of infection, MOI) με αντισώματα έναντι της pERK1/2, της ERK1/2, της pMEK1/2 και της MEK1/2. Κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μεταγωγή (untransduced) ή κύτταρα που

έχουν υποστεί μεταγωγή με αδενοϊό που φέρει τη β-γαλακτοσιδάση (AdLacZ) χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

5.2. Η αναστολή της ΜΕΚ1/2 οδηγεί σε καταστολή του πολλαπλασιασμού και αποφωσφορυλίωση της ERK1/2 σε ανθρώπινα ουροθηλιακά κύτταρα

Δεδομένου ότι αναστολείς της MEK1/2 χορηγούνται θεραπευτικά σε ασθενείς με καρκίνο στους οποίους το μονοπάτι MAPK υπερλειτουργεί (Zhao & Adjei, 2014), θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν οι ανθρώπινες ουροθηλιακές σειρές που χρησιμοποιήσαμε είναι ευαίσθητες στη φαρμακολογική αναστολή της MEK1/2. Έτσι, χορηγήσαμε τον αναστολέα της MEK1/2 PD98059 και διαπιστώσαμε ότι οδηγεί σε καταστολή του πολλαπλασιασμού και αποφωσφορυλίωση της ERK1/2 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (**Εικόνα 37**).



Εικόνα 37: α) Δοκιμασία βιωσιμότητας MTT σε ανθρώπινες ουρθηλιακές σειρές έπειτα από χορήγηση του αναστολέα της MEK1/2 PD98059 στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις. β) Western blot σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των ίδιων σειρών έπειτα από χορήγηση του αναστολέα της MEK1/2 PD98059 στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις με αντισώματα έναντι της pERK1/2 και της ERK1/2. Κύτταρα στα οποία έχει χορηγηθεί DMSO χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

5.3. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των DUSPs σε ανθρώπινα ουροθηλιακά κύτταρα

Η αποφωσφορυλίωση της ERK1/2 διαμεσολαβείται από τις DUSPs, καθώς και από την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (protein phosphatase 2A, PP2A). Συνεπώς, το επόμενο βήμα μας ήταν η μελέτη της επίδρασης της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch στην έκφρασή τους. Παρατηρήσαμε ότι η υπερέκφραση του *NOTCH1*, του *NOTCH2* και του *JAG1* σε ανθρώπινες ουροθηλιακές σειρές οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης ορισμένων μελών DUSPs (*DUSP1, 2, 5, 8, 10*) [**Εικόνα 38**].





Εικόνα 38: Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time qPCR) για την ανάλυση της έκφρασης των DUSPs *a*) στην ουροθηλιακή σειρά T24 που έχει υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic ή τον AdJAG1, β) στις ουροθηλιακές σειρές RT4, TCCSUP, HTB9 που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic και γ) στην ουροθηλιακή σειρά T24 που έχει υποστεί μεταγωγή με τον AdN2ic. Κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με αδενοϊό που φέρει τη β-γαλακτοσιδάση (AdLacZ) χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Γνωστά γονίδια-στόχοι του μονοπατιού Notch (*HES1, HEY1* και *HEY2*) χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες της ενεργοποίησής του. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την επίδραση της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch στην έκφραση των DUSP1, 5, 6 και 10, καθώς και της PP2A σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Είδαμε ότι η υπερέκφραση του NOTCH1 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των DUSPs σε ουροθηλιακές κυτταρικές σειρές, ενώ τα επίπεδα της PP2A μένουν ανεπηρέαστα (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Western blot σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των ανθρώπινων ουροθηλιακών σειρών T24, RT4, TCCSUP και HTB9 που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic με αντισώματα έναντι των DUSP1, 5, 6, 10, PP2A και β-actin. Κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μεταγωγή (untransduced) ή κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με αδενοϊό που φέρει τη β-γαλακτοσιδάση (AdLacZ) χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

5.4. Η αναστολή του μονοπατιού Notch οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των DUSPs και αποκατάσταση της φωσφορυλίωσης της Erk1/2 σε ουροθηλιακά κύτταρα ανθρώπου και ποντικιού

Ακολουθώντας την αντίστροφη πορεία, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της απενεργοποίησης του μονοπατιού Notch στην έκφραση των DUSPs. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα της γ-σεκρετάσης, DAPT, σε ανθρώπινες ουροθηλιακές κυτταρικές σειρές και στην ουροδόχο κύστη ποντικιών *ex vivo*. Και στις δύο περιπτώσεις, η έκφραση ορισμένων μελών της οικογένειας των DUSPs μειώθηκε αισθητά. Επιπλέον, η Erk1/2 απαντήθηκε στη φωσφορυλιωμένη της μορφή στην ουροδόχο κύστη ποντικιών *αυ* δυροδόχο κύστη ποντικιών της μορφή στην ουροδόχο κύστη ποντικιών που καλλιεργήθηκε υπό την παρουσία DAPT (**Εικόνα 40**). Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί ότι τα ποντίκια που

αναπτύσσουν όγκο στον ουρητήρα λόγω απενεργοποίησης του μονοπατιού Notch εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα DUSPs (βλ. κεφ. 1.5).



Εικόνα 40: Real-time qPCR για την ανάλυση της έκφρασης των DUSPs μετά από επίδραση του αναστολέα του μονοπατιού Notch, DAPT (10 μM), **a**) στις ανθρώπινες ουροθηλιακές σειρές T24, RT4 και HTB9 και **β**) σε ουροδόχους κύστεις φυσιολογικών ποντικιών C57/Bl6 που καλλιεργήθηκαν *ex vivo* για 3 ημέρες. Γνωστά γονίδια-στόχοι του μονοπατιού Notch (*Hes1*, *Hey1* και *Hey2*) χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες της ενεργοποίησής του. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. γ) Western blot σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ουροδόχων κύστεων φυσιολογικών ποντικιών C57/Bl6 που

καλλιεργήθηκαν *ex vivo* για 3 ημέρες έπειτα από επίδραση DAPT με αντισώματα έναντι της pErk1/2 και της Erk1/2.

5.5. Η κανονική σηματοδότηση μέσω Notch ρυθμίζει την έκφραση των DUSPs και τον πολλαπλασιασμό των ουροθηλιακών κυττάρων ανθρώπου και ποντικιού

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν αυτός ο ρόλος του μονοπατιού Notch εκτελείται μέσω της κανονικής οδού ενεργοποίησής του. Χρησιμοποιήσαμε, λοιπόν, κύτταρα T24 που εκφράζουν σταθερά μία επικρατή αρνητική μορφή (dominant-negative, dn) του μεταγραφικού συνενεργοποιητή MAML1 (MAML1dn) [Maillard et al., 2004] και είδαμε ότι έπειτα από υπερέκφραση του *NOTCH1* δεν καταστέλλεται ο πολλαπλασιασμός τους ούτε αυξάνεται η έκφραση των DUSPs (**Εικόνα 41α**, **β**). Επιπλέον, οι ουροδόχοι κύστεις από ποντίκια *Cbf1*^{flox/flox} που υπέστησαν μεταγωγή με αδενοϊό που φέρει τη ρεκομπινάση Cre (AdCre) —με αποτέλεσμα την απαλοιφή της DNA-προσδένουσας πρωτεΐνης Cbf1— εμφανίζουν μειωμένη έκφραση των DUSPs (**Εικόνα 41**γ). Συνολικά, τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι παράγοντες του κανονικού μονοπατιού σηματοδοότησης Notch είναι απαραίτητοι για τη διαμεσολάβηση της δράσης του στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ουροθηλιακών κυττάρων και της έκφρασης των DUSPs.






Εικόνα 41: *α*) Δοκιμασία βιωσιμότητας MTT σε κύτταρα T24 που εκφράζουν σταθερά μια επικρατή αρνητική μορφή του *MAML1* (MAML1dn) και έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic σε σύγκριση με τα ίδια κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdLacZ και T24 κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdLacZ και T24 κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdLacZ και T24 κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdLacZ και T24 κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic ή τον AdLacZ. Real-time qPCR για την ανάλυση της έκφρασης των DUSPs **β**) σε κύτταρα T24 MAML1dn που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic ή τον AdLacZ σε σύγκριση με T24 που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic ή τον AdLacZ σε σύγκριση με T24 που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic και γ) σε ουροδόχους κύστεις ποντικιών *Cbf1*^{flox/flox} που έχουν υποστεί μεταγωγή με έναν αδενοϊό που φέρει τη ρεκομπινάση Cre (AdCre) ή με τον AdLacZ και καλλιεργήθηκαν *ex vivo* για 3 ημέρες. Γνωστά γονίδια-στόχοι του μονοπατιού Notch (*Hes1, Hey1* και *Hey2*) χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες της ενεργοποίησής του. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

β

γ

5.6. Οι DUSPs είναι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του NOTCH1 σε ανθρώπινα ουροθηλιακά κύτταρα

Το επόμενο ερώτημα που θελήσαμε να απαντήσουμε είναι αν η αύξηση της έκφρασης των DUSPs ως επακόλουθο της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch είναι αποτέλεσμα μεταγραφικής ρύθμισης. Η ανάλυση *in silico* στους υποκινητές των μελών DUSP στα οποία ο NOTCH1 είχε τη μεγαλύτερη επίδραση αποκάλυψε θέσεις πρόσδεσης του CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) —της DNA-προσδένουσας πρωτεΐνης του μεταγραφικού συμπλόκου που διαμεσολαβεί την κανονική σηματοδότηση μέσω Notch— στους υποκινητές των DUSP1, 5, 8 και 10. Στη συνέχεια, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (chromatin immunoprecipitation, ChIP) επιβεβαίωσαν την πρόσδεση του N1ic στους υποκινητές των συγκεκριμένων μελών DUSP (**Εικόνα 42**).



Εικόνα 42: Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) στις ανθρώπινες ουροθηλιακές κυτταρικές σειρές T24 και HTB9 που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic. Το γράφημα απεικονίζει το βαθμό εμπλουτισμού των αντίστοιχων περιοχών υποκινητών σε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του NOTCH1 σε σύγκριση με το αντίσωμα-μάρτυρα IgG. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Γνωστά γονίδιαστόχοι του μονοπατιού Notch (*HES1* και *HEY1*) χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση της Erk1/2 μέσω άμεσης μεταγραφικής ενεργοποίησης των DUSPs και συνεπώς αναχαιτίζει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό του μονοπατιού MAPK.

5.7. Ο άξονας NOTCH1-DUSP-ERK1/2 πιθανά παίζει ρόλο στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα

Εύλογα προκύπτει το ερώτημα αν τα προαναφερθέντα ευρήματα αφορούν μόνο στην ουροδόχο κύστη ή αν πρόκειται για γενικότερο μηχανισμό που απαντάται και σε άλλους ιστούς. Έτσι, σε επόμενο στάδιο, θελήσαμε να μελετήσουμε άλλους τύπους καρκίνου, θεωρώντας πιθανότερους υποψήφιους αυτούς στους οποίους η ERK1/2 είναι υπερφωσφορυλιωμένη (λόγω ογκογόνων μεταλλαγών π.χ. στα EGFR, RAS, RAF1, BRAF ή κανονικής ενεργοποίησης του μονοπατιού RTK/RAS/MAPK) και αυτούς που προσομοιάζουν σε μοριακό προφίλ τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (π.χ. επιθηλιακοί όγκοι βασικού τύπου στους οποίους το μονοπάτι Notch έχει ογκοκατασταλτική δράση όπως των πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα [Wang et al., 2011] και της κεφαλής και του τράχηλου [Agrawal et al., 2011, Stransky et al., 2011]).

Σύμφωνα με ανάλυση δεδομένων από RNA-Seq σε 129 δείγματα που πραγματοποιήθηκε από το δίκτυο TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) οι όγκοι της ουροδόχου κύστης μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες. Έπειτα από σύγκριση αυτών των τεσσάρων κατηγοριών με τους 11 άλλους τύπους καρκίνου που είχαν ήδη αναλυθεί από το TCGA προέκυψε ότι ο τύπος ΙΙΙ, που περιλαμβάνει τους όγκους βασικού/πλακώδους τύπου ("basal/squamous-like")—και στον οποίο ανήκουν και οι όγκοι ουρητήρα των ποντικιών R26rtTA; tetO-Cre; *Ncstn*^{flox/flox}—εμφανίζει παρόμοια γονιδιακή υπογραφή με τον καρκίνο του μαστού βασικού τύπου (BRCA Basal) και τα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής-τραχήλου (HNSC) και πνεύμονα (LUSC) (**Εικόνα 43**). Αυτοί οι τύποι καρκίνου εκφράζουν χαρακτηριστικά γονίδια της επιθηλιακής γενεαλογίας, όπως τα *KRT14*, *KRT5*, *KRT6A* και *EGFR*. Συνεπώς, παρά το διαφορετικό ιστό προέλευσης, κάποιοι όγκοι ουροδόχου κύστης, μαστού, πνεύμονα και κεφαλήςτραχήλου μοιράζονται κοινά μονοπάτια καρκινογένεσης.



Εικόνα 43: Συσχέτιση κατά Pearson των υποτύπων καρκίνου ουροδόχου κύστης (BLCA I-IV) με άλλους τύπους καρκίνου που έχουν μελετηθεί από το TCGA όπως προέκυψε από ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από RNA-seq (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

Εξετάσαμε πληθώρα κυτταρικών σειρών από διάφορους τύπους καρκίνου (πνεύμονα, μαστού, κεφαλής και τραχήλου, παγκρέατος) και διαπιστώσαμε ότι ο άξονας NOTCH1-DUSP-ERK1/2 απαντάται στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονα H1299, η οποία φέρει τη μεταλλαγή Q61K στο γονίδιο NRAS καθώς και ομόζυγη μερική έλλειψη της πρωτεΐνης p53 που οδηγεί σε απουσία της έκφρασής της. Η υπερέκφραση του NOTCH1 αλλά όχι και του NOTCH2—σε κύτταρα H1299 οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση της ERK1/2 (**Εικόνα 44**).



H1299

Εικόνα 44: Western blot σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονα H1299 που έχει υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic και τον AdN2ic με αντισώματα έναντι της pERK1/2 και της ERK1/2. Κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μεταγωγή

(untransduced) ή κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με αδενοϊό που φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

Επιπλέον, η ενεργοποίηση του NOTCH1 ή του NOTCH2 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης μελών της οικογένειας των DUSPs (Εικόνα 45). Τέλος, κύτταρα που υπερεκφράζουν NOTCH1 ή NOTCH2 σταματούν να πολλαπλασιάζονται (Εικόνα 46).

α



β



Εικόνα 45: Real-time qPCR για την ανάλυση της έκφρασης των DUSPs στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονα H1299 που έχει υποστεί μεταγωγή **a**) με τον AdN1ic και **β**) τον AdN2ic. Παρουσιάζεται η αύξηση της έκφρασης ως προς κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdGFP. Γνωστά γονίδια-στόχοι του μονοπατιού Notch (*HES1*, *HEY1* και *HEY2*) χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες της ενεργοποίησής του.



Εικόνα 46: Δοκιμασία βιωσιμότητας MTT σε κύτταρα H1299 που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdN1ic ή τον AdN2ic σε σύγκριση με τα ίδια κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μεταγωγή (wt) ή που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdGFP. Στον άξονα x απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μεταγωγή, ενώ στον άξονα y αναπαρίσταται η απορρόφηση στα 570 nm από την οποία έχει αφαιρεθεί η απορρόφηση στα 650 nm ως θόρυβος.

[Τα πειράματα αυτού του κεφαλαίου πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τους Δρ. Θεόδωρο Ράμπια και Δρ. Μαργαρίτη Αυγέρη.]

6. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΝΟΤCΗ ΕΜΦΑΝΙΖΕΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

6.1. Ταυτοποίηση νέων, σωματικών μεταλλαγών σε γονίδια που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η απενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch είναι χαρακτηριστικό του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήσαμε προσδιορισμό της αλληλουχίας των εξωνίων (full-exon sequencing) σε βασικά γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *MAML1*, *NCSTN*, *PSEN1*, *APH1A*, *APH1B*, *PSENEN*) σε μια ομάδα 72 ασθενών που είχαν διαγνωσθεί με ουροθηλιακό καρκίνωμα (Παράρτημα II, Supplementary Table 1). Από αυτούς, οι 40 (55%) ήταν επιφανειακοί όγκοι (pTa ή pT1), ενώ οι υπόλοιποι είχαν διηθήσει στο μυ (pT2-pT4). Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν μεταλλαγές σε 31 από τους 72 ασθενείς (43%) [Πίνακας 4], ενώ αρκετοί έφεραν περισσότερες από μία (45 μεταλλαγές συνολικά), οι οποίες πολλές φορές βρίσκονταν σε δαφορετικά αλληλόμορφα (Παράρτημα II, Supplementary Figure 3).

Οι αλλοιώσεις που ταυτοποιήθηκαν περιλαμβάνουν παρανοηματκές μεταλλαγές, μη νοηματικές μεταλλαγές και ελλείψεις που οδηγούν σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης καθώς και σε πρώιμα κωδικόνια λήξης. Επιπλέον, βρέθηκαν ελλείψεις εντός πλαισίου ανάγνωσης που οδηγούν σε εξάλειψη τμημάτων της πρωτεΐνης (Εικόνα 47, Παράρτημα ΙΙ, Supplementary Table 3). Οι μεταλλαγές στο NOTCH1 και το NOTCH2 αποτελούν το 64% των μεταλλαγών (29/45). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταλλαγές ήταν κατανεμημένες μεταξύ των ασθενών ανεξάρτητα από το στάδιο και το βαθμό του όγκου (Παράρτημα ΙΙ, Supplementary Table 2). Αξίσσημείωτα, οι μεταλλαγές που ταυτοποιήθηκαν ήταν νέες, εκτός από την N800T στο MAML1, η οποία έχει ανιχνευθεί σε ασθενή με οξεία μυελογενή λευχαιμία (Jerez et al., 2012). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση σε παρακείμενο φυσιολογικό ιστό της ουροδόχου κύστης η οποία επιβεβαίωσε ότι όλες οι μεταλλαγές ήταν σωματικές (Παράρτημα ΙΙ, Supplementary Figure 4). Πέραν των σωματικών μεταλλαγών, ταυτοποιήθηκαν αρκετοί ήδη γνωστοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), καθώς και

συνώνυμες σωματικές μεταλλαγές (Παράρτημα II, Supplementary Table 4, Supplementary Table 5, Supplementary Table 6).

Πίνακας 4: Αριθμός και ποσοστό ασθενών που εμφανίζουν μεταλλαγές σε βασικά γονίδια του μονοπατιού Notch

Γονίδιο	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό ασθενών
NOTCH1	14	19,4
NOTCH2	9	12,5
NOTCH3	2	2,8
MAML1	9	12,5
NICASTRIN	3	4,2
Μονοπάτι Notch	31	43
Σύνολο	72	100



Εικόνα 47: Γραφική απεικόνιση της κατανομής των μεταλλαγών στο γονίδιο του υποδοχέα NOTCH1 (κόκκινο), NOTCH2 (μπλε) και NOTCH3 (κίτρινο). Τα οριζόντια βέλη (ελλείψεις εντός πλαισίου ανάγνωσης) και οι μπάρες (ελλείψεις που οδηγούν σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης) υποδεικνύουν το τμήμα που λείπει από την πρωτεΐνη, οι κύκλοι υποδεικνύουν τις παρανοηματικές μεταλλαγές και τα τετράγωνα υποδεικνύουν τις μη νοηματικές αμινοξικές αντικαταστάσεις. EGF repeats, epidermal growth factor-like repeats, επανάληψη Lin12/Notch, HD-N, heterodimerization–N terminal, αμινοτελική περιοχή

ετεροδιμερισμού, HD-C, heterodimerization–C terminal, καρβοζυτελική περιοχή ετεροδιμερσμού, TM, transmembrane, διαμεμβρανική περιοχή, RAM, Rbp-associated molecule, μόριο που σχετίζεται με την Rbp, ANK, CDC10/ankyrin domain, επικράτεια CDC10/ankyrin, NLS, nuclear localization signal, πυρηνικό σήμα εντοπισμού, TAD, transactivating domain, επικράτεια trans-ενεργοποίησης, PEST, a region rich in proline (P), glutamate (E), serine (S) and threonine (T), περιοχή πλούσια σε προλίνη, γλουταμικό οξύ, σερίνη και θρεονίνη.

6.2. Οι μισοί ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης εμφανίζουν απώλεια αριθμού αντιγράφων του γονιδίου NOTCH1

Αξίζει να σημειωθεί ότι το *NOTCH1* εδράζεται στον επιμήκη βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9q34.3) και η απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος 9 ή του επιμήκη βραχίονά του, 9q, αποτελεί την πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, καθώς αφορά το 50% των περιπτώσεων ανεξάρτητα από το βαθμό του όγκου. Συνεπώς, χρησιμοποιήσαμε γονιδιωματικό DNA από τους όγκους των ασθενών προκειμένου να μελετήσουμε πιθανές χρωμοσωμικές απώλειες που να περιλαμβάνουν το γενετικό τόπο του *NOTCH1*. Από τους 62 ασθενείς—από τους οποίους ήταν εφικτή η απομόνωση γονιδιωματικού DNA—ταυτοποιήθηκαν 30 (48%) με απώλεια αριθμού αντιγράφων (copy number loss, CNL) του *NOTCH1* (**Εικόνα 48, Παράρτημα ΙΙ, Supplementary Table 7**). Ειδικότερα, βρέθηκε CNL στο γενετικό τόπο του *NOTCH1* και τουλάχιστον μία μεταλλαγή σε συστατικό του μονοπατιού σε 17 ασθενείς (27%), ενώ σε 7 (11%) από αυτούς η μεταλλαγή εντοπιζόταν στο *NOTCH1*, γεγονός που υποδηλώνει απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH). Συνδυαστικά οι μεταλλαγές και τα CNL φέρνουν τη συνολική συχνότητα των γενετικών αλλοιώσεων στο *NOTCH1* και το μονοπάτι Notch στο 51% (37/72) και 61% (44/72) αντίστοιχα.





6.3. Οι μεταλλαγές που ταυτοποιήθηκαν οδηγούν σε απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch

Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPHEN-2) (Adzhubei et al., 2010) βρήκαμε ότι η πλειοψηφία των παρανοηματικών μεταλλαγών πιθανότατα παρεμποδίζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης, ενώ λίγες είναι αβλαβείς (Παράρτημα ΙΙ, Supplementary Table 3). Για να μελετήσουμε αν αυτές οι μεταλλαγές επηρεάζουν τη σηματοδότηση μέσω Notch συγκρίναμε in vitro τη λειτουργικότητα των μεταλλαγμένων cDNAs με φυσιολογικούς μάρτυρες με τη δοκιμασία της λουσιφεράσης (luciferase, luc) χρησιμοποιώντας το CSL (Cbf1, Su(H) and LAG1)-luc πλασμίδιο αναφοράς (Funahashi et al., 2008) στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά εμβρυϊκού νεφρού ΗΕΚ293Τ, εκτός από τις περιπτώσεις μεταλλαγών που εδράζονται στο εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων Notch1 και Notch2 για τις οποίες η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικιού από τους οποίους λείπουν οι υποδοχείς Notch1, 2 και 3. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι περισσότερες αλλοιώσεις αποτελούν απενεργοποιητικές μεταλλαγές επιβεβαιώνοντας τις προβλέψεις του PolyPHEN-2 (Εικόνα 49). Αξιοσημείωτα, έξι μεταλλαγές στα NOTCH1, NOTCH2 και NOTCH3 οι οποίες εξαλείφουν το ενδοκυτταρικό τμήμα οδήγησαν σε μορφές με επικρατή αρνητική λειτουργία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των μεταλλαγών που εμφανίζουν καθόλου ή μικρή απώλεια της ενεργότητας του μονοπατιού Notch προέρχονται από τον ίδιο όγκο. Επίσης, αυτές οι μεταλλαγές συνήθως συνυπήρχαν με μεταλλαγές με σημαντική επίδραση στην ενεργότητα του μονοπατιού, με επικρατείς αρνητικές μεταλλαγές καθώς και με απώλεια αριθμού αντιγράφων του NOTCH1. Επιπλέον, για περαιτέρω λειτουργικό χαρακτηρισμό των μεταλλαγών, συγκρίναμε την έκφραση κλασικών στόχων του μονοπατιού Notch καθώς και μελών DUSPs μεταξύ ουροθηλιακών κυττάρων που εξέφραζαν μεταλλαγμένες μορφές του NOTCH2 και κυττάρων που εξέφραζαν τη φυσιολογική (Εικόνα 50).



Εικόνα 49: Δραστικότητα επί τοις εκατό των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών NOTCH1 (κόκκινο), NOTCH2 (μπλε), MAML1 (πράσινο), NCSTN (μωβ) σε σύγκριση με την αντίστοιχη φυσιολογική μορφή όπως μετρήθηκαν *in vitro* με τη δοκιμασία της λουσιφεράσης (αριστερά). Western blot με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικιού με γονότυπο *Notch1*^{sucture}; *Notch2*^{sucture}; *Notch3*⁻⁻ έπειτα από μεταγωγή με αδενοϊό που εκφράζει τη ρεκομπινάση Cre (AdCre). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποείται η β-ακτίνη (δεξιά).



Εικόνα 50: Real-time qPCR σε ανθρώπινα ουροθηλιακά κύτταρα RT4 που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδια που εκφράζουν τις μεταλλαγές A2025E και Q2223X καθώς και το φυσιολογικό *NOTCH2*. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στην κανονικοποιημένη έκφραση σε σύγκριση με το φυσιολογικό Notch2 που έχει τεθεί ως το 100% στόχων του μονοπατιού Notch (*HES1*, *HEY1*) καθώς και μελών DUSPs (*DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP5*).

6.4. Οι μεταλλαγές στο μονοπάτι Notch δε συνυπάρχουν συχνά με μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR3*, *HRAS/KRAS* και *PIK3CA*

Μέχρι τώρα, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είχε συσχετιστεί με μεταλλαγές στα γονίδια FGFR3 και RAS, οι οποίες είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες και, παρόλο που συναντώνται κυρίως σε επιφανειακούς όγκους, συνδυαστικά εμφανίζονται στο 50-70% των περιπτώσεων (Sanger Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [COSMIC], Forbes et al., 2015). Για να διερευνήσουμε αν αυτές οι μεταλλαγές συνυπάρχουν με μεταλλαγές στο μονοπάτι Notch, πραγματοποιήσαμε αλληλούχηση στην ομάδα των 72 ασθενών που προαναφέρθηκε για μεταλλαγές σε γνωστά «θερμά σημεία» των γονιδίων FGFR3, HRAS, KRAS και PIK3CA (Παράρτημα II, Supplementary Table 8). Τα αποτελέσματα έδειζαν ότι οι μεταλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch καθώς και το CNL στο NOTCH1 μόνο μερικώς συνυπάρχουν με μεταλλαγές στα FGFR3, RAS και PIK3CA (Εικόνα 51). Ειδικότερα, μεταλλαγές στο γονίδιο FGFR3 και σε κάποιο συστατικό του μονοπατιού Notch εμφανίζει το 15,3% των ασθενών, μεταλλαγές στο HRAS ή το KRAS και το μονοπάτι Notch υπάρχουν μόλις στο 1,5% και μεταλλαγές και στα τρία συγχρόνως φέρει το 1,5% των ασθενών. Αν στις γενετικές αλλοιώσεις στο μονοπάτι Notch συμπεριλάβουμε εκτός από τις μεταλλαγές και το CNL στο *NOTCH1*, τότε τα αντίστοιχα ποσοστά ανέρχονται σε 22,2%, 6,9% και 1,4% (Εικόνα 52).



Εικόνα 51: α) Απεικόνιση της κατανομής των μεταλλαγών στα γονίδια του μονοπατιού Notch, *FGFR3* και RAS καθώς και της συνύπαρξής τους στους ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης με τη μορφή πίτας β) συμπεριλαμβανομένων και των διακυμάνσεων αριθμού αντιγράφων στο γενετικό τόπο του *NOTCH1*.



Εικόνα 52: Χάρτης που αναπαριστά τις μεταλλαγές (κίτρινο) στα αναγραφόμενα γονίδια καθώς και τα κέρδη (κόκκινο) και τις απώλειες (μπλε) αριθμού αντιγράφων στο γενετικό τόπο του NOTCH1 για καθένα ασθενή ξεχωριστά.

[Τα πειράματα αυτού του κεφαλαίου πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Δρ. Θεόδωρο Ράμπια.]

7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΡΕΤΙΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

7.1. Ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης εμφανίζουν απώλεια αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *RXRA*

Πρόσφατες μελέτες υψηλής απόδοσης (high-throughput) σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης αποκάλυψαν ότι το 6-9% φέρει μεταλλαγές στο γονίδιο RXRA και συγκεκριμένα το 5-8%, ανάλογα τη μελέτη, αφορά αμινοξική αντικατάσταση στο S427 (Guo et al., 2013, Cancer Genome Atlas Research Network, 2014, Van Allen et al., 2014). Έτσι, λοιπόν θελήσαμε αφενός να χαρακτηρίσουμε τη συγκεκριμένη μεταλλαγή και αφετέρου να μελετήσουμε το ρόλο της σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος στο ουροποιητικό σύστημα.

Αρχικά, αναλύσαμε τα δεδομένα που προήλθαν από μελέτες υψηλής απόδοσης που αφορούν στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *RXRA* σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Iyer et al., 2013, Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) μέσω του cBioportal (Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013). Σύμφωνα με τα δεδομένα του δικτύου TCGA, σε σύνολο 128 ασθενών οι 47 (35,9%) [1 (0,8%) -2 και 46 (35,1%) -1] εμφανίζουν απώλεια αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *RXRA*, οι 24 (18,3%) κέρδος, ενώ σε 57 δεν παρατηρήθηκε αλλαγή (43,5%). Παρόμοια εικόνα πήραμε και με βάση τη μελέτη του MKSCC όπου από του2 97 ασθενείς, οι 37 (38,1%) είχαν -1 αντίγραφο, οι 5 (5,2%) +1 και οι υπόλοιποι 55 (56,7%) εμφάνισαν φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων του *RXRA* (**Εικόνα 53α**).

Δεδομένου ότι μεταλλαγές στο S427 έχουν ταυτοποιηθεί επίσης στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (Cancer Genome Atlas Research Network, Pancreatic Adenocarcinoma, provisional), στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Cancer Genome Atlas Research Network, Liver Hepatocellular Carcinoma, provisional), στο σάρκωμα (Cancer Genome Atlas Research Network, Sarcoma, provisional) και στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (Giannakis et al., 2016), εξετάσαμε τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *RXRA* στους ασθενείς από όσες από τις παραπάνω μελέτες υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία. Διαπιστώσαμε ότι στους ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα η απώλεια αριθμού αντιγράφων του *RXRA* ήταν πολύ πιο συχνή σε σχέση με το κέρδος (23,9% απώλεια και 6,5% κέρδος και 28,38% απώλεια και

11,62% κέρδος αντίστοιχα), ενώ στους ασθενείς με σάρκωμα ήταν εξίσου συχνά φαινόμενα (24,13% απώλεια και 24,9% κέρδος) [Εικόνα 53β].



Εικόνα 53: Ποσοστιαίο διάγραμμα του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου RXRA που εντοπίστηκαν α) σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με τη μελέτη από το TCGA το 2014 (αριστερά) και το MKSCC το 2013 (δεξιά) και β) σε ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (αριστερά), με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (κέντρο) και με σάρκωμα (δεξιά) σύμφωνα με προσωρινά δεδομένα από το TCGA. Στον κάθετο άξονα απεικονίζεται το ποσοστό των ασθενών με τον αντίστοιχο αριθμό αντιγράφων, ενώ στον οριζόντιο η αντίστοιχη μελέτη. Ο χρωματικός κώδικας είναι ο εξής: -2 πορτοκαλί, -1 μπλε, 0 κόκκινο, 1 πράσινο, 2 μωβ.

Συνολικά, βλέπουμε ότι σχεδόν το 40% των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης παρουσιάζει απώλεια αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *RXRA* κι επιπλέον η απώλεια αυτή είναι συχνή και σε ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα και ηπατοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα, γεγονός που υποδεικνύει πιθανή συσχέτιση της απώλειας λειτουργίας του *RXRA* με την ογκογένεση.

7.2. Η αμινοξική αντικατάσταση στη θέση S427 είναι πιθανώς επιζήμια για τη λειτουργικότητα του RXRa

Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPHEN-2), ο οποίος προβλέπει την επίδραση μιας αμινοξικής αντικατάστασης στη δομή και τη λειτουργία μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης (Adzhubei et al., 2010), βρήκαμε ότι οι αμινοξικές αντικαταστάσεις στη θέση 427 από σερίνη (S) σε φαινυλαλανίνη (F), τυροσίνη (Y) ή κυστεΐνη (C) πιθανότατα παρεμποδίζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης (**Εικόνα 54**).



Εικόνα 54: Πρόβλεψη του αλγορίθμου PolyPHEN-2 για την επίδραση των αμινοξικών αντικαταστάσεων S427F, S427Y και S427C στη λειτουργία του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa. Όσο πλησιέστερα στο 1.00 ή αντίστοιχα στο κόκκινο βρίσκεται η γραμμή, τόσο πιο επιζήμια η μεταλλαγή.

Επίσης, χρησιμοποιήσαμε το HOPE, ένα πρόγραμμα που αναλύει την επίδραση σημειακών μεταλλαγών στη δομή και τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης (Venselaar et al., 2010). Σύμφωνα με αυτό, η μεταλλαγμένη φαινυλαλανίνη είναι μεγαλύτερη και πιο υδρόφοβη από τη σερίνη που βρίσκεται φυσιολογικά στη θέση 427 του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa (**Εικόνα 55**, **56**). Η φυσικού τύπου σερίνη σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την R124, αλλά αυτό δε συμβαίνει με το μεταλλαγμένο κατάλοιπο καθώς λόγω μεγέθους δε βρίσκεται στη σωστή θέση κι επιπλέον η υδροφοβικότητά του επηρεάζει το σχηματισμό δεσμού.



Εικόνα 55: Σχηματική απεικόνιση της δομής του φυσιολογικού (αριστερά) και του μεταλλαγμένου (δεξιά) αμινοξικού καταλοίπου στη θέση 427 του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa (S427F). Με κόκκινο χρωματίζεται το κοινό τμήμα ενώ με μαύρο η πλευρική αλυσίδα που είναι μοναδική για κάθε κατάλοιπο.



Εικόνα 56: Σχηματική απεικόνιση της θέσης 427 στον ανθρώπινο υποδοχέα RXRa από το εργαλείο HOPE. Παριστάνεται το κατάλοιπο φυσικού τύπου με πράσινο και το μεταλλαγμένο με κόκκινο, ενώ η υπόλοιπη πρωτεΐνη έχει χρωματιστεί γκρι.

Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόκειται για ένα 100% συντηρημένο κατάλοιπο, καθώς μόνο η σερίνη απαντάται στη συγκεκριμένη θέση σε όλες τις ορθόλογες πρωτεΐνες που έχουν περιγραφεί (**Εικόνα 57**). Επομένως, η μεταλλαγή ενός τόσο συντηρημένου καταλοίπου αναμένεται να είναι επιζήμια για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, το κατάλοιπο αυτή βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και συνεπώς η μεταλλαγή του μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια ή τμήματα της πρωτεΐνης.

