



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ *DLL1 IN VIVO*  
ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ**

**Έλενα Μ. Μορόζικινα**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:**

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής του τμήματος  
Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος  
Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ, 2018**



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ  
ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ DLL1 *IN VIVO* ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Έλενα Μ. Μορόζκινα

Επιβλέποντες:

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, καθηγητής του τμήματος  
Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, επίκουρος καθηγητής του τμήματος  
Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ

## Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

**Τίτλος:** Ανίχνευση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των κυττάρων που εκφράζουν το Dll1 in vino στα ποντίκια.

**Φοιτήτρια:** Ελενα Μ. Μορόζκινα.

### **Επιβλέπων:**

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, *Καθηγητής του τμήματος Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ,*

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, *Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ.*

### **Τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, *Καθηγητής του τμήματος Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ,*

Απόστολος Κλινάκης, *Ερευνητής Β', ΙΒΕΑΑ,*

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, *Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί ένα εξελικτικά συντηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη βιολογία των βλαστικών κυττάρων, στην καρκινογένεση, στην αγγειογένεση, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση. Το Notch ελέγχει αρκετά στάδια της διαφοροποίησης των κυττάρων σε διαφορετικούς ιστούς, είναι δυνατόν να εμπλέκεται στη δημιουργία διαφορετικών τύπων όγκων. Ο συνδέτης του Notch Dll1, απαιτείται για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διατήρηση των ενηλίκων βλαστικών κυττάρων σε πολλούς ιστούς.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήσαμε την κυτταροειδική έκφραση και τον λειτουργικό χαρακτηρισμό του συνδέτη Dll1 σε διάφορους ιστούς των διαγονιδιακών ποντικών με τη χρήση του συστήματος ανασυνδυασμού Cre/LoxP. Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα με γονότυπους *Dll1CreERT2xR26tdTomato*, *Dll1CreERT2xR26<sup>mTmG</sup>* και *Dll1CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup>* που δημιουργήθηκαν από διασταυρώσεις του *Dll1CreERT2* ποντικού. Πρόκειται για μία *in vivo* μελέτη που έχει στόχο να δώσει περαιτέρω απαντήσεις και λεπτομέρειες όσον αφορά στο γονίδιο Dll1 και το ρόλο του στην επίδραση των γενετικών μεταλλάξεων.

Μέσω των παραπάνω διασταυρώσεων μελετήθηκε επίσης πρώτο-ογκογονίδιο Kras. Το ογκογονίδιο Kras είναι μέλος της οικογένειας γονιδίων Ras. Κωδικοποιεί πρωτεΐνη 21KDa, η οποία παίζει ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την αγγειογένεση και την απόπτωση, συμμετέχοντας στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch συνδέεται στενά με το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras.

Η σειρά πειραμάτων έδειξε ότι τό Kras ενεργοποιείται στα κύτταρα στα οποία είναι μεταγραφικώς ενεργό το Dll1 στους *Dll1CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup>* ποντικούς. Μετά τη χορήγηση ταμοξιφαίνης (tamoxifen) προκάλεσε υπερπλασίες των επιθηλιακών κυττάρων στον μαστικό αδένα και ογκογένεση στον στόμαχο και στα χείλη των ποντικών.

Αξίζει να σημειωθεί πως στους *Dll1CreERT2xR26tdTomato* και *Dll1CreERT2xR26<sup>mTmG</sup>* ποντικούς παρατηρήσαμε την έκφραση του Dll1 σε όργανα γαστρεντερικού συστήματος (στόμαχο, έντερο, ήπαρ, σπλήνας), στο νεφρό, στο μαστό και στο δέρμα.

Με αυτά τα πειράματα συμπεράναμε ότι τα Dll1<sup>+</sup> κύτταρα αποτελούν κύτταρα πιο ευαίσθητα σε ογκογόνες μεταλλάξεις, μέσω διασταρώσεων με ποντικούς που φέρουν ογκογονίδια στον μαστικό αδένα, στον στόμαχο και στα χείλη του ποντικού. Όποτε το Dll1 αποτελεί έναν υποψήφιο είτε βλαστικών είτε προγονικών κυττάρων στους ιστούς αυτούς.

**Λέξεις κλειδιά:** το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, συνδέτης Dll1, ογκογονίδιο Kras, μεταλλάξεις, όγκος, καρκίνος, διαγονιδιακά ποντίκια.

## ABSTRACT

The Notch signaling pathway is a highly evolutionarily-conserved signaling pathway that plays a central role in stem cell biology, carcinogenesis, angiogenesis, cell differentiation, proliferation and apoptosis. Notch signaling controls multiple steps of cell differentiation in different tissues; it may be involved in causing different types of tumors. Notch ligand Dll1 is required for embryonic development and maintenance of adult stem cells in many different tissues.

In this master thesis, we studied the cellular expression and functional characterization of Notch ligand Dll1 in various tissues of transgenic mice using the Cre /loxP recombination system. In the experimental procedure laboratory animals were used with genotypes *Dll1CreERT2xR26tdTomato*, *Dll1CreERT2xR26<sup>mTmG</sup>* and *Dll1CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup>* have been generated by crosses of mice Dll1CreERT2. This is an in-vivo study aimed to giving further answers and details about the Dll1 gene and its role in the effect of genetic mutations.

Through the cross-breeding experiments Kras proto-oncogene was also studied. The Kras oncogene is a member of the Ras gene family. It encodes a 21kDa protein, which plays a role in the cell proliferation, differentiation, angiogenesis and apoptosis, by participating in the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway. It plays an important role in the development and progression of cancer. The Notch signaling pathway is closely cooperates with the Ras signaling pathway.

A series of experiments showed that Kras is activated in the cells in which Dll1 is transcriptionally active in *Dll1CreERT2xKras<sup>LSL-G12</sup>* transgenic mouse. Following tamoxifen administration, it induced epithelial cell hyperplasia in the mammary gland and tumorigenesis in the stomach and oral cavity of the mice.

It's important to stress that in transgenic mouse models *Dll1CreERT2xR26tdTomato* and *Dll1CreERT2xR26<sup>mTmG</sup>* we observed the expression of Dll1 in organs of the gastrointestinal systems (stomach, intestine, liver, spleen), in kidney, breast and skin.

With these experiments, we concluded that Dll1<sup>+</sup> cells are cells more susceptible to oncogenic mutations, through cross-breeding with transgenic mice bearing oncogenes in the mammary gland, stomach and mouth. Whenever Dll1 is a candidate of either stem or progenitor cells in these tissues.

**Key-words:** the Notch signaling pathway, ligand Dll1, Kras oncogene, genetic mutations tumor, cancer, transgenic mice.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Βιολογία συστημάτων της Σχολής Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής και Γονιδιακής Θεραπείας του Κέντρου Βασικής Έρευνας ΙΙ του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, κατά το χρονικό διάστημα Μαΐου 2017- Φεβρουαρίου 2018 υπό την επίβλεψη του Δρ. Α. Κλινάκη.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Απόστολο Κλινάκη-επιστήμονα με μεγάλες γνώσεις και εμπειρία πάνω στην επιστήμη του, και την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του με την καθοδήγηση και υποστήριξή του.

Επιπλέον, η συμβολή της υποψήφιας διδάκτορος Ελένης Βασιλάκη ήταν καταλυτική και χωρίς τη δική της καθοδήγηση, η παρούσα εργασία θα ήταν ημιτελής και ελλειπής. Για αυτό θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την υπομονή της, την εμπιστοσύνη, τη βοήθειά της και την άψογη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ όλους τους καθηγητες του Μεταπτυχιακου Προγράμματος σπουδών για τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου παρείχαν καθώς και τον διδάκτορα Γεράσιμο Δάρα για την πολύτιμη συμβολή ου στο Π.Μ.Σ.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο και τον Δρ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη, για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Επιτροπή και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και υποδείξεις τους.

Μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Θεόδωρο Ράμπια, Βαρβάρα Παρασκευοπούλου, Πέγκυ Μέλισσα, Κωνσταντίνο Φαιδωνίδη, Έλια Χαβδούλα, Ζωή Κανάκη, Ελευθεριά Μπίφσα, Βαγγέλη Μπόνη, Πάνο Καρακαϊδό για την πολύτιμη βοήθειά τους και για την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος ευχαριστώ τα άτομα που είναι κοντά μου και κυρίως την οικογένειά μου που με στήριξαν και με στηρίζουν ψυχολογικά και που είναι κοντά μου σε όποια απόφαση και αν πάρω στη ζωή μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Παθογενεια του καρκινου.....	9
1.2. Μονοπατι κυτταρικής σηματοδοτηση Notch.....	9
1.2.1. Η οικογενεια των πρωτεϊνων Notch.....	10
1.2.2. Δομη των πρωτεϊνων Notch και των προσδετων τους.....	11
1.2.3. Η αλληλεπιδραση του notch με αλλα σηματοδοτικα μονοπατια.....	12
1.2.4. Ο ρολος και εκφραση του μονοπατι notch στο καρκινο.....	15
1.2.5. Διαρθρωτικα χαρακτηριστικα και ο βασικος ρολος του συνδέτη Notch Delta like 1.....	18
1.3. Αναλυση εκφρασης του γονιδιου Dll1.....	20
1.3.1. Συστημα ανασυνδυασμου Cre-lox.....	23
1.4. Στόχος της εργασίας.....	25
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1. Πειραματόζωα.....	26
2.2. Ανοσοϊστοχημεία.....	28
2.2.1. Μονιμοποίηση ιστού.....	28
2.3. Έγκλειση ιστού και λήψη κρυτομών.....	29
2.3.1. Τομές παραφίνης.....	29
2.3.2. Κρυτομές .....	29
2.4. Ανοσοφθορισμός.....	29
2.5. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA απο ουρές των ποντίκων.....	31



2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, pcr).....	32
2.7. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτικήαγαρόζης.....	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
3.1. Εκφραση του Dll1 σε διαφορους ιστους ποντικου με γονοτυπα	
<i>Dll1CreERT2xR26<sup>mtmg</sup></i> και <i>Dll1CreERT2xR26tdTomato</i> .....	35
3.1.1. Κρυοτομες νεφρού.....	35
3.1.2. Κρυοτομες στομάχου.....	37
3.1.3. Κρυοτομες εντερου.....	38
3.1.4. Κρυοτομες του ήπατος.....	38
3.1.5. Κρυοτομές σπλήνα και παγκρέατος.....	40
3.1.6. Κρυοτομες δέρματος.....	41
3.1.7. Κρυοτομές στόματος του ποντικού.....	41
3.1.8. Κρυοτομές μαστικού αδένα.....	43
3.2. Τομες απο διαφορους ιστους ποντικου με γονοτυπο	
<i>Dll1CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup></i> .....	45
3.2.1. Ογκοι στομαχου.....	46
3.2.2. Ογκοι στην περιοχή του στόματος.....	48
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Παθογένεια του καρκίνου

Η αλματώδης πρόοδος της κυτταρικής και μοριακής βιολογίας την τελευταία δεκαετία αποτέλεσε την απαρχή μιας νέας εποχής στην αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων, μεταξύ αυτών και του καρκίνου. Η διαλεύκανση πολλών μηχανισμών που σχετίζονται με την καρκινογένεση οδήγησε στην ανακάλυψη νέων μεθόδων διάγνωσης, πρόγνωσης, και θεραπείας του. Ο καρκίνος αποτελεί ουσιαστικά, μια γενετική νόσο με πολύπλοκους παθογενετικούς μηχανισμούς, μη ξεκαθαρισμένη αιτιολογία, καθώς στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αναγνωρίζονται μόνο παράγοντες κινδύνου ή προδιαθεσικοί παράγοντες και μη αποσαφηνισμένες παρατηρήσεις σχετικά με όργανα τα οποία δεν προσβάλλονται συχνά από κακοήθεις όγκους όπως το λεπτό έντερο, η καρδιά, ο σπλήνας και οι νευρώνες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια ετερογενή ομάδα ασθενειών, με βάση τα φαινοτυπικά και γενετικά τους χαρακτηριστικά. Η ανάπτυξη και η εξέλιξη ενός όγκου προϋποθέτει μια σειρά από γενετικές και μη μεταβολές που χαρακτηρίζουν τα κύτταρα του όγκου. Αυτές συνίστανται στην αυτάρκεια σε αυξητικά ερεθίσματα, στην αναισθησία σε αντιαυξητικά σήματα, στην αντίσταση στην απόπτωση, στην προαγωγή της αγγειογένεσης, στο απεριόριστο αντιγραφικό δυναμικό, στην ικανότητα διήθησης των γύρω ιστών και πρόκλησης απομακρυσμένων μεταστάσεων. Αυτά τα χαρακτηριστικά του καρκίνου αντανακλούν μεταβολές σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης εμπλεκόμενα στην κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό και αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων. Ακριβώς σε αυτά τα μονοπάτια στοχεύουν διάφοροι αντικαρκινικοί παράγοντες σε μια προσπάθεια να αναστείλουν τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης στους οποίους συμπεριλαμβάνονται τα μονοκλωνικά αντισώματα και άλλοι παράγοντες στο πλαίσιο της στοχευμένης θεραπείας του καρκίνου.

## 1.2. Μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης Notch

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch εμπλέκεται στην προώθηση της εξέλιξης διαφόρων τύπων καρκίνου. Ο όρος Notch χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να περιγράψει έναν μορφολογικό φαινότυπο που παρουσιάστηκε ως «εγκοπές» στο

περιθώριο πτέρυγας της *Drosophila*. Το σύστημα Notch είναι ένα πολύ συντηρημένο μονοπάτι με ρόλους στη μορφογένεση, στο σχηματισμό των ιστών και την κυτταρική διαφοροποίηση. Στα μέσα της δεκαετίας 1980, οι Αρταβάνης-Τσάκωνας και Young κατάφεραν να κλωνοποιήσουν το γονίδιο Notch. Μολονότι μόνο μία μοναδική Notch πρωτεΐνη και δύο συνδέτες Delta (DI) και Serrate (Ser) είναι παρόντα στην *Drosophila*, στα θηλαστικά, όπως στους ποντικούς και στον άνθρωπο, υπάρχουν 4 Notch υποδοχείς (NOTCH 1-4) και 5 συνδέτες, οι Delta-like1,-3,-4 (DLL1, DLL3, DLL4) και οι Jagged 1 και 2 (JAG1, JAG2) οι οποίοι είναι Ser-παρόμοιοι συνδέτες (K.G.Leong, 2006).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, το μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης Notch αναστέλλει την αρχική διαφοροποίηση του κυττάρου προκαλώντας μία δεύτερη διαφορετική διαφοροποίηση ή διατηρεί το κύτταρο σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση. Θεωρείται ως «ο φύλακας» έναντι της διαφοροποίησης (L.Miele, 2006), εμπλέκεται σε αρκετές κακοήθειες και μπορεί να συμπεριφέρεται ως ογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ανάλογα με το είδος του κυττάρου και τον ιστό, ενώ είναι πολύ σημαντικό για κυτταρικές λειτουργίες σε διαφορετικούς ιστούς, όπως το δέρμα, το πάγκρεας, το κεντρικό νευρικό σύστημα, μυϊκό και το αιμοποιητικό (E.Hansson, 2004; L.Miele, 2006).

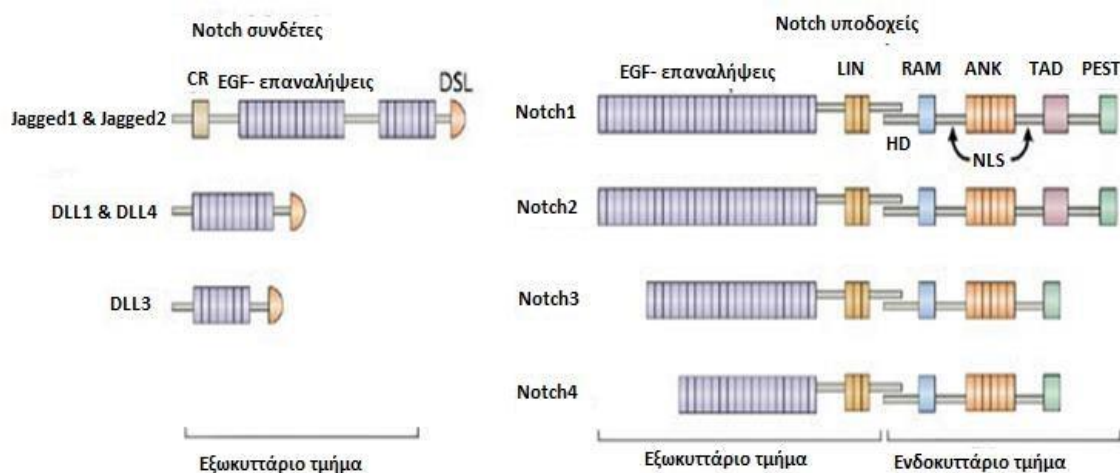
### **1.2.1. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Notch**

Η οικογένεια Notch είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με διπλή λειτουργία ως μεμβρανικοί υποδοχείς και ως μεταγραφικοί παράγοντες. Στα θηλαστικά, η οικογένεια Notch έχει 4 υποδοχείς, Notch 1, 2, 3 και 4. Κάθε υποδοχέας συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ως μία πρόδρομη πρωτεΐνη που περιέχει ένα ενδοκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα εξωκυττάριο τμήμα. Η πρόδρομη μορφή του υποδοχέα διασπάται στην περιοχή S1 με μία πρωτεάση της φουρίνης στο σύμπλεγμα Golgi. Μετά την πρώτη τροποποίηση εμφανίζεται ως ετεροδιμερές στην κυτταρική μεμβράνη, όπου και αλληλεπιδρά με κατάλληλους συνδέτες που εκφράζονται από τα ίδια ή από γειτονικά κύτταρα. Και οι τέσσερις υποδοχείς του Notch δομικά είναι παρόμοιοι, εκτός από κάποιες μικρές διαφορές στο εξωκυττάριο και το κυτταροπλασματικό τους τμήμα. Το εξωκυττάριο τμήμα αποτελείται από επαναλαμβανόμενες περιοχές με δομή ανάλογη του EGF (Epidermal growth factor),

οι οποίες παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση πρόσδεσης υποδοχέα με τον συνδέτη (R.Koran, M.Pagan,2009).