SP P28700 RXRA MOUSE	EALREKVYASLEAYCKHKYPEQPGRFAKLLLRLPALR	IGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDT	454
SP P19793 RXRA HUMAN	EALREKVYASLEAYCKHKYPEQPGRFAKLLLRLPALR	IGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDT	449
SP Q05343 RXRA RAT	EALREKVYASLEAYCKHKYPEQPGRFAKLLLRLPALR	IGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDT	454
SP P51128 RXRA XENLA	EALREKVYASLEAYCKQKYPEQPGRFAKLLLRLPALR	IGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDT	475
SP Q90416 RXRGA DANRE	EALREKVYASLEGYTKHNYPDQPGRFAKLLLRLPALR	IGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDT	428

Εικόνα 57: Στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών ποντικιού (MOUSE), ανθρώπου (HUMAN), αρουραίου (RAT), αφρικανικού ονυχοφόρου βατράχου (XENLA) και ψαριού-ζέβρα (DANRE) γύρω από τη θέση 427 του υποδοχέα RXRα. Με φούξια χρωματίζεται το συντηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη (S).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι οι προβλέψεις είναι ίδιες και για τη δεύτερη αντικατάσταση που έχει βρεθεί σε αυτή τη θέση όπου αντί για σερίνη εμφανίζεται τυροσίνη (S427Y), καθώς αυτό το αμινοξικό κατάλοιπο εμφανίζει παρόμοια δομή και ιδιότητες με τη φαινυλαλανίνη (**Εικόνα 58**).



Εικόνα 58: Σχηματική απεικόνιση της δομής του φυσιολογικού (αριστερά) και του μεταλλαγμένου (δεξιά) αμινοξικού καταλοίπου στη θέση 427 του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa (S427Y). Με κόκκινο χρωματίζεται το κοινό τμήμα ενώ με μαύρο η πλευρική αλυσίδα που είναι μοναδική για κάθε κατάλοιπο.

7.3. Η μεταλλαγή S427F του γονιδίου *RXRA* είναι επικρατής αρνητική βάσει προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής

Το επόμενο βήμα μας ήταν η μελέτη της επίδρασης της αμινοξικής αντικατάστασης S427F στον υποδοχέα RXRα μέσω προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, η οποία αποτελεί υπολογιστική μέθοδο που χρησιμεύει στη μελέτη της μικροσκοπικής δυναμικής συμπεριφοράς των ατόμων σε ένα σύστημα. Κατά τη διάρκεια μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, παρακολουθούμε την εξέλιξη του συστήματος σε πραγματικό χρόνο ενσωματώνοντας τις εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα.

Πραγματοποιήθηκαν 10 ανεξάρτητες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Γιάννης Γαλδαδάς, υπό την επίβλεψη της Δρ. Ζωής Κούρνια) [Πίνακας 5]. Η κρυσταλλική δομή που χρησιμοποιήθηκε αφορά το σύμπλεγμα του ανθρώπινου RARα, στον οποίο είναι προσδεδεμένοι ένας συνενεργοποιητής καθώς και ο αγωνιστής atRA με τον RXRα του ποντικιού στον οποίο είναι προσδεδεμένος ο ανταγωνιστής LG100754 κι έχει ανάλυση 2,75Å (PDB code: 3A9E) [Sato et al., 2010]. Αφενός, διαπιστώσαμε ότι ο όγκος της θέσης πρόσδεσης στον υποδοχέα RXRα μειώνεται στο σύμπλεγμα του μεταλλαγμένου S427F RXRα με τον υποδοχέα RARα σε σύγκριση με το σύμπλεγμα στο οποίο συμμετέχει ο RXRα φυσικού τύπου (WT), όπως επιβεβαιώθηκε από τρεις ανεξάρτητες προσομοιώσεις (Εικόνα 59, 60). Αφετέρου, η ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των μονομερών στο διμερές S427F RXRα-RARα σε σχέση με το WT RXRα-RARα δεν υποδεικνύει

στατιστικά σημαντική ενδυνάμωση μεταξύ του μεταλλαγμένου RXRa και του RARa (**Εικόνa 61**). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι η μεταλλαγή S427F στον RXRa παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση υποδοχέα-προσδέτη χωρίς όμως να επηρεάζεται ο σχηματισμός ετεροδιμερών. Συνεπώς, υποδηλώνεται ότι η μεταλλαγή δρα ως επικρατής αρνητική (domimant-negative), καθώς καταλαμβάνει διαθέσιμους υποδοχείς χωρίς όμως να υπάρχει η δυνατότητα ενεργοποίησης της σηματοδότησης.

Πίνακας 5: Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τη μελέτη της μεταλλαγής S427F του RXRa και οι αντίστοιχοι χρόνοι

Προσομοίωση	Χρόνος προσομοίωσης (ns)
Apo WT	925
Apo mutant 1	925
Apo mutant 2	740
Apo mutant 3	740
Holo WT	925
Holo mutant	925
Tetramer WT	1700
Tetramer mutant A	1700
Tetramer mutant A/B	1700
Tetramer mutant A/D	1700



Εικόνα 59: Υπέρθεση της δομής του υποδοχέα RXRα φυσικού τύπου (γκρι) και του μεταλλαγμένου S427F (ροζ). Αναγράφονται οι κρίσιμες έλικες για την αλληλεπίδραση με τον προσδέτη (πράσινο).



Εικόνα 60: Σχηματική απεικόνιση του ετεροδιμερούς RXRα-RARα α) απουσία προσδέτη (αρο μορφή υποδοχέα) και β) παρουσία προσδέτη (holo μορφή). Απεικονίζεται η θέση του αμινοξικού καταλοίπου S427 και του συνενεργοποιητή (coA), καθώς και των προσδετών atRA και LG100754 στη δεύτερη περίπτωση.



Εικόνα 61: Διάγραμμα της ενέργειας αλληλεπίδρασης του ετεροδιμερούς RXRα-RARα, μεταλλαγμένου (mutant) και φυσικού τύπου (WT), ως προς το χρόνο απουσία προσδέτη (apo μορφή υποδοχέα) και παρουσία (holo μορφή) προσδέτη. Αναγράφονται κάτω από κάθε διάγραμμα οι αντίστοιχες τιμές ενέργειας αλληλεπίδρασης.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δυναμικής δικτύου (dynamical network analysis) στο σύμπλεγμα S427F RXRα-RARα καθώς και στο WT RXRα-RARα. Η εν λόγω ανάλυση παρέχει τη συσχέτιση μεταξύ της κίνησης διαφορετικών αμινοξικών καταλοίπων. Πολύ ισχυρά συσχετιζόμενες κινήσεις αποκαλύπτουν κατάλοιπα που επικοινωνούν μεταξύ τους. Έτσι, βρήκαμε ότι το S427 είναι ένα καθοριστικής σημασίας κατάλοιπο, το οποίο σχηματίζει μια σημαντική ακμή (edge) με το P423, που επικοινωνεί με την έλικα 12—η θέση της οποίας καθορίζει την κατάσταση ενεργοποίησης του υποδοχέα—και κατά συνέπεια επηρεάζει τη δυναμική της. Επιπρόσθετα, είδαμε ότι η αμινοξική αντικατάσταση S427F εξασθενεί την επικοινωνία του δικτύου που απαρτίζεται από τα κατάλοιπα P423, R426/L425 και W305, το οποίο σχετίζεται με την επικοινωνία των θέσεων πρόσδεσης των υποδοχέων RXRα και RARα (Kojetin et al., 2015).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της μεταλλαγής S427F στη σταθερότητα των ομοτετραμερών του υποδοχέα RXRα (PDB code: 1G1U) [Gampe et al., 2000]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν 4 διαφορετικές προσομοιώσεις (WT, μία μεταλλαγή στην αλυσίδα A, δύο μεταλλαγές στις αλυσίδες A&B, δύο μεταλλαγές στις αλυσίδες A&D) [Εικόνα 62] κατά τις οποίες είδαμε ότι όλες οι μεταλλαγμένες μορφές οδηγούν σε ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων A&B και σε ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων A&B και σε ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων A&C. Συνεπώς, η αμινοξική αντικατάσταση S427F επιδρά στη σταθερότητα των ομοτετραμερών του RXRα και στις 3 μεταλλαγμένες μορφές που εξετάστηκαν, όπως προκύπτει από τον υπολογισμό της ενέργειας αλληλεπίδρασης των αντίστοιχων ομοτετραμερών.



Εικόνα 62: Σχηματική απεικόνιση των αλυσίδων του ομοτετραμερούς του υποδοχέα RXRa.

7.4. Κλωνοποίηση της μεταλλαγής S427F του ανθρώπινου γονιδίου RXRA

Το πρώτο βήμα μας για το λειτουργικό χαρακτηρισμό της μεταλλαγής S427F του ανθρώπινου υποδοχέα RXRα ήταν η κλωνοποίησή της, η οποία έγινε μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης (site-directed mutagenesis). Χρησιμοποιήσαμε το φορέα pCMV-SPORT6 στον οποίο έχει εισαχθεί το cDNA του ανθρώπινου RXRα (2235 bp, cDNA clone MGC: 102720, GenBank: BC110998.1) έπειτα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRV-NotI (Παράρτημα I, Εικόνα 1). Αρχικά, θελήσαμε να εισάγουμε το φυσιολογικό hRXRα (RXR WT) στο φορέα έκφρασης pENTR.GD.for-GFP, ο οποίος έχει δύο υποκινητές CMV, στον έναν έχει εισαχθεί το RXR WT από τον pCMV-SPORT6-hRXRα έπειτα PCR με τους παρακάτω εκκινητές (primers) στους οποίους είχαν εισαχθεί οι περιοριστικές θέσεις ClaI (μωβ) [F1] και NotI (ροζ) [R1]:

RXRa F1: 5' CGAGATCGATACCGCCATGGACACCAAACATTTC 3'

RXRa R1: 5'AAGCGGCCGCTAAGTCATTTGGTGCGG 3'

Ακολούθησε πέψη ClaI-NotI στο προϊόν της PCR (hRXRα) καθώς και στο φορέα pENTR.GD.for-GFP και αντίδραση συνένωσης (ligation) [**Εικόνα 63**, **64**].

Στη συνέχεια, στόχος μας ήταν η κλωνοποίηση της μεταλλαγής S427F, δηλαδή η εισαγωγή της σημειακής μεταλλαγής C1280T. Σχεδιάσαμε, λοιπόν, εκκινητές που να εμπεριέχουν το τμήμα στο οποίο βρίσκεται η μεταλλαγή (κόκκινο) εισάγοντάς την τόσο στον εμπρόσθιο (forward) όσο και στον αντίστροφο (reverse):

RXRα F2: 5' CCGCCTGCCGGCTCTGCGC**TTC**ATCGGG 3' RXRα R2: 5' CCCGAT<mark>GAA</mark>GCGCAGAGCCGGCAGGCGG 3' καθώς κι έναν εκκινητή αναρροϊκά μιας περιοριστικής θέσης (BSSHII) πλησίον της θέσης της μεταλλαγής:

RXRa F3: 5' GGACATGCAGATGGACAAG 3'

Έπειτα, πραγματοποιήσαμε PCR με υπόστρωμα το φορέα pCMV-SPORT6-hRXRα και τα ζεύγη εκκινητών F3-R2 και F2-R1 και ακολούθησε πέψη του πρώτου προϊόντος μεγέθους 214 bp με BSSHII-NgoMIV και του δεύτερου μεγέθους 129 bp με NgoMIV-NotI. Μετά από πέψη του pENTR.GD.for-GFP-hRXRα WT με BSSHII-NotI, εκτελέσαμε αντίδραση συνένωσης των τριών τμημάτων με αποτέλεσμα την κατασκευή του pENTR.GD.for-GFP-hRXRα MUT. Τέλος, πραγματοποιήσαμε αλληλούχηση (sequencing) τόσο στον pENTR.GD.for-GFP-hRXRα WT όσο και στον pENTR.GD.for-GFP-hRXRα MUT για να επιβεβαιώσουμε ότι φέρουν όντως τις αντίστοιχες μορφές του hRXRα χωρίς λάθη (**Εικόνα 65**).

ACCTCCCCGACGGGGGGGGGGGGCTCCATGGCTGCCCCCTCGCTGCACCCGTCCCTGGGG CCTGGCATCGGCTCCCCGGGACAGCTGCATTCTCCCATCAGCACCCTGAGCTCCCCC ATCAACGGCATGGGCCCGCCTTTCTCGGTCATCAGCTCCCCCATGGGCCCCCACTCC ATGTCGGTGCCCACCACCCACCCTGGGCTTCAGCACTGGCAGCCCCCAGCTCAGC TCACCTATGAACCCCGTCAGCAGCAGCGAGGACATCAAGCCCCCCTGGGCCTCAA CATCTGCGCCATCTGCGGGGGACCGCTCCTCAGGCAAGCACTATGGAGTGTACAGCTG CGAGGGGTGCAAGGGCTTCTTCAAGCGGACGGTGCGCAAGGACCTGACCTACACCT GCCGCGACAACAAGGACTGCCTGATTGACAAGCGGCAGCGGAACCGGTGCCAGTAC TGCCGCTACCAGAAGTGCCTGGCCATGGGCATGAAGCGGGAAGCCGTGCAGGAGGA GCGGCAGCGTGGCAAGGACCGGGAACGAGAATGAGGTGGAGTCGACCAGCAGCGCC AACGAGGACATGCGGTGGAGAGGGATCCTGGAGGCTGAGCTGGCCGTGGAGCCCAAG ACCGAGACCTACGTGGAGGCAAACATGGGGCTGAACCCCAGCTCGCCGAACGACCC TGTCACCAACATTTGCCAAGCAGCCGACAAACAGCTTTTCACCCTGGTGGAGTGGGC CAAGCGGATCCCACACTTCTCAGAGCTGCCCCTGGACGACCAGGTCATCCTGCTGCG GGCAGGCTGGAATGAGCTGCTCATCGCCTCCTTCTCCCACCGCTCCATCGCCGTGAA GGACGGGATCCTCCTGGCCACCGGGCTGCACGTCCACCGGAACAGCGCCCACAGCG CAGGGGTGGGCGCCATCTTTGACAGGGTGCTGACGGAGCTTGTGTCCAAGATGCG

Εικόνα 63: Κωδική αλληλουχία του ανθρώπινου υποδοχέα RXRα. Οι θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται υπογραμμισμένοι και συγκεκριμένα του F1 έχει χρωματιστεί τυρκουάζ, του R1 φούξια, του F3 πράσινο και των F2-R2 γκρι. Επίσης, με κόκκινο απεικονίζεται η θέση της μεταλλαγής TCC→TTC, με γαλάζιο η περιοριστική θέση BSSHII και με πράσινο η περιοριστική θέση NgoMIV.



Εικόνα 64: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pENTR.GD.for-GFP-hRXRa. Με φούξια απεικονίζεται το cDNA του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa. Αναγράφονται επίσης οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 65: Αλληλούχηση κατά Sanger της φυσιολογικής (WT) και της μεταλλαγμένης μορφής S427F (MUT) του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa. Με κόκκινο βέλος απεικονίζεται η θέση της σημειακής μεταλλαγής.

7.5. Κατασκευή λεντιϊκών φορέων του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου ανθρώπινου υποδοχέα RXRa

Στη συνέχεια, κατασκευάσαμε λεντιϊκούς φορείς του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa φυσικού τύπου καθώς και αυτού που φέρει τη μεταλλαγή S427F με στόχο να δημιουργήσουμε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν σταθερά τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Χρησιμοποιήσαμε το φορέα έκφρασης p199-FSmHey2-iEPv2 (Παράρτημα I, Εικόνα 3) στον οποίο πραγματοποιήσαμε την πέψη BamHI-EcoRI, η οποία απελευθερώνει το ένθεμα Hey2. Σχεδιάσαμε

εκκινητές στους οποίους εισάγαμε τις περιοριστικές θέσεις BgIII (πράσινο) και EcoRI (μπλε)—η BamHI και BgIII δημιουργούν τμήματα με συμβατά άκρα—

RXRa F4 EcoRI: 5' AAGAATTCGCCGCCATGGACACCAAACAT 3'

RXRa R3 BgIII: 5'AAAGATCTCTAAGTCATTTGGTGCGGCGCCTC 3'

και πραγματοποιήσαμε PCR με υπόστρωμα τους pENTR.GD-GFP-hRXRa WT και MUT για να απομονώσουμε τον hRXRa φυσικού και μεταλλαγμένου τύπου αντίστοιχα και εκτελέσαμε αντίδραση συνένωσης με τον φορέα p199. Έτσι, προέκυψαν οι λεντιϊκοί φορείς p199-GFP-hRXRa WT και MUT αντίστοιχα (Εικόνα 66).



Εικόνα 66: Πλασμιδιακός χάρτης του λεντιϊκού φορέα p199-GFP-hRXRa. Με φούξια απεικονίζεται το cDNA του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa. Αναγράφονται επίσης οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.

Κατόπιν, θελήσαμε να εισάγουμε στους λεντιϊκούς φορείς την αλληλουχία-ετικέτα FLAG. Προσθέσαμε λοιπόν στον εκκινητή R3 την αλληλουχία FLAG (πορτοκαλί):

RXRa R4 BglII FLAG:

5' AAAGATCTCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAGTCATTTGGTGCGG 3'

Πραγματοποιήσαμε PCR με υπόστρωμα το φορέα pENTR.GD.for-GFP-hRXRα και τους εκκινητές F3-R4 και εκτελέσαμε την πέψη BSSHII-BgIII στο προϊόν. Παράλληλα, πραγματοποιήσαμε την πέψη EcoRI-BamHI στο φορέα p199-FSmHey2-iEPv2 και την πέψη EcoRI-BSSHII στους φορείς p199-GFP-hRXRα WT και MUT. Έπειτα από αντίδραση συνένωσης των τριών τμημάτων αποκτήσαμε τους λεντιϊκούς φορείς p199-GFP-FLAG-hRXRα WT και MUT αντίστοιχα (**Εικόνα 67**) Τέλος, επιβεβαιώσαμε την εισαγωγή της μεταλλαγής καθώς και την ορθότητα των αλληλουχιών με αλληλούχηση στους δύο φορείς.

Στο φορέα p199 η έκφραση του ενθέματος είναι επαγόμενη σύμφωνα με το tet-on σύστημα. Συνεπώς, οι κυτταρικές σειρές οι οποίες διαμολύνθηκαν με τους φορείς p199-GFP-FLAG-hRXRa WT και MUT, είχαν προηγουμένως διαμολυνθεί με το φορέα pLenti6.2/V5-DEST-rtTA, ο οποίος φέρει την αλληλουχία του rtTA (Παράρτημα Ι, Εικόνα 4). Επιπρόσθετα, η κυτταρική σειρά από ουροθηλιακό όγκο ποντικιού *Rxra*^{flox/flox} διαμολύνθηκε με λεντιϊκό φορέα έκφρασης της ρεκομπινάσης Cre έτσι ώστε να απαλοιφεί το ενδογενές *Rxra* και να εκφράζεται μόνο ο υποδοχέας φυσικού τύπου ή ο μεταλλαγμένος με επαγόμενο τρόπο. Για την κατασκευή του Lenti6,2-V5/DEST-Cre (Εικόνα 68) ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία: απομονώσαμε την αλληλουχία του Cre με πέψη EcoRI-PvuII από το φορέα Psp73Cre και την εισάγαμε στο φορέα p199-FSmHey2-iEPv2, στον οποίο είχαμε πραγματοποιήσει πέψη με BamHI, προσθήκη νουκλεοτιδίων έτσι ώστε τα κολλώδη άκρα να γίνουν λεία (fill-in) και πέψη με EcoRI. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά εκφράζει rtTA έπειτα από διαμόλυνση με το φορέα pInducer20 (Meerbrey K et al., 2011) [Παράρτημα Ι, Εικόνα 5].



Εικόνα 67: Πλασμιδιακός χάρτης του λεντιϊκού φορέα p199-GFP-hRXRα-FLAG. Με φούξια απεικονίζεται το cDNA του ανθρώπινου υποδοχέα RXRα. Αναγράφονται επίσης οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 68: Πλασμιδιακός χάρτης του λεντιϊκού φορέα pLenti6.2/V5-DEST-Cre. Με βυσσινί απεικονίζεται η αλληλουχία της ρεκομπινάσης Cre. Αναγράφονται επίσης οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.

7.6. Η μεταλλαγή S427F του γονιδίου RXRA είναι επικρατής αρνητική

Το επόμενο βήμα μας ήταν η μελέτη της επίδρασης της μεταλλαγής S427F του γονιδίου *RXRA* στη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα. Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία της λουσιφεράσης σε κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με φορείς του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου υποδοχέα RXRa (pENTR.GD.for-GFP-RXRa WT και pENTR.GD.for-GFP-RXRa MUT) καθώς και με ένα πλασμίδιο στο οποίο το γονίδιο της λουσιφεράσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των ρυθμιστικών στοιχείων του *RXRA* (DR1-tk-luc), έτσι ώστε η έκφραση της λουσιφεράσης να αντικατοπτρίζει τη μεταγραφική ενεργότητα του *RXRA*. Έτσι, διαπιστώσαμε ότι κύτταρα ποντικιού και ανθρώπου που έχουν διαμολυνθεί με τον υποδοχέα που φέρει τη μεταλλαγή

S427F εμφανίζουν μειωμένη δραστικότητα του RXRa συγκριτικά με τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον υποδοχέα φυσικού τύπου. Επιπλέον, το γεγονός ότι η ενεργότητα λουσιφεράσης μειώνεται ακόμα και σε σύγκριση με τα ενδογενή επίπεδα των κυττάρων υποδηλώνει ότι η μεταλλαγή αυτή έχει επικρατή αρνητική δράση (Εικόνα 69).



β

α



γ



Εικόνα 69: Διάγραμμα της ενεργότητας λουσιφεράσης μετρημένης σε τυχαίες μονάδες λουσιφεράσης (Random Lusiferase Units, RLUs) **a)** σε ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού νεφρού HEK293T που έχουν διαμολυνθεί με φορέα του RXRα φυσικού τύπου (RXR WT), μεταλλαγμένου τύπου (RXR MUT) ή με φορέα-μάρτυρα (empty) σε 10% ή 0,5% εμβρυϊκό ορό βοός (fetal bovine serum, FBS), **β)** σε ανθρώπινα ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα TCCSUP απουσία (w/o) ή παρουσία του προσδέτη 9cisRA (9cisRA) και γ) σε ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα ποντικιού Rxra^{flox/flox} τα οποία εκφράζουν σταθερά την Cre (βλ. κεφ. 7.9).

7.7. Ο μεταγραφικός παράγοντας Notch1 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου RXRA μέσω του συμπλέγματος που προσομοιάζει στο COMPASS

Η πλακώδης μεταπλασία συχνά εξελίσσεται σε πλακώδες καρκίνωμα το οποίο αποτελεί έναν πολύ επιθετικό και σπάνιο τύπο καρκίνο της ουροδόχου κύστης που απαντάται περίπου στο 5% των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο. Έχει συσχετιστεί κυρίως με δύο αιτίες: τη χρόνια φλεγμονή που είναι πολύ συχνή στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω σχιστοσωμίασης και την έλλειψη βιταμίνης Α. Όπως προαναφέρθηκε (κεφ. 2.3), η απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch στο μοντέλο χημικής καρκινογένεσης μέσω BBN οδηγεί σε πλακώδη μεταπλασία. Επιπλέον, είναι γνωστό παλαιόθεν ότι διατροφή φτωχή σε βιταμίνη Α, η οποία αποτελεί πρόδρομο του ρετινοϊκού οξέος, οδηγεί σε πλακώδη μεταπλασία στην ουροδόχο κύστη του ποντικιού (Molloy & Laskin, 1988). Επιπρόσθετα, ποντίκια στα οποία χορηγείται BBN αναπτύσσουν όγκους στην ουροδόχο κύστη πιο σύντομα όταν στερούνται βιταμίνης A (Cohen et al., 1976). Αξιοσημείωτα, τα ρετινοϊκά οξέα καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ουροθηλιακών κυτταρικών σειρών (Clifford et al., 2001). Επίσης, πρόσφατα δείχθηκε ότι η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την αναγέννηση της ουροδόχου κύστης (Gandhi et al., 2013). Τέλος, έχουν βρεθεί μεταλλαγές σε γονίδια του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014), οι οποίες είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες με μεταλλαγές στο μονοπάτι Notch. Συνολικά, όλα αυτά τα δεδομένα μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και την καρκινογένεση της ουροδόχου κύστης και ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και του μονοπατιού Notch.

Κατ' αρχάς, για να διερευνήσουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών ρετινοϊκού και Notch, εξετάσαμε την έκφραση του *RXRA* έπειτα από την υπερέκφραση του N1ic σε ανθρώπινες καρκινικές ουροθηλιακές σειρές. Αυτό που είδαμε είναι ότι η έκφραση του *RXRA* αυξάνεται σε παρόμοια επίπεδα με αυτήν του HEY1, το οποίο αποτελεί κλασικό στόχο του μονοπατιού Notch (**Εικόνα 70**).



Εικόνα 70: Διάγραμμα της έκφρασης των γονιδίων RXRA και HEY1 έπειτα από μεταγωγή με τον AdN1ic στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου ουροδόχου κύστης HTB9. Παρουσιάζεται η μεταβολή της έκφρασης ως προς κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τον AdGFP. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Στη συνέχεια, έπειτα από ανάλυση δεδομένων του εργαστηρίου από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης συνδεδεμένη με αλληλούχηση (Chromatin immunoprecipitation-sequencing, ChIP-Seq) [Δρ. Θεόδωρος Ράμπιας] σε ανθρώπινα ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα HTB9 που υπερεκφράζουν N1ic είδαμε ότι το N1ic προσδένεται στον υποκινητή του RXRA (Eικόνα 71). Το ίδιο ισχύει και για τις RBPP5 και WDR5, που αποτελούν συστατικά του συμπλέγματος που προσομοιάζει στο COMPASS (COMPASS-like complex), το οποίο έχει δραστικότητα μεθυλοτρανσφεράσης μεσολαβούμενη από την MLL3 ή την MLL4. Αξίζει να σημειωθεί ότι το N1ic προσδένεται επίσης στον υποκινητή του RARA και του PPARG. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με Real-time qPCR σε ανθρώπινες ουροθηλιακές καρκινικές σειρές που υπέστησαν μεταγωγή με AdN1ic και εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης των RXRA, RAR και PPARG καθώς και σε ουροδόχο κύστη από ποντίκια με γονότυπο UpII-Cre; Ncstn^{flox/flox} που παρουσίασαν μείωση της έκφρασής τους σε επίπεδα ανάλογα των κλασικών στόχων του μονοπατιού Notch, *HEY1* και *HEY2*.



Εικόνα 71: Σχηματική απεικόνιση δεδομένων από ChIP-seq σε ανθρώπινα ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα HTB9 που υπερεκφράζουν N1ic που δείχνουν τις θέσεις πρόσδεσης των NOTCH1, RBPP5 και WDR5 στον υποκινητή του *RXRA*.

Γνωρίζουμε ότι η MLL3 είναι μια μεθυλοτρανσφεράση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4Me) που εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Όταν στην ίδια κυτταρική σειρά εκφράζεται σταθερά ένα shRNA που στοχεύει την MLL3, επιγενετικά σήματα που συνδέονται με ενεργή μεταγραφή όπως η τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4Me3) και η ακετυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (H3K9Ac) στον υποκινητή του γονιδίου *RXRA* χάνονται (**Εικόνα 72**). Φαίνεται λοιπόν ότι η MLL3 αποτελεί κρίσιμο ρυθμιστή της μεταγραφικής ενεργότητας του *RXRA*. Αυτό επιβεβαιώθηκε και με Real-time qPCR όπου είδαμε ότι η έκφραση του *RXRA* μειώνεται στο μισό έπειτα από απώλεια της MLL3 (**Εικόνα 73**). Αξίζει να σημειωθεί ότι η συμμετοχή της MLL3 σε μεταγραφικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν το Notch1 έχει περιγραφεί (Ntziachristos et al., 2014b) και ο ρόλος της ειδικότερα στην ουροδόχο κύστη υποστηρίζεται από δεδομένα του εργαστηρίου (Rampias et al., υπό αξιολόγηση).



Εικόνα 72: Σχηματική απεικόνιση δεδομένων από ChIP-seq σε ανθρώπινα ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα HTB9 φυσικού τύπου (parental, κόκκινο) καθώς και κύτταρα που εκφράζουν σταθερά ένα shRNA που στοχεύει την MLL3 (X44, μπλε) στο οποίο απεικονίζεται η παρουσία των επιγενετικών σημάτων που αναφέρονται στον υποκινητή του *RXRA*.



Εικόνα 73: Ποσοστιαίο διάγραμμα της έκφρασης των γονιδίου RXRA και HEY1 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης HTB9 που εκφράζουν σταθερά ένα shRNA που στοχεύει την MLL3 (X44) καθώς και φυσικού τύπου (parental). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

7.8. Ο υποδοχέας Rxra εκφράζεται στο ουροθήλιο του ποντικιού σε όλα τα στάδια της φυσιολογικής ανάπτυξης

Το επόμενο βήμα μας ήταν να μελετήσουμε το ρόλο του υποδοχέα Rxra *in vivo* στη φυσιολογική ανάπτυξη και την καρκινογένεση του ποντικιού. Κατ' αρχάς, εξετάσαμε την έκφρασή του στην ουροδόχο κύστη φυσιολογικών ποντικιών και είδαμε ότι ο υποδοχέας Rxra παρουσιάζει πυρηνική έκφραση σε όλες τις στιβάδες του ουροθηλίου —λιγότερο στα επιφανειακά κύτταρα—(Εικόνα 74) και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν, δηλαδή από την εμβρυϊκή ημέρα 13.5 μέχρι την ηλικία του ενός έτους (Εικόνα 75).



Εικόνα 74: Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του υποδοχέα Rxra στην ουροδόχο κύστη φυσιολογικού ενήλικου ποντικιού. Με μαύρα βέλη υποιδεικνύονται κάποια από τα επιφανειακά κύτταρα στα οποία εκφράζεται ο υποδοχέας Rxra. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.


Εικόνα 75: Ανοσοφθορισμός έναντι του υποδοχέα Rxra (πράσινο χρώμα) και της UpIII (κόκκινο) σε τομές ουροδόχου κύστης φυσιολογικών ποντικιών **a**) κατά την εμβρυϊκή μέρα E13.5, **β**) E14.5, γ) E15.5, **δ**) E17.5, ε) E18.5, στ) κατά τη γέννηση (p0), ζ) σε ηλικία 3 εβδομάδων (3w), **η**) 2 μηνών (2m) και **θ**) ενός έτους (1y). Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI (μπλε). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 75 μm.

7.9. Δημιουργία κυτταρικής σειράς από όγκο ουροδόχου κύστης από τον οποίο απουσιάζει ο υποδοχέας RXRa

Ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου του υποδοχέα Rxra *in vitro* αποτελούν οι κυτταρικές σειρές από όγκους ουροδόχου κύστης ποντικιών με γονότυπο *Rxra*^{flox/flox} (Chen et al., 1998) που εμφανίστηκαν έπειτα από 6 μήνες χορήγησης BBN. Όπως προαναφέρθηκε (κεφ.2.3), η πλειοψηφία των ποντικιών φυσικού τύπου παρουσιάζουν διηθητικά κερατινοποιητικά πλακώδη καρκινώματα μετά από 6 μήνες στο χημικό καρκινογόνο BBN (**Εικόνα 76**). Έτσι,

απομονώσαμε τους όγκους και τους διαχωρίσαμε σε μονήρη κύτταρα τα οποία αθανατοποιήθηκαν έπειτα από καλλιέργεια.





Εικόνα 76: α) Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και β) χρώση έναντι της Pankeratin σε τομές ουροδόχου κύστης ποντικιού *Rxra*^{flox/flox} που εμφανίζει διηθητικό κερατινοποιητικό πλακώδες καρκίνωμα μέτριας διαφοροποίησης μετά από 6 μήνες χορήγησης BBN. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.

7.10. Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα Rxra στην καρκινογένεση στο ουροθήλιο του ποντικιού

Στη συνέχεια, το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε στο ρόλο που παίζει ο υποδοχέας Rxra στην καρκινογένεση στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού. Προς αυτή την κατεύθυνση, χρησιμοποιήσαμε ποντίκια από τα οποία απουσιάζει το γονίδιο *Rxra* (UpII-Cre; *Rxra*^{flox/flox}) από το ουροθήλιο. Τα πειραματόζωα αυτά θυσιάστηκαν σε διάφορες ηλικίες, ωστόσο σε καμία περίπτωση (n=5) δεν παρατηρήθηκε νεοπλασματικός φαινότυπος. Ωστόσο, σε λίγες περιπτώσεις είδαμε ότι υπήρχαν πολλαπλές κυτταρικές στιβάδες στο ουροθήλιο (**Εικόνα 77**).

Το επόμενο βήμα μας ήταν να τοποθετήσουμε ποντίκια φυσικού τύπου καθώς και ποντίκια με απώλεια του γονιδίου *Rxra* σε BBN—για να επισπευθεί η καρκινογένεση—τα οποία και θυσιάσαμε 2 (n=10 και n=13 αντίστοιχα) και 6 μήνες (n=14 και n=12 αντίστοιχα) μετά την έναρξη της χορήγησης. Δεν παρατηρήσαμε αξιοσημείωτες διαφορές ως προς τους φαινοτύπους που παρατήρησαν οι δύο ομάδες πειραματοζώων που εξετάσαμε.



Εικόνα 77: *α*), β) Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και γ), δ) χρώση έναντι της Pankeratin σε τομές ουροδόχου κύστης ποντικιού UpII-Cre; *Rxra*^{flox/flox} ηλικίας ενός έτους. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.

Στη συνέχεια, ακολουθήσαμε την ίδια πειραματική διαδικασία χρησιμοποιώντας ζώα της σειράς CK5-CreER, στην οποία η Cre εκφράζεται αποκλειστικά και καθολικά στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του ουροθηλίου. Ενδιαφέρον προκάλεσε η παρατήρηση ότι ποντίκια από τα οποία απουσίαζε ο υποδοχέας Rxra (CK5-CreER; *Rxraaa^{flox/flox}*) εμφάνιζαν πιο συχνά πλακώδη μεταπλασία από ό,τι τα ποντίκια φυσικού τύπου στο ίδιο χρονικό διάστημα χορήγησης BBN. Συγκεκριμένα, έπειτα από 2 μήνες σε BBN, δύο από τα τρία ποντίκια με γονότυπο CK5-CreER; *Rxra^{flox/flox}* παρουσίασαν πλακώδη μεταπλασία, ενώ ο ίδιος φαινότυπος παρατηρήθηκε σε 2 από τα 10 ποντίκια φυσικού τύπου που εξετάστηκαν (**Εικόνα 78**). Αντίστοιχα, μετά από 4 μήνες σε BBN, ένα στα τρία ποντίκια με απώλεια του υποδοχέα Rxra εμφάνισε πλακώδη μεταπλασία, με χαρακτηριστική έκφραση των CK5, CK14 και CK10, ενώ κανένα από τα φυσικού τύπου δεν παρουσίασε τον εν λόγω φαινότυπο (**Εικόνα 79**). Αυτός ο φαινότυπος παρουσιάζει ομοιότητες με

αυτόν που παρατηρούμε στα ποντίκια τα οποία στερούνται σηματοδότησης μέσω Notch, ενισχύοντας την εκτίμησή μας ότι τα δύο μονοπάτια σηματοδότησης επικοινωνούν. Αναμένεται να θυσιαστούν περισσότερα πειραματόζωα για να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.



Εικόνα 78: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές ουροδόχου κύστης **α**) ποντικιού φυσικού τύπου που παρουσιάζει φυσιολογική μορφολογία και **β**) ποντικιού CK5-CreER; *Rxra*^{flox/flox} που εμφανίζει πλακώδη μεταπλασία μετά από 4 μήνες χορήγησης BBN. Η ράβδος κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 μm.