### 1.2.2. Δομή των πρωτεϊνών Notch και των συνδετών τους

Τα γονίδια των πρωτεϊνών Notch, παρότι εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών των οποίων η δομή ακολουθεί μια κοινή βασική αρχιτεκτονική (Εικόνα 1). Όπως προαναφέρθηκε, κάθε υποδοχέας Notch απαρτίζεται από εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα.



**Εικόνα 1:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των Notch υποδοχέων και των συνδετών τους. OsborneBA&MinterLM, *Nature Reviews Immunology* 7, 64-75 (2007)

Το εξωκυττάριο και αμινοτελικό τμήμα απαρτίζεται από αρκετές περιοχές επαναλήψεις τύπου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), ακολουθούμενες από μια περιοχή γνωστή ως αρνητική ρυθμιστική περιοχή (negative regulatory region, NRR), η οποία περιλαμβάνει τρεις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, γνωστές ως Notch/Lin12 (LN repeats) και μία C τελική “ουρά” από 103 κατάλοιπα αμινοξέων. Οι περιοχές τύπου EGF αποτελούν περιοχές γλυκοσυλίωσης και συμμετέχουν στην πρόσδεση των υποδοχέων με το συνδέτη τους, ενώ η NRR περιοχή παρεμποδίζει τη σηματοδότηση απουσία συνδέτη (C.Sanchez-Irizarry, 2004).

Στο ενδοκυττάριο-κυτταροπλασματικό τμήμα απαντούν: μια περιοχή RAM, για την οποία πιστεύεται ότι εγείρει αλλοστερικές τροποποιήσεις στη δομή του μεταγραφικού πρωτεϊνικού συμπλόκου (CSL/RBP-J<sub>k</sub>-NIC-MAM), απαραίτητες για

την έναρξη της μεταγραφής στον πυρήνα, έξι επαναλήψεις αγκυρίνης (ankyrin ή CDC10 repeats), που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του μεταγραφικού συμπλόκου κατά τη σηματοδότηση στον πυρήνα καθώς συμβάλλουν στη σύνδεση του συνενεργοποιητή (co-activator) Mastermind (MAM) [D.Barrickand, R.Koran,2006], δύο σήματα πυρηνικής εντόπισης (nuclear-localization signals), τα οποία συνορεύουν με μια περιοχή μεταγραφικής τρανσενεργοποίησης (transcription transactivation domain, TAD) και τέλος μια αλληλουχία αμινοξέων PEST [(P) προλίνης, (E) γλουταμικού, (S) σερίνης και (T) θρεονίνης].

Παρά την όμοια δομή τους, οι υποδοχείς Notch εμφανίζουν κάποιες διαφορές τόσο στο εξωκυττάριο όσο και στο κυτταροπλασματικό τμήμα. Έτσι ενώ οι υποδοχείς Notch 1 και 2 έχουν 36 επαναλήψεις τύπου EGF στο εξωκυττάριο τους τμήμα, ο Notch 3 έχει 34 και ο Notch 4 μόλις 29. Επιπλέον σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Notch 1 που περιέχει ισχυρό “δυναμικό” μεταγραφής (TAD) και τη Notch 2 έστω αδύναμο, στις Notch 3 και 4 απουσιάζει η συγκεκριμένη περιοχή (F.Radtke, 2003).

Παρόμοια με τους υποδοχείς Notch και οι συνδέτες τους (JAG1, 2 και Delta-like 1, 3, 4) είναι τύπου I διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Και στους πέντε συνδέτες στο εξωκυττάριο-αμινοτελικό τμήμα, υπάρχει μια εξελικτικά συντηρημένη περιοχή γνωστή ως DSL (Delta, Serrate or LAG-2 από το νηματοσκώληκα *C.elegans*), απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τους Notch υποδοχείς, την οποία ακολουθούν EGF επαναλήψεις. Χαρακτηριστικό μόνο των συνδετών JAG1, 2 και όχι των Delta-like 1, 3, 4 είναι και η ύπαρξη μια πλούσιας περιοχής σε κυστεΐνη.

### **1.2.3. Η αλληλεπίδραση του Notch με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια**

Το μονοπάτι του Notch είναι ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια στην εμβρυική ανάπτυξη. Δεδομένου ότι η ογκογένεση και η ανάπτυξη των οργάνων μοιράζονται ίδιους μηχανισμούς δεν είναι παράξενο ότι τα μονοπάτια που σχετίζονται με την ανάπτυξη όπως του Notch, Wnt και του Hedgehog παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Πολύ επιθετικά καρκινικά κύτταρα έχουν δείξει ότι έχουν πολλά χαρακτηριστικά των εμβρυϊκών προγονικών κυττάρων χρησιμοποιούν το μονοπάτι του Notch για την επιβίωση τους.

Οι γενετικές αποδείξεις σε ποντίκια καθώς και οι μελέτες μοριακής βιολογίας σε ανθρώπινα κύτταρα δείχνουν σαφώς ότι η απελευθερωμένη σηματοδότηση Hedgehog μπορεί να οδηγήσει σε υπερπλασία του μαστού και σχηματισμό όγκων (A.Visbal, 2010). Ο συνδέτης του Notch, JAG2 προκαλείται από τη σηματοδότηση του Hedgehog κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης (M.Katoh, 2007). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος που ενεργοποιείται η σηματοδότηση Hedgehog στην ανάπτυξη ή εξέλιξη του καρκίνου του μαστού παραμένει ασαφής.

Το μονοπάτι του Notch συνδέεται στενά με εκείνο του Ras. Σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης ο ρόλος της ενεργοποίησης Ras έχει πλέον μελετηθεί λεπτομερώς: στο δέρμα, θύμο, μαστικό αδένες και ήπαρ. Όλα τα κύτταρα θηλαστικών εκφράζουν τρεις μορφές της πρωτεΐνης Ras. Αυτές είναι οι H-ras, K-ras και N-ras, οι οποίες επάγουν ογκογένεση όταν μεταλλαχθούν στα κωδικόνια 12, 13 ή 61.

Δύο από τα σημαντικότερα μονοπάτια σηματοδότησης, που απορρυθμίζονται συχνά στα διάφορα είδη κακοήθων όγκων, είναι τα μονοπάτια Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) και PI3K/AKT/mTOR. Το μονοπάτι σηματοδότησης Ras/Raf/MEK/ERK, το οποίο είναι εξαιρετικά συντηρημένο στην εξέλιξη των οργανισμών, εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η μετανάστευση. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού, που προκαλείται από μια ποικιλία σημάτων, οδηγεί στην ενεργοποίηση των RAF πρωτεϊνών μέσω της πρωτεΐνης Ras.

Το μονοπάτι του Notch μετά την ενεργοποίηση από το Ras μονοπάτι μπορεί αντιστρόφως να πυροδοτήσει το τμήμα ras-raf-mek-MAPK που είναι κλάδος του Ras μονοπατιού. Σε κυτταροκαλλιέργειες μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΚΠ), με έλλειψη μεταλλάξεων του Ras, όπου η ενεργότητα της MAPK είναι γενικά χαμηλή και σε κυτταροκαλλιέργειες ΜΚΠ που έχουν υψηλή ενεργότητα MAPK και Ras, η ενεργοποίηση του Notch1 οδηγεί σε υψηλά επίπεδα pERK (Proline-rich receptor-like proteinkinase 1) και pERK2 (B.J.Collins, 2004; N.Haruki, 2005; V.Sriuranpong, M.W.Borges, R.K.Ravi, 2001). Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι σε μερικές περιπτώσεις η ενεργοποίηση του Notch μπορεί να έχει συνεργική δράση με το Ras. Είναι προφανές ότι η αλληλεπίδραση του Notch και του Ras μονοπατιού μπορεί να αποτελέσει σημαντικό πεδίο έρευνας στον ΜΚΠ

όπου υπάρχουν του Ras, ενισχυμένη δράση του EGFR και ενεργοποιημένη δράση συνδετών του Ras μονοπατιού (J.Konishi, 2010).

Η ενεργοποίηση του Notch στα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* με άμεση ρύθμιση των φωσφατασών διπλής ειδικότητας (DUSPs), μειώνοντας τη φωσφορυλίωση των ERK1 και ERK2 κινασών (ERK1/2 Extracellular signal-Regulated Kinase). Σε μοντέλα ποντικών, η γενετική απενεργοποίηση σηματοδότησης Notch οδηγεί σε φωσφορυλίωση ERK1/2, με αποτέλεσμα την ογκογένεση στο ουροποιητικό σύστημα (T.Rampias, 2014).

Η ενεργοποίηση των τριών διαφορετικών μελών της οικογένειας Ras συνδέεται με συγκεκριμένους τύπους όγκων, καρκινογόνους παράγοντες και καρκινογόνα στάδια, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες Ras μπορεί να εμπλέκονται σε διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες (R.Mangues, Pellicer, 1992). Παρότι οι τρεις ισομορφές μοιάζουν πολύ μεταξύ τους, μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη K-ras παρατηρούνται πολύ πιο συχνά στον καρκίνο (22% όλων των καρκίνων). Μετάλλαξεις που ενεργοποιούν το Kras λαμβάνουν χώρα σε πρώιμο στάδιο κατά την παγκρεατική καρκινογένεση και έχειδειχθεί ότι η ταυτόχρονη έκφραση του N1-ICD σε προγονικά παγκρεατικά ή ώριμα κυψελιδικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα στην ανάπτυξη παγκρεατικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (Pan IN) πολύ νωρίτερα από ό,τι η έκφραση μόνο του ενός από τα δύο. Συνεπώς, το Kras και το Notch συνεργάζονται για την έναρξη του παγκρεατικού καρκίνου στα ποντίκια. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η σηματοδότηση μέσω Notch προωθεί την εξέλιξη από PanIN σε παγκρεατικά πορώδη αδενοκαρκινώματα (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC) *in vivo* (Plentz, 2009).

Σε ινοβλάστες με μετάλλαξη του Ras, η αναστολή του μονοπατιού του Notch από αναστολείς της γ-σεκρετάσης οδήγησε σε αναστολή της αύξησης του όγκου σε ποσοστό 80%. Στα αντίστοιχα κύτταρα-μάρτυρες, η αναστολή της γ-σεκρετάσης δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου.

Άλλα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης με τα οποία αλληλεπιδρά το μονοπάτι του Notch είναι τα NFκB, Akt, Sonic, estrogen receptor, androgen receptor, PDGF (K.Sakamoto, 2002).

#### 1.2.4. Ο ρόλος και η έκφραση του μονοπατιού Notch στον καρκίνο

Η δυσλειτουργία του μονοπατιού κυτταρικής σηματοδότησης Notch σχετίζεται με πολλά είδη καρκίνου και, όπως αναφέρθηκε το μονοπάτι του Notch μπορεί να έχει ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική δράση ανάλογα με τον ιστό ή την θέση του οργάνου που εκφράζεται. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν που απενεργοποιούν το μονοπάτι Notch σε μία μερίδα ασθενών με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Myelomonocytic Leukemia, CMML) [A.Klinakis, 2011].

Η απενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω Notch σε HSCs ποντικού είχε ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική συσσώρευση προγονικών κοκκικοκυττάρων/ μονοκυττάρων, την εξωμυελική αιμοποίηση και την επαγωγή μιας ασθένειας παρόμοιας με τη CMML. Η ανάλυση του μεταγραφώματος αποκάλυψε ότι η σηματοδότηση μέσω Notch ρυθμίζει την εκτεταμένη μυελομονοκυτταρική γονιδιακή υπογραφή μέσω άμεσης καταστολής της μεταγραφής από τον HES1. Επιπλέον, αυξημένη έκφραση του Notch1 ή/και του Hes1 έχει παρατηρηθεί σε πολλά μοντέλα ποντικών για παγκρεατικά πορώδη αδenoκαρκινώματα (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC), σε πρώιμες μεταπλαστικές αλλοιώσεις (PanIN) και σε πλήρως ανεπτυγμένα PDACs, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση του Notch αποτελεί πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη καρκίνου στο πάγκρεας. Το πιο πιθανό μοντέλο σχετικά με το κύτταρο προέλευσης του παγκρεατικού καρκίνου υποστηρίζει ότι τα κυψελιδικά κύτταρα υφίστανται μεταπλασία από κυψελιδικά σε πορώδη, η οποία στη συνέχεια δίνει γένεση σε PanIN προτού τελικά καταλήξει σε PDAC (A.Hezel, 2006). Αξιοσημείωτα, η έκφραση του N1-ICD σε καλλιέργεια ενήλικου παγκρέατος ποντικού επάγει παρόμοια μεταπλαστική μετατροπή (Y.Miyamoto, 2003).

Είναι ενδιαφέρον ότι η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης έδειξε, επίσης, ότι το μεγαλύτερο μέρος του πλακώδους καρκινώματος της κεφαλής και του λαιμού υπερεκφράζει τα μέλη των σηματοδοτικών μονοπατιών Notch, γεγονός που υποδηλώνει τη συμβολή αυτών των γονιδίων στην καρκινογένεση των πλακωδών κυττάρων (C.Leethanakul, 2000).

Πολλές μελέτες υποδεικνύουν επίσης ότι το Notch δρα ως ογκογονίδιο σε μια ποικιλία στερεών όγκων (Galluzzo and Bocchetta, 2011; Reedijk, 2012; Teodorczyk



and Schmidt, 2015). Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπινα γλοιώματα αύξηση της έκφρασης των συνιστωσών του μονοπατιού Notch. Σε αυτές τις κακοήθειες, αυξημένη έκφραση υποδοχέων, συνδετών του Notch και καθοδικών στόχων σχετίζεται με την αύξηση του βαθμού κακοηθείας του όγκου (Somasundaram et al., 2005; Phillips et al., 2006; Hulleman et al., 2009). Η αναστολή των Notch1 ή Dll1 σε μοντέλα *in vivo* έχει επίσης ως αποτέλεσμα στην καθυστέρηση ανάπτυξης όγκου (K.Xu et al., 2010; Purow, 2005) και υψηλή έκφραση του Hey-1 σε ανθρώπινα γλοιώματα συνδέεται με κακή πρόγνωση (Hulleman et al., 2009; Gaetani, 2010). Περαιτέρω, η αναστολή του Notch 1 σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος επάγει διακοπή κυτταρικού κύκλου, ενώ η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση σηματοδότησης Notch έχει ως αποτέλεσμα στον αυξημένο πολλαπλασιασμό. (Gao et al., 2007; Kanamori et al., 2007; Purow et al., 2005; Zhao et al., 2009).

Το μοτίβο έκφρασης των πρωτεϊνικών υποδοχέων Notch και των συνδετών τους, αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων. Υψηλά επίπεδα συνέκφρασης των Notch1, Notch3 και Jag1 παρατηρήθηκαν στον καρκίνο του μαστού και ανευρέθηκε ότι αυτά σχετίζονται με μικρό προσδόκιμο επιβίωσης. (Sansone et al., 2007; Shipitsin et al., 2007; Reedijk et al., 2005). Σύμφωνα με αυτό, η υπερέκφραση των Notch1 και Notch3 σε ποντίκια προάγει την ανάπτυξη όγκου του μαστού (Sansone et al., 2007; Hu et al., 2006). 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 συγκριτικά με τους όγκους που επάγονται από το N4-ICD (Diévert, 1999). Τα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν το MMTV-hN1-ICD αναπτύσσουν όλα μέχρι την τρίτη εγκυμοσύνη τους θηλώδεις όγκους που εξαρτώνται από τη γαλουχία, δεν είναι διηθητικοί και υποτροπιάζουν κατά την επαναφορά του αδένου στην αρχική του μορφή (A.Klinakis, 2006).

Επιπλέον, το 50% των ανθρώπινων καρκινωμάτων του μαστού έχουν απωλέσει τον έλεγχο του Notch που διαμεσολαβείται από τη Numb (Pecce, 2004). Δηλαδή, η Numb ασκεί ογκοκατασταλτική δράση, καθώς η εκτοπική έκφρασή της σε NUMB<sup>-</sup> καρκινικά κύτταρα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους. Τέλος, ταυτοποιήθηκε η παρουσία της ενεργοποιημένης μορφής του Notch4 σε CD44<sup>+</sup> καρκινικές βλαστοκυτταρικές σειρές του μαστού και σε πρωτογενή δείγματα, ενώ το

NI-ICD ανευρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα του αυλού του φυσιολογικού επιθηλίου του μαστού (H.Harrison, 2010). Συνολικά, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το προγονικό κύτταρο του αυλού μπορεί να αποτελεί το κύτταρο από το οποίο ξεκινά ο όγκος, όταν το μονοπάτι Notch ενεργοποιείται ανεξέλεγκτα, οδηγώντας σε υπερπλασία και, τελικά, σε καρκινογένεση.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, στον καρκίνο του μαστού, το μονοπάτι Notch παίζει αιτιακό ρόλο στο μετασχηματισμό των κυττάρων μέσω ρύθμισης της απόπτωσης. Συνεπώς, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού συνεισφέρει στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η Doxorubicin και το Docetaxel (Zang, 2010), στη θεραπεία που στοχεύει τη HER2 (Osipov, 2008), σε ενδοκρινείς θεραπείες όπως το Tamoxifen (Rizzo, 2008) και στην ακτινοθεραπεία (Phillips, 2006).