Εικόνα 79: Ανοσοφθορισμός σε τομές ουροδόχου κύστης *a*) ποντικιού φυσικού τύπου το οποίο είναι φυσιολογικό με χρώση έναντι της κυτταροκερατίνης CK5 (πράσινο χρώμα) και της UpIII (άσπρο) και β) με χρώση έναντι του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 (πράσινο χρώμα) και της CK14 (άσπρο), γ) ποντικιού από το οποίο απουσιάζει ο υποδοχέας Rxra CK5-CreER; *Rxra*^{flox/flox} και εμφανίζει πλακώδη μεταπλασία με χρώση έναντι της CK5 (πράσινο χρώμα) και της CK14 (άσπρο), και της CK5 (πράσινο χρώμα) και της CK10 (άσπρο), δ) με χρώση έναντι του Ki67 (πράσινο χρώμα) και της CK14 (άσπρο) και ε) με χρώση έναντι της CK10 (άσπρο), μετά από 4 μήνες χορήγησης BBN. Επιπρόσθετα, οι τομές έχουν σημανθεί με την ειδική πυρηνική χρωστική DAPI (μπλε). Οι ράβδοι κλίμακας αντιστοιχούν σε 100 μm.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch δρα ογκοκατασταλτικά στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού

Μολονότι ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί έναν πολύ συχνό και θανατηφόρο τύπο καρκίνου, η έρευνα που αφορά στη μοριακή του βάση και τη θεραπεία του είναι πολύ περιορισμένη σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου. Η παρούσα εργασία συνέβαλε σημαντικά στην ταυτοποίηση του μονοπατιού Notch ως ενός σηματοδοτικού μονοπατιού με ρόλο-κλειδί στην καρκινογένεση του ουροθηλίου, καθώς και στην αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν αυτές τις διαδικασίες.

Κατ' αρχάς, η ομάδα μας έδειξε για πρώτη φορά ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ασκεί ογκοκατασταλτική δράση στο ουροθήλιο, μελέτη που πυροδοτήθηκε από μία αρχική, τυχαία παρατήρηση ότι η απενεργοποίησή του οδηγεί σε ανάπτυξη όγκων στο ουροποιητικό σύστημα του ποντικιού. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την αιτιακή σχέση μεταξύ της απώλειας της σηματοδότησης μέσω Notch και της καρκινογένεσης στο ουροθήλιο. Ως γνωστόν, το μονοπάτι Notch παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την καρκινογένεση σε πληθώρα ιστών, στους οποίους προωθεί τον πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση και δρα ογκογενετικά ή ογκοκατασταλτικά αντίστοιχα. Ενώ αρχικά περιγράφηκε ως ογκογονίδιο, όπως για παράδειγμα στην Τ-οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Weng et al., 2004) και τον καρκίνο του μαστού (Gallahan et al., 1987), μεταγενέστερες μελέτες αποκάλυψαν τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο στον καρκίνο του δέρματος (Nicolas et al., 2003) και τα πλακώδη καρκινώματα δέρματος, πνεύμονα (Wang et al., 2011) και κεφαλής και τραχήλου (Agrawal et al., 2011, Stransky et al., 2011). Προσθέσαμε λοιπόν στη λίστα έναν ακόμη επιθηλιακό ιστό όπου το Notch δρα ογκοκατασταλτικά και υπογραμμίστηκε και πάλι ότι η δράση του μονοπατιού εξαρτάται σημαντικά από το περιβάλλον.

Ένας άλλος τομέας στον οποίο η έρευνα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης υστερεί είναι η ύπαρξη μοντέλων γενετικά τροποποιημένων ποντικιών τα οποία αναπαριστούν πιστά την ανθρώπινη ασθένεια. Πέραν του ότι τα υπάρχοντα γενετικά μοντέλα καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι λίγα, τα καρκινώματα που αναπτύσσονται σε αυτά είναι μη διηθητικά ή προκύπτουν από υπερέκφραση επικρατών ογκογονιδίων, όπως το SV40, σε πειραματικές συνθήκες που δεν είναι ρεαλιστικές για τον άνθρωπο. Τα ανθρώπινα διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από κοινές μεταλλαγές σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα TP53, RB και PTEN. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων λειτουργούν ως δικλείδες ασφαλείας στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, ωστόσο η απουσία τους από μόνη της δεν οδηγεί σε ογκογένεση. Ειδικότερα, έχει δειχθεί *in vivo* σε μοντέλα ποντικιού ότι η ταυτόχρονη απαλοιφή των Tp53 και Rb οδηγεί μακροπρόθεσμα σε υπερπλασία αλλά όχι σε όγκο (He et al., 2009). Προφανώς, καμία από τις δύο από μόνη της δεν αρκεί για να προκαλέσει καρκινογένεση. Μόνο η συνδυαστική απενεργοποίηση των Tp53 και Pten προωθεί το διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Puzio-Kuter et al., 2009).

Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι στο μοντέλο μας μία μόνο μεταλλαγή που οδηγεί στην απώλεια της δράσης της γ-σεκρετάσης και κατά συνέπεια στην απενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch επαρκεί για την εμφάνιση διηθητικού καρκίνου και μάλιστα μέσα σε δύο μόλις βδομάδες, χρονικό διάστημα συμβατό με την υπόθεση του ενός βήματος ("single hit" hypothesis) για την έναρξη και εξέλιξη των όγκων. Παρόλο που η ογκογένεση σε ένα βήμα στο ουροθήλιο του ποντικιού δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα, είναι γνωστό ότι η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *Apc* ειδικά στα βλαστικά κύτταρα του εντέρου οδηγεί αυτόματα σε καρκινογένεση (Barker et al., 2009). Συνεπώς, εγείρεται το ερώτημα αν εμπλέκονται τα βλαστικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης και αν το Notch έχει γενικότερη ογκοκατασταλτική δράση στο ουροθήλιο.

Οι όγκοι που αναπτύσσονται στα ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί η σηματοδότηση μέσω Notch πιθανότατα είναι βασικής προέλευσης, καθώς εκφράζουν τους δείκτες βασικών κυττάρων CK5 και p63. Η σύγκριση των προφίλ έκφρασης των όγκων ουρητήρα των ποντικιών με τους τέσσερις υποτύπους ανθρώπινου καρκίνου ουροδόχου κύστης σύμφωνα με το TCGA έδειξε ότι οι όγκοι αυτοί προσομοιάζουν στο βασικό/τύπου πλακώδη υπότυπο (BLCA3). Η απόκριση κατά προτίμηση των CK5⁺ κυττάρων της βασικής στιβάδας, και πιο συγκεκριμένα του CK14⁺ υποπληθυσμού, σε ογκογενετικά σήματα έχει περιγραφεί σε μοντέλο χημικής καρκινογένεσης (Shin et al., 2014, Papafotiou et al., 2016) και η έκφραση κυτταρικών δεικτών της βασικής στιβάδας έχει συσχετιστεί με κακή κλινική πρόγνωση (Choi et al., 2014, Ho et al., 2012). Δεδομένου ότι οι όγκοι στα ποντίκια από τα οποία λείπει η Nicastrin χαρακτηρίζονται από την έκφραση της CK14, εικάζουμε ότι η απενεργοποίηση του μονοπατιού στα βλαστικά κύτταρα

χρονικό διάστημα. Επίσης, εύλογα μπορούμε να υποθέσουμε ότι το μονοπάτι Notch παίζει ρόλο στη ρύθμιση της αυτο-ανανέωσης των ουροθηλιακών βλαστικών κυττάρων.

Περιγράψαμε δύο μοντέλα ποντικιού: στο πρώτο, η καθολική έλλειψη της Nicastrin οδηγεί σε μυοδιηθητικό καρκίνο στον ουρητήρα, ενώ στο δεύτερο η ειδική για το ουροθήλιο απαλοιφή της Nicastrin επάγει απλή και οζώδη υπερπλασία και καρκίνωμα *in situ* στην ουροδόγο κύστη και λιγότερο συχνά καρκίνο του ουρητήρα. Παρόλο που στο πρώτο μοντέλο η ρεκομπινάση Cre βρίσκεται υπό τον καθολικό υποκινητή του ROSA26, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα μόνο στα ουροθηλιακά κύτταρα της νεφρικής πυέλου, του ουρητήρα και της ουροδόχου κύστης στο συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο πειραματοζώων. Η διαφορά στο φαινότυπο μεταξύ των δύο μοντέλων μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική ευαισθησία στην απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch η οποία αντανακλά τη διαφορετική εμβρυϊκή προέλευση ουρητήρα (μεσόδερμα) και ουροδόχου κύστης (ενδόδερμα) αλλά και στο ότι στην πρώτη περίπτωση ο ανασυνδυασμός συμβαίνει σε όλα τα ουροθηλιακά κύτταρα, ενώ στη δεύτερη, στα κύτταρα της βασικής στιβάδας, στην οποία εδράζονται τα βλαστικά κύτταρα του ουροθηλίου, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα σε μικρότερο ποσοστό. Επιπρόσθετα, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα γονίδια αναφοράς με βάση τα οποία εκτιμάται ο ανασυνδυασμός δεν εμφανίζουν απαραίτητα παρόμοιο πρότυπο ανασυνδυασμού με κάθε γενετικό τόπο. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι διαπιστώσαμε τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του Notch στο ουροθήλιο χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά γονίδια που οδηγούν σε καθολική απενεργοποίηση του μονοπατιού (Nestn και Cbfl) υπό τον έλεγχο δύο διαφορετικών υποκινητών δύο διαφορετικά μοντέλα ποντικιού (R26rtTA και UpII). Επιπλέον, είδαμε ότι η έκφραση της ενεργούς μορφής του υποδοχέα Notch1 σε ποντίκια από τα οποία λείπει η Nicastrin αναστέλλει την εμφάνιση νεοπλασματικού φαινοτύπου, γεγονός που επιβεβαιώνει το ρόλο του Notch και όχι κάποιου άλλου υποστρώματος της γ-σεκρετάσης ή μεταγραφικού παράγοντα που αλληλεπιδρά με την Cbf1.

Έκπληξη προξενεί το ότι προϋπήρχαν ορισμένες παρατηρήσεις που υποστήριζαν ότι το μονοπάτι Notch δρα ογκογενετικά στην ουροδόχο κύστη. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι ο υποδοχέας Notch1 εκφράζεται τόσο στα κύτταρα του όγκου όσο και του στρώματος και η έκφρασή του στο στρώμα σχετίζεται με την έκφραση της ενεργής πυρηνικής μορφής του Oct-4 στον όγκο, η οποία σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Abdou et al., 2013), καθώς και ότι η αυξημένη έκφραση του Jagged2 στο ουροθηλιακό καρκίνωμα σχετίζεται με μετάσταση και επανεμφάνιση του όγκου (Li et al., 2013). Από την άλλη μεριά, τα χαμηλά επίπεδα του NOTCH1 και του

JAGGED1 έχουν συσχετιστεί με χαμηλή επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Shi et al., 2008). Μετά τη δημοσίευση της δικής μας έρευνας, ακολούθησαν μελέτες οι οποίες επιβεβαίωσαν τα ευρήματά μας σχετικά με τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του μονοπατιού Notch στην ουροδόχο κύστη (Greife et al., 2014, Maraver et al., 2015). Ειδικότερα, η πρώτη ομάδα έδειξε ότι η κανονική σηματοδότηση μέσω Notch καταστέλλεται στο ουροθηλιακό καρκίνωμα κυρίως μέσω μείωσης της έκφρασης του *NOTCH1*. Η πιο σημαντική επιβεβαίωση, όμως, ήρθε από τη δεύτερη ομάδα η οποία έδειξε ότι η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch μέσω της απαλοιφής του *Psen*, η οποία αποτελεί επίσης υπομονάδα της γ-σεκρετάσης, ή του *Cbf1*, επιταχύνει την καρκινογένεση και προωθεί το σχηματισμό πλακωδών καρκινωμάτων στην ουροδόχο κύστη ποντικιών που έχουν εκτεθεί σε χημική καρκινογένεση. Επίσης, έδειξαν ότι οι ανθρώπινοι όγκοι του TCGA που φέρουν μεταλλαγές στους υποδοχείς Notch1 ή Notch2 ανήκουν στο βασικό/τύπου πλακώδη υπότυπο (BLCA3) και εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των πλακωδών δεικτών CK5, CK14 και p63 και μειωμένη έκφραση των στόχων του μονοπατιού Notch Hes1 και Hey1.

2. Ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχο κύστης εμφανίζουν γενετικές αλλοιώσεις στο μονοπάτι Notch

Μία πολύ σημαντική πτυχή της έρευνας αυτής είναι ότι τα ευρήματα που αφορούν στον ογκοκατασταλτικό ρόλο του μονοπατιού Notch στην ουροδόχο κύστη του ποντικιού μεταφράζονται στον άνθρωπο, καθώς το 61% των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο παρουσιάζουν γενετικές αλλοιώσεις στη σηματοδότηση μέσω Notch. Ειδικότερα, ταυτοποιήθηκαν νέες, σωματικές, απενεργοποιητικές μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού Notch (*NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, MAML1, NCSTN*) στο 43% των ασθενών και παρατηρήθηκε απώλεια αριθμού αντιγράφων στο γενετικό τόπο του *NOTCH1* στο 48% των περιπτώσεων. Παράλληλα, δημοσιεύθηκαν μελέτες μεγάλης κλίμακας οι οποίες αφορούσαν αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing) καθώς και ανάλυση των μεταβολών στον αριθμό αντιγράφων σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Cancer Genome Atlas Research Network, Bladder Urothelial Carcinoma, provisional, Cancer Genome Atlas Research Network, 2014, Guo et al., 2013, Van Allen et al., 2014, Iyer et al., 2013, Kim et al., 2013, Al-Ahmadie et al., 2016). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με τα δεδομένα αυτών των μελετών μέσω της πλατφόρμας cBioPortal (Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013) βλέπουμε

ότι υπάρχει συμφωνία σε γενικές γραμμές ως προς τις γενετικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο μονοπάτι Notch. Συγκεκριμένα, διαπιστώσαμε ότι παρατηρούνται μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού Notch, στους τέσσερις υποδοχείς και τις υπομονάδες της γ-σεκρετάσης—δηλαδή στα γονίδια στα οποία πραγματοποιήσαμε αλληλούχηση με εξαίρεση το NOTCH4—, σε ποσοστό ασθενών που κυμαίνεται από 13,1% μέχρι 24% αναλόγως τη μελέτη (**Εικόνα 1**). Τα ποσοστά αυτά είναι σημαντικά μικρότερα από το 43% που ταυτοποιήθηκε στη δική μας μελέτη. Επιπλέον, συγκρίναμε τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλαγών σε κάθε γονίδιο ξεχωριστά σε αυτές τις μελέτες και διαπιστώσαμε ότι τα αποτελέσματά τους φαίνονται παρόμοια στις περισσότερες περιπτώσεις. Οι πιο αξιοσημείωτες διαφορές αφορούν το σημαντικά υψηλότερο ποσοστό μεταλλαγών στο NOTCH1 και το MAML1 στη δική μας μελέτη και στο NOTCH4 στη μελέτη των Al-Ahmadie et al. (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 1: Διάγραμμα που απεικονίζει το συνολικό ποσοστό μεταλλαγών στα γονίδια NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, MAML1, NCSTN, APH1A, APH1B, PSEN1 και PSENEN, που αποτελούν βασικά συστατικά του μονοπατιού Notch, σε όλες τις μελέτες μεγάλης κλίμακας σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης με βάση τα δημόσια διαθέσιμα δεδομένα μέσω του cBioPortal (Van Allen et al., 2014 [DFCI/MKSCC 2014], Al-Ahmadie et al., 2016 [MKSCC], Cancer Genome Atlas Research Network, Bladder Urothelial Carcinoma, provisional) [TCGA], Kim et al., 2015 [MKSCC 2014], Cancer Genome Atlas Research Network, 2014 [TCGA 2014], Guo et al., 2013 [BGI 2013], Iyer et al., 2013 [MKSCC 2012]).



Εικόνα 2: Διαγράμματα που απεικονίζουν τα ποσοστά μεταλλαγών στα γονίδια NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, MAML1, NCSTN, APH1A, APH1B και PSEN1, που αποτελούν βασικά συστατικά του μονοπατιού Notch, σε όλες τις μελέτες μεγάλης κλίμακας σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης τα δεδομένα των οποίων είναι διαθέσιμα μέσω του cBioPortal σε σύγκριση με τη δική μας μελέτη (Rampias et al., 2014 [Nat Med, 2014], Cancer Genome Atlas Research Network, 2014 [TCGA, 2014], Cancer Genome Atlas Research Network, 2014 [TCGA], Van Allen et al., 2014 [DFCI/MKSCC, 2014], Al-Ahmadie et al., 2016 [MKSCC], Iyer et al., 2013 [MKSCC, 2012], Guo et al., 2013 [BGI, 2013], Kim et al., 2015 [MKSCC, 2014]). Δεν απεικονίζεται διάγραμμα για το PSENEN καθώς δεν παρατηρήθηκαν μεταλλαγές σε αυτό το γονίδιο σε καμία μελέτη.

Οι διαφορές που παρατηρούνται συγκρίνοντας τη δική μας μελέτη με άλλες αποδίδονται κυρίως στην εφαρμογή διαφορετικής τεχνικής αλληλούχησης. Η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome) ή όλων των εξωνίων (whole exome) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό για την επεξεργασία των δεδομένων από τη χρήση αλγορίθμων οι οποίοι δίνουν βαθμολογία βάσει

παραμέτρων όπως είναι η αφθονία των μεταλλαγών πάνω από το υπόβαθρο, η ομαδοποίησή τους σε «θερμά σημεία» και η επίδρασή τους στη λειτουργία της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης. Παρόλο που αυτοί οι αλγόριθμοι είναι κατάλληλοι για την ταυτοποίηση συχνών ογκογενετικών γεγονότων ("driver" events), πιθανώς αποτυγχάνουν να εστιάσουν την προσοχή σε μονοπάτια μεταλλαγμένα σε μεγάλο βαθμό όταν τα μεμονωμένα συστατικά εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα αλλοιώσεων. Συνεπώς, η ανάλυση χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο βάθος (coverage depth): όσο μεγαλύτερο είναι αυτό, τόσο μεγαλύτερη και η πιθανότητα να αλληλουχηθεί ένα γονίδιο με χαμηλή συχνότητα. Ωστόσο, δεν είναι εγγυημένο ότι καθένα από αυτά τα γονίδια θα αναλυθεί. Από την άλλη, στην αλληλούχηση κατά Sanger δεν υπεισέρχεται ο παράγοντας του βάθους της ανάλυσης, καθώς προηγείται πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών μέσω PCR και η μέθοδος αυτή εγγυάται ότι τα mRNA που στοχεύουμε θα αλληλουχηθούν ανεξάρτητα από το πόσο σπάνια είναι. Ειδικότερα, για το NOTCH1, σε πρόσφατη δημοσίευση που αφορά στο πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος, η συχνότητα μεταλλαγών μέσω αλληλούχησης όλων των εξωνίων ήταν 45%, ενώ μέσω πολλαπλασιασμού με PCR και πυροαλληλούχησης (pyrosequencing) ήταν 75%, χρησιμοποιώντας την ίδια ομάδα όγκων και στις δύο περιπτώσεις (South et al., 2014). Η μεγάλη αυτή διαφορά αποδίδεται στη σπανιότητα των αλληλουχιών του NOTCH1. Επιπρόσθετα, μόνο στη δική μας μελέτη και στη μελέτη των Guo et al. συμπεριλήφθηκαν και επιφανειακοί όγκοι. Ωστόσο, δεδομένου ότι δεν παρατηρήσαμε συσχέτιση είτε στον αριθμό είτε στο είδος των μεταλλαγών στο μονοπάτι Notch με το στάδιο και το βαθμό του όγκου, το γεγονός αυτό πιθανότατα δε συμβάλλει σημαντικά στις διαφορές που παρατηρήθηκαν.

Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι έξι μεταλλαγές στους υποδοχείς Notch1, 2 ή 3 οδηγούν σε έλλειψη του ενδοκυτταρικού τμήματος και κατά συνέπεια δημιουργούν μορφές με επικρατή αρνητική λειτουργία. Επιπρόσθετα, επόμενη μελέτη ταυτοποίησε απενεργοποιητικές μεταλλαγές στα γονίδια *NOTCH1* και *NOTCH2*, σύμφωνα με τη δοκιμασία της λουσιφεράσης, επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματά μας (Maraver et al., 2015).

Όσον αφορά τις μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων του NOTCH1, παρατηρήσαμε απώλεια στο 48% των ασθενών, ενώ σε δύο άλλες μελέτες το αντίστοιχο ποσοστό βρέθηκε 41% και 18% (Εικόνα 3). Σε όλες τις περιπτώσεις, η απώλεια αριθμού αντιγράφων στο γενετικό τόπο του NOTCH1 είναι πολύ πιο συχνή από ό,τι το κέρδος. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε ορισμένους ασθενείς η απώλεια αριθμού αντιγράφων του NOTCH1 συνοδευόταν από μεταλλαγή στο NOTCH1 στο άλλο αλληλόμορφο. Επιπλέον, μερικά αλληλόμορφα προβλέπεται ότι δημιουργούν επικρατείς αρνητικές πρωτεΐνες NOTCH, οι οποίες μπορούν να αναστείλουν τη σηματοδότηση μέσω όλων των υποδοχέων Notch. Δεδομένου ότι περίπου οι μισοί ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης ανεξάρτητα από το στάδιο και το βαθμό του όγκου εμφανίζουν LOH στο χρωμόσωμα 9 και ότι διαπιστώσαμε ότι σχεδόν οι μισοί ασθενείς της ομάδας που εξετάσαμε, που περιλαμβάνει όγκους όλων των σταδίων και βαθμών, παρουσιάζουν απώλεια αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *NOTCH1*, το οποίο εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9q34.3), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι χαρτογραφήσαμε το ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κρύβεται πίσω από την πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία που χαρακτηρίζει τον ουροθηλιακό καρκίνο.



NOTCH1 CNA

Εικόνα 3: Διάγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό μεταβολής του αριθμού αντιγράφων του *NOTCH1* σε όλες τις μελέτες μεγάλης κλίμακας σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης για τις οποίες υπάρχουν τα αντίστοιχα δεδομένα (Cancer Genome Atlas Research Network, Bladder Urothelial Carcinoma, provisional [TCGA, provisional], Kim et al., 2015 [MKSCC, 2014]) σε σύγκριση με τη δική μας μελέτη (Rampias et al., 2014 [Nat Med, 2014]).

3. Ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης στους οποίους το μονοπάτι Notch είναι απορρυθμισμένο παρουσιάζουν μειωμένη επιβίωση

Ένα ακόμη εύρημα με κλινική σημασία που προέκυψε από αυτή τη μελέτη είναι ότι οι ασθενείς που φέρουν μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού Notch ή απώλεια αριθμού αντιγράφων στο NOTCH1 εμφανίζουν χειρότερη συνολική επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς που δεν παρουσιάζουν γενετικές αλλοιώσεις στο μονοπάτι (Δρ. Μαργαρίτης Αυγέρης, υπό την επίβλεψη του Δρ. Ανδρέα Σκορίλα) [Εικόνα 4]. Επιπρόσθετα, αυτή η ομάδα ασθενών εμφανίζει μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου τόσο στο σύνολο των ασθενών όσο και στην ομάδα των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο. Επιπλέον, η σύγκριση φυσιολογικού και νεοπλασματικού ιστού ως προς την έκφραση τριών καθιερωμένων στόχων του μονοπατιού Notch, *HEY1*, *HES1* και *CDKN1A*, έδειξε ότι αυτοί εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στους όγκους των ασθενών που φέρουν γενετικές αλλοιώσεις στο μονοπάτι (Εικόνα 5), τα οποία συσχετίζονται με μικρότερη συνολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση (Εικόνα 6).



Εικόνα 4: Ανάλυση Kaplan-Meier της συνολικής επιβίωσης του συνόλου των ασθενών (αριστερά) ή των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (δεξιά) ως προς την παρουσία αλλοιώσεων (μεταλλαγών ή/και απώλεια αριθμού αντιγράφων του *NOTCH1*) στο μονοπάτι Notch (Mut/loss, κόκκινο) ή την απουσία αυτών (WT, μπλε). Ο αριθμός η αναφέρεται στον αριθμό των ασθενών και ο αριθμός των γεγονότων (events) αναφέρεται σε θανάτους. Οι τιμές σημαντικότητας (*P* values) υπολογίστηκαν μέσω της δοκιμασίας λογαριθμικής τάξης (log-rank test). Τα διαγράμματα συνοδεύονται από πίνακες στους οποίους αναγράφονται οι μήνες επιβίωσης σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 5: Θηκόγραμμα της αναλογίας της γονιδιακής έκφρασης στόχων του μονοπατιού Notch σε καρκινικό ιστό σε σύγκριση με το φυσιολογικό σε ασθενείς με και χωρίς μεταλλαγές ή/και απώλεια αριθμού αντιγράφων του *NOTCH1* (Mut/loss [κόκκινο] και WT [μπλε] αντίστοιχα). Οι *P* values υπολογίστηκαν μέσω Mann-Whitney *U* test. Οι γραμμές στο εσωτερικό των θηκών αντιπροσωπεύουν τις διαμέσους (50° εκατοστημόριο ή δεύτερο τεταρτημόριο). Τα κάτω και άνω όρια των θηκών αντιπροσωπεύουν το 25° εκατοστημόριο (πρώτο τεταρτημόριο) και το 75° εκατοστημόριο (τρίτο τεταρτημόριο) αντίστοιχα. Οι κάτω και πάνω απολήξεις εκτείνονται στη χαμηλότερη και την υψηλότερη τιμή αντίστοιχα μέσα στο 1,5x διατεταρτημοριακό εύρος (ύψος της θήκης) από τα όρια της θήκης.





Εικόνα 6: Ανάλυση Kaplan-Meier της ελεύθερης νόσου (αριστερά) και της συνολικής επιβίωσης (δεξιά) των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης ως προς τα επίπεδα έκφρασης κλασικών γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch (high [υψηλά, μπλε] και low [χαμηλά, κόκκινο]). Σύμφωνα με τον αλγόριθμο X-tile, οι τιμές αποκοπής (cut-off values) για τα *HES1*, *HEY1* και *CDKN1A* αφορούν το 55°, 50° και 62° εκατοστημόριο αντίστοιχα των επιπέδων έκφρασης των ασθενών. Ο αριθμός η αναφέρεται στον αριθμό των ασθενών και ο αριθμός των γεγονότων (events) αναφέρεται σε θανάτους. Οι *P* values υπολογίστηκαν μέσω log-rank test. Τα διαγράμματα συνοδεύονται από πίνακες στους οποίους αναγράφονται οι μήνες επιβίωσης σε κάθε περίπτωση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρότι οι μεταλλαγές στο μονοπάτι Notch είναι ισομοιρασμένες μεταξύ των τεσσάρων υποτύπων καρκίνου ουροδόχου κύστης που προτάθηκαν από το TCGA, οι στόχοι *HES1* και *CDKN1A* εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση στο βασικό/τύπου πλακώδη υπότυπο BLCA3, ο οποίος παρουσιάζει χαμηλή διαφοροποίηση και υψηλή επιθετικότητα, στη δημοσιευμένη ομάδα ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης του TCGA (**Εικόνα 7α**). Μία πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι η σηματοδότηση μέσω Notch υφίσταται περίπλοκη ρύθμιση και δεν εξαρτάται αποκλειστικά από τα 10 βασικά συστατικά του στα οποία αναζητήσαμε μεταλλαγές. Επιπλέον, δε συμπεριλάβαμε στην ανάλυσή μας την επιγενετική κατάσταση του μονοπατιού στους ασθενείς. Συνεπώς, η έκφραση των καθιερωμένων στόχων του μονοπατιού αποτελεί πιο ασφαλές κριτήριο για την εκτίμηση της κατάστασης ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch.

Επιπρόσθετα, η μειωμένη έκφραση του *HES1* αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη μικρότερης συνολικής επιβίωσης ανεξάρτητα από τον υπότυπο του όγκου σύμφωνα με τα δεδομένα του TCGA (Εικόνα 7β). Η συσχέτιση μεταξύ χαμηλής ενεργοποίησης του μονοπατιού

Notch, όπως αυτή εκφράζεται μέσω της χαμηλής έκφρασης του *HEY1*, και αυξημένης επιθετικότητας του όγκου και μικρότερης επιβίωσης των ασθενών επιβεβαιώθηκε και σε μία τρίτη ομάδα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Maraver et al., 2015). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η χαμηλή έκφραση του *NOTCH1* και του *JAG1* έχουν προταθεί ως δείκτες επιβίωσης για το θηλώδες καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (Shi et al., 2008). Συνεπώς, προκύπτει ότι η κατάσταση ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch χρησιμεύει ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης και η ενσωμάτωσή του στην κλινική πράξη μπορεί να αποβεί ωφέλιμη για τους ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης.



Εικόνα 7: α) Θηκόγραμμα των επιπέδων έκφρασης των στόχων του μονοπατιού Notch *CDKN1A* (p21) και *HES1* στους 4 υποτύπους καρκίνου ουροδόχου κύστης σύμφωνα με το TCGA (BLCA1-4). Οι *P* values υπολογίστηκαν μέσω Mann-Whitney *U* test. Οι γραμμές στο εσωτερικό των θηκών αντιπροσωπεύουν τις διαμέσους (50° εκατοστημόριο ή δεύτερο τεταρτημόριο). Τα κάτω και άνω όρια των θηκών αντιπροσωπεύουν το 25° εκατοστημόριο (πρώτο τεταρτημόριο) και το 75° εκατοστημόριο (τρίτο τεταρτημόριο) αντίστοιχα. Οι κάτω και πάνω απολήξεις εκτείνονται στη χαμηλότερη και την υψηλότερη τιμή αντίστοιχα μέσα στο 1,5x διατεταρτημοριακό εύρος (ύψος της θήκης) από τα όρια της θήκης. **β**) Ανάλυση Kaplan-Meier της συνολικής επιβίωσης της ομάδας ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης του TCGA ως προς τα επίπεδα έκφρασης του *HES1* (high [υψηλά, μπλε] και low [χαμηλά, κόκκινο]). Ο αριθμός η αναφέρεται στον αριθμό των ασθενών και ο αριθμός των γεγονότων (events) αναφέρεται σε θανάτους. Οι *P* values υπολογίστηκαν μέσω log-rank test.

4. Το μονοπάτι Notch ασκεί την ογκοκατασταλτική του δράση μέσω ρύθμισης του μονοπατιού ΜΑΡΚ

Οι μελέτες που στηρίχθηκαν στην αλληλούχηση νέας γενιάς (next generation sequencing) παρείχαν πολύτιμη γνώση σχετικά με τις γενετικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ωστόσο αυτή δε συνοδεύτηκε από μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων που ταυτοποιήθηκαν. Ωστόσο, η μελέτη μας, πέρα από την ταυτοποίηση απενεργοποιητικών μεταλλαγών στο μονοπάτι Notch, αποσαφήνισε και το μηχανισμό της ογκοκατασταλτικής του δράσης τόσο *in vitro* χρησιμοποιώντας ανθρώπινες καρκινικές σειρές όσο και *in vivo* χρησιμοποιώντας μοντέλα ποντικιού.

Αρχικά, δείξαμε *in vitro* ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί σε καταστολή του πολλαπλασιασμού ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών κυττάρων όλων των σταδίων και βαθμών μέσω διακοπής της μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S.

Είναι γνωστό ότι πάνω από το 80% των μη διηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστης φέρουν μεταλλαγές στο RAS (*HRAS* ή *KRAS*) ή στο *FGFR3*, οι οποίες οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK και επάγουν καρκινογένεση μέσω φωσφορυλίωσης της ERK1/2. Επομένως, εξετάσαμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης της ERK1/2 σε όγκους ασθενών που φέρουν μεταλλαγές στο μονοπάτι Notch και διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της (pERK1/2) ήταν πολύ υψηλά ακόμη και απουσία μεταλλαγών στο *FGFR3* ή το RAS. Για την ακρίβεια, οι όγκοι με αλλοιώσεις στο Notch εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα pERK1/2 από τους όγκους με μεταλλαγές στο *FGFR3* ή το RAS (**Eικόνα 8**). Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch αναιρεί αναρροϊκά θετικά σήματα που οδηγούν σε φωσφορυλίωση της ERK1/2 ακόμα και στην κυτταρική σειρά T24 η οποία φέρει τη μεταλλαγή HRAS^{G12V}. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι τα επίπεδα της pERK1/2 στους ανθρώπινους όγκους της ουροδόχου κύστης δε συσχετίζονται με τις μεταλλαγές στο RAS (Juanpere et al., 2012).



Εικόνα 8: Θηκόγραμμα των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 σε σχέση με τις μεταλλαγές που φέρει ο όγκος. Ως WT χαρακτηρίζονται οι όγκοι που δε φέρουν αλλοιώσεις ούτε στο Notch ούτε στα *FGFR3*/RAS. Οι *P* values υπολογίστηκαν μέσω Mann-Whitney *U* test. Οι γραμμές στο εσωτερικό των θηκών αντιπροσωπεύουν τις διαμέσους (50° εκατοστημόριο ή δεύτερο τεταρτημόριο). Τα κάτω και άνω όρια των θηκών αντιπροσωπεύουν το 25° εκατοστημόριο (πρώτο τεταρτημόριο) και το 75° εκατοστημόριο (τρίτο τεταρτημόριο) αντίστοιχα. Οι κάτω και πάνω απολήξεις εκτείνονται στη χαμηλότερη και την υψηλότερη τιμή αντίστοιχα μέσα στο 1,5x διατεταρτημοριακό εύρος (ύψος της θήκης) από τα όρια της θήκης.

Στη συνέχεια, διαπιστώσαμε ότι η ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδότησης μέσω Notch οδηγεί σε άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση των DUSPs, οι οποίες με τη σειρά τους αποφωσφορυλιώνουν την ERK1/2. Είδαμε επίσης ότι η έκφραση της DUSP1 και—σε μικρότερο βαθμό—της DUSP5 συσχετίζεται με την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch στην ομάδα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης που αναλύσαμε (**Εικόνα 9**). Τα αποτελέσματά μας σχετικά με την αντίστροφη σχέση των μονοπατιών Notch και MAPK επιβεβαιώθηκαν και στην ομάδα ασθενών του TCGA, καθώς διαπιστώσαμε ότι η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch, όπως αυτή αντανακλάται κυρίως μέσω της χαμηλής έκφρασης του HES1 και λιγότερο των CDKN1A και HEY1, συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα της pERK1/2 και με μειωμένα επίπεδα μελών της οικογένειας των DUSPs (DUSP1, 2, 5, 6 και 10). Επιπλέον, δείξαμε ότι η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch με τη χορήγηση αναστολέα των DUSP1 και 6 οδηγεί σε μερική αποφωσφορυλίωση της ERK1/2 και μείωση—αλλά όχι διακοπή—της αύξησης καρκινικών ουροθηλιακών κυττάρων. Συνεπώς, τα δύο αυτά μέλη DUSPs διαμεσολαβούν σημαντικό μέρος της δράσης του Notch, ωστόσο συμμετέχουν και άλλα μέλη. Τέλος, μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων ουρητήρα σε ποντίκια επιβεβαίωσε το μηχανισμό δράσης του Notch μέσω ρύθμισης της κατάστασης φωσφορυλίωσης της Erk1/2.