Κάθε υποδοχέας και κάθε συνδέτης μπορεί να παίζει διαφορετικούς ρόλους στην ανάπτυξη και την εξέλιξη διαφορετικών τύπων καρκίνου. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του Notch 4 έχει προταθεί ως υποψήφιος δείκτης για την ταξινόμηση των τριπλά αρνητικά όγκων (Andre, 2009), ενώ οι DLL4 και JAG1 έχουν διαφορετική δράση στην αγγειογένεση και τη μετάσταση στα οστά (Benedito, 2009).

Σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που εμφανίζουν έκφραση του Notch3 είχαν σημαντικά μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με αυτούς που δεν εμφάνισαν έκφραση του Notch 3. Συνεπώς ο Notch 3 θα μπορούσε να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη σε αυτό το είδος του καρκίνου (K.Sakamoto, 2002; K.Yao, P.Rizzo, P.Rajan, 2011; S.Santagata, F.Demichelis, A.Riva, 2004). Επίσης, ο Notch 3 έχει συσχετιστεί με την επιβίωση και την αυτο-ανανέωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε υποξικά περιβάλλοντα όπου αναπτύσσονται πιο προχωρημένοι όγκοι (Sansone, 2007).

Αξιοσημείωτα, ο Notch 2 φαίνεται να ανταγωνίζεται τη σηματοδότηση από τους τρεις άλλους υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα του μαστού με την έκφρασή του να παίζει ογκοκατασταλτικό ρόλο και να αποτελεί θετικό προγνωστικό δείκτη (Parr, 2004). Τα επίπεδα του Notch σχετίζονται με αδιαφοροποίητους όγκους, ενώ υψηλά επίπεδα Notch 2 παρατηρούνται σε καλά διαφοροποιημένους όγκους.

### **1.2.5. Διαρθρωτικά χαρακτηριστικά και ο βασικός ρόλος του συνδέτη του Notch Delta like 1**

Ο συνδέτης Delta like 1 (Dll1) απαιτείται για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διατήρηση των ενηλίκων βλαστικών κυττάρων σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η σηματοδότηση Notch επαγόμενη από το Dll1 προκαλείται μέσω μιας ενδοκυτταρικής επικοινωνίας που ρυθμίζει την κυτταρική σειρά, την περιγραφή των κυττάρων, τη διαμόρφωση κυττάρων και τη μορφογένεση μέσω επιδράσεων στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό (K.Schuster-Gossler, 2007). Παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου σε διαφορετικό επίπεδο, συγκεκριμένα ρυθμίζοντας τη νευρωνική διαφοροποίηση των νευρικών προδρόμων κυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης κυττάρου προς κύτταρο, πιθανότατα μέσω του πλευρικού ανασταλτικού συστήματος, σε έναν ενδογενές επίπεδο, με εξαρτώμενο τρόπο (B.Bettenhausen, 1995).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νεοφλοιού, η μετάδοση σήματος Dll1-Notch προκαλείται από δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδιάμεσων νευρογενών προγόνων και ακτινωτών γλοιών. Οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο διαμεσολαβούνται μέσω δυναμικών και παροδικών διεργασιών επιμήκυνσης, οι οποίες είναι πιθανό να επαναδραστηριοποιήσουν/διατηρήσουν τη δραστηριότητα Notch σε γειτονικούς προγόνους και να συντονίσουν τη διαίρεση των προγονικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση σε ακτινωτά και ζωνικά όρια (B.R.Nelson, 2013).

Κατά τη διάρκεια της παρεγκεφαλιδικής ανάπτυξης, ρυθμίζει το σχηματισμό της γλοιακής μονοστιβάδας του Bergmann και τη μορφολογική του ωρίμανση μέσω μιας σηματοδοτικής οδού Notch (Y.Hiraoka, 2013). Στο επίπεδο του αμφιβληστροειδούς και του νωτιαίου μυελού, ρυθμίζει τη νευρογένεση εμποδίζοντας την πρόωρη διαφοροποίηση των νευρικών προγόνων και επίσης διατηρώντας τους προγόνους στο νωτιαίο μυελό μέσω της οδού σηματοδότησης Notch (S.F.Rocha, 2009).

Το Dll1 ελέγχει τη νευρογένεση του νευρικού σωλήνα σε έναν ειδικό για τον προγονικό τομέα τρόπο κατά μήκος του ραχιαίου άξονα (U.Marklund, 2010). Διατηρεί την ακινησία των νευρικών βλαστικών κυττάρων και παίζει ρόλο ως προσδιοριστής της μοίρας που διαχωρίζει ασυμμετρικά ένα θυγατρικό κύτταρο κατά τη διάρκεια της μίτωσης νευρικών βλαστικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη

διαφοροποίηση των νευρώνων σε κύτταρα που κληρονομούν Dll1 (D.Kawaguchi, 2013). Παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή στην ανάπτυξη όλων των T-κυττάρων και των B-κυττάρων της περιθωριακής ζώνης (MZ) (J.B.Tan, 2009). Αποκλείει τη διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων στην κυτταρική σειρά B, ενώ προάγει την εμφάνιση πληθυσμού κυττάρων με τα χαρακτηριστικά ενός T-κυττάρου / NK προδρόμου κυττάρων. Κατά τη διάσπαση της MMP14, ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση Notch σε αιματοποιητικά προγονικά κύτταρα για να διατηρήσει ειδικά την ανάπτυξη φυσιολογικών κυττάρων B σε μυελό των οστών (G.Jin, F.Zhang, 2011).

Το Dll1 έχει επίσης ρόλο κατά την ανάπτυξη των παγκρεατικών κυττάρων. Διεγείρει τον πολυδύναμο πολλαπλασιασμό των παγκρεατικών προγονικών κυττάρων και την παγκρεατική ανάπτυξη, διατηρώντας την έκφραση HES1 και τα επίπεδα πρωτεΐνης PTF1A (J.Ahnfelt-Roenne, 2012). Κατά τη διάρκεια των εμβρυϊκών σταδίων ανάπτυξης, απαιτείται για να διατηρηθεί η αρτηριακή ταυτότητα και η ανταπόκριση των αρτηριακών ενδοθηλιακών κυττάρων για το VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor) μέσω ρύθμισης της ενεργοποίησης του KDR (Kinase insert domain receptor) και της έκφρασης NRP1 (Neuropilin 1). Ελέγχει την ανάπτυξη της αγγειογένεσης και τον επακόλουθο κατακόρυφο σχηματισμό διακλάδωσης μέσω της ρύθμισης της διαφοροποίησης των κυττάρων. Ρυθμίζει αρνητικά τη διαφοροποίηση των καλυκοειδών κύτταρων στο έντερο και ελέγχει τη δέσμευση του εκκριτικού λίπους, μέσω πλευρικής αναστολής στο λεπτό έντερο (L.C. Napp, 2012).

Επιπλέον, το Dll1 σημαίνει έναν κυτταρικό υποπληθυσμό της κρύπτης του λεπτού εντέρου, ο οποίος μπορεί λειτουργικά να αντικαταστήσει τα LGR5 κύτταρα, τα οποία αποτελούν τα βλαστικά κύτταρα στις κρύπτες, μετά από καταστροφή του ιστού.

Μελέτες σε ποντικούς έχουν δείξει ότι τα Notch1 και Notch2 είναι απαραίτητοι υποδοχείς για τη διατήρηση της ομοιόστασης του εντερικού επιθηλίου (Riccio, 2008). Οι συνδέτες του Notch Dll1 και Dll4 εκφράζονται από τον ίδιο πληθυσμό εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (IECs) του λεπτού εντέρου στους ποντικούς (D.Stamataki et al., 2011). Επίσης, η εξάλειψη του Dll1 οδήγησε σε πλήρη σίγαση της ενεργοποίησης του Notch εντός του εντερικού επιθηλίου και έτσι προκάλεσε απώλεια του προγονικού πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων και

σημαντική αύξηση του αριθμού των εκκριτικών κυττάρων (L.Pellegrinet, 2011). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα Dll1<sup>+</sup> εντερικά επιθηλιακά κύτταρα IECs διέμεναν αποκλειστικά εντός της κρύπτης του λεπτού και του παχύ εντέρου, υποδεικνύοντας ότι μπορούν να συνεισφέρουν στη δημιουργία της θέσης των εντερικών βλαστικών κυττάρων. Στο λεπτό έντερο και στο παχύ έντερο, το Dll1 θα μπορούσε να αποκτήσει φαινότυπο καλυκοειδών κύτταρων, αλλά σπάνια εμφανίζει το φαινότυπο άλλων εκκριτικών κυττάρων (Hiromichi Shimizu, 2014). Η σηματοδότηση του Notch στο αυτί έχει ξεχωριστές προοπτικές και πλευρικές ανασταλτικές λειτουργίες, για τις οποίες κατά κύριο λόγο ευθύνονται οι διαφορετικοί συνδέτες. Το Dll1 παίζει ρόλο κατά την ανάπτυξη του εσωτερικού αυτιού και ρυθμίζει αρνητικά τη διαφοροποίηση των τριχωτών κυττάρων (R.Brooker, 2006). Επιπλέον, παίζει ένα ρόλο στην ανάπτυξη των νεφρών, μέσω της σηματοδότησης Notch. Ρυθμίζει την ανάπτυξη, την αρτηριακή πίεση και την ομοίωση της ενέργειας και συμμετέχει στον μεταβολισμό, στην ενεργειακή ισορροπία και στην ανοσολογία.