Εικόνα 9: Θηκόγραμμα των επιπέδων έκφρασης των DUSP1 και DUSP5 σε σχέση με την κατάσταση ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch όπως αυτή αντανακλάται στην έκφραση του κλασικού στόχου HEY1. Με κόκκινο απεικονίζεται η ομάδα με χαμηλή έκφραση HEY1 και κατά συνέπεια απενεργοποιημένο μονοπάτι Notch (HEY1 low) και με μπλε οι υπόλοιποι όγκοι (Control). Οι P values υπολογίστηκαν μέσω Mann-Whitney U test. Οι γραμμές στο εσωτερικό των θηκών αντιπροσωπεύουν τις διαμέσους (50° εκατοστημόριο ή δεύτερο τεταρτημόριο). Τα κάτω και άνω όρια των θηκών αντιπροσωπεύουν το 25° εκατοστημόριο (πρώτο τεταρτημόριο) και το 75° εκατοστημόριο (τρίτο τεταρτημόριο) αντίστοιχα. Οι κάτω και πάνω απολήξεις εκτείνονται στη χαμηλότερη και την υψηλότερη τιμή αντίστοιχα μέσα στο 1,5x διατεταρτημοριακό εύρος (ύψος της θήκης) από τα όρια της θήκης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ογκογενετικός άξονας Notch1/Hes1/Dusp1/pErk1/2 έχει περιγραφεί και στον καρκίνο του πνεύμονα, όπου η ενεργοποίηση του Notch1 οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης του *Dusp1* μέσω του Hes1 με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της pErk1/2 και την προώθηση της ανάπτυξης αδενοκαρκινωμάτων στον πνεύμονα ποντικιών τα οποία εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή Kras^{G12V} (Maraver et al., 2012). Επίσης, έχει δειχθεί ότι ο υποδοχέας Notch1 προωθεί την έκφραση του *DUSP1*, το οποίο ρυθμίζει της φωσφορυλίωση της p38 κατά τη μυογένεση (Kondoh et al., 2007) καθώς και ότι ο Notch3 ασκεί τον ογκογενετικό του ρόλο στην T-ALL μέσω της DUSP1 (Masiero et al., 2011). Ωστόσο, δείξαμε για πρώτη φορά ότι μέλη της οικογένειας των DUSPs αποτελούν άμεσους μεταγραφικούς στόχους του Notch1. Συνεπώς, ο ογκοκατασταλτικός ρόλος της σηματοδότησης μέσω Notch περιλαμβάνει τον

περιορισμό του ογκογενετικού δυναμικού του μονοπατιού MAPK και η λεπτή ισορροπία μεταξύ των δύο μονοπατιών καθορίζει την κατάσταση φωσφορυλίωσης της Erk1/2 (Eικόνα 10). Προσθέτοντας, λοιπόν, και το 40% των όγκων που φέρουν μεταλλαγές στο μονοπάτι Notch, συμπεραίνουμε ότι συνολικά ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των όγκων της ουροδόχου κύστης εξαρτάται από την ERK και συνεπώς μπορεί να επωφεληθεί από τη χρήση αναστολέων MEK.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των συστατικών των σηματοδοτικών μονοπατιών, καθώς και των αντίστοιχων ποσοστών μεταλλαγών που εμφανίζουν, που επιδρούν στην κατάσταση φωσφορυλίωσης της ERK1/2.

Μελέτες σε μοντέλα ποντικιού έχουν δείξει ότι η μεταλλαγμένη μορφή του Fgfr3 δεν επαρκεί για την ανάπτυξη όγκου (Ahmad et al., 2011) και παρόλο που η ενεργοποίηση του Hras προκαλεί υπερπλασία, χρειάζονται επιπρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις για τη εξέλιξη σε θήλωμα (Zhou et al., 2012). Σε αντίθεση με αυτά, τα μοντέλα ποντικιού που βασίζονται στην έλλειψη της Nicastrin έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch αποτελεί γεγονός που οδηγεί σε ογκογένεση ("driver" event). Υποθέτουμε πως είτε η καταστολή του Notch έχει ισχυρότερη επίδραση στη φωσφορυλίωση της Erk1/2 από ό,τι οι μεταλλαγές στο Fgfr3 ή το Ras είτε ότι ασκεί επιπλέον άγνωστες δράσεις ανεξάρτητες από την Erk1/2 οι οποίες προωθούν την ογκογένεση. Επομένως, θα είχε ενδιαφέρον να ταυτοποιηθούν επιπρόσθετοι μηχανισμοί ογκοκαταστολής μέσω Notch καθώς και να εξεταστεί αν το μονοπάτι Notch ασκεί γενικότερη ογκοκατασταλτική δράση και σε άλλους τύπους καρκίνου, οι οποίοι εξαρτώνται από την Erk1/2. Για παράδειγμα, παρατηρήσαμε *in vitro* ότι ο άξονας Notch-Dusp-Erk συναντάται και σε κυτταρική σειρά μονοπατιού ΜΑΡΚ στην καρκινογένεση, τα ευρήματά μας δυναμιτίζουν την θεωρούμενη γραμμικότητα του καταρράκτη RTK/Ras/Erk1/2 και τον απόλυτο ογκογενετικό του ρόλο.

Η μελέτη που ακολούθησε και επιβεβαίωσε τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του μονοπατιού Notch στην ουροδόχο κύστη πρότεινε έναν άλλο μηχανισμό δράσης. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η αναστολή του μονοπατιού οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του *HES1* με αποτέλεσμα την αποκαταστολή των γονιδίων που διαμεσολαβούν την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Συνεπώς, το μονοπάτι Notch αναστέλλει την EMT στην ουροδόχο κύστη όπου δρα ογκοκατασταλτικά, ενώ είναι γνωστό ότι επάγει EMT σε ιστούς όπου δρα ογκογενετικά. Το ίδιο συμβαίνει και με τις DUSPs, όπως προαναφέρθηκε, καθώς το Notch επάγει την έκφρασή τους στο ουροθήλιο, ενώ την καταστέλλει στα κύτταρα του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα. Μπορεί να υποθέσει, λοιπόν, κανείς ότι η διττή δράση της σηματοδότησης μέσω Notch στον καρκίνο αντανακλά αντίθετες δράσεις στους ίδιους μεταγραφικούς στόχους.

5. Οι υποδοχείς Notch1 και Notch2 διαμεσολαβούν την ογκοκατασταλτική δράση του μονοπατιού στο ουροθήλιο

Τα μοντέλα ποντικιού που βασίζονται στην έλλειψη της Nicastrin ή της Cbf1 μας βοήθησαν να αποδείξουμε τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του μονοπατιού Notch στο ουροποιητικό σύστημα, όμως δεν προσέφεραν καμία πληροφορία σχετικά με το ποιος υποδοχέας διαμεσολαβεί αυτή τη δράση και αν οι υποδοχείς εμφανίζουν πλεοναστική ή αντίθετη δράση. Υπάρχουν παραδείγματα ιστών στους οποίους ένας υποδοχέας Notch δρα ογκογενετικά ενώ άλλος ογκοκατασταλτικά (Baumgart et al., 2015), συνεπώς το επόμενο βήμα μας ήταν η αποσαφήνιση αυτού του ζητήματος. Χρησιμοποιώντας ποντίκια από τα οποία λείπει ένας υποδοχέας Notch κάθε φορά είδαμε ότι οι Notch1 και Notch2 αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές της χημικής καρκινογένεσης στο ουροθήλιο και ότι η απαλοιφή τους οδηγεί σε κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία.

Προς αυτή την κατεύθυνση συνηγορεί και το γεγονός ότι πάνω από τις μισές μεταλλαγές που ταυτοποιήσαμε αφορούν τα γονίδια NOTCH1 και NOTCH2, τα οποία επίσης εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλαγών μεταξύ των συστατικών του μονοπατιού Notch στις μελέτες μεγάλης κλίμακας που προαναφέρθηκαν. Επιπλέον, το γεγονός ότι η έλλειψη ενός μόνο υποδοχέα

δεν επαρκεί για την ανάπτυξη όγκου στο χρονικό διάστημα στο οποίο εμφανίστηκε νεοπλασία στα ποντίκια με καθολική απενεργοποίηση του μονοπατιού υποδηλώνει συνεργιστική δράση μεταξύ των διαφορετικών υποδοχέων.

Οσον αφορά τη μεταβολή αριθμού αντιγράφων των NOTCH2, NOTCH3 και NOTCH4, την οποία δεν εξετάσαμε, η αντίστοιχη πληροφορία είναι διαθέσιμη από την ομάδα του TCGA. Ενώ για τα γονίδια NOTCH3 και NOTCH4 οι ελλείψεις και τα κέρδη εμφανίζουν παρεμφερείς και μάλιστα μικρούς αριθμούς, κάτι που συμβαδίζει με την παρατήρησή μας ότι ο φαινότυπος της έλλειψής τους προσομοιάζει περισσότερο σε αυτόν των ποντικιών φυσικού τύπου στο μοντέλο χημικής καρκινογένεσης, για το NOTCH2 το 45% των ασθενών εμφανίζει κέρδος αριθμού αντιγράφων, γεγονός που εγείρει αμφιβολίες για τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο (**Εικόνα 11**). Στη διχογνωμία αυτή σχετικά με το ρόλο του υποδοχέα Notch2 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, προστίθενται δύο μελέτες εκ των οποίων η μία ταυτοποίησε απενεργοποιητικές μεταλλαγές στο NOTCH2 (Maraver et al., 2015), ενώ η άλλη υποστηρίζει ότι η υπερέκφραση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch2 οδηγεί σε κυτταρική αύξηση και διήθηση *in vitro* και σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων (Hayashi et al., 2016).



Εικόνα 11: Διαγράμματα που απεικονίζουν το ποσοστό μεταβολής του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων NOTCH2, NOTCH3 και NOTCH4 σε μελέτες μεγάλης κλίμακας σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης για τις οποίες υπάρχουν τα αντίστοιχα δεδομένα διαθέσιμα μέσω της πλατφόρμας cBioPortal (Cancer Genome Atlas Research Network, Bladder Urothelial Carcinoma, provisional, [TCGA, provisional], Kim et al., 2015 [MKSCC, 2014]).

Σχεδόν όλα τα ποντίκια από τα οποία λείπει ο υποδοχέας Notch1 ή ο Notch2 εμφανίζουν κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία, ενώ η έλλειψη της Nicastrin οδηγεί σε διηθητικό πλακώδες καρκίνωμα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από μελέτη που έδειξε ότι η χορήγηση BBN σε ποντίκια με καθολική απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch οδηγεί σε πλακώδες καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (Maraver et al., 2015). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch είναι ένα κρίσιμο βήμα προς την αύξηση καρκινικών κυττάρων με γαρακτηριστικά πλακώδους διαφοροποίησης. Αυτή η άποψη ενισχύεται από το γεγονός ότι το μονοπάτι παίζει ογκοκατασταλτικό ρόλο κυρίως σε πλακώδη καρκινώματα (δέρμα, πνεύμονας, οισοφάγος, κεφαλή και τράχηλος). Η ογκοκατασταλτική δράση του μονοπατιού Notch στο δέρμα στηρίζεται εν μέρει στο ρόλο του στην τελική διαφοροποίηση (Rangarajan et al., 2001). Συγκεκριμένα, απουσία σηματοδότησης μέσω Notch, τα κερατινοκύτταρα δε διαφοροποιούνται πλήρως και παραμένουν σε ένα φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των βλαστικών κυττάρων. Πράγματι, στον οισοφάγο έχει δειγθεί ότι η απώλεια του Notch επάγει μεταλλαγμένους κλώνους οι οποίοι επεκτείνονται μέσω της διαδικασίας της «καρκινοποίησης πεδίου» (field cancerization) και αποτελούν τα κύτταρα προέλευσης των πλακωδών καρκινωμάτων του οισοφάγου (Alcolea et al., 2014). Δεν αποκλείεται παρόμοια διαδικασία να λαμβάνει χώρα και κατά την καρκινογένεση του ουροθηλίου. Υπογραμμίζεται λοιπόν ότι η σηματοδότηση μέσω Notch είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της επιθηλιακής ταυτότητας των κυττάρων, εφόσον η απώλειά της οδηγεί σε πλακώδη διαφοροποίηση και σε ΕΜΤ. Γενικότερα, στους ιστούς οι οποίοι εκτίθενται στο εξωτερικό περιβάλλον, η σηματοδότηση μέσω Notch είναι απαραίτητη για την καταστολή της διαφοροποίησης προς δέρμα στα επιφανειακά κύτταρα/κύτταρα του αυλού. Συνήθως, οι ιστοί αυτοί αποτελούν στρωματοποιημένα επιθήλια που αποτελούνται από μία βασική στιβάδα κυττάρων που εκφράζει CK5 και p63 και διατηρεί την ομοιόσταση μέσω αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης και η σηματοδότηση μέσω Notch εμπλέκεται στη διαφοροποίηση προς κύτταρα της επιφανειακής στιβάδας. Επομένως, περαιτέρω έρευνα σχετικά με το ρόλο του μονοπατιού Notch στη διαφοροποίηση του ουροθηλίου αποτελεί προτεραιότητα.

Ένα άλλο αξιοπρόσεκτο σημείο είναι ότι ενώ η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch οδηγεί στην ανάπτυξη ουροθηλιακών όγκων, όταν συνδυάζεται με επιπλέον γενετικές αλλοιώσεις, όπως συμβαίνει κατά τη χημική καρκινογένεση, όλοι οι όγκοι που προκύπτουν είναι πλακώδεις. Γνωρίζουμε ότι τα κύτταρα της βασικής στιβάδας, τα οποία φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα στην απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch, αποτελούν τα κύτταρα προέλευσης των όγκων στα ουροθηλιακά αλλά και στα πλακώδη καρκινώματα στα ποντίκια (van Batavia et al., 2014). Όσον αφορά το γιατί στη μία περίπτωση παίρνουμε αποκλειστικά ουροθηλιακά καρκινώματα, ενώ στην άλλη πλακώδη, μία πιθανή ερμηνεία είναι ότι η συνδυαστική απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch με επιπρόσθετα ογκογενετικά γεγονότα, τα οποία προκαλούνται έπειτα από χορήγηση BBN, οδηγούν στην ανάπτυξη πλακωδών καρκινωμάτων μέσω μηχανισμών που παραμένουν αδιευκρίνιστοι (Εικόνα 12). Βλέπουμε λοιπόν ότι τα πειράματα αυτά αποτελούν μόνο την αρχή στη διαλεύκανση του ρόλου του μονοπατιού Notch στην ομοιόσταση και την καρκινογένεση στο ουροποιητικό σύστημα και δίνουν το έναυσμα για τη λεπτομερή αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης του.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της ογκοκατασταλτικής δράσης του μονοπατιού Notch στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. *a*) Η φυσιολογική σηματοδότηση μέσω Notch απαιτεί την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός υποδοχέα (N1, N2) και ενός προσδέτη (DLL1, JAG1, JAG2) και την επακόλουθη απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα (NICD) μέσω πρωτεόλυσης από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης. Μεταλλαγές εντοπίζονται τόσο στους υποδοχείς όσο και στο σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης. **β**) Στον πυρήνα,

το NICD αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα CSL και το συνενεργοποιητή MAML1 με αποτέλεσμα τη μεταγραφή μελών της οικογένειας DUSP που αποφωσφορυλιώνουν την ERK1/2. Η ERK1/2 φωσφορυλιώνεται έπειτα από ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK είτε φυσιολογικά ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες είτε ως αποτέλεσμα μεταλλαγών στο *FGFR3* ή το RAS στον ουροθηλιακό καρκίνο. Μεταλλαγές έχουν ταυτοποιηθεί και στο *MAML1*. γ) Οι δράσεις του μονοπατιού Notch στην ουροδόχο κύστη αφορούν αναστολή του μονοπατιού MAPK, της πλακώδους διαφοροποίησης, της EMT, καθώς και άλλες άγνωστες λειτουργίες (Greife et al., 2015).

6. Αλληλεπίδραση του μονοπατιού Notch με άλλα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά στην ουροδόχο κύστη

Εύλογα προκύπτει το ερώτημα αν υπάρχει αλληλεπίδραση του μονοπατιού Notch με άλλα ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά στην ουροδόχο κύστη. Χρησιμοποιώντας γενετικά μοντέλα ποντικιού και συνδυάζοντας την απώλεια της σηματοδότησης μέσω Notch με τη μεταλλαγμένη μορφή Kras^{G12D} ή την PI3K^{E545K} ή και τις 3 μαζί, διαπιστώσαμε ότι σε σπάνιες μόνο περιπτώσεις εμφανίστηκε συνεργιστική δράση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η απώλεια του Notch είναι τόσο επιβλαβής για την ουροδόχο κύστη που η ενεργοποίηση άλλων ογκογενετικών μονοπατιών δε δυσχεραίνει περαιτέρω την κατάσταση. Ωστόσο, στο μοντέλο R26rtTA: tetO-Cre. παρατηρήθηκε υδρονέφρωση σε πειραματόζωα ετερόζυγα για την έλλειψη της Nicastrin και ενεργοποιημένο Kras ή/και Pik3ca, γεγονός που υποδεικνύει συνέργεια μεταξύ πολλαπλών γενετικών αλλοιώσεων. Όσον αφορά την ουροδόχο κύστη, δεν παρατηρείται αλλοίωση, παρά μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, πράγμα που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μοντέλο για λόγους που δε γνωρίζουμε (βλ. κεφ.1) δεν είναι κατάλληλο για μελέτες καρκινογένεσης σε αυτό το όργανο. Από την άλλη, αναφορικά με το μοντέλο UpII-Cre, άλλες πιθανές εξηγήσεις αποτελούν το ότι ο αριθμός των πειραματοζώων που εξετάστηκαν δεν ήταν αρκετά μεγάλος καθώς και το ότι ίσως να έχει χαθεί ή μειωθεί η ικανότητα ανασυνδυασμού, όπως αυτή αντανακλάται από το φαινότυπο στο δέρμα. Συνολικά, κλίνουμε προς το ότι η απώλεια του μονοπατιού Notch έχει πολύ δραματικές επιπτώσεις στο ουροθήλιο και δεν εξαρτάται από επιπρόσθετα γενετικά γεγονότα που οδηγούν επίσης στην ενεργοποίηση του μονοπατιού ΜΑΡΚ, υπόθεση στην οποία συνηγορεί και το γεγονός ότι οι μεταλλαγές στο Notch καθώς και το CNL στο NOTCH1 μόνο μερικώς συνυπάρχουν με μεταλλαγές στα FGFR3, RAS και PIK3CA, οι οποίες δεν είναι συχνές στους μυοδιηθητικούς όγκους.

Επιπλέον, δεδομένου ότι οι αλλοιώσεις στο *TP53* αποτελούν χαρακτηριστικό της πλειοψηφίας των μυοδιηθητικών όγκων, χρήζει μελέτης η πιθανή συνεργιστική δράση του μονοπατιού αυτού με το Notch. Στους όγκους ουρητήρα ποντικιού που προέκυψαν λόγω απενεργοποίησης της σηματοδότησης μέσω Notch, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της *Mdm2*, η οποία αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της p53. Επίσης, είναι γνωστό ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του Notch και της p53 στην καταστολή των επιθηλιακών όγκων (Dotto, 2009). Πρώιμα δεδομένα μας από ποντίκια στα οποία λείπει συγχρόνως η p53 και η Nicastrin δεν έδειξαν κάποια συνέργεια που αντανακλάται ως χειροτέρευση του νεοπλασματικού φαινοτύπου, πιθανότατα διότι, όπως προαναφέρθηκε, η απώλεια του μονοπατιού Notch αποτελεί ισχυρό ογκογενετικό γεγονός στην ουροδόχο κύστη. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη διερεύνηση.

Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση που προέκυψε στα πλαίσια της αποσαφήνισης αυτών των ερωτημάτων είναι ότι τα ποντίκια από τα οποία λείπει η p53 ειδικά στο ουροθήλιο εμφανίζουν υπερπλασία/δυσπλασία. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ότι αυτή η γενετική αλλοίωση από μόνη της δεν προκαλεί καμία αλλαγή στην ουροδόχο κύστη, παρά μόνο όταν συνδυάζεται με ενεργοποίηση του Kras οπότε και εμφανίζεται υπερπλασία (Yang et al., 2013). Στη συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε ενδοκυστική έγχυση AdCre και πιθανότατα η διαφορά αυτή οφείλεται σε χαμηλότερο ποσοστό ανασυνδυασμού λόγω μειωμένης πρόσβασης σε εσωτερικές στιβάδες με αυτό τον τρόπο σε σχέση με το UpII-Cre το οποίο έχει ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμό σχεδόν όλων των κυττάρων και στις τρεις στιβάδες του ουροθηλίου. Στα δικά μας μοντέλα, ο συνδυασμός ενεργοποίησης του Kras και απώλειας της p53 οδηγεί στον ίδιο φαινότυπο που παρατηρούμε λόγω απώλειας της p53 και καθώς δε διαφαίνεται κάποια συνέργεια θεωρούμε ότι αυτή η έλλειψη είναι πιο καταστροφική για το ουροθήλιο. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα, η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του Hras και η έλλειψη της p53 σε ποντίκια οδηγεί σε CIS και μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης σε χρονικό διάστημα 6 μηνών και άνω (He et al., 2015), δηλαδή μεγαλύτερο από αυτό που εξετάσαμε εμείς. Συνεπώς, απαιτείται η μελέτη περισσότερων πειραματοζώων και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να καταλήξουμε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Τέλος, δε μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του μονοπατιού Notch με δύο από τα τέσσερα μονοπάτια που εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό αλλοιώσεων σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με το TCGA: τις τροποποιήσεις ιστονών και το σύμπλοκο SWI/SNF. Δεδομένου ότι το ουροθηλιακό καρκίνωμα εμφανίζει το μεγαλύτερο

ποσοστό μεταλλαγών σε επιγενετικούς ρυθμιστές μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, η διερεύνηση αυτής της αλληλεπίδρασης θεωρείται υψίστης σημασίας.

7. Η μεταλλαγή S427 του υποδοχέα RXRa δρα ως επικρατής αρνητική μορφή σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Η μεγάλης κλίμακας μελέτη που διενέργησε το TCGA αναφορικά με το «μοριακό τοπίο» του μυοδιηθητικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης ταυτοποίησε μία νέα μεταλλαγή «θερμού σημείου» στη θέση S427 του γονιδίου του υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος RXRa στο 5% των ασθενών. Εντύπωση προκαλεί το ότι ενώ αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή μεταλλαγή «θερμού σημείου»—μετά από τη μεταλλαγή E545K του γονιδίου *PIK3CA* με συχνότητα 10%—που έχει αναφερθεί στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, καμία πληροφορία δεν είναι διαθέσιμη σχετικά με το ρόλο του συγκεκριμένου γονιδίου στον ουροθηλιακό καρκίνο.

Σύμφωνα με ανάλυση μεταγραφώματος από το TCGA, οι συγκεκριμένοι όγκοι εμφάνιζαν αυξημένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη λιπογένεση και στο μεταβολισμό των λιπιδίων κι έτσι προτάθηκε ότι η μεταλλαγή αυτή προκαλεί συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα. Για να χαρακτηρίσουμε τη μεταλλαγή S427F του *RXRA* ακολουθήσαμε τόσο *in vitro* όσο και *in silico* προσεγγίσεις, οι οποίες συνέκλιναν στο ότι η μεταλλαγή αυτή οδηγεί σε μία επικρατή αρνητική μορφή. Συγκεκριμένα, η αμινοξική αντικατάσταση (S→F) οδηγεί σε μείωση του όγκου που καταλαμβάνει ο προσδέτης με αποτέλεσμα να μην είναι επιτρεπτή η δέσμευσή του. Δεδομένου ότι ο μεταλλαγμένος υποδοχέας σχηματίζει ετεροδιμερή φυσιολογικά, καταλαμβάνει άλλους υποδοχείς και θέσεις πρόσδεσης σε RXREs στο DNA χωρίς όμως να έχει τη δυνατότητα ρύθμισης από προσδέτη, συνεπώς δρα μονίμως ως καταστολέας της μεταγραφής. Εικάζουμε ότι το ίδιο ισχύει και για την εναλλακτική αντικατάσταση σε Y, καθώς η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη παρουσιάζουν παρόμοιο μέγεθος και ιδιότητες.

Η μεταλλαγή στη θέση S427 του RXRA ταυτοποιήθηκε επίσης σε ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, σάρκωμα και αδενο-καρκίνωμα του παχέος εντέρου, γεγονός που υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη λειτουργία του υποδοχέα RXRa. Ενώ στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πληθώρα περιπτώσεων μεταλλαξιγένεσης στον υποδοχέα RXRa που οδηγεί σε όλα τα πιθανά αποτελέσματα στη λειτουργία του, τίποτα δεν είναι γνωστό για μεταλλαγές στο αμινοξικό κατάλοιπο S427. Γνωρίζουμε ότι η απαλοιφή των καταλοίπων 413-443 οδηγεί σε έναν υποδοχέα που διατηρεί την ικανότητα ετεροδιμερισμού αλλά εμφανίζει μειωμένη μεταγραφική ενεργοποίηση (Zhang et al., 1994). Ωστόσο, κάθε κατάλοιπο συμμετέχει σε ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων και ακόμα και κοντινά αμινοξέα ή ακόμα και διαφορετική αντικατάσταση στην ίδια θέση μπορεί να έχει διαφορετική συνέπεια στη λειτουργία του υποδοχέα. Για παράδειγμα, η μεταλλαγή L430F δημιουργεί έναν υποδοχέα τα ομοδιμερή του οποίου δεσμεύονται ισχυρά στο DNA με τρόπο ανεξάρτητο από προσδέτη, ενώ η L422Q οδηγεί σε μία μορφή στην οποία πραγματοποιείται ομοδιμερισμός απουσία προσδέτη ο οποίος αναστέλλεται από το 9-*cis* RA.

Διαπιστώσαμε τον κρίσιμο ρόλο του S427 και έπειτα από δυναμική ανάλυση δικτύου η οποία έδειξε ότι η μεταλλαγή S427F εξασθενεί την επικοινωνία του μονοπατιού σηματοδότησης P423 \rightarrow R426/L425 \rightarrow W305 το οποίο συμμετέχει στην επικοινωνία της θέσης πρόσδεσης στο ετεροδιμερές RXRa/RARa. Πρόσφατα, μία μελέτη αποκάλυψε το δομικό μηχανισμό μεταγωγής σήματος από ετεροδιμερή στα οποία συμμετέχει ο RXR και μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων που διαμεσολαβούν αυτή τη δράση και συνιστούν ένα εξελικτικά συντηρημένο δίκτυο τοποθετήθηκε και το S427 (Kojetin et al., 2015) [Εικόνα 13]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι το κατάλοιπο S427 παίζει κρίσιμο ρόλο στον ετεροδιμερισμό του RXRα με τον PPARα (Venäläinen et al., 2010).

Τα μελλοντικά πειράματα αφορούν μελέτη της ικανότητας της μεταλλαγμένης μορφής του RXRα να σχηματίζει ετεροδιμερή—μέσω ανοσοκατακρήμνισης (Immunoprecipitation, IP)—και να προσδένεται στο DNA καθώς και ανάλυση της επίδρασης που έχει στη μεταγραφή μέσω ChIP ή ChIP-Seq.



Εικόνα 13: Δομή της επιφάνειας ετεροδιμερισμού των RXRa/PPARγ όπως προκύπτει από δεδομένα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR). Δίνεται έμφαση στα κατάλοιπα της έλικας 7 (κίτρινο) και 10/11 (μπλε) του RXRα τα οποία επηρεάζονται από τη δέσμευση προσδέτη στον PPARγ (Kojetin et al., 2015).

8. Η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος οδηγεί στην ανάπτυξη πλακώδους μεταπλασίας στην ουροδόχο κύστη ποντικιών

Το επόμενο ερώτημα που μας απασχόλησε ήταν ο ρόλος της σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος στον καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος, καθώς πλέον έχει συσσωρευθεί πλήθος δεδομένων που υποδεικνύουν τη συμμετοχή του στην ογκοκαταστολή στο ουροθήλιο. Η πλακώδης μεταπλασία συνήθως εξελίσσεται σε πλακώδες καρκίνωμα το οποίο αποτελεί ένα σπάνιο και επιθετικό τύπου καρκίνου της ουροδόχου κύστης ο οποίος απαντάται στο 5% των ασθενών με όγκους στο ουροποιητικό σύστημα. Έχει συνδεθεί κυρίως με τη χρόνια φλεγμονή, που είναι πολύ συχνή στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω σχιστοσωμίασης, και με την έλλειψη βιταμίνης Α. Είναι γνωστό εδώ και πάρα πολλά χρόνια ότι δίαιτα φτωχή σε βιταμίνη Α-η οποία αποτελεί πρόδρομο του ρετινοϊκού οξέος---οδηγεί σε πλακώδη μεταπλασία στην ουροδόχο κύστη ποντικιών (Molloy & Laskin, 1988) καθώς και το ότι ποντίκια που στερούνται βιταμίνης Α αναπτύσσουν γρηγορότερα ουροθηλιακούς όγκους κατά τη χημική καρκινογένεση (Cohen et al., 1976). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η χορήγηση ρετινοϊκού οξέος καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών ουροθηλιακών σειρών (Clifford et al., 2001). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την αναγέννηση της ουροδόχου κύστης (Gandhi et al., 2013). Τέλος, η ταυτοποίηση μεταλλαγών στον υποδοχέα του RXRα και συγκεκριμένα μιας μεταλλαγής «θερμού σημείου» την οποία χαρακτηρίσαμε ως επικρατή αρνητική, καθώς και της απώλειας αριθμού αντιγράφων του RXRA σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης φανέρωσε την κλινική σημασία του μονοπατιού (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι το γονίδιο RXRA εδράζεται στο γρωμόσωμα 9 (9q34.2), το οποίο εμφανίζει LOH στο 50% των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Διαπιστώσαμε ότι ποντίκια από τα οποία λείπει ο υποδοχέας RXRα εμφανίζουν πλακώδη μεταπλασία έπειτα από 2-4 μήνες χημικής καρκινογένεσης με BBN. Δηλαδή, ουσιαστικά είδαμε τον ίδιο φαινότυπο που προκαλείται από την έλλειψη βιταμίνης Α. Η στροφή προς το φαινότυπο της πλακώδους μεταπλασίας σε χρονικό διάστημα στο οποίο τα ποντίκια φυσικού τύπου εμφανίζουν συνήθως υπερπλασία/δυσπλασία πιθανότατα αντανακλά το ρόλο του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος στη διαφοροποίηση του ουροθηλίου, πεδίο που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Στο χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματά μας παρατηρήσαμε ανάπτυξη προνεοπλασματικών αλλοιώσεων. Από την άλλη, χορήγηση BBN για 6 μήνες είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυρίως διηθητικών πλακωδών καρκινωμάτων τόσο στα ζώα φυσικού τύπου όσο και σε αυτά από τα οποία λείπει ο υποδοχέας RXRa. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με το ότι το χρονικό διάστημα έκθεσης στο καρκινογόνο είναι τόσο μεγάλο που αναπτύσσονται όγκοι σε όλα τα ζώα συνεπώς δεν είναι το κατάλληλο για την εξαγωγή συμπερασμάτων αλλά και με το ότι πιθανώς και σε αυτό το μοντέλο η έκφραση του RXRa να χάνεται—όπως συμβαίνει και στον ανθρώπινο καρκίνο—με αποτέλεσμα καμία από τις δύο ομάδες πειραματοζώων να μην είναι πλέον φυσικού τύπου για τον RXRa.

Για να χαρακτηριστεί το γονίδιο *Rxra* ως ογκοκατασταλτικό *per se* θα έπρεπε η έλλειψή του να οδηγούσε σε καρκινογένεση. Καθώς δεν παρατηρήσαμε νεοπλασματικό φαινότυπο σε ποντίκια μέχρι και ενός έτους από τα οποία έλειπε ο RXRa, παρά μόνο κατά τη χημική καρκινογένεση, υποθέτουμε ότι η απώλεια του μονοπατιού σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος δρα συνεργιστικά με αλλά σηματοδοτικά μονοπάτια ευνοώντας την καρκινογένεση, Αξίζει να σημειωθεί ότι η απώλεια του RXRa οδηγεί στην ανάπτυξη προνεοπλασματικών αλλοιώσεων του προστάτη σε ποντίκια (Huang et al., 2002). Επιπλέον, ούτε η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής S427F του υποδοχέα RXRa ούτε η απαλοιφή του RXRa σε καρκινικές ουροθηλιακές κυτταρικές σειρές ανθρώπου και ποντικιού δεν οδήγησαν σε καταστολή του πολλαπλασιασμού ή της ικανότητας δημιουργίας αποικιών. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στο ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν συσσωρεύσει πλήθος αλλοιώσεων και έχουν απωλέσει πλέον την ικανότητα ρύθμισης από το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στην υπόθεση ότι η απώλεια της σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος δεν αποτελεί γεγονός που οδηγεί σε καρκινογένεση, αστόσο ενισχύει την ογκογενετική διαδικασία.

Γνωρίζουμε ότι τα CK5⁺ κύτταρα της βασικής στιβάδας αποτελούν τα κύτταρα από τα οποία ξεκινούν ουροθηλιακά και πλακώδη καρκινώματα (van Batavia et al., 2014). Τα πλακώδη καρκινώματα συσχετίζονται με χρόνιες ενοχλήσεις λόγω καθετήρων ή άλλου τύπου βλάβης που επηρεάζει τον ουροθηλιακό φραγμό και οδηγεί σε φλεγμονή και επαγωγή αποκρίσεων φυσικής ανοσίας. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η σχιστοσωμίαση επάγει επίσης χρόνια φλεγμονή με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης δομικών γονιδίων απαραίτητων για την ακεραιότητα του ουροθηλίου και την επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης τύπου 2 (Ray et al., 2012). Το γεγονός ότι στα ποντίκια φυσικού τύπου εμφανίζεται κυρίως ουροθηλιακή υπερπλασία/δυσπλασία, ενώ σε αυτά από τα οποία λείπει ο RXRα πλακώδης μεταπλασία μπορεί να οφείλεται σε ρόλο του RXRα στη διαφοροποίηση ή στην απόκριση σε φλεγμονή. Αξίζει να σημειώθεί ότι ποντίκια με απαλοιφή του *Rxra* στην επιδερμίδα εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα σχηματισμού θηλωμάτων τα οποία εξελίσσονται γρήγορα σε πλακώδη, ακανθώδη και βασικοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος (Altucci & Gronemeyer, 2001).

Μία ενδιαφέρουσα μελέτη των μοριακών τύπων του καρκίνου της ουροδόχου κύστης έδειξε ότι οι ουροβασικοί (Urobasal) όγκοι διατηρούν τον άξονα ουροθηλιακής διαφοροποίησης που αποτελείται από τους PPARG/RXRA, FOXA1/GATA3, HOXA και HOXB. Από την άλλη, οι τύπου πλακώδους όγκοι (SCCL) εμφανίζουν αναστολή της διαφοροποίησης μέσω μείωσης της έκφρασης των *PPARG/RXRA* και *FOXA1/GATA3* (Eriksson et al., 2015). Σε αυτό το σημείο, πρέπει να αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα PPARγ καταστέλλει την αύξηση των ουροθηλιακών κυττάρων (Kawakami et al., 2002) και ότι η έκφρασή του χάνεται στον καρκίνο και η απώλεια αυτή σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Mylona et al., 2009). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η σηματοδότηση μέσω PPARγ-RXRα ευνοεί τη διαφοροποίηση προς CK20⁺ κύτταρα, ενώ η αναστολή της οδηγεί στην εμφάνιση CK14⁺ πλακώδους μεταπλασίας (Varley et al., 2004), μελέτη που βρίσκεται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις μας.

Διάφορα μοντέλα σχετικά με τους κυτταρικούς μηχανισμούς ανάπτυξης πλακώδους καρκινώματος λόγω έλλειψης βιταμίνης Α έχουν αναφερθεί και η διαλεύκανσή τους αποτελεί προτεραιότητα (Εικόνα 14). Δεδομένου ότι δεν έχουν ανιχνευθεί κύτταρα της ενδιάμεσης στιβάδας που να εκφράζουν τόσο ουροθηλιακούς όσο και κερατινοποιητικούς δείκτες, το ενδεχόμενο *trans*-διαφοροποίησης ή αποδιαφοροποίησης και επαναδιαφοροποίησης των επιφανειακών κυττάρων δε μοιάζει πιθανό. Μία άλλη πιθανότητα είναι τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα του ουροθηλίου να δίνουν γένεση σε διαφορετικό τύπο διαφοροποιημένων κυττάρων σε κατάσταση φλεγμονής. Έδαφος κερδίζει τελευταία το μοντέλο που υποστηρίζει ότι ο υποπληθυσμός των CK14⁺ κυττάρων της βασικής στιβάδας, τα οποία παραμένουν αδρανή σε συνθήκες ομοιόστασης, ενεργοποιείται επιλεκτικά κατά την έλλειψη βιταμίνης Α και δημιουργεί κερατινοποιητικές εστίες οι οποίες συνενώνονται και εξαπλώνονται. Επίσης, υποστηρίζεται ότι η πλακώδης μεταπλασία ξεκινάει από την περιοχή της εγγύς ουρήθρας και του τριγώνου της ουροδόχου κύστης και στη συνέχεια εξαπλώνεται στην υπόλοιπη ουροδόχο κύστη (Liang et al., 2005).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών μηχανισμών ανάπτυξης πλακώδους μεταπλασίας στο ουροθήλιο του ποντικιού που επάγεται από έλλειψη βιταμίνης Α. α) Μοντέλο trans-διαφοροποίησης: Ένα τελικώς διαφοροποιημένο κύτταρο (terminally differentiated cell [DC, τετράγωνο]) μπορεί να μετασχηματιστεί απευθείας σε ένα διαφορετικό τύπο τελικώς διαφοροποιημένο κύτταρο μπορεί να αποδιαφοροποίησης και επαναδιαφοροποίησης: Ένα τελικώς διαφοροποιημένο κύτταρο φηροποίησης: Ένα τελικώς διαφοροποιημένο κύτταρο (terminally differentiated cell [DC, τετράγωνο]) μπορεί να μετασχηματιστεί απευθείας σε ένα διαφορετικό τύπο τελικώς διαφοροποιημένο κύτταρο μπορεί να επανέλθει σε αδιαφοροποίησης και επαναδιαφοροποίησης: Ένα τελικώς διαφοροποιημένο κύτταρο μπορεί να επανέλθει σε αδιαφοροποίητο ή βλαστικό κύτταρο (stem cell, SC), το οποίο στη συνέχεια μπορεί να διαφοροποιηθεί προς άλλη γενεαλογία δίνοντας ένα διακριτό φαινότυπο ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ή μεσεγχυματικά σήματα (πορτοκαλί), γ) Μοντέλο του πολυδύναμου βλαστικού κυττάρου: υπό κανονικές συνθήκες, τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα δίνουν γένεση σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα ενός

συγκεκριμένου φαινοτύπου. Ωστόσο, μεσεγχυματικές αλλαγές μπορεί να επάγουν ένα εναλλακτικό μονοπάτι διαφοροποίησης στο βλαστικό κύτταρο, δ) Μοντέλο επιλεκτικής εξάπλωσης: Ο ιστός περιέχει δύο ξεχωριστούς πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων: ο ένας από αυτούς (κίτρινο) κανονικά δίνει γένεση στον κύριο φαινότυπο, ενώ ο άλλος παραμένει αδρανής. Μεσεγχυματικές ή/και περιβαλλοντικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στο μικροπεριβάλλον των βλαστικών κυττάρων, καταστέλλουν την αύξηση και τη διαφοροποίηση του κυρίαρχου πληθυσμού βλαστικών κυττάρων αδρανή πληθυσμό βλαστικών κυττάρων (κόκκινο) ο οποίος δίνει γένεση σε ένα διαφορετικό φαινότυπο, ε) Μοντέλο εξάπλωσης και αντικαταστάσης: Ο ιστός περιέχει δύο ξεχωριστος πληθυσμό βλαστικών κυττάρων που κυρίαρχου πληθυσμού βλαστικών κυττάρων των αλαγών το μέχρι πρότινος αδρανή πληθυσμό βλαστικών κυττάρων (κόκκινο) ο οποίος δίνει γένεση σε ένα διαφορετικό φαινότυπο, ε) Μοντέλο εξάπλωσης και αντικαταστάσης: Ο ιστός περιέχει δύο ξεχωριστές κυτταρικές γενεαλογίες που καταλαμβάνουν διαφορετικές περιοχές οι οποίες χωρίζονται από διακριτά όρια. Μεσεγχυματικές ή/και περιβαλλοντικές αλλαγές, όπως η έλλειψη βιταμίνης Α, ευνοούν την εξάπλωση της μίας κυτταρικής γενεαλογίας σε σχέση με την άλλη επιτρέποντας συνεπώς στον έναν κυτταρικό τύπο να εξαπλωθεί και να εισβάλλει στην περιοχή του άλλου (Liang et al., 2005).

Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι στους τύπους καρκίνου όπου απαντάται η μεταλλαγή στη θέση S427 (ουροδόχος κύστη, πάγκρεας, ήπαρ) πλήθος μελετών έχει δείξει ότι η χορήγηση ρετινοϊκού οξέος οδηγεί σε καταστολή του πολλαπλασιασμού *in vitro* (Laaksovirta et al., 1999, Balasubramanian et al., 2004), δεδομένα που συγκλίνουν σε ογκοκατασταλτικό ρόλο της σηματοδότησης μέσω ρετινοϊκού οξέος στους συγκεκριμένους ιστούς. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι τα ρετινοειδή είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη και την αναγέννηση στους προαναφερθέντες ιστούς. Συγκεκριμένα, η σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος αυξάνεται κατά την αναγέννηση ενώ μειώνεται στον καρκίνο (Colvin et al., 2011, Zou et al., 2001, Costantini et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρόλος των ρετινοειδών στην αναστολή της καρκινογένεσης σε μοντέλα χημικής καρκινογένεσης έχει δειχθεί επίσης στο δέρμα (Leder et al., 1990) και στο μαστό (Anzano et al., 1994) και ο μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης του που έχει προταθεί αφορά στην καταστολή του ΑΡ1 (Huang et al., 1997). Όπως είναι αναμενόμενο, οι άμεσοι μελλοντικοί μας στόχοι αφορούν την αποσαφήνιση του μηχανισμού ογκοκαταστολής μέσω RXRα στο ουροποιητικό σύστημα, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω αλληλούχησης RNA (RNA-Seq).

9. Το μονοπάτι Notch ρυθμίζει το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος στο ουροθήλιο

Οπως προαναφέρθηκε, τα ποντίκια από τα οποία λείπει ο υποδοχέας Notch1 ή Notch2 εμφανίζουν κερατινοποιητική πλακώδη μεταπλασία κατά τη χημική καρκινογένεση με BBN, φαινότυπος που εμφανίζεται και στα πειραματόζωα από τα οποία λείπει ο υποδοχέας RXRa στο ίδιο μοντέλο. Επιπρόσθετα, οι μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος που ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης τείνουν να είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες με τις μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού Notch σύμφωνα με ανάλυση δεδομένων της μελέτης του TCGA όπως παρουσιάζονται μέσω της πλατφόρμας cBioPortal (**Εικόνα 15**). Τέλος, συνδυάζοντας τη γνώση για το ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στη διαφοροποίηση του ουροθηλίου (Gandhi et al., 2013) και τα ευρήματά μας σχετικά με το ρόλο του μονοπατιού Notch στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού στον ίδιο ιστό, προκύπτει το ερώτημα ποια η σχέση μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών στην ομοιόσταση και την καρκινογένεση της ουροδόχου κύστης.

Πειράματα ChIP-seq του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα Notch1 προσδένεται στον υποκινητή του RXRA σε ανθρώπινα ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς, το RXRA αποτελεί στόχο του μονοπατιού Notch και διαμεσολαβεί μέρος της δράσης του στην ουροδόχο κύστη. Δεδομένου ότι η απώλεια της ενεργότητας του μονοπατιού Notch έχει πιο δραματικές επιπτώσεις για το ουροθήλιο από ό,τι η ενεργοποίηση του Fgfr3 ή του Ras είχαμε υποθέσει ότι πέρα από τον περιορισμό του μονοπατιού MAPK μέσω ρύθμισης των DUSPs το Notch ασκεί επιπλέον δράσεις ανεξάρτητες από την Erk1/2 οι οποίες προωθούν την ογκογένεση. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος από τη σηματοδότηση Νotch έρχεται να συμπληρώσει τις γνώσεις μας σχετικά με τους μηχανισμούς ογκοκαταστολής του Notch. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται άμεση σύνδεση των δύο μονοπατιών με το RA να βρίσκεται καταρροϊκά του Notch. Αντίστροφα, έχει δειχθεί ότι το μονοπάτιξη των δενδριτικών κυττάρων στον σπλήνα (Beijer et al., 2013), την ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων του δοντιού (Mitsiadis et al., 1995) και τη διαφοροποίηση κυττάρων γλοιοβλαστώματος (Ying et al., 2011).


Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών σε βασικά συστατικά του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος (υποδοχείς RAR και RXR) και του μονοπατιού Notch (υποδοχείς, υπομονάδες της γ-σεκρετάσης και μεταγραφικός συνενεργοποιητής MAML1) που ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με τη μελέτη του TCGA το 2014. Το γονίδιο *PSENEN* παραλείφθηκε λόγω χώρου κι επιπλέον λόγω του ότι δεν ταυτοποιήθηκε καμία μεταλλαγή σε αυτό. Αναγράφεται το ποσοστό των μεταλλαγών για κάθε γονίδιο καθώς και ο τύπος της μεταλλαγής: μεταλλαγή που οδηγεί σε κομμένη μορφή (μαύρο), παρανοηματική μεταλλαγή που πιθανώς οδηγεί σε καρκίνο (πράσινο σκούρο), παρανοηματική μεταλλαγή που πιθανώς οδηγεί σε καρκίνο (πράσινο σκούρο), παρανοηματική μεταλλαγή που πιθανώς ανοιχτό). Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε έναν ασθενή. Απεικονίζονται μόνο οι ασθενείς στους οποίους βρέθηκαν μεταλλαγές στα υπό μελέτη γονίδια [δεδομένα από την πλατφόρμα cBioPortal (Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013)].

Επιπλέον, είδαμε ότι οι πρωτεΐνες RBPP5 και WDR5, που αποτελούν συστατικά του συμπλέγματος που προσομοιάζει στο COMPASS (COMPASS-like complex), το οποίο έχει δραστικότητα μεθυλοτρανσφεράσης μεσολαβούμενη από την MLL3 ή την MLL4, προσδένονται στον υποκινητή του RXRA καθώς και ότι η έκφραση του RXRA μειώνεται έπειτα από απώλεια της

MLL3. Φαίνεται λοιπόν ότι η MLL3 αποτελεί κρίσιμο ρυθμιστή της μεταγραφικής ενεργότητας του RXRA, πιθανότατα συμμετέχοντας σε συμπλέγματα που περιλαμβάνουν το Notch. Αξίζει να σημειωθεί ότι ποντίκια από τα οποία λείπει η MLL3 εμφανίζουν όγκους στον ουρητήρα, που προσομοιάζουν στους όγκους ουρητήρα που αναπτύσσονται έπειτα από απαλοιφή της Nicastrin, υποδεικνύοντας ότι ο φαινότυπος αυτός πιθανώς αντανακλά απώλεια ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch. Πρόσφατα, περιγράφηκε η συμμετοχή της MLL3 σε μεταγραφικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν το Notch1 (Ntziachristos et al., 2014b) [Εικόνα 16] και ο κρίσιμος ρόλος της ειδικότερα στην ουροδόχο κύστη υποστηρίζεται από δεδομένα του εργαστηρίου (Rampias et al., υπό αξιολόγηση). Επίσης, έχει δειχθεί ότι ενεργοποιητικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν την MLL2 ανταγωνίζονται με κατασταλτικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν την NCoR στα γονίδιαστόχους του Notch (Oswald et al., 2016). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι το σύμπλοκο που προσομοιάζει στο COMPASS αλληλεπιδρά άμεσα με ετεροδιμερή RXRα-PPARy (Lee et al., 2008). Τέλος, έχει δειχθεί ότι κατά τη σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση είναι η στρατολόγηση του συμπλόκου που προσομοιάζει στο COMPASS και περιλαμβάνει τις MLL3/4 (Lee et al., 2006) καθώς και η μεθυλίωση της H3K4 μέσω MLL2/3 και η απομεθυλίωση της H3K27 από την UTX (Lee et al., 2007).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του ενεργοποιητικού μεταγραφικού συμπλόκου που περιλαμβάνει το NOTCH1 και την MLL στον υποκινητή γονιδίου-στόχου. Μετά την πρόσδεση του NOTCH1 και του συνενεργοποιητή MAML1, τα γονίδια-στόχοι ενεργοποιούνται μέσω στρατολόγησης της JMJD3 και του συμπλόκου της MLL και ταυτόχρονης απομάκρυνσης της PRC2 με αποτέλεσμα την απομεθυλίωση της H3K27me3 και τη μεθυλίωση της H3K4me3 (Ntziachristos et al., 2014b).

10. Θεραπευτικές προοπτικές

Η ταυτοποίηση ενός μονοπατιού που παίζει προεξέχοντα ρόλο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης μπορεί να αποτελέσει τη βάση για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις σε έναν τύπο καρκίνου του οποίου η αντιμετώπιση δεν έχει προοδεύσει σημαντικά εδώ και δεκαετίες και παραμένει θανατηφόρος. Παρόλο που πολλές στρατηγικές αναστολής της σηματοδότησης μέσω Notch είναι διαθέσιμες σήμερα, δεν ισχύει το ίδιο και για την ενεργοποίηση του μονοπατιού που είναι το ζητούμενο στην προκειμένη. Επιπλέον, καθώς το μονοπάτι Notch δρα τόσο ογκογενετικά όσο και ογκοκατασταλτικά ακόμα και μέσα στον ίδιο ιστό και είναι πλέον ολοφάνερο ότι εξαρτάται σημαντικά από το περιβάλλον, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη εξαιρετικά στοχευμένων θεραπευτικών σχημάτων για την αποφυγή παρενεργειών. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του μονοπατιού Notch που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η ευαισθησία στη δόση (Mazzone et al., 2010). Δηλαδή, υπάρχει πιθανότητα τόσο η υπερενεργοποίηση όσο και η καταστολή του μονοπατιού να οδηγούν σε καρκινογένεση.

Κατ' αρχάς, δείξαμε ότι η κατάσταση ενεργοποίησης του μονοπατιού μέσω ανάλυσης των επιπέδων κλασικών του στόχων προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση της πορείας ενός ασθενούς και συνεπώς η κλινική εφαρμογή της θα μπορούσε να αποβεί ωφέλιμη. Επιπλέον, χρήσιμη θα ήταν η ανάλυση για μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού Notch καθώς και για την επιγενετική κατάστασή του, έτσι ώστε να γνωρίζουμε ποιο θεραπευτικό σχήμα θα ωφελήσει τον κάθε ασθενή προσωπικά. Ειδικότερα, σε περιπτώσεις επιγενετικής αποσιώπησης του μονοπατιού, η χορήγηση επιγενετικών φαρμάκων, τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα και επιδεικνύουν ευεργετικά αποτελέσματα σε πλήθος καρκίνων, θα ήταν χρήσιμη.

Συνολικά, πλέον έχουμε πληροφορίες ή υποδείξεις για πληθώρα μηχανισμών μέσω των οποίων το μονοπάτι Notch παίζει ρόλο στην ομοιόσταση και την καρκινογένεση στο ουροποιητικό σύστημα, όπως είναι η καταστολή του μονοπατιού MAPK, η ενεργοποίηση του μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος, η καταστολή της *trans*-διαφοροποίησης σε κερατινοποιημένα κύτταρα που προσομοιάζουν στα πλακώδη κύτταρα του δέρματος, η καταστολή της επιθηλιακήςμεσεγχυματικής μετάβασης, η επαγωγή διαφοροποίησης και η καταστολή του πολλαπλασιασμού/ της αυτο-ανανέωσης καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Όλη αυτή η γνώση σε συνδυασμό με περαιτέρω έρευνα για τη λεπτομερή διασαφήνιση όλων αυτών των κυτταρικών μηχανισμών παράδειγμα, πολλές σύγχρονες στοχευμένες αντικαρκινικές θεραπείες αναστέλλουν κινάσες υποδοχέων τυροσίνης αναρροϊκά της ERK, αλλά στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν επιδείξει μικρή αποτελεσματικότητα. Μία πιθανή αιτιολογία μπορεί να αποτελεί η απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch που αναιρεί την εξάρτηση της ενεργότητας της ERK από αναρροϊκά σήματα. Η εξάρτηση των όγκων που παρουσιάζουν απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch και αναστολέων απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch και αναστολέων ΜΕΚ. Επιπλέον, η χορήγηση ρετινοειδών είναι αναμενόμενο να μη φέρει κάποιο αποτέλεσμα σε ασθενείς με τη μεταλλαγή «θερμού σημείου» S427F/Y στον υποδοχέα RXRα, καθώς και με επιγενετική αποσιώπηση του μονοπατιού.

Εν κατακλείδι, με την ερευνητική αυτή εργασία αποδείξαμε τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch στο ουροποιητικό σύστημα και αποσαφηνίσαμε τους μοριακούς μηχανισμούς που τον διέπουν τόσο *in vitro* σε ανθρώπινα καρκινικά ουροθηλιακά κύτταρα όσο και *in vivo* σε μοντέλα ποντικιού. Τα ευρήματα αυτά καθώς και οι σημαντικές πληροφορίες που αποκομίσαμε από τις εμπεριστατωμένες μελέτες μεγάλης κλίμακας σχετικά με το μοριακό υπόβαθρο του ουροθηλιακού καρκίνου αποτελούν σημαντική πρόοδο για τη διαλεύκανση της αιτιολογίας της ασθένειας, αναζωπυρώνουν το ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα στο πεδίο και ανοίγουν το δρόμο για την ανάπτυξη καινοτόμων στοχευμένων θεραπειών με απώτερο στόχο την αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdou AG, El-Wahed MM, Kandil MA, Samaka RM, Elkady N. Immunohistochemical analysis of the role and relationship between Notch-1 and Oct-4 expression in urinary bladder carcinoma. APMIS. 2013 Oct;121(10):982-96.

Abu-Abed SS, Beckett BR, Chiba H, Chithalen JV, Jones G, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. J Biol Chem. 1998 Jan 23;273(4):2409-15.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010 Apr;7(4):248-9.

Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Treviño L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. Science. 2011 Aug 26;333(6046):1154-7.

Ahmad I, Singh LB, Foth M, Morris CA, Taketo MM, Wu XR, Leung HY, Sansom OJ, Iwata T. K-Ras and β -catenin mutations cooperate with Fgfr3 mutations in mice to promote tumorigenesis in the skin and lung, but not in the bladder. Dis Model Mech. 2011 Jul;4(4):548-55.

Al-Ahmadie HA, Iyer G, Lee BH, Scott SN, Mehra R, Bagrodia A, Jordan EJ, Gao SP, Ramirez R, Cha EK, Desai NB, Zabor EC, Ostrovnaya I, Gopalan A, Chen YB, Fine SW, Tickoo SK, Gandhi A, Hreiki J, Viale A, Arcila ME, Dalbagni G, Rosenberg JE, Bochner BH, Bajorin DF, Berger MF, Reuter VE, Taylor BS, Solit DB. Frequent somatic CDH1 loss-of-function mutations in plasmacytoid variant bladder cancer. Nat Genet. 2016 Apr;48(4):356-8.

Alcolea MP, Greulich P, Wabik A, Frede J, Simons BD, Jones PH. Differentiation imbalance in single oesophageal progenitor cells causes clonal immortalization and field change. Nat Cell Biol. 2014 Jun;16(6):615-22.

Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. Nat Rev Cancer. 2001 Dec;1(3):181-93.

Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. Nat Rev Drug Discov. 2007 Oct;6(10):793-810.

Anzano MA, Byers SW, Smith JM, Peer CW, Mullen LT, Brown CC, Roberts AB, Sporn MB. Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. Cancer Res. 1994 Sep 1;54(17):4614-7.

Arrieta O, González-De la Rosa CH, Aréchaga-Ocampo E, Villanueva-Rodríguez G, Cerón-Lizárraga TL, Martínez-Barrera L, Vázquez-Manríquez ME, Ríos-Trejo MA, Alvarez-Avitia MA, Hernández-Pedro N, Rojas-Marín C, De la Garza J. Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2010 Jul 20;28(21):3463-71

Balasubramanian S, Chandraratna RA, Eckert RL. Suppression of human pancreatic cancer cell proliferation by AGN194204, an RXR-selective retinoid. Carcinogenesis. 2004 Aug;25(8):1377-85.

Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. Nature. 2009 Jan 29;457(7229):608-11.

Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. Gene. 2004 Mar 17;328:1-16.

Baumgart A, Mazur PK, Anton M, Rudelius M, Schwamborn K, Feuchtinger A, Behnke K, Walch A, Braren R, Peschel C, Duyster J, Siveke JT, Dechow T. Opposing role of Notch1 and Notch2 in a Kras(G12D)-driven murine non-small cell lung cancer model. Oncogene. 2015 Jan 29;34(5):578-88.

Bayha E, Jørgensen MC, Serup P, Grapin-Botton A. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. PLoS One. 2009 Jun 10;4(6):e5845.

Becci PJ, Thompson HJ, Grubbs CJ, Squire RA, Brown CC, Sporn MB, Moon RC. Inhibitory effect of 13-cis-retinoic acid on urinary bladder carcinogenesis induced in C57BL/6 mice by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. Cancer Res. 1978 Dec;38(12):4463-6.

Beijer MR, Molenaar R, Goverse G, Mebius RE, Kraal G, den Haan JM. A crucial role for retinoic acid in the development of Notch-dependent murine splenic CD8- CD4- and CD4+ dendritic cells. Eur J Immunol. 2013 Jun;43(6):1608-16.

Bonanni B, Lazzeroni M. Retinoids and breast cancer prevention. Recent Results Cancer Res. 2009;181:77-82.

Boorjian S, Scherr DS, Mongan NP, Zhuang Y, Nanus DM, Gudas LJ. Retinoid receptor mRNA expression profiles in human bladder cancer specimens. Int J Oncol. 2005 Apr;26(4):1041-8.

Bray S, Bernard F. Notch targets and their regulation. Curr Top Dev Biol. 2010;92:253-75.

Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrinmetalloprotease TACE. Mol Cell. 2000 Feb;5(2):207-16.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. Nature. 2014 Mar 20;507(7492):315-22.

Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. Urol Oncol. 2010 Jul-Aug;28(4):401-8.

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov. 2012 May;2(5):401-4.

Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti J Jr, Chang HY, van de Rijn M, Shortliffe L, Weissman IL. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 18;106(33):14016-21.

Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. Clin Cancer Res. 2002 Feb;8(2):464-70.

Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandoth C, Gao J, Socci ND, Solit DB, Olshen AB, Schultz N, Taylor BS. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. Nat Biotechnol. 2016 Feb;34(2):155-63.

Chen J, Kubalak SW, Chien KR. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. Development. 1998 May;125(10):1943-9.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature. 2005 Aug 4;436(7051):725-30.

Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CP, McConkey DJ. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. Cancer Cell. 2014 Feb 10;25(2):152-65.

Clifford JL, Sabichi AL, Zou C, Yang X, Steele VE, Kelloff GJ, Lotan R, Lippman SM. Effects of novel phenylretinamides on cell growth and apoptosis in bladder cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Apr;10(4):391-5.

Cohen SM, Wittenberg JF, Bryan GT. Effect of avitaminosis A and hypervitaminosis A on urinary bladder carcinogenicity of N-(4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formamide. Cancer Res. 1976 Jul;36(7 PT 1):2334-9.

Colvin EK, Susanto JM, Kench JG, Ong VN, Mawson A, Pinese M, Chang DK, Rooman I, O'Toole SA, Segara D, Musgrove EA, Sutherland RL, Apte MV, Scarlett CJ, Biankin AV. Retinoid signaling in pancreatic cancer, injury and regeneration. PLoS One. 2011;6(12):e29075.

Connolly RM, Nguyen NK, Sukumar S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. Clin Cancer Res. 2013 Apr 1;19(7):1651-9.

Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. Scand J Urol Nephrol Suppl. 2008 Sep;(218):154-65.

Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. Gene. 2013 Apr 15;518(2):335-45.

Cras A, Politis B, Balitrand N, Darsin-Bettinger D, Boelle PY, Cassinat B, Toubert ME, Chomienne C. Bexarotene via CBP/p300 induces suppression of NF-κB-dependent cell growth and invasion in thyroid cancer. Clin Cancer Res. 2012 Jan 15;18(2):442-53.

Crowe DL, Kim R, Chandraratna RA. Retinoic acid differentially regulates cancer cell proliferation via dose-dependent modulation of the mitogen-activated protein kinase pathway. Mol Cancer Res. 2003 May;1(7):532-40.

D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands. Curr Top Dev Biol. 2010;92:73-129.

Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, Kim WY. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 25;111(8):3110-5.

de Celis JF, Bray SJ. The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. Development. 2000 Mar;127(6):1291-302.

Decensi A, Torrisi R, Bruno S, Costantini M, Curotto A, Nicolò G, Malcangi B, Baglietto L, Bruttini GP, Gatteschi B, Rondanina G, Varaldo M, Perloff M, Malone WF, Bruzzi P. Randomized trial of fenretinide in superficial bladder cancer using DNA flow cytometry as an intermediate end point. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Oct;9(10):1071-8.

Demehri S, Liu Z, Lee J, Lin MH, Crosby SD, Roberts CJ, Grigsby PW, Miner JH, Farr AG, Kopan R. Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. PLoS Biol. 2008 May 27;6(5):e123.

Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. Clin Cancer Res. 2002 Feb;8(2):494-501.

Diévart A, Beaulieu N, Jolicoeur P. Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. Oncogene. 1999 Oct 28;18(44):5973-81.

Dilworth FJ, Chambon P. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. Oncogene. 2001 May 28;20(24):3047-54.

Dotto GP. Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. Nat Rev Cancer. 2009 Aug;9(8):587-95.

Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. Cell. 2008 Sep 19;134(6):921-31.

Duvic M, Hymes K, Heald P, Breneman D, Martin AG, Myskowski P, Crowley C, Yocum RC; Bexarotene Worldwide Study Group. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II-III trial results. J Clin Oncol. 2001 May 1;19(9):2456-71.

Dyrskjøt L, Kruhøffer M, Thykjaer T, Marcussen N, Jensen JL, Møller K, Ørntoft TF. Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. Cancer Res. 2004 Jun 1;64(11):4040-8.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell. 1991 Aug 23;66(4):649-61.

Eriksson P, Aine M, Veerla S, Liedberg F, Sjödahl G, Höglund M. Molecular subtypes of urothelial carcinoma are defined by specific gene regulatory systems. BMC Med Genomics. 2015 May 26;8:25.

Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. Cell. 2014 Mar 27;157(1):255-66.

Faria TN, Mendelsohn C, Chambon P, Gudas LJ. The targeted disruption of both alleles of RARbeta(2) in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. J Biol Chem. 1999 Sep 17;274(38):26783-8.

Fiuza UM, Klein T, Martinez Arias A, Hayward P. Mechanisms of ligand-mediated inhibition in Notch signaling activity in Drosophila. Dev Dyn. 2010 Mar;239(3):798-805.

Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok CY, Jia M, De T, Teague JW, Stratton MR, McDermott U, Campbell PJ. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D805-11.

Fryer CJ, White JB, Jones KA. Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. Mol Cell. 2004 Nov 19;16(4):509-20.

Funahashi Y, Hernandez SL, Das I, Ahn A, Huang J, Vorontchikhina M, Sharma A, Kanamaru E, Borisenko V, Desilva DM, Suzuki A, Wang X, Shawber CJ, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Kitajewski J. A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. Cancer Res. 2008 Jun 15;68(12):4727-35.

Gallahan D, Kozak C, Callahan R. A new common integration region (int-3) for mouse mammary tumor virus on mouse chromosome 17. J Virol. 1987 Jan;61(1):218-20.

Gallahan D, Jhappan C, Robinson G, Hennighausen L, Sharp R, Kordon E, Callahan R, Merlino G, Smith GH. Expression of a truncated Int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. Cancer Res. 1996 Apr 15;56(8):1775-85.

Gampe RT Jr, Montana VG, Lambert MH, Wisely GB, Milburn MV, Xu HE. Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix. Genes Dev. 2000 Sep 1;14(17):2229-41.

Gandhi D, Molotkov A, Batourina E, Schneider K, Dan H, Reiley M, Laufer E, Metzger D, Liang F, Liao Y, Sun TT, Aronow B, Rosen R, Mauney J, Adam R, Rosselot C, Van Batavia J, McMahon A, McMahon J, Guo JJ, Mendelsohn C. Retinoid signaling in progenitors controls specification and regeneration of the urothelium. Dev Cell. 2013 Sep 16;26(5):469-82.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013 Apr 2;6(269):pl1. Germain P, Iyer J, Zechel C, Gronemeyer H. Co-regulator recruitment and the mechanism of

retinoic acid receptor synergy. Nature. 2002 Jan 10;415(6868):187-92.

Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, Qian ZR, Cohen O, Nishihara R, Bahl S, Cao Y, Amin-Mansour A, Yamauchi M, Sukawa Y, Stewart C, Rosenberg M, Mima K, Inamura K, Nosho K, Nowak JA, Lawrence MS, Giovannucci EL, Chan AT, Ng K, Meyerhardt JA, Van Allen EM, Getz G, Gabriel SB, Lander ES, Wu CJ, Fuchs CS, Ogino S, Garraway LA. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. Cell Rep. 2016 Oct 18;17(4):1206.

Gordon WR, Vardar-Ulu D, Histen G, Sanchez-Irizarry C, Aster JC, Blacklow SC. Structural basis for autoinhibition of Notch. Nat Struct Mol Biol. 2007 Apr;14(4):295-300.

Greife A, Jankowiak S, Steinbring J, Nikpour P, Niegisch G, Hoffmann MJ, Schulz WA. Canonical Notch signalling is inactive in urothelial carcinoma. BMC Cancer. 2014 Aug 29;14:628.

Greife A, Hoffmann MJ, Schulz WA. Consequences of Disrupted Notch Signaling in Bladder Cancer. Eur Urol. 2015 Jul;68(1):3-4.

Guo G, Sun X, Chen C, Wu S, Huang P, Li Z, Dean M, Huang Y, Jia W, Zhou Q, Tang A, Yang Z, Li X, Song P, Zhao X, Ye R, Zhang S, Lin Z, Qi M, Wan S, Xie L, Fan F, Nickerson ML, Zou X, Hu X, Xing L, Lv Z, Mei H, Gao S, Liang C, Gao Z, Lu J, Yu Y, Liu C, Li L, Fang X, Jiang Z, Yang J, Li C, Zhao X, Chen J, Zhang F, Lai Y, Lin Z, Zhou F, Chen H, Chan HC, Tsang S, Theodorescu D, Li Y, Zhang X, Wang J, Yang H, Gui Y, Wang J, Cai Z. Whole-genome and

whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. Nat Genet. 2013 Dec;45(12):1459-63.

Haeseleer F, Huang J, Lebioda L, Saari JC, Palczewski K. Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. J Biol Chem. 1998 Aug 21;273(34):21790-9.

Hameed DA, el-Metwally TH. The effectiveness of retinoic acid treatment in bladder cancer: impact on recurrence, survival and TGFalpha and VEGF as end-point biomarkers. Cancer Biol Ther. 2008 Jan;7(1):92-100.

Hamel S, Fantini J, Schweisguth F. Notch ligand activity is modulated by glycosphingolipid membrane composition in Drosophila melanogaster. J Cell Biol. 2010 Feb 22;188(4):581-94.

Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lübke T, Lena Illert A, von Figura K, Saftig P. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. Hum Mol Genet. 2002 Oct 1;11(21):2615-24.

Hayashi T, Gust KM, Wyatt AW, Goriki A, Jäger W, Awrey S, Li N, Oo HZ, Altamirano-Dimas M, Buttyan R, Fazli L, Matsubara A, Black PC. Not all NOTCH Is Created Equal: The Oncogenic Role of NOTCH2 in Bladder Cancer and Its Implications for Targeted Therapy. Clin Cancer Res. 2016 Jun 15;22(12):2981-92.

He F, Mo L, Zheng XY, Hu C, Lepor H, Lee EY, Sun TT, Wu XR. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. Cancer Res. 2009 Dec 15;69(24):9413-21.

He F, Melamed J, Tang MS, Huang C, Wu XR. Oncogenic HRAS Activates Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Confers Stemness to p53-Deficient Urothelial Cells to Drive Muscle Invasion of Basal Subtype Carcinomas. Cancer Res. 2015 May 15;75(10):2017-28. He X, Marchionni L, Hansel DE, Yu W, Sood A, Yang J, Parmigiani G, Matsui W, Berman DM. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. Stem Cells. 2009 Jul;27(7):1487-95.

Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. Cell. 1992 Jan 24;68(2):397-406.

Hicks RM. Hyperplasia and cornification of the transitional epithelium in the vitamin A-deficient rat. Changes in fine structure of the cells. J Ultrastruct Res. 1968 Feb;22(3):206-30.

Ho PL, Kurtova A, Chan KS. Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. Nat Rev Urol. 2012 Oct;9(10):583-94.

Hoey T, Yen WC, Axelrod F, Basi J, Donigian L, Dylla S, Fitch-Bruhns M, Lazetic S, Park IK, Sato A, Satyal S, Wang X, Clarke MF, Lewicki J, Gurney A. DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. Cell Stem Cell. 2009 Aug 7;5(2):168-77.

Hua S, Kittler R, White KP. Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. Cell. 2009 Jun 26;137(7):1259-71.

Huang C, Ma WY, Dawson MI, Rincon M, Flavell RA, Dong Z. Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 27;94(11):5826-30.

Huang J, Powell WC, Khodavirdi AC, Wu J, Makita T, Cardiff RD, Cohen MB, Sucov HM, Roy-Burman P. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. Cancer Res. 2002 Aug 15;62(16):4812-9.

Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Retinoic acid actions through mammalian nuclear receptors. Chem Rev. 2014 Jan 8;114(1):233-54. Hurst RE, Waliszewski P, Waliszewska M, Bonner RB, Benbrook DM, Dar A, Hemstreet GP 3rd. Complexity, retinoid-responsive gene networks, and bladder carcinogenesis. Adv Exp Med Biol. 1999;462:449-67.

Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. Temporallycontrolled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. Nucleic Acids Res. 1999 Nov 15;27(22):4324-7.

Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, Hanrahan AJ, Ostrovnaya I, Balar AV, Kim PH, Lin O, Weinhold N, Sander C, Zabor EC, Janakiraman M, Garcia-Grossman IR, Heguy A, Viale A, Bochner BH, Reuter VE, Bajorin DF, Milowsky MI, Taylor BS, Solit DB. Prevalence and cooccurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. J Clin Oncol. 2013 Sep 1;31(25):3133-40.

Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic Kras. Genes Dev. 2001 Dec 15;15(24):3243-8.

Jerez A, Gondek LP, Jankowska AM, Makishima H, Przychodzen B, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, Batista D, Sekeres MA, McDevitt MA, Mufti GJ, Maciejewski JP. Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. J Clin Oncol. 2012 Apr 20;30(12):1343-9.

Jiang W, Deng W, Bailey SK, Nail CD, Frost AR, Brouillette WJ, Muccio DD, Grubbs CJ, Ruppert JM, Lobo-Ruppert SM. Prevention of KLF4-mediated tumor initiation and malignant transformation by UAB30 rexinoid. Cancer Biol Ther. 2009 Feb;8(3):289-98.