Ο συνδέτης Dll1 παρατηρήθηκε ότι είναι το πιο εκφραζόμενο συστατικό της οδού Notch σε κύτταρα ενισχυμένου με MYCN νευροβλαστώματα και η κατώτερη ρύθμισή του, με miRNAs, επαγόμενη διαφοροποίηση και διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ενεργοποίηση του Notch είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη και τη διάδοση των κυττάρων νευροβλαστώματος, ενώ η αναστολή της προκαλεί τη διακοπή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων.

### **1.3. Ανάλυση της εκφρασης του γονιδίου Dll1**

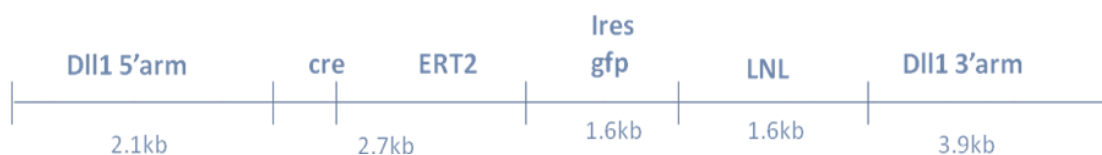
Με την εκθετική αύξηση του αριθμού των γονιδίων που αποκαλύφθηκαν από τα προγράμματα αποκωδικοποίησης του γονιδιώματος διαφόρων οργανισμών κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για την εύρεση της λειτουργίας κάθε γονιδίου. Τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη ποντικών αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στον τομέα της Λειτουργικής Γονιδιωματικής, το νέο κλάδο της Μοριακής Βιολογίας που έρχεται να αναδείξει την λειτουργία (εξ) κάθε γονιδίου. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δέκα χρόνων, έγινε δυνατή η δημιουργία σχεδόν κάθε είδους μεταλλαγής στο γονιδίωμα του ποντικού με τη βοήθεια δύο προσεγγίσεων, της αντίστροφης γενετικής και της πρόσθιας γενετικής.

Στην αντίστροφη γενετική, ο ερευνητής έχοντας απομονώσει το γονίδιο που μελετά, μπορεί να το τροποποιήσει σε επίπεδο οργανισμού και να μελετήσει το

αποτέλεσμα της γενετικής επέμβασης με την παρατήρηση ενός φαινοτύπου. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την εισαγωγή νέων γονιδίων σε ολόκληρους οργανισμούς (διαγονιδιακά ποντίκια –transgenic mice), την κατευθυνόμενη απενεργοποίηση ή μεταλλαξογένεση ενδογενών γονιδίων σε όλα (knockout) ή σε επιλεγμένα κύτταρα του οργανισμού (conditional mutants) και προσφέρει ένα *in vivo* σύστημα για την αναγνώριση γονιδίων που καθορίζουν τη ομαλή λειτουργία του οργανισμού ή που ευθύνονται για ασθένειές του. Η πρόσθια γενετική ακολουθεί την τακτική της κλασικής γενετικής, παρατηρώντας δηλαδή ένα φαινότυπο, ακολουθεί η εύρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου χρησιμοποιώντας ειδικές διασταυρώσεις και γενετικές αναλύσεις.

Στο εργαστήριο του κ. Κλινάκη, δημιουργήθηκε «knockin/knockout» ποντικός που επιτρέπει την έκφραση της ρεκομπινάσης Cre και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του γονιδίου Dll1.

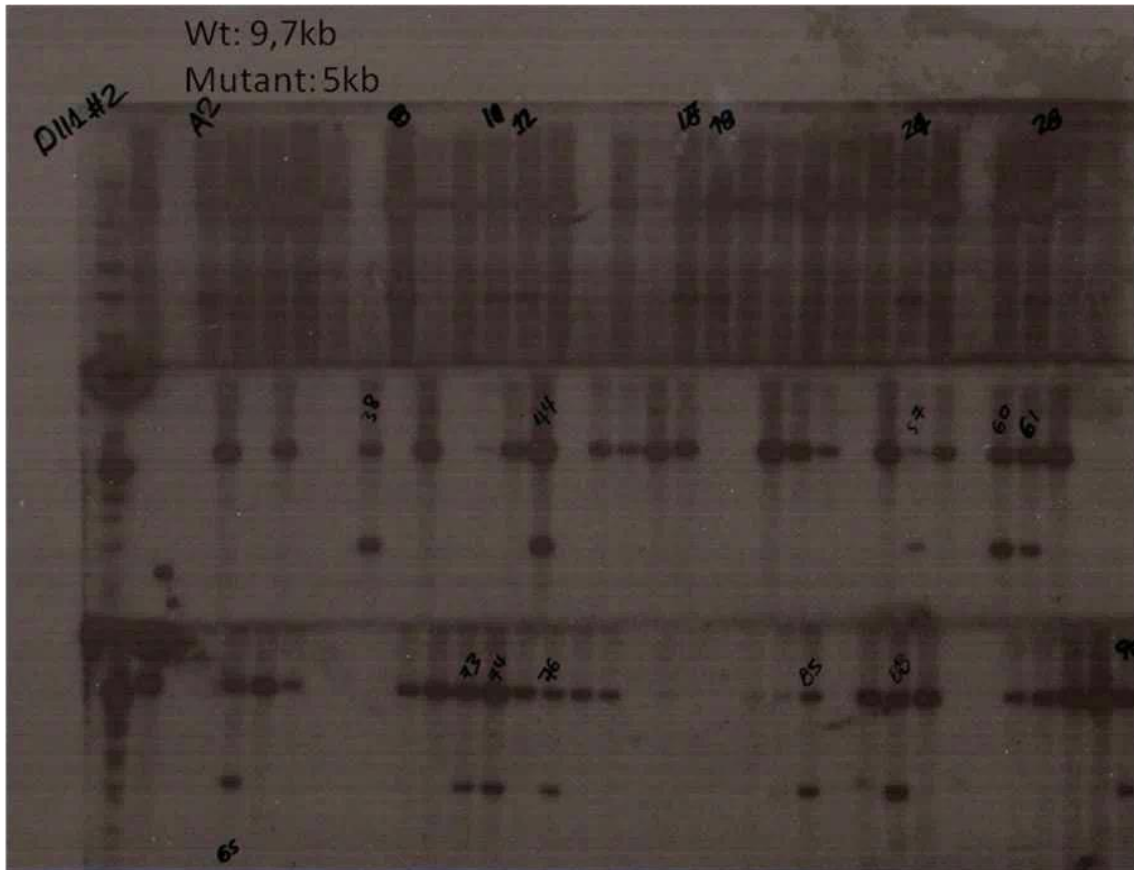
Συγκεκριμένη γονιδιακή κατασκευή εισέρχεται σε ένα φορέα στόχευσης, ο οποίος φέρει μία περιοχή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (δείκτης θετικής επιλογής) και ομόλογες περιοχές. Δημιουργήθηκε τη *DLL1creER;Ires-gfp* γονιδιακή κατασκευή, όπως φαίνεται παρακάτω:



Οι ομόλογες περιοχές ορίζουν τα ακριβή όρια της γονιδιωματικής ενσωμάτωσης λόγω του ανασυνδυασμού. Ο φορέας στόχευσης εισέρχεται με τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ES). Τα σωστά στοχευμένα εμβρυικά βλαστοκύτταρα επιλέγονται με τη χρήση αντιβιοτικών και πολλαπλασιάζονται. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περίπου 7 ημέρες. Θεωρητικά, οι ανθεκτικοί κλώνοι έχουν το επιθυμητό διαγονίδιο, οπότε επιλέγονται και καλλιεργούνται σε πλάκες 96 φρεατίων.

Στη συνέχεια, με την τεχνική του Southern, εντοπίζονται οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι, με τη συμβολή του ανιχνευτή (probe) που έχουνε σχεδιάσει να προσδέεται πριν από τον 5' βραχίονα του διαγονιδίου. **(Εικόνα 3)**.