Jorissen E, De Strooper B. Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. Curr Top Dev Biol. 2010;92:201-30. Juanpere N, Agell L, Lorenzo M, de Muga S, López-Vilaró L, Murillo R, Mojal S, Serrano S, Lorente JA, Lloreta J, Hernández S. Mutations in FGFR3 and PIK3CA, singly or combined with RAS and AKT1, are associated with AKT but not with MAPK pathway activation in urothelial bladder cancer. Hum Pathol. 2012 Oct;43(10):1573-82.

Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, Grondona JM, Décimo D, Krezel W, Dierich A, Chambon P. Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. Genes Dev. 1996 Jan 1;10(1):80-92.

Kastner P, Messaddeq N, Mark M, Wendling O, Grondona JM, Ward S, Ghyselinck N, Chambon P. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. Development. 1997 Dec;124(23):4749-58.

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. Science. 2007 Feb 9;315(5813):820-5.

Kawakami S, Arai G, Hayashi T, Fujii Y, Xia G, Kageyama Y, Kihara K. PPARgamma ligands suppress proliferation of human urothelial basal cells in vitro. J Cell Physiol. 2002 Jun;191(3):310-9.

Kersten S, Gronemeyer H, Noy N. The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. J Biol Chem. 1997 May 9;272(19):12771-7.

Kim PH, Cha EK, Sfakianos JP, Iyer G, Zabor EC, Scott SN, Ostrovnaya I, Ramirez R, Sun A, Shah R, Yee AM, Reuter VE, Bajorin DF, Rosenberg JE, Schultz N, Berger MF, Al-Ahmadie HA, Solit DB, Bochner BH. Genomic predictors of survival in patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder. Eur Urol. 2015 Feb;67(2):198-201.

Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, Oh P, Haeno H, Buonamici S, van De Walle I, Cathelin S, Trimarchi T, Araldi E, Liu C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Efstratiadis A, Taghon T, Michor F, Levine RL, Aifantis I. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. Nature. 2011 May 12;473(7346):230-3.

Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. Nat Rev Cancer. 2015 Jan;15(1):25-41.

Koch U, Radtke F. Notch signaling in solid tumors. Curr Top Dev Biol. 2010;92:411-55.

Kojetin DJ, Matta-Camacho E, Hughes TS, Srinivasan S, Nwachukwu JC, Cavett V, Nowak J, Chalmers MJ, Marciano DP, Kamenecka TM, Shulman AI, Rance M, Griffin PR, Bruning JB, Nettles KW. Structural mechanism for signal transduction in RXR nuclear receptor heterodimers. Nat Commun. 2015 Aug 20;6:8013.

Komatsu H, Chao MY, Larkins-Ford J, Corkins ME, Somers GA, Tucey T, Dionne HM, White JQ, Wani K, Boxem M, Hart AC. OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during Caenorhabditis elegans vulval development. PLoS Biol. 2008 Aug 12;6(8):e196.

Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, van Rhijn BW, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. PLoS One. 2010 Nov 3;5(11):e13821.

Kondoh K, Sunadome K, Nishida E. Notch signaling suppresses p38 MAPK activity via induction of MKP-1 in myogenesis. J Biol Chem. 2007 Feb 2;282(5):3058-65.

Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell. 2009 Apr 17;137(2):216-33.

Kovall RA. Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex. Curr Opin Struct Biol. 2007 Feb;17(1):117-27.

256

Kovall RA, Blacklow SC. Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. Curr Top Dev Biol. 2010;92:31-71.

Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. Genes Dev. 2000 Jun 1;14(11):1343-52.

Krezel W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-/RXR beta -/-/RXR gamma -/- mutant mice are viable. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 20;93(17):9010-4.

Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P. Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. Science. 1998 Feb 6;279(5352):863-7.

Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P. A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jul;86(14):5310-4.

Kurie JM, Lotan R, Lee JJ, Lee JS, Morice RC, Liu DD, Xu XC, Khuri FR, Ro JY, Hittelman WN, Walsh GL, Roth JA, Minna JD, Hong WK. Treatment of former smokers with 9-cis-retinoic acid reverses loss of retinoic acid receptor-beta expression in the bronchial epithelium: results from a randomized placebo-controlled trial. J Natl Cancer Inst. 2003 Feb 5;95(3):206-14.

Kurokawa R, Yu VC, Näär A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, Glass CK. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. Genes Dev. 1993 Jul;7(7B):1423-35.

Kurtova AV, Xiao J, Mo Q, Pazhanisamy S, Krasnow R, Lerner SP, Chen F, Roh TT, Lay E, Ho PL, Chan KS. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. Nature. 2015 Jan 8;517(7533):209-13.

Laaksovirta S, Rajala P, Nurmi M, Tammela TL, Laato M. The cytostatic effect of 9-cis-retinoic acid, tretinoin, and isotretinoin on three different human bladder cancer cell lines in vitro. Urol Res. 1999;27(1):17-22.

Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, Boulter J, Sun YE, Kintner C, Weinmaster G. The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. J Cell Biol. 2005 Sep 12;170(6):983-92.

Lammi J, Perlmann T, Aarnisalo P. Corepressor interaction differentiates the permissive and nonpermissive retinoid X receptor heterodimers. Arch Biochem Biophys. 2008 Apr 15;472(2):105-14.

LaVoie MJ, Selkoe DJ. The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alphasecretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. J Biol Chem. 2003 Sep 5;278(36):34427-37.

Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. Development. 2005 Apr;132(8):1751-62.

Leblanc BP, Stunnenberg HG. 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. Genes Dev. 1995 Aug 1;9(15):1811-6.

Leder A, Kuo A, Cardiff RD, Sinn E, Leder P. v-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinoic acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec;87(23):9178-82.

Lee J, Saha PK, Yang QH, Lee S, Park JY, Suh Y, Lee SK, Chan L, Roeder RG, Lee JW. Targeted inactivation of MLL3 histone H3-Lys-4 methyltransferase activity in the mouse reveals vital roles for MLL3 in adipogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 9;105(49):19229-34.

Lee J, Kim DH, Lee S, Yang QH, Lee DK, Lee SK, Roeder RG, Lee JW. A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 26;106(21):8513-8.

Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhattar R. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. Science. 2007 Oct 19;318(5849):447-50.

Lee S, Lee DK, Dou Y, Lee J, Lee B, Kwak E, Kong YY, Lee SK, Roeder RG, Lee JW. Coactivator as a target gene specificity determinant for histone H3 lysine 4 methyltransferases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 17;103(42):15392-7.

Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, Dedieu S, Billaut X, Lefebvre B. Transcriptional activities of retinoic acid receptors. Vitam Horm. 2005;70:199-264.

Leighton PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, Lu X, Pinson K, Scherz P, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. Nature. 2001 Mar 8;410(6825):174-9.

Leong KG, Gao WQ. The Notch pathway in prostate development and cancer. Differentiation. 2008 Jul;76(6):699-716.

Li K, Li Y, Wu W, Gordon WR, Chang DW, Lu M, Scoggin S, Fu T, Vien L, Histen G, Zheng J, Martin-Hollister R, Duensing T, Singh S, Blacklow SC, Yao Z, Aster JC, Zhou BB. Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3. J Biol Chem. 2008 Mar 21;283(12):8046-54.

Li R, Faria TN, Boehm M, Nabel EG, Gudas LJ. Retinoic acid causes cell growth arrest and an increase in p27 in F9 wild type but not in F9 retinoic acid receptor beta2 knockout cells. Exp Cell Res. 2004 Mar 10;294(1):290-300.

Li W, Liu M, Feng Y, Huang YF, Xu YF, Che JP, Wang GC, Zheng JH. High expression of Notch ligand Jagged2 is associated with the metastasis and recurrence in urothelial carcinoma of bladder. Int J Clin Exp Pathol. 2013 Oct 15;6(11):2430-40.

Liu L, Gudas LJ. Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency. J Biol Chem. 2005 Dec 2;280(48):40226-34.

Liu M, Iavarone A, Freedman LP. Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. J Biol Chem. 1996 Dec 6;271(49):31723-8.

Liang FX, Bosland MC, Huang H, Romih R, Baptiste S, Deng FM, Wu XR, Shapiro E, Sun TT. Cellular basis of urothelial squamous metaplasia: roles of lineage heterogeneity and cell replacement. J Cell Biol. 2005 Dec 5;171(5):835-44.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta C(T)$ method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lu CS, Shieh GS, Wang CT, Su BH, Su YC, Chen YC, Su WC, Wu P, Yang WH, Shiau AL, Wu CL. Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer. Oncotarget. 2016 May 26.

Lu TY, Li WC, Chen RY, Fan QX, Wang LX, Wang RL, Lu SX, Meng H. Inhibition effects of all trans-retinoic acid on the growth and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma in nude mice. Chin Med J (Engl). 2011 Sep;124(17):2708-14.

Lubman OY, Ilagan MX, Kopan R, Barrick D. Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. J Mol Biol. 2007 Jan 19;365(3):577-89.

Maillard I, Weng AP, Carpenter AC, Rodriguez CG, Sai H, Xu L, Allman D, Aster JC, Pear WS. Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. Blood. 2004 Sep 15;104(6):1696-702.

Maraver A, Fernandez-Marcos PJ, Herranz D, Cañamero M, Muñoz-Martin M, Gómez-López G, Mulero F, Megías D, Sanchez-Carbayo M, Shen J, Sanchez-Cespedes M, Palomero T, Ferrando A, Serrano M. Therapeutic effect of γ-secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma by derepression of DUSP1 and inhibition of ERK. Cancer Cell. 2012 Aug 14;22(2):222-34.

Maraver A, Fernandez-Marcos PJ, Cash TP, Mendez-Pertuz M, Dueñas M, Maietta P, Martinelli P, Muñoz-Martin M, Martínez-Fernández M, Cañamero M, Roncador G, Martinez-Torrecuadrada JL, Grivas D, de la Pompa JL, Valencia A, Paramio JM, Real FX, Serrano M. NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression. J Clin Invest. 2015 Feb;125(2):824-30.

Masiero M, Minuzzo S, Pusceddu I, Moserle L, Persano L, Agnusdei V, Tosello V, Basso G, Amadori A, Indraccolo S. Notch3-mediated regulation of MKP-1 levels promotes survival of T acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia. 2011 Apr;25(4):588-98.

Maskos K, Fernandez-Catalan C, Huber R, Bourenkov GP, Bartunik H, Ellestad GA, Reddy P, Wolfson MF, Rauch CT, Castner BJ, Davis R, Clarke HR, Petersen M, Fitzner JN, Cerretti DP, March CJ, Paxton RJ, Black RA, Bode W. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 31;95(7):3408-12.

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med. 1999 Oct 14;341(16):1165-73.

Mauney JR, Ramachandran A, Yu RN, Daley GQ, Adam RM, Estrada CR. All-trans retinoic acid directs urothelial specification of murine embryonic stem cells via GATA4/6 signaling mechanisms. PLoS One. 2010 Jul 13;5(7):e11513.

Mazzone M, Selfors LM, Albeck J, Overholtzer M, Sale S, Carroll DL, Pandya D, Lu Y, Mills GB, Aster JC, Artavanis-Tsakonas S, Brugge JS. Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to Notch pathway activation in mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 16;107(11):5012-7.

McCright B, Lozier J, Gridley T. Generation of new Notch2 mutant alleles. Genesis. 2006 Jan;44(1):29-33.

Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, Roarty K, Li MZ, Fang JE, Herschkowitz JI, Burrows AE, Ciccia A, Sun T, Schmitt EM, Bernardi RJ, Fu X, Bland CS, Cooper TA, Schiff R, Rosen JM, Westbrook TF, Elledge SJ. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 1;108(9):3665-70.

Mitsiadis TA, Lardelli M, Lendahl U, Thesleff I. Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. J Cell Biol. 1995 Jul;130(2):407-18.

Moellering RE, Cornejo M, Davis TN, Del Bianco C, Aster JC, Blacklow SC, Kung AL, Gilliland DG, Verdine GL, Bradner JE. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. Nature. 2009 Nov 12;462(7270):182-8.

Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol. 2008 Jun;129(6):705-33.

Molloy CJ, Laskin JD. Effect of retinoid deficiency on keratin expression in mouse bladder. Exp Mol Pathol. 1988 Aug;49(1):128-40. Mylona E, Giannopoulou I, Diamantopoulou K, Bakarakos P, Nomikos A, Zervas A, Nakopoulou L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in urothelial carcinomas of the bladder: association with differentiation, proliferation and clinical outcome. Eur J Surg Oncol. 2009 Feb;35(2):197-201.

Nam Y, Sliz P, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 13;104(7):2103-8.

Nguyen NK, Korangath P, Sabnis G, Brodie A, Ordentlich P, Stearns V, Sukumar S. A combination of HDAC inhibitor entinostat (MS-275), all trans retinoic acid (ATRA) and chemotherapy drug(s) causes regression of established xenografts of triple negative breast cancer. Cancer Res. 2010 Dec 15;70(24 Suppl):Abstract nr PD01-05.

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. Nat Genet. 2003 Mar;33(3):416-21.

Ntziachristos P, Tsirigos A, Van Vlierberghe P, Nedjic J, Trimarchi T, Flaherty MS, Ferres-Marco D, da Ros V, Tang Z, Siegle J, Asp P, Hadler M, Rigo I, De Keersmaecker K, Patel J, Huynh T, Utro F, Poglio S, Samon JB, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Rabadan R, Levine RL, Brown S, Pflumio F, Dominguez M, Ferrando A, Aifantis I. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Med. 2012 Feb 6;18(2):298-301.

Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, Aifantis I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. Cancer Cell. 2014a Mar 17;25(3):318-34.

Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L, Loizou E, Holmfeldt L, Strikoudis A, King B, Mullenders J, Becksfort J, Nedjic J, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Tonon G, Satoh T, Kruidenier L, Prinjha R, Akira S, Van Vlierberghe P, Ferrando AA, Jaenisch

R, Mullighan CG, Aifantis I. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. Nature. 2014b Oct 23;514(7523):513-7.

Oswald F, Winkler M, Cao Y, Astrahantseff K, Bourteele S, Knöchel W, Borggrefe T. RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. Mol Cell Biol. 2005 Dec;25(23):10379-90.

Oswald F, Rodriguez P, Giaimo BD, Antonello ZA, Mira L, Mittler G, Thiel VN, Collins KJ, Tabaja N, Cizelsky W, Rothe M, Kühl SJ, Kühl M, Ferrante F, Hein K, Kovall RA, Dominguez M, Borggrefe T. A phospho-dependent mechanism involving NCoR and KMT2D controls a permissive chromatin state at Notch target genes. Nucleic Acids Res. 2016 Jun 2;44(10):4703-20.

Owen GI, Zelent A. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. Cell Mol Life Sci. 2000 May;57(5):809-27.

Papafotiou G, Paraskevopoulou V, Vasilaki E, Kanaki Z, Paschalidis N, Klinakis A. KRT14 marks a subpopulation of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis. Nat Commun. 2016 Jun 20;7:11914.

Papi A, Guarnieri T, Storci G, Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, De Carolis S, Avenia N, Sanguinetti A, Sidoni A, Orlandi M, Bonafé M. Nuclear receptors agonists exert opposing effects on the inflammation dependent survival of breast cancer stem cells. Cell Death Differ. 2012 Jul;19(7):1208-19.

Pappas JJ, Toulouse A, Basik M, Lévesque L, Bradley WE. Knockdown of RARB2 identifies a dual role in cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2011 Sep;50(9):700-14.

Parks AL, Stout JR, Shepard SB, Klueg KM, Dos Santos AA, Parody TR, Vaskova M, Muskavitch MA. Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in Drosophila. Genetics. 2006 Dec;174(4):1947-61.

Patel NS, Dobbie MS, Rochester M, Steers G, Poulsom R, Le Monnier K, Cranston DW, Li JL, Harris AL. Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. Clin Cancer Res. 2006 Aug 15;12(16):4836-44.

Perl AK, Wert SE, Nagy A, Lobe CG, Whitsett JA. Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10482-7.

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. Science. 1998 Nov 13;282(5392):1281-4.

Pignon JC, Grisanzio C, Geng Y, Song J, Shivdasani RA, Signoretti S. p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 May 14;110(20):8105-10.

Pintar A, De Biasio A, Popovic M, Ivanova N, Pongor S. The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? Biol Direct. 2007 Jul 10;2:19.

Piskunov A, Rochette-Egly C. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK. Oncogene. 2012 Jul 12;31(28):3333-45.

Prout GR Jr, Barton BA. 13-cis-retinoic acid in chemoprevention of superficial bladder cancer. The National Bladder Cancer Group. J Cell Biochem Suppl. 1992;16I:148-52.

Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, Shen MM, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. Genes Dev. 2009 Mar 15;23(6):675-80.

Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. Immunity. 1999 May;10(5):547-58.

Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):756-67

Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, Clements JA. Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. Int J Cancer. 2000 Dec 1;88(5):726-32.

Rampias T, Vgenopoulou P, Avgeris M, Polyzos A, Stravodimos K, Valavanis C, Scorilas A, Klinakis A. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. Nat Med. 2014 Oct;20(10):1199-205.

Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. EMBO J. 2001 Jul 2;20(13):3427-36.

Ray D, Nelson TA, Fu CL, Patel S, Gong DN, Odegaard JI, Hsieh MH. Transcriptional profiling of the bladder in urogenital schistosomiasis reveals pathways of inflammatory fibrosis and urothelial compromise. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(11):e1912.

Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chanthery Y, Kowalski J, Watts RJ, Callahan C, Kasman I, Singh M, Chien M, Tan C, Hongo JA, de Sauvage F, Plowman G, Yan M. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. Nature. 2006 Dec 21;444(7122):1083-7.

Ross-Innes CS, Stark R, Holmes KA, Schmidt D, Spyrou C, Russell R, Massie CE, Vowler SL, Eldridge M, Carroll JS. Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer. Genes Dev. 2010 Jan 15;24(2):171-82.

Sato Y, Ramalanjaona N, Huet T, Potier N, Osz J, Antony P, Peluso-Iltis C, Poussin-Courmontagne P, Ennifar E, Mély Y, Dejaegere A, Moras D, Rochel N. The "Phantom Effect" of the Rexinoid LG100754: structural and functional insights. PLoS One. 2010 Nov 30;5(11):e15119.

Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. Cell. 2007 May 18;129(4):723-33.

Shi TP, Xu H, Wei JF, Ai X, Ma X, Wang BJ, Ju ZH, Zhang GX, Wang C, Wu ZQ, Zhang X. Association of low expression of notch-1 and jagged-1 in human papillary bladder cancer and shorter survival. J Urol. 2008 Jul;180(1):361-6.

Shimizu K, Chiba S, Kumano K, Hosoya N, Takahashi T, Kanda Y, Hamada Y, Yazaki Y, Hirai H. Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. J Biol Chem. 1999 Nov 12;274(46):32961-9.

Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. EMBO J. 2002 Feb 1;21(3):294-302.

Shin K, Lee J, Guo N, Kim J, Lim A, Qu L, Mysorekar IU, Beachy PA. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. Nature. 2011 Apr 7;472(7341):110-4.

Shin K, Lim A, Odegaard JI, Honeycutt JD, Kawano S, Hsieh MH, Beachy PA. Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. Nat Cell Biol. 2014 May;16(5):469-78.

Shirotani K, Tomioka M, Kremmer E, Haass C, Steiner H. Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes. Neurobiol Dis. 2007 Jul;27(1):102-7.

Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, Patschan O, Aine M, Fernö M, Ringnér M, Månsson W, Liedberg F, Lindgren D, Höglund M. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. Clin Cancer Res. 2012 Jun 15;18(12):3377-86.

Sjölund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, Nilsson E, Ljungberg B, Axelson H. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. J Clin Invest. 2008 Jan;118(1):217-28.

South AP, Purdie KJ, Watt SA, Haldenby S, den Breems NY, Dimon M, Arron ST, Kluk MJ, Aster JC, McHugh A, Xue DJ, Dayal JH, Robinson KS, Rizvi SM, Proby CM, Harwood CA, Leigh IM. NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. J Invest Dermatol. 2014 Oct;134(10):2630-8.

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, Shefler E, Ramos AH, Stojanov P, Carter SL, Voet D, Cortés ML, Auclair D, Berger MF, Saksena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfeld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareño C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR, Garraway LA, Grandis JR. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Science. 2011 Aug 26;333(6046):1157-60.

Stratikopoulos EE, Dendy M, Szabolcs M, Khaykin AJ, Lefebvre C, Zhou MM, Parsons R. Kinase and BET Inhibitors Together Clamp Inhibition of PI3K Signaling and Overcome Resistance to Therapy. Cancer Cell. 2015 Jun 8;27(6):837-51.

Studer UE, Jenzer S, Biedermann C, Chollet D, Kraft R, von Toggenburg H, Vonbank F. Adjuvant treatment with a vitamin A analogue (etretinate) after transurethral resection of superficial bladder tumors. Final analysis of a prospective, randomized multicenter trial in Switzerland. Eur Urol. 1995;28(4):284-90.

Suzui M, Shimizu M, Masuda M, Lim JT, Yoshimi N, Weinstein IB. Acyclic retinoid activates retinoic acid receptor beta and induces transcriptional activation of p21(CIP1) in HepG2 human hepatoma cells. Mol Cancer Ther. 2004 Mar;3(3):309-16.

Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Ikuta A, Fukumori A, Matsumoto N, Ishizuka-Katsura Y, Nakayama T, Itoh N, Jiang J, Nishitomi K, Kamino K, Morihara T, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Chiba S, Takeda M. Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. Mol Cell Biol. 2008 Jan;28(1):165-76.

Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med. 1997 Oct 9;337(15):1021-8.

Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. Cell. 1991 Jun 28;65(7):1255-66.

Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP, Ince TA, McKeon FD, Cordon-Cardo C. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. Am J Pathol. 2002 Oct;161(4):1199-206.

Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, Iyer G, Wagle N, Al-Ahmadie H, Zhu C, Ostrovnaya I, Kryukov GV, O'Connor KW, Sfakianos J, Garcia-Grossman I, Kim J, Guancial EA, Bambury R, Bahl S, Gupta N, Farlow D, Qu A, Signoretti S, Barletta JA, Reuter V, Boehm J, Lawrence M, Getz G, Kantoff P, Bochner BH, Choueiri TK, Bajorin DF, Solit DB, Gabriel S, D'Andrea A, Garraway LA, Rosenberg JE. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. Cancer Discov. 2014 Oct;4(10):1140-53.

Van Batavia J, Yamany T, Molotkov A, Dan H, Mansukhani M, Batourina E, Schneider K, Oyon D, Dunlop M, Wu XR, Cordon-Cardo C, Mendelsohn C. Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. Nat Cell Biol. 2014 Oct;16(10):982-91, 1-5.

Varley CL, Stahlschmidt J, Smith B, Stower M, Southgate J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses squamous metaplasia and induces transitional differentiation in normal human urothelial cells. Am J Pathol. 2004 May;164(5):1789-98.

Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. In Vivo. 2012 Jul-Aug;26(4):727-39.

Venäläinen T, Molnár F, Oostenbrink C, Carlberg C, Peräkylä M. Molecular mechanism of allosteric communication in the human PPARalpha-RXRalpha heterodimer. Proteins. 2010 Mar;78(4):873-87.

Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. BMC Bioinformatics. 2010 Nov 8;11:548.

Volkmer JP, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova AV, Willingham SB, Pazhanisamy SK, Contreras-Trujillo H, Storm TA, Lotan Y, Beck AH, Chung BI, Alizadeh AA, Godoy G, Lerner SP, van de Rijn M, Shortliffe LD, Weissman IL, Chan KS. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 7;109(6):2078-83.

Wang NJ, Sanborn Z, Arnett KL, Bayston LJ, Liao W, Proby CM, Leigh IM, Collisson EA, Gordon PB, Jakkula L, Pennypacker S, Zou Y, Sharma M, North JP, Vemula SS, Mauro TM, Neuhaus IM, Leboit PE, Hur JS, Park K, Huh N, Kwok PY, Arron ST, Massion PP, Bale AE, Haussler D, Cleaver JE, Gray JW, Spellman PT, South AP, Aster JC, Blacklow SC, Cho RJ. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 25;108(43):17761-6.

Wang Q, Lee D, Sysounthone V, Chandraratna RAS, Christakos S, Korah R, Wieder R. 1,25dihydroxyvitamin D3 and retonic acid analogues induce differentiation in breast cancer cells with function- and cell-specific additive effects. Breast Cancer Res Treat. 2001 May;67(2):157-68. Warthen DM, Moore EC, Kamath BM, Morrissette JJ, Sanchez-Lara PA, Piccoli DA, Krantz ID, Spinner NB. Jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome: increasing the mutation detection rate. Hum Mutat. 2006 May;27(5):436-43.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. 2004 Oct 8;306(5694):269-71.

Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. Genes Dev. 1995 May 1;9(9):1033-45.

Wolbach SB, Howe PR. Epithelial repair in recovery from vitamin A deficiency : an experimental study. J Exp Med. 1933 Feb 28;57(3):511-26.

Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. Kidney Int. 2009 Jun;75(11):1153-65.

Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. Nat Struct Biol. 1996 Jan;3(1):87-94.

Yang X, La Rosa FG, Genova EE, Huber K, Schaack J, Degregori J, Serkova NJ, Li Y, Su LJ, Kessler E, Flaig TW. Simultaneous activation of Kras and inactivation of p53 induces soft tissue sarcoma and bladder urothelial hyperplasia. PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74809.

Ying M, Wang S, Sang Y, Sun P, Lal B, Goodwin CR, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A, Laterra J, Xia S. Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. Oncogene. 2011 Aug 4;30(31):3454-67.

Yu HM, Liu B, Chiu SY, Costantini F, Hsu W. Development of a unique system for spatiotemporal and lineage-specific gene expression in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8615-20.

Zhang XK, Salbert G, Lee MO, Pfahl M. Mutations that alter ligand-induced switches and dimerization activities in the retinoid X receptor. Mol Cell Biol. 1994 Jun;14(6):4311-23.

Zhang XK, Su Y, Chen L, Chen F, Liu J, Zhou H. Regulation of the nongenomic actions of retinoid X receptor- α by targeting the coregulator-binding sites. Acta Pharmacol Sin. 2015 Jan;36(1):102-12.

Zhao G, Liu Z, Ilagan MX, Kopan R. Gamma-secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. J Neurosci. 2010 Feb 3;30(5):1648-56.

Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. Nat Rev Clin Oncol. 2014 Jul;11(7):385-400.

Zhou H, Liu W, Su Y, Wei Z, Liu J, Kolluri SK, Wu H, Cao Y, Chen J, Wu Y, Yan T, Cao X, Gao W, Molotkov A, Jiang F, Li WG, Lin B, Zhang HP, Yu J, Luo SP, Zeng JZ, Duester G, Huang PQ, Zhang XK. NSAID sulindac and its analog bind RXRalpha and inhibit RXRalpha-dependent AKT signaling. Cancer Cell. 2010 Jun 15;17(6):560-73.

Zhou H, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Huang WC, Mohammadi M, Mohr I, Tang MS, Huang C, Wu XR. Urothelial tumor initiation requires deregulation of multiple signaling pathways: implications in target-based therapies. Carcinogenesis. 2012 Apr;33(4):770-80.

Zhou Y, Atkins JB, Rompani SB, Bancescu DL, Petersen PH, Tang H, Zou K, Stewart SB, Zhong W. The mammalian Golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis. Cell. 2007 Apr 6;129(1):163-78.

Zou C, Liebert M, Zou C, Grossman HB, Lotan R. Identification of effective retinoids for inhibiting growth and inducing apoptosis in bladder cancer cells. J Urol. 2001 Mar;165(3):986-92.

Zou C, Zhou J, Qian L, Feugang JM, Liu J, Wang X, Wu S, Ding H, Zou C, Liebert M, Grossman HB. Comparing the effect of ATRA, 4-HPR, and CD437 in bladder cancer cells. Front Biosci. 2006 Sep 1;11:2007-16.
ПАРАРТНМА

Ι. ΧΑΡΤΕΣ

ΙΙ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Rampias T, **Vgenopoulou P**, Avgeris M, Polyzos A, Stravodimos K, Valavanis C, Scorilas A, Klinakis A. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. Nat Med. 2014 Oct;20(10):1199-205. doi: 10.1038/nm.3678.

Vgenopoulou P, Rampias T, Avgeris M, Scorilas A, Klinakis A. Notch signaling pathway plays a tumor suppressor role in mouse and human urothelium via MAPK pathway regulation. Poster presentation delivered at the Mechanisms & Models of Cancer Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, August 2014, NY, USA.



Εικόνα 1: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pCMV-Sport6-RXRA. Με φούξια απεικονίζεται το cDNA του ανθρώπινου υποδοχέα RXRa. Αναγράφονται οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 2: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pENTR.GD.for. Αναγράφονται οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 3: Πλασμιδιακός χάρτης του λεντιϊκού φορέα p199-FSmHey2-iEPv2. Με βυσσινί απεικονίζεται το cDNA του Hey2 του ποντικιού. Αναγράφονται επίσης οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 4: Πλασμιδιακός χάρτης του λεντιϊκού φορέα pLenti6.2/V5-DEST-rtTA. Με βυσσινί απεικονίζεται η αλληλουχία του rtTA. Αναγράφονται επίσης οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 5: Πλασμιδιακός χάρτης του λεντιϊκού φορέα pInducer20. Με βυσσινί απεικονίζεται η αλληλουχία του rtTA. Αναγράφονται επίσης οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.

Title: A novel tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer

Authors: Theodoros Rampias¹, Paraskevi Vgenopoulou¹, Margaritis Avgeris², Alexander Polyzos¹, Konstantinos Stravodimos³, Christos Valavanis⁴, Andreas Scorilas² and Apostolos Klinakis^{1,*}

Affiliations:

¹Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Athens, Greece

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens,

Panepistimiopolis, Athens, Greece

³First Department of Urology, "Laiko" General Hospital, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

⁴Molecular Pathology Unit, Department of Pathology, Metaxa Cancer Hospital, Piraeus, Greece

* Corresponding author

The Notch signaling pathway controls cell fates through interactions between neighboring cells by positively or negatively affecting, in a context-dependent manner, processes of proliferation, differentiation, and apoptosis¹. It has been implicated in human cancer both as an oncogene and a tumor suppressor². Here we report, for the first time, novel inactivating mutations in Notch pathway components in over forty percent of the human bladder cancers examined. Bladder cancer is the fourth most commonly diagnosed malignancy in the US male population³. Thus far, driver mutations in the FGFR3 and less commonly RAS proteins have been identified^{4,5}. We show that Notch activation in bladder cancer cells suppresses proliferation both *in vitro* and *in vivo* by directly upregulating dual specificity phosphatases (DUSPs), thus reducing ERK1/2 phosphorylation. In mouse models, genetic inactivation of Notch signaling leads to Erk1/2 phosphorylation resulting in tumorigenesis in the urinary tract. Collectively, our findings show that loss of Notch activity is a driving event in urothelial cancer.

A tumor suppressor role for Notch was first established in the skin by genetic experiments in mice⁶ and human keratinocytes⁷. In recent years, the tumor suppressor role of Notch has been recognized by loss-of-function mutations identified in myeloid cancers⁸ as well as squamous cell carcinomas of the lung⁹ and the head and neck^{10,11}. Of the 4 Notch receptors (N1-4), only N1 and N2 have been implicated in human cancer. This study was prompted by an initial observation that mice lacking γ -secretase activity develop urothelial carcinoma within few weeks (described in detail in a later section). To investigate a possible role of Notch in human bladder cancer, we first assessed the expression levels of Notch pathway components in normal human urothelium. Antibodies that recognize both full length and cleaved N1 and N2 receptors revealed uniform cytoplasmic and nuclear signal in all three layers (basal, intermediate and umbrella). While DLL1 was undetectable (data not shown), JAG1 was found ubiquitously expressed (**Supplementary Figs. 1** and **2**).

Next, we performed full exon sequencing of Notch pathway components (N1, N2, N3, MAML1, NCSTN, PSEN1, APH1a, APH1b and PSENEN) in a cohort of 72 patients diagnosed with bladder transitional cell carcinoma (TCC). Of these, forty (55%) were

superficial (pTa or pT1), while the rest were muscle-invasive (pT2-pT4; **Supplementary Tables 1** and **2**).

We identified Notch pathway mutations that were distributed equally among tumors of different grade and stage (**Supplementary Table 2**). In total we recovered mutations in 31/72 patients (43%), some of which carried more than one (45 mutations in total;

Supplementary Table 3) often found in different alleles (Supplementary Fig. 3).

Identified mutations include missense, nonsense, and deletions that lead to frameshifts and premature stop codons. We also found in-frame deletions that eliminate portions of the protein. N1 and N2 comprised 29/45 mutations (**Fig. 1a**). All mutations were novel with the exception of the MAML1/N800T which has been previously found in a Acute Myeloid Leukemia patient¹². Adjacent normal bladder tissue from patients was also sequenced and all mutations were confirmed to be somatic (**Supplementary Fig. 4**). In addition to somatic mutations, we identified several previously reported single nucleotide polymorphisms (SNPs) as well as synonymous somatic mutations (**Supplementary Tables 4-6**).

Interestingly, N1 is located in the long arm of chromosome 9 (9q34.3) while complete loss of chromosome 9 or its long arm 9q has been described as the most common chromosomal aberration in bladder cancer, occurring in approximately 50% of the cases¹³. We therefore used tumor genomic DNA to investigate possible chromosomal losses encompassing the *NOTCH1* locus. We identified 30/62 cases with copy number loss (CNL; **Fig. 1b** and **Supplementary Table 7**). In seventeen patients we found N1 CNL and at least one pathway mutation, and in 7 of these, the mutation was in N1 itself, thus representing apparent loss-of-heterozygosity (LOH) cases. Mutations and CNL combined bring the overall pathway and N1 mutation frequency to 61% (44/72) and 51% (37/72), respectively.

Using PolyPHEN-2¹⁴, we found that the majority of missense mutations are damaging (D) for protein function while few are benign (B; **Supplementary Table 3**). To examine whether any of these mutations affected Notch signaling output, we compared the functionality of mutated cDNAs with wild-type controls using *in vitro* luciferase assays with CSL-Luc reporters which confirmed the PolyPHEN-2 predictions and demonstrated that most were loss-of-function mutations (**Fig. 1c**). Notably, we recovered six mutations in N1, N2 and N3 which truncate the protein at its extracellular part leading to variants with dominant negative (DN) function¹⁵.

In comparison to wild-type, patients with Notch mutations and/or N1 CNL present a worse overall survival indicated by Kaplan-Meier survival analysis (p=0.041; **Fig. 1d**). Additionally, they show significantly higher risk for death, compared to the control wild-type group, highlighted by Cox proportional hazard models adjusted for the total (Hazard ratio (HR): 3.336; 95% CI: 0.957 – 11.632; p=0.059) and the muscle-invasive (HR: 5.075; 95% CI: 1.103 – 23.34; p=0.037) group of patients. Tumor vs. normal comparison for three established Notch targets, *HEY1*, *HES1* and *CDKN1A*, showed significantly lower expression levels in patients with Notch genetic alterations (**Fig. 1e**), which correlate with shorter disease-free and/or overall survival (**Supplementary Fig. 5a**).

Fully corroborating our findings, analysis of publicly available data obtained from highthroughput bladder cancer studies¹⁶⁻¹⁹ via the cBioportal²⁰ (www.cbioportal.org), revealed mutations in the same Notch pathway components with frequencies ranging from 13.0-21.4%, and N1 CNL in approximately 40% of the patients, independently of tumor grade and stage. However, whole genome/exome studies largely depend upon the use of algorithms for data processing that assign scores based on parameters such as the "abundance" of mutations above background, their "clustering" in hotspots, and their functional impact. While these algorithms are suitable for identification of frequent driver oncogenic events, they might fail to draw attention to highly mutated pathways when individual components are mutated at low frequency. Interestingly, although Notch pathway mutations are evenly distributed among the four different bladder cancer subtypes reported (BLCA1-4)¹⁶, *HES1* and *CDKN1A* show significantly lower expression in the "basal" BLCA3 subtype (Supplementary Fig. 5b). In this cohort of 131 invasive bladder tumors, reduced HES1 expression strongly predicts shorter overall survival, independently of tumor subtype (Supplementary Fig. 5c).

Thus far, bladder cancer has been associated with mutations in FGFR3 and RAS which are mutually exclusive and, although present primarily in superficial cancers, combined they account for 50-70% of all cases (Sanger Cosmic Catalogue of somatic mutations). We therefore sequenced our cohort for mutations in the known hotspots of *FGFR3*, *HRAS*, *KRAS* and *PIK3CA* (**Supplementary Table 8**). Notch pathway mutations and N1 CNLs only partially overlapped with mutations in *FGFR3*, *RAS* and *PIK3CA* (**Figs. 2a-c**). Because FGFR3 and RAS promote tumorigenesis by phosphorylating ERK1/2, we

examined its phosphorylation status in protein lysates and paraffin sections from healthy and neoplastic tissue. Samples with Notch mutations showed indistinguishably high levels of phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) even in the absence of FGFR3/RAS mutations (**Figs. 2d** and **e**). In fact, tumors with Notch pathway alterations show higher pERK1/2 levels compared to those with FGFR3/RAS mutations (**Fig. 2f**). We hypothesize that a fine balance between the two pathways determines ERK1/2 phosphorylation status (**Fig. 2g**).

To test this hypothesis, we transduced human TCC cell lines with adenoviral vectors expressing the active intracellular domain of N1 (AdN1ic). We observed that cell growth completely stalled and cells accumulated in the G0/G1 phase (Fig. 3a). This effect is independent of tumor grade and mutation status (Supplementary Table 9). In AdN1ictransduced human TCC cell lines, ERK1/2 phosphorylation is partially or completely abolished whereas upstream cascade components (i.e. MEK1/2) are not affected (Fig. 3b) implying that Notch activation nullifies upstream positive stimuli that drive ERK1/2 phosphorylation, even in cells with activating RAS mutations (i.e. T24). Importantly, canonical activation of the pathway through JAG1 overexpression in T24 cells also abrogates ERK1/2 phosphorylation (Fig. 3c). As expected, these cell lines are sensitive to MEK1/2 inhibition and treatment with the inhibitor PD98059 leads to reduced pERK1/2 levels and growth inhibition (Fig. 3d). Because ERK1/2 dephosphorylation is mediated by DUSPs, we assessed the expression levels of several DUSPs in AdN1ic- and AdJAG1-transduced TCC cells (Fig. 3e). Using qPCR and Western analyses, we found that DUSP1, 2, 5, 6, 8 and 10 were variably but consistently upregulated in all TCC cell

lines tested while expression of PP2A, a phosphatase that also dephosphorylates ERK1/2, was unchanged (**Figs. 3f** and **g**). Similarly to N1ic, N2ic upregulates DUSPs, abrogates ERK1/2 phosphorylation and suppresses proliferation of human TCC cells in vitro (Supplementary Fig. 6). Finally, in a loss-of-function approach, treatment with the γ secretase inhibitor DAPT showed that TCC cell lines downregulate DUSP expression (**Fig. 3h**). In T24 cells stably expressing a dominant negative form of MAML 1^{21} (MAMLdn), N1ic fails to upregulate DUSPs and to suppress cell growth (Fig. 3i). In silico promoter analysis of the upregulated DUSPs revealed consensus CSL binding sites in the promoter region of various members. ChIP experiments confirmed the association of N1ic with the promoters of *DUSP1*, 5, 8 and 10 (Fig. 3j). Finally, expression of DUSP1 and, to a lesser extent, DUSP5 correlates with Notch pathway activity (as indicated by HEY1 expression; Supplementary Fig. 5d). In summary, our results indicate that Notch activity regulates ERK1/2 phosphorylation through direct transcriptional activation of DUSPs, and therefore restrains MAPK proliferative output. Interestingly, a N1/HES1/DUSP1/pERK1/2 oncogenic axis has been described in lung carcinoma²².

In concordance with our observations in normal human bladder, all layers of the mouse urothelium express N1 and JAG1 (**Supplementary Fig. 7**). Our initial observation, however, that mice with global Notch signaling abrogation, based on a Ncstn conditional knockout line⁸ ($Ncstn^{f/f}$) and the R26rtTA;tetO-Cre binary system^{23,24}, rapidly develop invasive urothelial cancer came as a great surprise. R26rtTA;teto-Cre; $Ncstn^{f/f}$ mice (n=18, 10 males, 8 females) were administered Doxycycline (Dox) and were sacrificed two months later. Of these, 12/18 (7 males, 5 females) developed uni- or bilateral hydronephrosis, as early as two weeks following Dox administration due to tumor masses obstructing the upper ureter (Fig. 4a). These tumors are high grade urothelial carcinomas, grow mostly with a solid pattern and display blunt cellular atypia and focal glandular differentiation. They invade the lamina and muscularis propria and are characterized by Erk1/2 phosphorylation and expression of the proliferation markers Ki67 and Cyclin D1. All tumors lacked nuclear N1 (N1ic) and expressed the basal markers p63 and CK5 which could indicate that they originate from the basal or intermediate layer and classifying them as "basal"²⁵ (Figs. 4b and c). The preferential response of Cytokeratin 5positive basal cells to tumorigenic signals has also been described in a model of chemical carcinogenesis²⁶. Expression of basal cell markers is associated with bladder cancer stem cells and poor clinical prognosis^{27,28}. This phenotype was completely suppressed in mice (n=7) which in addition carried a transgene for Cre-dependent overexpression of N1ic²⁹ (*R26rtTA;teto-Cre;Ncstn^{f/f};Ef1/N1ic*). In these mice, N1 nuclear localization was reconstituted and they remained healthy during a 6-month period of observation (Figs. 4a and c). Microarray expression analysis of normal and neoplastic ureters revealed reduced expression of Notch targets and Erk1/2-targeting Dusps, and upregulation of cell cycle markers in the latter (Supplementary Fig. 8a). Of interest, Mdm2, a negative regulator of the tumor suppressor protein p53, was found significantly upregulated in mouse tumors. A crosstalk between Notch and p53 in epithelial tumor suppression has been previously described³⁰. In addition, comparison of the expression profiles of the mouse

ureter tumors with the reported human bladder subtypes¹⁶, showed that the mouse tumors are most closely related with the "basal" BLCA3 subtype (**Supplementary Fig. 8b**). Finally, primary cells isolated from the ureteral tumors (P3) lacked Ncstn protein and showed strong Erk1/2 phosphorylation which was eliminated upon AdN1ic transduction (**Supplementary Fig. 8c**). *R26rtTA;teto-Cre;Ncstn^{f/f}* do not develop any other phenotype. As we later discovered, this was due to the fact that the R26rtTA;teto-Cre binary system fails to recombine any other cell type other than urothelial cells of the renal pelvis, ureter and bladder (**Supplementary Fig. 9a**).

In parallel, we developed a mouse model for urothelium-specific deletion of *Ncstn*. For this purpose, we generated a novel mouse line in which Cre recombinase and EGFP are expressed under the mouse Uroplakin II promoter (UpkII-CreEGFP). *UpkII-CreEGFP* mice express EGFP in the urothelium which declines from the umbrella towards the basal layer, leading to partial recombination in cell types residing in the latter (**Supplementary Figs. 9b-e**). *UpkII-CreEGFP;Ncstn^{ff}* mice (*n*=7) developed within 2-6 months occasional unilateral hydronephrosis due to ureter obstruction, and consistently bladder tumors which consisted of simple and nodular hyperplasia, as well as high-grade dysplasia and carcinoma in situ (CIS) showing basal characteristics (**Figs. 4d-f**). No differences in tumor latency or tumor characteristics was observed between male (*n*=2) and female (*n*=5) mice. Whether the different phenotypes observed in the two models is the result of differential sensitivity to Notch abrogation reflecting the distinct embryonic origin of the upper (mesoderm) and lower (endoderm) urinary tract, or it is the result of recombination in overlapping but not identical cell populations remains an open question. Further supporting our findings, *ex vivo*-cultured wild-type mouse bladders treated with DAPT showed an increase in pERK1/2 levels presumably caused by reduced Dusp expression (**Supplementary Fig. 8d**). Similarly, bladders from *Cbf1^{f/f}* mice³¹ transduced with Cre recombinase-expressing adenovirus (AdCre) showed a uniform reduction in Dusp expression (**Supplementary Fig. 8e**).

Here we show that one in four tumors (18/72; 25%) carry Notch pathway mutations without concomitant mutation in the *FGFR3* or RAS oncogenes. Patients with Notch mutations and, consequently, reduced Notch target gene expression show significantly shorter survival. In a published cohort of invasive bladder cancer patients, we show that reduced Notch pathway output, as indicated by the expression levels of direct transcriptional targets such as *HES1* and *CDKN1A*, strongly correlates with the less differentiated and more aggressive "basal" subtype of bladder cancers, and serves as an independent prognostic marker for survival.

In our mouse models, Notch inactivation leads to tumorigenesis within a time frame compatible with a "single hit" hypothesis of tumor initiation and progression thus far known for tumor suppressors only in the case of *Apc* inactivation in stem cells of the mouse intestine³². Whether normal bladder stem cells are implicated in this process is an intriguing question. Nevertheless, mouse tumors express basal cell markers and show significant similarities at the molecular level with the "basal" subtype of human bladder cancers.

Studies in mouse models, however, have shown that mutant Fgfr3 is not sufficient for tumor development³³, while oncogenic Hras induces bladder hyperplasia but progression

to papillomas depends upon additional genetic events³⁴. Contrary to Fgfr3 and Hras, our findings in the Ncstn mouse model indicate that Notch signaling abrogation is a "driver" tumorigenic event. We hypothesize that Notch signaling abrogation either has a stronger effect on Erk1/2 phosphorylation than Fgfr3 or Ras mutation, or that it exerts unknown Erk1/2-independent functions that facilitate tumorigenesis. Notch pathway mutations are equally common in superficial and invasive tumors. This is important because a "classical" driver mutation in muscle-invasive bladder cancers has yet to be discovered. We show that inhibition of MAPK phosphorylation with MEK inhibitors and Notch pathway activation in human TCC cells leads to growth suppression. Given the fact that Notch pathway agonists are available, studies aiming at assessing its therapeutic potential in bladder cancer but also other MAPK-dependent tumors become a priority.

Methods

Human specimens: Bladder tissue specimens were obtained from 72 bladder cancer patients having undergone transurethral resection of bladder tumors (TURBT) for primary non muscle-invasive bladder cancer (NMIBC; Ta, T1) or radical cystectomy (RC) for primary muscle-invasive bladder cancer (MIBC; T2-T4), at "Laikon" General Hospital, Athens, Greece (**Supplementary Table 1**). Additionally, normal adjacent tissue specimens, from the same patients' cohort, were included in the study as reference samples, following the pathologist's evaluation for the absence of CIS and dysplasia. All patients were diagnosed with urothelial carcinoma based on histopathological criteria and none of them had received therapy prior to surgery. Following the pathologist's evaluation of the tissue mirror-image specimen, samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing. Patients who had received hormonal therapy or radiotherapy prior to the surgery were not included in our study. Our study was performed according to the ethical standards of the 1975 Declaration of Helsinki, as revised in 2008, and approved by the ethics committee of "Laiko" General Hospital. Informed consent was obtained from all the participating patients.

Mice: Animals were housed in individually ventilated cages under specific pathogen free conditions, in full compliance with FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations) recommendations, in the Animal House Facility of the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA, Greece). All procedures for care and treatment of animals were approved by the Institutional Committee on Ethics of Animal Experiments and the Greek Ministry of Agriculture.

Sanger sequencing. RNA from healthy and cancerous tissue was reverse transcribed with random primers and used in PCR reactions to obtain overlapping amplicons 600-800 bp that cover the whole coding region (CDS) of the Notch pathway genes. Oligonucleotide sequences are provided in **Supplementary Table 10**. PCR fragments were sequenced in both strands with standard Sanger sequencing procedures. For patients with more than one mutation in the same gene, mutations were amplified in the same amplicon (distance permitting), which was subsequently subcloned in TOPO vector (Life Technologies). Individual clones were sequenced and the mutations were found in individual clones implying that they were located in different alleles.

Sequence annotations: Nucleotide and amino acid positions described in Supplementary Table 1 refer to the following database entries: *NOTCH1*, NM_017617 and NP_060087.3; *NOTCH2*, NM_024408.3 and AAG37073.1; *NOTCH3*, U97669.1 and NP_000426.2; *MAML1*, NM_014757.4 and NP_055572.1; *NCSTN*, NM_015331 and NP_056146.1.

Tissue processing and quantitative real-time PCR (qPCR): Total RNA was isolated with the use of Tri reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) and reverse transcribed with MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo-dT (from tumor samples) or random primers (from cell lines and mouse tissue). The qPCR was performed in the 7500 Real-Time PCR System using the sequence detection software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The 10 µl reaction mixture consists of Kapa SYBR® Fast Universal 2X qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA). Gene expression analysis was carried out using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ relative quantification (RQ) method³⁵. Duplicate reactions were performed for each tested sample and the average CT (Avg. CT) was calculated for the quantification analysis. *HPRT1* was used as an endogenous reference control. Oligonucleotide sequences for are available upon request.

Adenoviral transduction: AdN1ic and AdJAG1 vectors were generous gifts from Drs. Paolo Dotto and Mark Post, respectively. We generated the AdN2ic vector using the pAd/PL-DEST Gateway vector (Invitrogen Life Technologies). In all experiments, the multiplicity of infection (MOI) was 10. **Chromatin immunoprecipitation**: T24 and HTB9 cells were transduced either with a control recombinant adenovirus expressing *E.coli* beta-galactosidase (AdLacZ) or with a recombinant adenovirus expressing the intracellular domain of Notch1 receptor (AdN1ic) for 72 hours before cross-linking with 1% formaldehyde at room temperature for 10 minutes. ChIP assay was performed by using SimpleChIP enzymatic chromatin IP kit (#9003, Cell Signaling Technology) according to the manufacturer's instructions. The DNA–protein complexes were immunoprecipitated using 5 µg of anti-Notch1 antibody (C-20 Clone, sc-6014, Santa Cruz) or normal rabbit IgG (sc-2027, Santa Cruz) as negative control. The bound DNA fragments were subjected to real-time PCR with SYBR green.

Luciferase assays: A CSL-reporter plasmid (TP1-Luc) was co-transfected with pcDNA3 plasmids expressing NOTCH1, NOTCH2, MAML1 or NCSTN cDNAs which were either WT or carried the mutation under investigation. As a control we used an empty pCDNA3 vector. We used β -galactosidase for transfection normalization. For N1 and N2, mutations in the intracellular (ic) portion were introduced into pCDNA3 expressing only the intracellular domain. All validations were performed in HEK293T cells except those located in the extracellular domain of N1 and N2. These mutations were introduced into primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) generated from mice homozygous for the conditional alleles of *Notch1* and *Notch2* and the knockout alleles of *Notch3* (*N1^{ff};N2^{ff};N3^{-/-}*). Prior to transfection, MEFs were infected with an adenovirus expressing Cre recombinase (AdCre) and AdJAG1 in order to reduce endogenous

background and increase the activation status of the pathway. Cells were harvested 48 hours post-transfection for luciferase assays and beta-galactosidase colorimetric assays.

Histology and antibodies: Tissues were harvested and fixed in 4% formaldehyde. Standard dehydration, embedding and sectioning protocols were used for H&E or antibody staining. The following antibodies from Cell Signaling were used: N1 full length, 3608S; N1ic, 4147S; N2, 4530S; pERK1/2, 4376S; ERK1/2, 91102S; pMEK1/2, 9154S; MEK1/2, 9126S; DUSP1, 2857S; DUSP6, 3058S; DUSP10, 3483; PP2A, 2039S; Ncstn, 9447S. In addition, we used the following antibodies: sc-8303 and sc-46927 (Santa Cruz) for JAG1 and DUSP5, respectively; Z0622 and IR083 (DAKO) for Pankeratin and Cyclin D1, respectively; ab15580 (Abcam) for Ki67 and PRB-160P (Covance) for Cytokeratin 5.

Copy number assays: *NOTCH1* copy number variations were assessed with TaqMan Copy Number Assays (Applied Biosystems) using a probe (Hs03708325_cn) located within intron 22 (Chr.9:139388896-1394402) of the human *NOTCH1* locus. Normalizations were performed using *RNase* P TaqMan Copy Number Reference Assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, in the 7500 Real-Time PCR System. CopyCaller software (Applied Biosystems) was used for the copy number variation analysis.

Expression microarrays: Total RNA was isolated from ureter tumors of *R26rtTA;teto-Cre;Ncstn^{f/f}* or healthy ureters of age-matched *C57Bl/6* mice with the Macherey Nagel NucleoSpin RNA kit (740955). Affymetrix platform mm430_2.0 was used to measure gene expression differences between tumor and normal tissue. Each group consisted of

two independent biological replicates. MAS5.0 algorithm was used for background correction and median per chip normalization was performed in each array. In order for a gene to be considered as expressed it should fulfill the following criteria: i) flag according to MAS5.0 should be 'Present' (P) or 'Marginal' (M) at least in one of the two replicates, and ii) intensity of the genes should be above 50 at least in one of the samples in the study group (tumor or normal). Student's t-test was performed in order to compare our groups (tumor vs. normal). A 1.5 fold change cut off and *p*-value below 0.10 were used as filters in order to identify differentially expressed genes.

Accession numbers: The microarray data can be found in the Gene Expression Omnibus with accession number GSE5489. Sequencing data are available at the Trace Archive with accession number XXX.

Acknowledgements

We would like to thank Drs. J. Kitajewski, P. Dotto, M. Post, D. Stravopodis and K. Zoi for donating reagents, Dr. S. Artavanis-Tsakonas for donating mice, Ms Z. Kanaki for pronuclear injections for the generation of the *UpII-CreEGFP* line, Dr. M. Roubelaki for help with the cell cycle analysis, and Dr. A. Efstratiadis for critically reading the manuscript. This work was supported by a Marie Curie Reintegration grant (N° 224821), a Greek General Secretariat for Research and Technology "Excellence" grant (UTN_1799) and a Fondation Santé Grant in Biomedical Sciences to AK.

Author contributions

AK and TR conceived the study and designed all experiments. TR, PV and MA

performed all experiments. AP analysed expression array data. CV performed the mouse

histology analysis. AS and KS provided the library of human tumor samples. AK wrote

the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to

aklinakis@bioacademy.gr

References and Notes

- 1. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776 (1999).
- 2. Lobry, C., Oh, P. & Aifantis, I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *The Journal of experimental medicine* **208**, 1931-1935 (2011).
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300 (2010).
- 4. Cordon-Cardo, C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 154-165 (2008).
- 5. Knowles, M.A. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol* **13**, 287-297 (2008).
- 6. Nicolas, M., *et al.* Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nature genetics* **33**, 416-421 (2003).
- 7. Lefort, K., *et al.* Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes & development* **21**, 562-577 (2007).
- 8. Klinakis, A., *et al.* A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature* **473**, 230-233 (2011).
- 9. Wang, N.J., *et al.* Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 17761-17766 (2011).

- 10. Agrawal, N., *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **333**, 1154-1157 (2011).
- 11. Stransky, N., *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157-1160 (2011).
- 12. Jerez, A., *et al.* Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 1343-1349 (2012).
- 13. Kimura, F., *et al.* Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *British journal of cancer* **85**, 1887-1893 (2001).
- 14. Adzhubei, I.A., *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* **7**, 248-249 (2010).
- 15. Funahashi, Y., *et al.* A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. *Cancer research* **68**, 4727-4735 (2008).
- 16. Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **507**, 315-322 (2014).
- 17. Guo, G., *et al.* Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nature genetics* **45**, 1459-1463 (2013).
- 18. Iyer, G., *et al.* Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 3133-3140 (2013).
- 19. Cazier, J.B., *et al.* Whole-genome sequencing of bladder cancers reveals somatic CDKN1A mutations and clinicopathological associations with mutation burden. *Nature communications* **5**, 3756 (2014).
- 20. Cerami, E., *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* **2**, 401-404 (2012).
- 21. Weng, A.P., *et al.* Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Molecular and cellular biology* **23**, 655-664 (2003).
- 22. Maraver, A., *et al.* Therapeutic effect of gamma-secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma by derepression of DUSP1 and inhibition of ERK. *Cancer cell* **22**, 222-234 (2012).
- Yu, H.M., Liu, B., Chiu, S.Y., Costantini, F. & Hsu, W. Development of a unique system for spatiotemporal and lineage-specific gene expression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8615-8620 (2005).
- 24. Perl, A.K., Wert, S.E., Nagy, A., Lobe, C.G. & Whitsett, J.A. Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10482-10487 (2002).

- 25. Karni-Schmidt, O., *et al.* Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression. *The American journal of pathology* **178**, 1350-1360 (2011).
- 26. Shin, K., *et al.* Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nature cell biology* **16**, 469-478 (2014).
- 27. Choi, W., *et al.* Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscleinvasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer cell* **25**, 152-165 (2014).
- 28. Ho, P.L., Kurtova, A. & Chan, K.S. Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *Nature reviews. Urology* **9**, 583-594 (2012).
- 29. Buonamici, S., *et al.* CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* **459**, 1000-1004 (2009).
- 30. Dotto, G.P. Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. *Nature reviews. Cancer* **9**, 587-595 (2009).
- 31. Han, H., *et al.* Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *International immunology* **14**, 637-645 (2002).
- 32. Barker, N., *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**, 608-611 (2009).
- 33. Ahmad, I., *et al.* K-Ras and beta-catenin mutations cooperate with Fgfr3 mutations in mice to promote tumorigenesis in the skin and lung, but not in the bladder. *Disease models & mechanisms* **4**, 548-555 (2011).
- 34. Zhou, H., *et al.* Urothelial tumor initiation requires deregulation of multiple signaling pathways: implications in target-based therapies. *Carcinogenesis* **33**, 770-780 (2012).

Figure legends

Figure 1. Identification, molecular characterization and clinical impact of Notch

pathway alterations in TCC patients.

(a) Distribution of mutations in *NOTCH1* (red), *NOTCH2* (blue) and *NOTCH3* (yellow)

receptors. Horizontal arrows (in-frame deletions) and bars (frameshift deletions) indicate

the missing portion of the protein, circles indicate missense and squares nonsense single

amino acid replacements. (b) Copy Number Variations (CNV) of the NOTCH1 locus

(9q34.3) in TCC patients. (c) Remaining activity of NOTCH1 (red), NOTCH2 (blue),

MAML1 (green) and NCSTN (purple) mutant proteins obtained from *in vitro* luciferase assays. To the right, Western blot analysis with protein lysates from *Notch1^{ff};Notch2^{ff};Notch3^{-/-}* mouse embryonic fibroblasts showing Notch1 and Notch2 loss upon AdCre transduction. (**d**) Kaplan-Meier analysis of overall survival of all (left) or muscle-invasive (right) bladder cancer patients in regard to the presence of Notch pathway alterations (Mutations and/or *NOTCH1* CNL; Mut/loss) or not (wild-type; WT). "n" refers to the number of patients and events refers to deaths or cases of disease recurrence. *P* value calculated by log-rank test. (**e**) Notch target genes' expression ratio (cancer vs healthy) in patients with and without Notch pathway mutations and/or *NOTCH1* CNL. *p* value calculated by Mann-Whitney *U* test.

Figure 2. TCC patients with mutations in the Notch pathway alone or in combination with *FGFR3*/RAS mutations show increased ERK1/2 phosphorylation.

(a) Hit map depicting mutations (orange) in the indicated genes, copy number gains (red) and losses (blue) in the Notch locus for each patient individually. (b) A significant percentage of patients with Notch pathway mutations and/or *NOTCH1* CNLs (c) respectively, does not carry additional mutations in the *FGFR3* and RAS oncogenes. (d) Immunohistochemistry with anti-pERK1/2 antibodies on paraffin sections and (e) Western blot analysis with protein lysates from TCC patients with variable Notch, *FGFR3* and RAS mutational profile. Ratio values were calculated by dividing pixel counts obtained with ImageJ software. Healthy (H) and tumor (Tu) pairs are also shown for comparison purposes. (f) pERK1/2 levels correlate with Notch pathway alterations. *p*

values calculated with Mann-Whitney U test. (g) Schematic representation of the signaling components and individual mutation frequency for each gene.

Figure 3. Notch1 suppresses TCC cell growth and ERK1/2 phosphorylation through direct DUSP transcriptional upregulation.

(a) MTT assays (top) showing growth suppression of TCC lines transduced by adenoviral vectors expressing the intracellular domain of human NOTCH1 (AdN1ic) or LacZ (AdLacZ). Measurements were taken at 0, 2, 4 and 6 days post-infection. Cell cycle analysis (bottom) of T24 cells treated with AdLacZ (left; two days post-infection), or AdN1ic 12 hrs (middle) and two days (right) post-infection. (b) Western blot analysis on protein lysates of the indicated TCC cells. (c) Western blot analysis on protein lysates from T24 TCC cells transduced with increasing multiplicity of infection (MOI) with AdJAG1 vectors expressing the full length human JAG1 cDNA. Untransduced or AdLacZ-transduced cells are used as a control. (d) MTT assays on TCC cells after a 72hour treatment with the indicated concentrations of the MEK inhibitor PD98059 and Western blot analysis of cell lysates with pERK1/2 and total ERK1/2 antibodies. (e) Real time qPCR data from T24 cells transduced with AdLacZ, AdN1ic or AdJAG1. Known Notch targets genes (*HES1*, *HEY1*, and *HEY2*) are used as control. (**f**) Real time qPCR data from TCC cell lines transduced with AdLacZ or AdN1ic (presented values indicate fold difference in AdN1ic over AdLacZ). (g) Western blot analysis on protein lysates from TCC cells. (h) DUSP expression (qPCR data) in DAPT-treated TCC cells. (i) MTT assays with T24 MAML1dn and control T24 cells at 0, 2, 4 and 6 days (left), and real time qPCR data for DUSPs in T24 MAML1dn cells (right). (j) ChIP experiments from

AdN1ic-transduced T24 and HTB9 cells showing that certain DUSPs are direct transcriptional targets of N1. The graph represents fold enrichment of the respective promoter region in immunoprecipitations with anti-N1 antibodies in comparison to control IgG. The average of three independent experiments is presented. For all experiments, lysates, RNA or chromatin were prepared 72 hours post-infection. Error bars represent the standard error of the mean (SEM).

Figure 4. Mouse models of urothelial cancer.

(a) Hydronephrotic and normal kidneys from experimental (n=18; 12 showed the)phenotype) and "rescued" mice (n=7), respectively. Doxycycline (2 mg/ml) was added to the drinking water upon weaning for a period of seven days. (b) H&E staining of a normal ureter and a ureteral tumor from *R26rtTA*;*teto-Cre*;*Ncstn*^{ff} mice. The arrows indicate the site where the tumor has disrupted the muscularis propria. Pankeratin, pERK, Ki67, Cyclin D1 and p63 stainings on the same tumor. (c) Immunofluorescence (IF) showing (from left to right) a ureteral tumor with strong staining for Cytokeratin 5 (CK5), a normal ureter with nuclear staining for N1 (N1ic), a tumor lacking N1ic and a ureter from a R26rtTA; teto-Cre; Nic^{f/f}; Ef1/N1ic mouse. Pankeratin and DAPI are used as counterstains. (d) Age (in months) and histological findings of the UpII-*CreEGFP*;*Ncstn^{f/f}* mouse cohort. Arrows correspond to individual mice. BI-SH: Bladder simple hyperplasia; Bl-NH: Bladder nodular hyperplasia; Bl-CIS: Bladder carcinoma in situ; UrCa: ureter cancer. (e) H&E staining from normal bladder and three different stages of bladder cancer from *UpII-CreEGFP*;*Ncstn^{f/f}* mice: simple hyperplasia, nodular hyperplasia, carcinoma in situ (CIS). Staining with Pankeratin, Ki67, pERK1/2 and p63

are also shown. (**f**) Immunofluorescence (IF) against CK5 on normal and hyperplastic bladder showing significant expansion of CK5-positive cells in the latter, and N1ic indicating the complete absence of Notch pathway activation in a bladder and ureter tumor from *UpII-CreEGFP;Ncstn^{f/f}* mice. Pankeratin and DAPI are used as counterstains. All IF stainings were photographed with a Leica TS5 II confocal on an upright microscope (Leica DM6000 CFS). Scale bars: 50µm.

Supplementary Figure 1. Notch signaling pathway activation in normal human bladder epithelium.

Immunofluorescence on paraffin sections of normal human bladder stained with antibodies recognizing full length NOTCH1 (N1), cleaved N1 (N1ic), cleaved and fulllength NOTCH2 (N2), and JAG1. Sections were counterstained with a Pankeratin antibody (CK) and DAPI, and photographed with a fluorescence microscope (model BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) connected to a cooled CCD camera (SenSys, Photometrics).

Supplementary Figure 2. Notch signaling pathway activation in normal human ureter.

Immunofluorescence on paraffin sections of normal human ureter stained with antibodies recognizing full-length NOTCH1 (N1), cleaved NOTCH1 (N1ic), cleaved and full-length NOTCH2 (N2), and JAG1. Sections were counterstained with DAPI, and photographed with a Leica TS5 II confocal on an upright microscope (Leica DM6000 CFS).

Supplementary Figure 3. Allele-specific mutation analysis.

Chromatographs of the sequenced amplicon as well as of individual TOPO clones of the respective amplicon. Mutations c.C3859T and G4082A from patient TCC67 are found in different clones indicating that they are located in different alleles. This was the case also for mutations c.T5645C and c.C6365T of the same patient (not shown here).

Supplementary Figure 4. Tumor vs. normal sequence verification of somatic mutations.

Chromatograph pairs of tumor (top) and corresponding healthy (bottom) tissue indicating the somatic mutations identified. Arrows indicate the double peak in the tumor sample (only for single nucleotide changes).

Supplementary Figure 5. Analysis of DUSP1, DUSP2 and DUSP5 expression levels in bladder cancer tissues.

(a) Kaplan-Meier analysis of overall and disease-free survival of bladder cancer patients in regard to expression levels of Notch target genes. According to X-tile algorithm cut-off values for *HES1*, *HEY1* and *CDKN1A* were adopted at the 55th, 50th and 62nd percentile, respectively, of the patients' expression levels. "n" refers to the number of patients and "events" refers to deaths or cases of disease recurrence. *p* value calculated by log-rank test. (b) CDKN1A and HES1 levels in the four different bladder cancer subtypes (BLCA1-4); *p* value calculated by Mann-Whitney *U* test. (c) Kaplan-Meier analysis of overall survival of the TCGA cohort of bladder cancer patients in regard to expression levels of HES1. (d) DUSP levels related to the presence of Notch pathway mutations and *NOTCH1* copy number loss. Group A: Control cohort, Group B: Bladder cancer patients with low HEY1 expression.

Supplementary Figure 6. Notch2 suppresses TCC cell growth and ERK1/2 phosphorylation through DUSP overexpression.

(a) MTT assays showing growth suppression of TCC lines transduced with adenoviral vectors expressing the intracellular domain of human NOTCH2 (AdN2ic) or LacZ (AdLacZ). Measurements were taken at 0, 2, 4 and 6 days post-infection. (b) Western blot analysis on protein lysates of the indicated TCC cells. (c) Real time qPCR data from T24 cells. Lysates and RNAs were prepared 72 hours post-infection. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). (d) Functional validation of NOTCH2 mutations A2025E and Q2223X. TCC RT4 cells were transfected with wild-type and mutant NOTCH2-expressing plasmids. RNA was harvested two days post-transfection, reverse transcribed and used in qPCR for Notch targets. Values presented correspond to normalized expression in comparison to wild-type NOTCH2 which is set as 100% for each gene.

Supplementary Figure 7. Notch signaling pathway activation in normal mouse bladder epithelium.

(a) Eight-week old bitransgenic *Notch1-CreERT2;R26-Tm* mice, expressing CreERT2 under the control of the *Notch1* locus³⁶ (kind donation of Dr. S. Artavanis-Tsakonas) and the fluorescent protein Tomato under the *ROSA26* locus³⁷, respectively, were injected with Tamoxifen five consecutive times (1mg per injection) and sacrificed. Anti-Ck5

antibodies that mark the basal and intermediate layers, and DAPI were used as counterstain. (**b**) Immunofluorescence on paraffin sections of normal mouse bladder stained with antibodies recognizing exclusively cleaved Notch1 (N1ic) and Jag1. Sections were counterstained with a Pankeratin antibody (CK) and DAPI. Sections were photographed with a Leica TS5 II confocal on an upright microscope (Leica DM6000 CFS). Scale bars: 50µm.

Supplementary Figure 8. Molecular characterization of mouse urothelial tissue lacking Notch activity.

(a) Unsupervised hierarchical clustering (Pearson correlation coefficient) of normalized values from expression arrays of normal and cancerous mouse ureters. A gene ontology cell cycle signature (left) and selected genes (right) are presented. Heatmaps and clustering were performed with the TMeV software. (b) Heatmaps indicating the correlation of mouse tumors with the BLCA1-4 human bladder subtypes. Correlation for each mouse tumor was calculated based on the overlapping genes of the 2708 gene signature used for human bladder cancer subtyping¹⁶, and those exhibiting two-fold change in the tumor vs. normal comparison in mice (number of overlapping genes: 1235 for mouse tumor 1, and 1032 for mouse tumor 2). (c) Western blot with Ncstn antibodies on mouse primary ureter tumor cells (P3) and control human TCC lines (top), and with pERK1/2 and total ERK1/2 antibodies on P3 cells untransduced or transduced with an adenovirus carrying the intracellular N1 (N1ic) or LacZ (bottom). (d) Western blot (left) and real time qPCR (right) from wild-type bladder tissue explants cultured *ex vivo* for three days and treated with DAPT (10uM). (e) Real-time qPCR on bladder tissue explants

from conditional *Cbf1* knockout mice transduced with adenoviral vectors expressing either LacZ or Cre recombinase.

Supplementary Figure 9. Recombination pattern of the Cre lines used.

(a) X-gal staining on tissues of tritransgenic *R26rtTA;teto-Cre;R26LacZ³⁸* mice which express β-galactosidase upon Dox administration in a Cre-dependent manner.
Recombination is restricted in urothelial cells of the ureter, bladder and renal pelvis.
Ubiquitous response of the teto-Cre transgene is lost presumably due to a genetic background switch from the original *FVB* to a mixed but primarily *C57Bl/6* background.
(b) Schematic representation of the UpII-CreEGFP construct injected in *CBA/C57Bl/6* mice (left) and genotyping of transgenic mice (right; Upk2F: ctgaggctacagtgccca; CreR: atgtttagctggcccaaatg).
(c) Native EGFP fluorescence in the ureter and bladder of *UpII-CreEGFP* mice.
(d) X-gal staining on the bladder of bitransgenic *UpII-*

CreEGFP;R26LacZ mice. Arrows indicate basal and/or intermediate cells in which recombination did not occur. (e) Immunofluorescence against Ck5 on frozen sections from *Up2-Cre;R26-Tm mice*³⁷ showing Ck5-positive cells in which Cre is active and recombination has occurred (yellow arrows) or Ck5-positive cells with no recombination (green arrows) and Ck5-negative cells showing Tomato fluorescence (red arrows). Scale bars: 50µm.