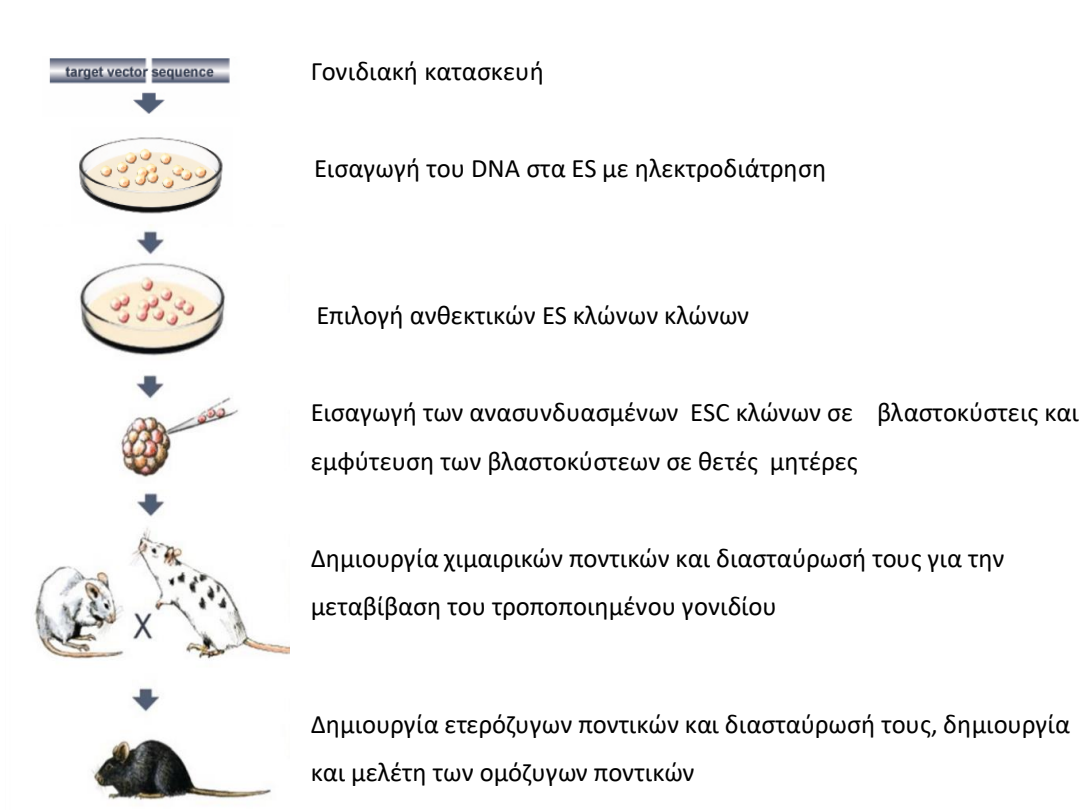
Χρωμόσωμα 17



**Εικόνα 3:** Αποτελέσματα της τεχνικής Southern blot. Οι κλώνοι που εμφανίζουν και τις δύο ζώνες (θετικοί ES κλώνοι), έχουν τη γονιδιακή κατασκευή στο ένα τους αλληλόμορφο (ζώνη 5kb). Το άλλο αλληλόμορφο δίνει τη φυσιολογική ζώνη 9,7kb.

Στη συνέχεια, ενίονται σε βλαστοκύστες και εμφυτεύονται στη μήτρα ενός ψευδο-έγκυου θηλυκού ποντικίου. Τα χιμαιρικά ποντίκια που προκύπτουν από το συνδυασμό των τροποποιημένων εμβρυϊκών κυττάρων και των κυττάρων του εμβρύου-δέκτη, έχουν τρίχωμα και από τα δύο χρώματα. Οι χίμαιρες αυτές ζευγαρώνονται με φυσιολογικά ποντίκια, με σκοπό τη γέννηση ποντικών που

προέρχονται αποκλειστικά από τα τροποποιημένα εμβρυϊκά κύτταρα. Τα ποντίκια στα οποία έχει μεταβιβαστεί το διαγονίδιο στα γαμετικά κύτταρα (germline) (τροποποίηση ενός γονιδίου για τα knockin ή αφαίρεση ενός γονιδίου για knock-out) δίνουν απογόνους με το τροποποιημένο γονίδιο. Η αλλαγή συμβαίνει στη γονιδιωματική περιοχή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει, οπότε, η έκφραση του γονιδίου (για το knockin) βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του ίδιου υποκινητή με το ενδογενές αλληλόμορφο φυσικού τύπου (**Εικόνα 4**).



**Εικόνα 4:** Δημιουργία μοντέλου «knock-in» ή «knockout» ποντικού.

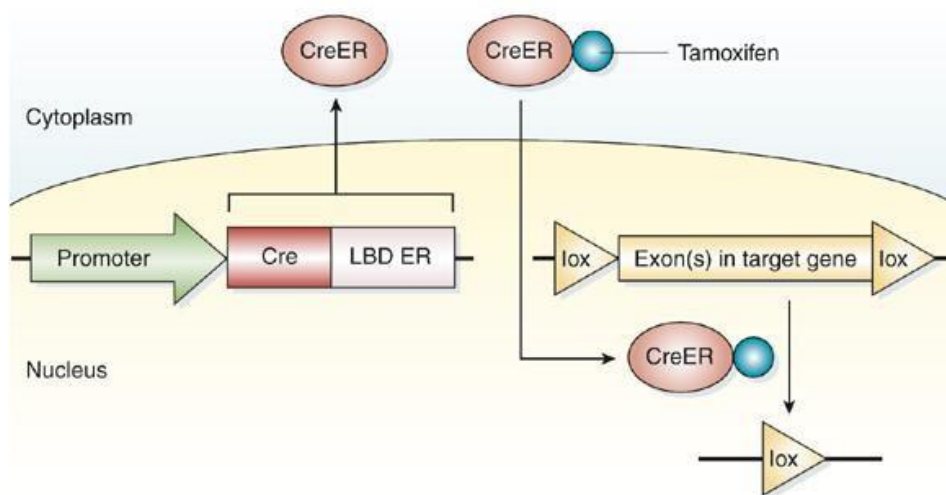
### 1.3.1. Σύστημα ανασυνδυασμού Cre-lox

Το σύστημα έκφρασης Cre-Lox χρησιμοποιείται ως ένα γενετικό εργαλείο ελέγχου γεγονότων ανασυνδυασμού σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδιωματικό DNA. Το ένζυμο Cre είναι μία ρεκομπινάση ειδικής θέσης του βακτηριοφάγου P1, η οποία καταλύει τον ανασυνδυασμό του DNA μεταξύ δύο θέσεων loxP (34 bp: μία



ασύμμετρη περιοχή 8 bp μεταξύ δύο παλίνδρομων αλληλουχιών 13 bp), οι οποίες περιέχουν ειδικές περιοχές σύνδεσης για την Cre. Το δίκλωνο DNA τέμνεται και στις δύο θέσεις loxP από την Cre και στη συνέχεια οι αλυσίδες του ενώνονται με τη βοήθεια της DNA λιγάσης. Όταν οι δύο θέσεις loxP εμφανίζουν ίδιο προσανατολισμό, η αλληλουχία που βρίσκεται μεταξύ τους απαλείφεται.

Το Cre-ER είναι ένα χμιαϊκό γονίδιο στο οποίο η ρεκομπινάση Cre είναι συντηγμένη με μία μεταλλαγμένη μορφή της περιοχής αλληλεπίδρασης με τον συνδέτη του υποδοχέα οιστρογόνων (ligand-binding domain of the estrogen receptor - LBDER) (Feil, 1997). Ο υποδοχέας αυτός ενεργοποιείται από το συνθετικό ανταγωνιστή οιστρογόνων, Tamoxifen, αλλά όχι από τη 17β-οιστραδιόλη (E2), η οποία παράγεται φυσιολογικά από τον οργανισμό. Το tamoxifen είναι μη στεροειδές φάρμακο τριφαινυλικής δομής, που εμφανίζει σύνθετο φάσμα αντι-οιστρογονικών και οιστρογονικών φαρμακολογικών επιδράσεων στους διάφορους ιστούς. Η υβριδική πρωτεΐνη που παράγεται, CreER, είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη. Παρουσία tamoxifen, η CreER μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου καταλύει τον ανασυνδυασμό των αλληλουχιών στόχευσης DNA που βρίσκονται ανάμεσα σε loxP περιοχές της ίδιας κατεύθυνσης (**Εικόνα 5**). Πρόκειται, επομένως, για ένα σύστημα χρήσιμο για την αποτελεσματική χωροχρονική ρύθμιση της σωματικής μεταλλαξογένεσης σε συγκεκριμένες θέσεις.