Supplementary References

- 35. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
- 36. Fre, S., *et al.* Notch lineages and activity in intestinal stem cells determined by a new set of knock-in mice. *PloS one* **6**, e25785 (2011).
- 37. Madisen, L., *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* **13**, 133-140 (2010).
- 38. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* **21**, 70-71 (1999).
Figure 1











Figure 2

Figure 3



Figure 4











Supplementary Figure 4 continued



Supplementary Figure 4 continued





BLCA1 BLCA2

BLCA2 BLCA3

BLCA4



а

100-

80













d









Patient	Grade (WHO 1973)	Grade (WHO 2004)	Tumor Stage	Age (years)	Gender
TCC1	3	High	T2	67	<u> </u>
<u>1CC2</u>	3	High	12 T-	76	<u>M</u>
	2	LOW	1a T2	66	<u> </u>
TCC6	3	High	T3	79	M
TCC7	2	Low	Ta	68	M
TCC8	1	Low	Та	62	М
TCC9	3	High	T3	54	М
TCC14	3	High	T2	45	M
<u>TCC15</u>	2	Low	Ta	82	<u>M</u>
TCC16	3	High	T1	88	M
TCC20	3	High		Unknown	<u>M</u>
TCC23	3	High	T3	88	M
TCC24	3	High	T1	78	М
TCC25	3	High	T3	71	M
TCC27	2	Low	Ta	63	<u>M</u>
TCC30	3	High	1a T4	70	N
TCC31	3	High		71	 M
TCC32	2	High	T1	76	M
TCC33	2	Low	Та	73	М
TCC34	2	Low	Та	85	<u>M</u>
TCC35	3	High	T2	Unknown	<u>M</u>
TCC37	1	Low	1a 	<u> </u>	<u>M</u>
TCC39	2	Low	T1	62	<u>M</u>
TCC40	2	Low	Та	58	М
TCC41	3	High	T2	85	М
TCC43	3	High	T2	64	<u>M</u>
TCC45	3	High	13 T2	69	<u>M</u>
TCC48		Low	T1	52	 F
TCC50	3	High		79	 M
TCC51	3	High	T4	62	M
TCC53	3	High	T3	80	М
TCC56	1	Low	Ta	50	<u>M</u>
TCC60	2	Low	<u> </u>	78	<u> </u>
TCC73	3	High	 	74	<u></u> M
TCC80	3	High	T2	74	M
TCC85	2	Low	Та	85	М
TCC90	2	Low	T1	73	М
TCC91	3	High	T2	75	<u>M</u>
TCC92	3	High	11 T2	<u>60</u> 75	<u>M</u>
TCC98	3	High	T2	65	<u>M</u>
TCC99	3	High	T3	72	F
TCC114	2	Low	Та	48	М
TCC115	2	Low	Ta	Unknown	M
TCC116	2	Low	Ta	87	<u>M</u>
TCC118	2	Low	<u>та</u> Та	61	<u>г</u> М
TCC119	2	Low		Unknown	M
TCC126	1	Low	Та	78	М
TCC127	3	High	T2	85	М
TCC128	3	High	<u>T1</u>	Unknown	<u> </u>
TCC129	2	High	11 To	Unknown	<u>M</u>
TCC130	2	Low	 T1	62	<u></u> M
TCC132	2	Low	Та	70	M
TCC141	3	High	T2	75	М
TCC142	3	High	T1	76	M
TCC144	3	High	<u>T2</u>	72	F
TCC145	3	High	14 T2	/5	<u>M</u>
TCC148	2	Low	Ta	unknown	<u></u> M
TCC157	2	Low	Та	79	M
TCC159	3	High	T1	74	М
TCC161	2	Low	Та	63	F
TCC162	3	High	Ta	56	<u>M</u>
100164	3	High	12	51	F

Supplementary Table 1. Unnical characteristics of the TCC pa	uenus
--	-------

		NOTCH 1	NOTCH 2	NOTCH 3	MAML1	NICASTRIN	Notch pathway
Variable	No. of patients	No of patients					
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Grade							
Low	29 (40.3)	6 (20.7)	5 (17.2)	0	3 (10.3)	0	13 (44.8)
High	43 (59.7)	8 (18.6)	4 (9.3)	2 (4.6)	6 (14.0)	3 (7.0)	18 (41.9)
Stage							
Superficial (Ta, T1)	40 (55.6)	8 (20.0)	5 (12.5)	0	5 (12.5)	0	17 (42.5)
Muscle-invasive (T2-T4)	32 (44.4)	6 (18.8)	4 (12.5)	2 (6.2)	4 (12.5)	3 (9.4)	14 (43.8)

Supplementary Table 2. Distribution of mutations with regard to the tumor grade (WHO 2004) and stage.

Patient	Gene	Nucleotide	Protein	PolyPHEN-2 ^a	N1 Copy
TCC3	MAML1	c.2235_2667del	p.F746LfsX5		Loss
TCC6	NOTCH1	c.T745C	p.F249L	D/D	
	NOTCH1	c.3781_3900del	p.V1261_H1300del		Neutral
	NOTCH3	c.G2401ins/del	p.G800LfsX1		
	MAML1	c.1456_1813del	p.P485L_S604del		
	NICASTRIN	c.C1747T	p.R583X		
TCC9	NOTCH1	c.5646_5886del	p.G1882_G1962del		Neutral
TCC17	NOTCH1	c.G689T	p.G230V	D/D	N. sectors 1
	NOTCH1	c.3743_3902del	p.V1249AfsX142		Neutral
TCC20	NOTCH1	c.T3511C	p.C1171R	D/D	Laga
ICC20	NOTCH2	c.2366_2752del	p.P881_F1009del		Loss
TCC27	NOTCH1	c.T3511C	p.C1171R	D/D	Loss
TCC29	MAML1	c.916_1203del	p.A306_DfsX60		Loss
TCC30	NICASTRIN	c.T435del	p.F145LfsX57		Loss
TCC32	NOTCH2	c.C6667T	p.Q2223X		Loss
TCC33	NOTCH1	c.T1769A	p.L590H	B/B	Gain
TCC34	MAML1	c.A2399C	p.N800T	D/D	Loss
TCC37	NOTCH1	c.T4855ins/del	pY1619TfsX70		Neutral
TCC39	NOTCH1	c.G6436A	p.R2179Q	D/B	т
	NOTCH2	c.4194_4365del	p.Q1497HfsX47		Loss
TCC40	NOTCH2	c.C6667T	p.Q2223X		Loss
TCC45	NOTCH2	c.C6074A	p.A2025E	D/D	Loss
TCC50	NOTCH2	c.C1726T	p.P576S	D/D	Neutral
TCC56	NOTCH2	c.G2731T	p.D914Y	D/D	Neutral
TCC67	NOTCH1	c.G4082A	p.G1361D	D/D	N. sectors 1
	NOTCH1	c.C3859T	p.R1287C	D/D	Neutral
	NOTCH1	c.C6365T	p.P2122L	D/D	
	NOTCH1	c.T5645C	p.F1882S	D/D	
	NICASTRIN	c.A329G	p.K110R	B/B	
TCC80	MAML1	c.A1471G	p.8491G	B/B	L
	MAML1	c.T1757C	p.V586A	B/B	Loss
TCC85	NOTCH1	c.C4639T	p.Q1548X		I
	NOTCH1	c.G3988C	p.A1330P	B/B	Loss
TCC96	NOTCH2	c.C4369T	p.L1457F	D/D	Gain
TCC114	NOTCH2	c.G4420del	p.D1474IfsX79		Loss
TCC118	NOTCH1	c.A1529G	p.N510S	B/B	Neutral
TCC127	NOTCH3	c.G2648A	p.R883Q	D/D	Coin
	NOTCH3	c.G4852A	p.E1618K	B/D	Gain
TCC129	MAML1	c.C2444T	p.T815I	D/D	Neutral
TCC144	NOTCH1	c.A605T	p.Y202F	B/B	Loss
TCC145	MAMLI	c.C1286A	p.T429K	D/B	Neutral
TCC146	NOTCH1	c.G226A	p.V76M	B/B	Loss
TCC157	NOTCH1	c.A311G	p.N104S	B/B	Loss
TCC162	MAML1	c.A2399C	p.N800T	D/D	Loss
TCC164	MAML1	c.C2444T	p.T815I	D/D	Neutral

Supplementary	7 Table 3. Description	of Notch pathway	alterations and	d PolyPHEN-2	predictions.
---------------	------------------------	------------------	-----------------	--------------	--------------

^a PolyPHEN-2 is an algorithm that utilizes homology (Humdiv) and structural (Humvar) parameters for the prediction of possible impact exclusively of amino acid replacements on protein structure and function.

Gene	SNP	Туре	rs	Genomic	Transcript	Protein	rs MAF ^a
NOTCH1		-JF-			F		
				NC_000009.11;g.139418260A>G;			
	N104N	synonymous	4489420	NG 007458.1:g.26979T>C	NM 017617.3:c.312T>C	NP 060087.3:p.Asn104Asn	2.93E-01
				NC 000009.11:g.139418261T>C;			
	N104S	nonsynonymous	199654211	NG_007458.1:g.26978A>G	NM_017617.3:c.311A>G	NP_060087.3:p.Asn104Ser	NA
				NC_000009.11:g.139413908C>T;			
				NG_007458.1:g.31331G>A;	NM_017617.3:c.852G>A;		
	P284P	synonymous	2229975	NG_007458.1:g.31331G>C	NM_017617.3:c.852G>C	NP_060087.3:p.Pro284Pro	1.01E-01
				NC_000009.11:g.139407932A>G;			
	N755N	synonymous	2229971	NG_007458.1:g.37307T>C	NM_017617.3:c.2265T>C	NP_060087.3:p.Asn755Asn	4.44E-01
				NC_000009.11:g.139402715G>A;			
	S1098S	synonymous	61751546	NG_007458.1:g.42524C>T;	NM_017617.3:c.3294C>T	NP_060087.3:p.Ser1098Ser	3.21E-03
				NC_000009.11:g.139401289C>G;			
	V1260V	synonymous	201354526	NG_007458.1:g.43950G>C;	NM_017617.3:c.3780G>C	NP_060087.3:p.Val1260Val	4.59E-03
	D107011		(1751542	NC_000009.11:g.139401233C>T;		ND 0(0007.2 A 12701)	1.015.02
	R1279H	nonsynonymous	61751543	NG_00/458.1:g.44006G>A;	NM_01/61/.3:c.3836G>A	NP_060087.3:p.Arg1279His	1.01E-02
	D12770		(1751540	NC_000009.11:g.139400219G>A;	NR 017(17.2 41000 T	ND 0(0007.2 D 12770	0.705.00
	P13//S	nonsynonymous	61/51542	NG_00/458.1:g.45020C>1;	NM_01/61/.3:c.4129C>1	NP_060087.3:p.Pro13778er	8.72E-03
	D1609D		10521	NC_000009.11:g.139397707G>A;	NM 017617 2:2 5004 $C>T$	ND 060097.2 m A sp1608 A sp	4.17E.01
	D1098D	synonymous	10521	NG_00/438.1:g.4/332C>1	NM_01/61/.5:C.5094C>1	NP_060087.3:p.Asp1698Asp	4.1/E-01
	т1006т	aun on um olig	196452256	$NC_{000009.11:g.139393658C>1;}$	NIM 017617 2:0 5089C>A	NB 060087 2 m Thr1006Thr	1 84E 02
	119901	synonymous	180433330	NG_00/438.1.g.51381G/A	NM_01/01/.5.C.59880-A	NP_000087.3.p.1111990111	1.84E-05
	G1893G	synonymous	2220073	NC_000009.11.g.1595952590-A,	NM_017617_3 c 5679C>T	NP_060087.3 n Gly1893Gly	8 26E-03
	010/50	synonymous	222))13	$NC_{00000} 11_{\alpha} 130301636C > \Lambda$	NW_017017.5.C.5077C21	141_000087.5.p.0191895019	8.20L-05
	D2185D	synonymous	rs2229974	NG_007458 1.g 53603C>T	NM_017617_3 c 6555C>T	NP_060087_3 [.] n Asp2185Asp	3.05E-01
	D2105D	synonymous	132229971	NC_000009.11:g.139391506C>T·		111_000007.5.p.115p2105115p	5.051 01
	V2229Met	nonsynonymous	202096917	NG_007458 1 g 53733G>A	NM 017617 3 c 6685G>A	NP_060087_3 [.] n Val2229Met	NA
NOTCH2	(===) !!!!!	noneynonymoue	202030317				1.1.1
				NC_000001.10;g.120510784G>A;		NP_001186930.1:p.Pro394Ser:	
	P394P	synonymous	312262794	NG 008163.1:g.106493C>T	NM 024408.3:c.1180C>T	NP 077719.2:p.Pro394Ser	NA
		5 5		NC 000001.10;g.120480583G>A;	NM 001200001.1:c.3234C>T:	NP 001186930.1:p.Cvs107Cvs:	
	C1078C	synonymous	7543643	NG_008163.1:g.136694C>T	NM 024408.3:c.3234C>T	NP_077719.2:p.Cys1078Cys	6.06E-02
				NC 000001.10:g.120469147T>C;			
	D1327G	nonsynonymous	61752484	NG_008163.1:g.148130A>G	NM_024408.3:c.3980A>G	NP_077719.2:p.Asp1327Gly	2.75E-03
				NC_000001.10:g.120468201A>T;			
	L1413H	nonsynonymous	41313282	NG_008163.1:g.149076T>A	NM_024408.3:c.4238T>A	NP_077719.2:p.Leu1413His	3.67E-03
NOTCH3							
	p.Gly801delins			NC_000019.9:g.15295724_15295725insT;		NP_000426.2:p.Gly801delins	
	GlyLeufs	frameshift	35308509	NG_009819.1:g.21068_21069insA	NM_000435.2:c.2402_2403insA	GlyLeufs	NA
				NC_000019.9:g.15290007C>T;			
	V1183M	nonsynonymous	10408676	NG_009819.1:g.26786G>A	NM_000435.2:c.3547G>A	NP_000426.2:p.Val1183Met	6.66E-02
				NC_000019.9:g.15272001C>T;			
	A2146A	synonymous	1044008	NG_009819.1:g.44792G>A	NM_000435.2:c.6438G>A	NP_000426.2:p.Ala2146=	2.30E-02
MAMLI							
	95009		270755	NC_000005.9:g.179193598C>T;			2.1
	\$5298	synonymous	3/9/776	N1_023133.13:g.24004871C>T	NM_014757.4:c.1580C>T	NP_055572.1:p.Ser529=	NA
	0.50201		41005555	NC_000005.9:g.179195867G>A;			1 (15 00
	5585N	nonsynonymous	41285557	N1_023133.13:g.2400/140G>A	NM_014/5/.4:c.1/48G>A	NP_055572.1::p.Ser583Asn	1.61E-02
	P824L	nonsynonymous	01/53466	NC_000005.9:g.1/9201298C>1	NM_014/5/.4:c.24/1C>T	NP_055572.1::p.Pro824Leu	1.40E-03
	S1007N	nonsynonymous	6895902	NC 000005.9:g.179201847/G>A	NM 014/5/.4:c.3020G>A	NP 055572.1:p.Ser1007Asn	2.53E-01

Supplementary Table 4. List of reported SNPs identified in human TCC patients

NICASTRIN							
				NC_000001.1O:g.160318835G>A;			
	E79E	svnonvmous	34445546	NG 027935.1:g.10773G>A	NM 015331.2:c.237G>A	NP 056146.1:u.G1u79G1u	7.81E-03
				NC_000001.1O:g.160321065A>G;			
	L212L	synonymous	12239747	NG 027935.1:g.13003A>G	NM 015331.2:c.636A>G	NP 056146.1:p.Leu212Leu	8.95E-02

a Frequency in the population

Supplementary Table 5. SNPs found in individual TCC patients

NOTCH1	N104N, N104K, N104S	P284P	N755N	S1098S	V1260V	R1279H	P1377S	D1698D	G1893G	Т1996Т	V2229M	D2185D
	TCC148	TCC118	TCC9	TCC115	TCC117	TCC128	TCC16	TCC40	TCC16	TCC7	TCC16	TCC40
	TCC162	TCC36	TCC30			TCC149 (Homo)		TCC9				TCC39 (Homo)
	TCC157 (N104S)	TCC45	TCC40					TCC30				TCC9 (Homo)
	TCC3	TCC16	TCC20					TCC127				TCC17 (Homo)
	TCC5	TCC127	TCC115					TCC126				TCC67 (Homo)
	TCC118 (Homo) ^a	TCC85						TCC161 (Homo)				TCC126
	TCC30	TCC7						TCC7				TCC129
	TCC119	TCC24						TCC162				TCC85 (Homo)
	TCC96 (Homo)	TCC162						TCC80				TCC33 (Homo)
	TCC41							TCC3				TCC115 (Homo)
	TCC126							TCC1				TCC127 (Homo)
	TCC24											TCC131 (Homo)
	TCC127 (N104K)											TCC53
	TCC30											TCC162
												TCC141
												TCC49
												TCC8
NOTCH2	P394P	C1078C	D1327G	L1413H								
	TCC16	TCC27	TCC45	TCC39								
	TCC20	TCC22	TCC17	TCC45								
		TCC20	TCC128									
<i>NOTCH3</i>	p.Gly801delinsGlyLeufs	V1183M	A2146A									
	TCC30	TCC33	TCC114									
		TCC127	TCC56									
			TCC129									
MAML1	S529S	S583N	P824L	S1007N								
	TCC56	TCC131	TCC114	TCC114								
	TCC129	TCC67	TCC9	TCC127								
	TCC114			TCC56								
	TCC37			TCC129								
	TCC142			TCC9								
				TCC32								
				TCC36								
				TCC96								
				TCC161								
NICASTRIN	E79E	L212L										
	TCC127	TCC115										

^a Homozygous

NOTCH1	Protein	Transcript	Sample
	H75H	NM_017617.3:c.225C>T	TCC146
	I258I	NM_017617.3:c.774C>T	TCC53
	G519G	NM_017617.3:c.1557C>T	TCC17
	D932D	NM_017617.3:c.2799C>T	TCC9
	K1228K	NM_017617.3:c.3714G>T	TCC67
	T2132T	NM_017617.3:c.6399G>A	TCC67
	Q2395Q	NM_017617.3:c.7188G>A	TCC16
NOTCH2			
	G1337G	NM_024408.3:c.4311C>T	TCC27
NOTCH3			
	Т993Т	NM_000435.2:c.3055G>A	TCC36
	P2051P	NM_000435.2:c.6229T>A	TCC16
MAML1			
	S474S	NM_014757.4:c.1421C>A	TCC67

Supplementary Table 6. Synonymous mutations found in human TCC patients.

<u>~~</u> PP J	AC _m volue			NOTCH1 calculated	NOTCH1 Conv
Patient	Average ^a	$\Lambda\Lambda C_{T^{b}}$	2- مەر	copy number	Number Variation
TCC1	-0.60		1 31	2.62	GAIN
TCC2	-0.08	0.08	0.95	1.89	NEUTRAL
TCC3	0.00	0.00	0.51	1.02	LOSS
TCC5	-0.08	0.13	0.91	1.82	NEUTRAL
TCC6	-0.51	-0.31	1.24	2.48	NEUTRAL
TCC7	0.18	0.38	0.77	1.54	NEUTRAL
TCC8	-0.75	-0.53	1.44	2.89	GAIN
TCC9	-0.11	0.05	0.97	1.93	NEUTRAL
TCC14	0.08	0.29	0.82	1.64	NEUTRAL
TCC15	0.74	0.95	0.52	1.03	LOSS
TCC16	1.25	1.32	0.40	0.80	LOSS
TCC17	0.14	0.21	0.86	1.72	NEUTRAL
TCC20	0.50	0.70	0.62	1.23	LOSS
TCC24	1.36	1.57	0.34	0.67	LOSS
TCC25	0.68	0.89	0.54	1.08	LOSS
TCC27	0.30	0.50	0.71	1.42	LOSS
TCC29	1.39	1.60	0.33	0.66	LOSS
TCC30	2.13	2.34	0.20	0.40	LOSS
TCC31	-0.21	0.00	1.00	2.00	NEUTRAL
TCC32	0.44	0.65	0.64	1.27	LOSS
TCC33	-0.57	-0.36	1.29	2.58	GAIN
TCC34	0.46	0.66	0.63	1.27	LOSS
TCC35	-0.87	-0.66	1.58	3.16	GAIN
TCC36	1.03	1.10	0.47	0.93	LOSS
TCC37	-0.15	0.01	0.99	1.98	NEUTRAL
TCC39	2.20	2.35	0.20	0.39	LOSS
1CC40	0.95	1.16	0.45	0.89	LOSS
<u>TCC41</u>	-0.12	0.09	0.94	1.88	NEUTRAL
<u>TCC43</u>	-0.57	-0.36	1.28	2.56	GAIN
TCC45	0.79	1.00	0.50	1.00	LOSS
TCC48	0.31	0.72	0.61	2.17	LUSS
TCC50	-0.28	-0.12	0.83	2.1/	
	0.12	0.27	1.07	2.14	
	-0.18	-0.10	1.07	2.14	GAIN
	-0.41	-0.47	1.37	2.78	NELITRAL
TCC67	0.11	0.19	0.88	1.76	NEUTRAL
TCC73	-0.21	0.00	1.00	2 00	NEUTRAL
TCC80	0.34	0.00	0.71	1 42	LOSS
TCC85	0.24	0.45	0.73	1.47	LOSS
TCC90	1.59	1.80	0.29	0.57	LOSS
TCC91	3.00	3.19	0.11	0.22	LOSS
TCC92	0.40	0.47	0.72	1.44	LOSS
TCC96	-0.90	-0.86	1.81	3.62	GAIN
TCC99	0.65	0.86	0.55	1.10	LOSS
TCC114	1.30	1.54	0.35	0.69	LOSS
TCC119	0.60	0.82	0.56	1.13	LOSS
TCC127	-0.79	-0.63	1.54	3.08	GAIN
TCC130	0.09	0.30	0.81	1.62	NEUTRAL
TCC131	-0.09	0.12	0.92	1.85	NEUTRAL
TCC132	-0.11	0.11	0.93	1.85	NEUTRAL
TCC141	-0.38	-0.16	1.12	2.24	NEUTRAL
TCC142	-0.20	0.00	1.00	2.00	NEUTRAL
TCC144	1.28	1.48	0.36	0.72	LOSS
TCC145	0.21	0.41	0.75	1.51	NEUTRAL
TCC146	0.88	0.95	0.52	1.04	LOSS
TCC148	1.33	1.55	0.34	0.69	LOSS
TCC157	1.31	1.52	0.35	0.70	LOSS
TCC159	-0.25	-0.04	1.03	2.06	NEUTRAL
TCC161	1.35	1.42	0.37	0.75	LOSS
<u>TCC162</u>	0.92	1.13	0.46	0.91	LOSS
100164	-0.21	-0.05	1.04	2.07	NEUTRAL

Supplementary Table 7. Copy Number Variations in the N1 locus

^a Average (Avg.) Δ C_T value of two replicates per sample ^b Δ ΔC_T= Avg. Δ C_T ^{sample} – Avg. Δ C_T ^{calibrator}

PATIENT	FGFR3	HRAS	KRAS	PIK3CA
TCC1	~	G13V		P539R
TCC2	S249C			
TCC3	S249C/Y3/5C			
TCC6				
TCC7	Y375C			
TCC8	R248C			
TCC9				
TCC14				
TCC15		G12A		
TCC16				
TCC1/				
TCC20	\$249C			
TCC24	S249C			E545K
TCC25	52170	Q61H		Loton
TCC27				
TCC29	R248C			
TCC30	G382R	G12S		
TCC31	R248C			E545K
TCC32	\$2400			
TCC34	S249C			
TCC35	52470	O61H		
TCC36	R248C/G382R	~~~~		
TCC37				
TCC39				
TCC40				
TCC41	GO 1 0 G			
TCC43	S249C			
TCC45			061R	
TCC48	¥375C		Quik	
TCC50	15750			
TCC51				
TCC53				E542K
TCC56	Y375C			E545Q
TCC60				E542K
TCC67	S373C			
TCC/3	S240C			
TCC85	B249C			
TCC90	R248C			
TCC91	S249C			
TCC92	R248C			
TCC96	S249C			
TCC98				
TCC99				
TCC114				H1047V
TCC116			O61R	11107/1
TCC117	S249C		2011	
TCC118	Y375C			
TCC119		G13V		
TCC126	S249C			E545K
TCC127				
TCC128				
TCC130		0611		P539R
TCC131	R248C	2012		E545K
TCC132		Q61E		
TCC141	S249C			
TCC142				
TCC145				DC4017
TCC146				E545K
TCC148				П104/К
TCC149		O61R		H1047L
TCC159		20111		
TCC161	Y375C			
TCC162				
TCC164	R248C			

Supplementary Table 8. Mutations in FGFR3, RAS and PIK3CA genes

Cell line	<i>Notch</i> pathway	FGFR3	RAS	РІКЗСА	p53	RB	Grade
T24			HRAS ^{G12V}		Null		III
RT112					Het		Ι
RT4	N3 ^{P844S} ; N4 ^{C733S}	Overexpression					I
НТВ9					Null	Null	Ш
TCCSUP				E545K	Null	Null	IV
SVHUC-1 ^a							

Supplementary Table 9. Mutation profile and grade of the TCC cell lines used

^a SVHUC-1 originates from primary urothelial cells immortalized with the SV40 large T antigen Only known mutations are shown.

	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	MAML1	NICASTRIN
Alf	gcgcgtgtgcgtcccagc	agcgtagcgccagggcctga	aggctggcccgggacgcg	agcccgcggcccatggtgc	aggccgctaacagacaggagc
AlR	ccgacctcgttgtggcagg	tctgccgacaggtgcctcc	caggaagacaggcacagtcg	tcaggctcagaggaaatgact	tgtatttataggctttagcat
A2F	aggatgtcaacgagtgtggc	accagtgccagtgccctcagg	ctgtgcaccctcaccatgccg	agccttcacttgaatggaggc	agcatcaacccagaaatcgtc
A2R	aggggcaggtgcagatgg	acaaggattgctattggccat	gccctgcgtgttcacgcacctgcc	tctgctgccatgtggacatct	gaccttaggtcctgcctgagg
A3F	tcaacgacgcatgcatcagc	catctggatgatgcatgcat	tgccacgcggatgctatctg	agcaggccaccccggcaccag	atgggttcctgattaaagcca
A3R	agcagaggtaggcgttgtcg	cagttgtcaatgttctcctc	ccctaccacaggaacc	cagaggaccctgtgaactgtc	tcagtatgacacagctcctgg
A4F	aggctacacgggccaccact	atcgatcacccgaatggcta	tgtaacgtggagatcaatgag	acaggagaagcaacagtttc	
A4R	caacgtcgtcaatacacgtg	ttgtccacttcacagttgatg	caggttggtgcagataccatg	tgggagccatgggcctgttg	
A5F	gtggctacgtgtgcacctgc	gtgaacgaatgcctgagcaa	tccagggacgtcagtgtgaact	actgcagcctccagtttccac	
A5R	atcgtgctggcagtagctgc	cactccatccatacaggaacc	gcaagcttcgcatgtcacag	agctccccaggccatgggct	
A6F	ctgcttcaacggtggcaccc	atggactgtgaggaggacat	agccttgtcaaaacggggggtc		
A6R	ggcaggagcacttgtaggtg	tgcgtgttgccagcattgatg	gtctgacagcgaggacctgaga		
A7F	ggtgaactgctctgaggag	atgtccatctggatgggctgg	gcctacacaatggcacctgcg		
A7R	aggatgtggcacaagagc	actggcacagcctgactcg	tcggcgcagtacttctcg		
A8F	tgctacaaccaggggacctg	agagcagctgtggacaagtga	tgcagctcgcccgcctgcct		
A8R	gtgcgccacgcttgaagacc	tcaaacaggcactcgaccgt	cgccactagcagtggcagcag		
A9F	agcagctgcgcaacagctcc	atggcgtctgtgatgaggcct	cctgagaatgatcactgcttc		
A9R	aacttcttggtctccagg	agctgctgctgcatccgtg	cagccaggtgcaaagcagtc		
AlOF	gaagaacgcttcagacggtg	attgacaaccgccagtgtgt	catcagctagcatcatctccg		
AlOR	ggtcctccagcatgccctcc	ttcatcactcaaatctgagct	cgactgtgccgctttgaggc		
AllF	tgtcttccagatcctgatcc	aggacaccatcgctggctct	acgtagcccaggagagactg		
AllR	cacgtctgacaggtagcc	acagatgacaggtgagagagc	gggctggcccagtgctca		
A12F	tggacageteeggeatgete	atgaatacaatgtgaccccaa	agtcccaggacatggcgagga		
A12R	gctgcaggctttgctgctgc	aggatgggtgccctcagctgg	tcaggccaacacttgcctctt		
A13F	tctgccgacaggtgcctcc	agttgctatcccaccaccac	agcccagccactgccactggg		
A13R	tggcatccacagagcgcaca	gagaatggtctgagctacc	tacttggtacatacctgggt		
A14F		cagattccagaaatggcccg			
A14R		tcacgcataaacctgcatgt			

Supplementary Table 10. Oligonucleotides used for cDNA amplification.

NOTCH SIGNALING PATHWAY PLAYS A TUMOR SUPPRESSOR ROLE IN MOUSE AND HUMAN UROTHELIUM VIA MAPK PATHWAY REGULATION

<u>Paraskevi Vgenopoulou</u>¹, Theodoros Rampias¹, Margaritis Avgeris², Andreas Scorilas², Apostolos Klinakis¹

¹Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Genetics & Gene therapy, Athens, Greece, ²University of Athens, Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece

The Notch signaling pathway controls cell fates through interactions between neighboring cells by positively or negatively affecting, in a context-dependent manner, processes of proliferation, differentiation, and apoptosis. It has been implicated in cancer both as an oncogene and a tumor suppressor. However, an involvement in bladder tumorigenesis has not been described.

An initial observation that mice lacking Nicastrin –which is indispensable for Notch signaling– develop urothelial carcinoma prompted us to investigate the role of Notch pathway in bladder cancer. First, we found that Notch signaling is active in normal human and mouse urothelium. Next, we showed that overexpression of the active intracellular domain of Notch1 (N1ic) or Notch2 in TCC cell lines leads to growth inhibition, dual specificity phosphatases (DUSPs) upregulation and ERK1/2 dephosphorylation. ChIP experiments confirmed the association of N1ic with the promoters of several DUSPs. Thus, we identified a novel mechanism through which Notch pathway exerts its tumor suppressor activity: it restrains the oncogenic output of MAPK pathway through direct transcriptional regulation of DUSPs, which control the MAPK phosphorylation status. Furthermore, mutation analysis in bladder cancer patients revealed novel somatic loss-of-function mutations in Notch pathway components and/or copy number loss in the NOTCH1 locus in 61% (44/72) of the cases studied.

Using two independent mouse models based on a Nicastrin conditional knockout line $(R26rtTA;teto-Cre;Ncstn^{f/f})$ and $UpkII-CreEGFP;Ncstn^{f/f})$, we showed that Notch signaling genetic abrogation leads to the development of all stages of ureter and bladder cancer (hyperplasia, carcinoma in situ, invasive carcinoma) in a time frame compatible with a "single hit" tumorigenesis model of tumor initiation and progression. These tumors were completely rescued upon re-expression of active forms of NOTCH1. Molecular characterization of mouse tumors corroborated the identified mechanism underlying Erk1/2 dephosphorylation by Notch. Based on specific marker expression, these tumors belong to the "basal" subtype which in humans is associated with poor prognosis.

Given the fact that Notch pathway agonists are available, studies aiming at assessing its therapeutic potential in bladder cancer become a priority.

BRFAA

Notch signaling pathway plays a tumor suppressor role in mouse and human urothelium via MAPK pathway regulation

Paraskevi Vgenopoulou¹, Theodoros Rampias¹, Margaritis Avgeris², Andreas Scorilas², Apostolos Klinakis¹

¹Division of Genetics and Gene Therapy, Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Athens, Greece ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece

INTRODUCTION Notch signaling pathway



 Evolutionarily conserved in Metazoans Controls cell fate decisions

Regulates processes of proliferation, differentiation and apoptosis

Deregulation leads to developmental syndromes and cancer

Implicated in cancer both as an oncogene (T-ALL², breast³, NSCLC⁴) and a tumor suppressor (CMML³, cutaneous SCC, lung SCC⁶, head & neck SCC^{2,8})

Bladder cancer



· Urothelium: epithelium lining the urinary tract (renal pelvis, ureter, bladder, urethra) Consists of 3 cell types: basal, intermediate and superficial (umbrella) cells

 \bullet Bladder cancer is the 4th most commonly diagnosed malignancy in the US male population 9

Two groups: low grade tumors (papillary, superficial), high grade tumors (papillary or non-papillary, invasive)

Metastatic bladder cancer-related death is 50% in 5 years¹⁰

RESULTS



			NOTCHI	NOTCH2	NOTCH3	MAMLI	NICASTRIN	Notch
Variable		No. of potients (%)	No. of patients (%)	No. of patients (%)	No. of patients (%)	No. of patients (%)	No. of patients (%)	No. of patients (%)
Grade								
Low		40.3	20.7	17.2	0	10.3	0	44.8
High		59.7	18.6	9.3	4.6	14.0	7.0	41.9
Stage								1/
Superficial (Ta, T1) Muscle-invasive (T2-T4)		55.6	20.0	12.5	0	12.5	0	42.5
		44.4	18.8	12.5	6.2	12.5	9.4	43.8
4		Novel	somatic	loss-of-	function	mutati	ons in Note	h
4 3.5 3 m 2.5	Jain :	Novel pathw seque	somatic ay comp ncing in	loss-of- oonents a cohor	function identifie t of 72 b	mutatio d by Sa ladder o	ons in Notc nger exon cancer patie	h ents (to
4 3.5 3 5 5 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	3ain : ⊫ő : 2kitolid	Novel pathw seque Copy r	somatic ay comp ncing in number	loss-of-l conents a cohor variatior	function identifie t of 72 b n in the /	mutatio d by Sa ladder d	ons in Notci nger exon cancer patie locus (left)	h ents (to

NOTCH1 and JAG1 suppress ERK1/2 phosphorylation without affecting upstr eam MAPK cascade com onents







Canonical Notch signaling activation controls DUSP expression and urothelial cell growth





issue explants from conditiona ed with AdLacZ or AdCre Cbf1 KO mice tre

T24





CONCLUSIONS

Notch signaling is active in normal human and mouse urothelium.
Mutation analysis in bladder cancer patients revealed novel somatic loss-of-function mutations in Notch pathway components and/or copy number loss in the NOTCH1 locus in 61% (44/72) of the cases studied.
Notch activation in bladder cancer cells suppresses proliferation both *in vitro* and *in vivo*.
Notch pathway exerts its tumor suppressor activity through a novel mechanism: it restrains the oncogenic output of MAPK pathway through direct transcriptional regulation of dual specificity phosphatases (DUSPs), which control the ERK1/2 phosphorylation status.
Genetic abrogation of Notch signaling leads to the development of superficial and invasive urothelial cancer in two independent mouses models in a time frame comparities with a "independent development of tumor, initiation and procession.

mouse models in a time frame compatible with a "single hit" tumorigenesis model of tumor initiation and progression

Supported by a Greek General Secretariat for Research and Technology "Excellence" award UTN 1466

25
taxanis Taalonas, S., Rani, M.D. & Lake, R.J. Notch signaling cell fate consoliand signal integration in development. Science 284, 770-778 (1998).
rog, A.Y. et al. Activating mutations of NECENII In Isuman T cell access (implicit/actic insidemila. Science 306, 2019–271 (2004).
edgis, NJ, et al Nigh-Invel conspression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human binara cancer and is associated with poor ownall survival. Cancer Anaech 46, (536–6537 (2005)
rathoff, B., et al. Adventions of the NoteX pathway in Kang cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 996, 22291–22298 (2006).
nahls, K., et ol. A novid turnola-supprevior function for the Netch pathway in reyekold/advantila, Nature 473, 236-233 (2011).
ing, N.J., et al. Loss-of-Fanction mutations in Notch: receptors in culture cost and long squareous cell cardinoma. Poorenings of the National Academy of Sciences of the United Sciences of America 1986, 17901-17966 (2011).
sawal, N., et al. Ecome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating motations in NOTCH1, Science 318, 1156-1157 (2011).
aniag, N., et al. Die instational landscape of kend and neck spaannoo soll cantinama. Solence 333, 1157-1166 (2011).

Adl an7

6 0

ssing the

G2/M 3.3% S 5.5% 10.7%

Flow cytometry cell cycle analysis using propidium iodide DNA staining of T24 cells treated with AdN1ic

0 4

ed by