**Εικόνα 5:** Έκφραση που ρυθμίζεται από το Tamoxifen.

Στη συνέχεια αυτά τα ζώα τα διασταυρώσανε με ζώα που φέρουν ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια που επάγονται από τη δράση της ρεκομπινάσης Cre και μετά μελετήσανε την επίδραση των γενετικών αυτών μεταλλαγών στη διαδικασία μετασχηματισμού των συγκεκριμένων βλαστοκυττάρων. Πέρα από τη μελέτη της ογκογένεσης, τα παραπάνω πειράματα τους επιτρέπουν να μελετάνε το ρόλο συγκεκριμένων μονοπατιών σηματοδότησης στη βιολογία των ενήλικων βλαστοκυττάρων και διαδικασίες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους.

#### **1.4. Στόχος της εργασίας**

**Σκοπός** της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση του προφίλ κυτταρο-ειδικής έκφρασης και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του συνδέτη Dll1 σε διάφορους ιστούς των διαγονιδιακών ποντικών, που προκύψανε από διασταυρώσεις με ποντικούς που φέρουν γονίδια αναφοράς. Θέλουμε να μελετήσουμε αν το Dll1 είναι ένας υποψήφιος δείκτης βλαστικών κυττάρων σε ποικίλους ιστούς του ποντικού και εάν τα Dll1 κύτταρα αποτελούν κύτταρα πιο ευαίσθητα σε ογκογόνες μεταλλάξεις, μέσω διασταυρώσεων με ποντικούς που φέρουν ογκογονίδια.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

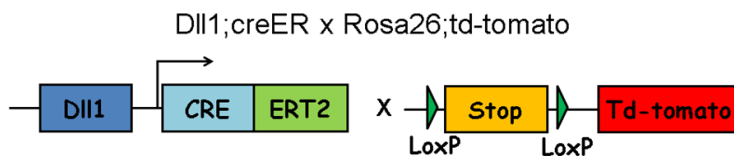
Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγραφούν οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, τόσο ως προς την αρχή λειτουργίας τους, όσο και ως προς τα στάδια που απαρτίζουν την καθεμία.

### 2.1. Πειραματόζωα

#### 2.1.1. Διασταυρώσεις του *Dll1CreERT2* ποντικού.

##### α) *Dll1CreERT2 xR26tdTomato*

Μέσω διασταυρώσεων των παραπάνω διαγονιδιακών ποντικών με το στέλεχος *Rosa26-stop-td-tomato*, έχουν προκύψει οι διαγονιδιακοί απόγονοι *Dll1CreERT2xR26tdTomato*. Σε αυτούς μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tamoxifen (σε δόση 0,1mg/g σωματικού βάρους για 3 συνεχόμενες ημέρες), επάγεται η ενεργότητα της ρεκομπινάσης Cre στα *Dll1*<sup>+</sup> κύτταρα και ακολουθεί εκτομή της stop αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στις θέσεις loxP στην κασέτα *Rosa26-stop-tdTomato*. Επομένως, τα κύτταρα στα οποία συμβαίνει ο ανασυνδυασμός εκφράζουν την πρωτεΐνη Tomato, η οποία όταν ενεργοποιηθεί έχει κόκκινο φθορισμό (Εικόνα 6).



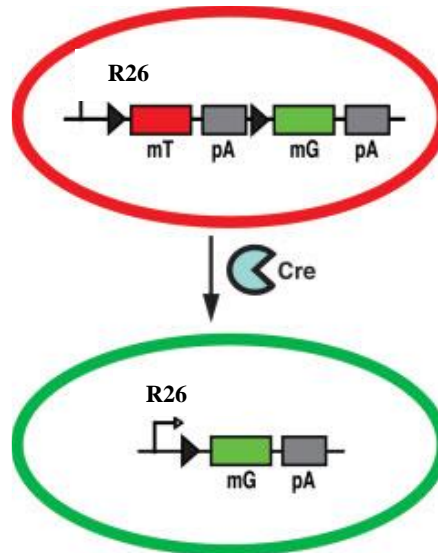
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διασταύρωσης του *Dll1creERxRosa26/td-tomato*.

##### β) *Dll1CreERT2 xR26<sup>mTmG</sup>*

Στην διασταύρωση αυτή, το mT/mG εκφράζεται με τη μεμβράνη-στόχο tdTomato ("mT") πριν από την εκτομή Cre και την EGFP με μεμβράνη-στόχο ("mG") μετά την εκτομή Cre, επιτρέποντας έτσι ζωντανή απεικόνιση και διάκριση ανασυνδυασμένων και μη ανασυνδυασμένων κυττάρων. Ο συνδυασμός ενός δυνατού και καθολικού προαγωγού R26 επιτρέπει την έντονη φθορίζουσα σήμανση όλων των εξετασθέντων ιστών: κόκκινο πριν και πράσινο μετά τον ανασυνδυασμό. Επιπλέον, ο εντοπισμός των φθοριζόντων πρωτεϊνών στις δομές μεμβράνης ("m")

περιγράφει τη μορφολογία των κυττάρων και επιτρέπει την ανάλυση των λεπτών κυτταρικών διεργασιών (Εικόνα 7).

Στους διπλά διαγονιδιακούς απογόνους της διασταύρωσης αυτής, *Dll1creERT2xRosa26<sup>mTmG</sup>*, μετά από επαγωγή με Tamoxifen (σε δόση 0,17 mg/g σωματικού βάρους, για 5 συνεχόμενες ημέρες), τα *Dll1<sup>+</sup>* κύτταρα εκφράζουν GFP.



**Εικόνα 7:** Σχηματική απεικόνιση της mT/mG κατασκευής πριν και μετά τον Cre-μεσολαβούμενο ανασυνδυασμό. Κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή Rosa26, υπάρχει η κωδική αλληλουχία mT (membrane-targeted tandem dimer Tomato), ανάμεσα σε loxP αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να εκφράζεται καθολικά tdTomato στις μεμβράνες. Μετά τον ανασυνδυασμό μέσω του Cre, η mT αλληλουχία απομακρύνεται και επιτρέπεται η έκφραση του mG (membrane-targeted enhanced green fluorescent protein - GFP). Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής. Τα τρίγωνα αντιπροσωπεύουν τις loxP περιοχές στόχους για τον Cre-μεσολαβούμενο ανασυνδυασμό. PA σημαίνει της αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης (Muzumdar, 2007).

### γ) *Dll1CreERT2 xKras<sup>LSL-G12D</sup>*

Το *KRAS<sup>LSL-G12D</sup>* είναι ένα στέλεχος που φέρει μία σημειακή μετάλλαξη (G12D) η έκφραση της οποίας αποκλείεται από την παρουσία ενός κωδικονίου stop ανάμεσα σε loxP περιοχές. Η έκφραση της ρεκομπινάσης Cre που εξαρτάται από τον ιστό και / ή τον χρόνο αφαιρεί την κασέτα STOP και επιτρέπει μεταγραφή από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο KRAS (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση αλληλόμορφου LSL-KrasG12D, αλληλόμορφου άγριου τύπου, και αλληλόμορφου Lox-KrasG12D.

Στους διπλά διαγονιδιακούς απογόνους της διασταύρωσης αυτής, *Dll1creERT2xKRAS<sup>G12D</sup>*, μετά από επαγωγή με Tamoxifen (σε δόση 0,1 mg/g σωματικού βάρους, για 3 συνεχόμενες ημέρες), τα κύτταρα που εκφράζουν Dll1, εκφράζουν συγχρόνως και τη μετάλλαξη στο KRAS γονίδιο G12D.

## 2.2. Ανοσοϊστοχημεία.

### 2.2.1. Μονιμοποίηση ιστού.

Για να μπορέσουμε να πάρουμε μία λεπτή τομή με τη χρήση μικροτόμου, οι ιστοί θα πρέπει μετά τη μονιμοποίηση να διηθηθούν με μία ουσία που θα δώσει μία σταθερή συνοχή, απαραίτητη για το κόψιμο. 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 75% αιθανόλη (Ethanol absolute, Fischer Scientific). Για έγκλειση σε κρυοπροστατευτικό μέσο OCT (Optimal Cutting Temperature compound), ακολουθούμε διαφορετική διαδικασία: μονιμοποιούμε σε 4% παραφορμαλδεΰδη (Paraformaldehyde, PFA, Fischer Scientific) για 2 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 20 λεπτών με PBS 1x και διατηρούμε τον ιστό ολονύκτια σε διάλυμα 30% σουκρόζης (Fischer Scientific). Την επόμενη ημέρα ακολουθεί έγκλειση του ιστού σε κρυοπροστατευτικό μέσο OCT (Optimal Cutting Temperature compound).

#### PBS 10x

1, 37 M NaCl (Sigma)

27 mM KCl (Mallinckrodt)

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (AppliChem)

20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fischer Scientific)

### **2.3. Έγκλειση ιστού και λήψη κρυτομών.**

#### **2.3.1. Τομές παραφίνης**

Η έγκλειση ιστού σε παραφίνη, όπως και η λήψη τομών και η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, πραγματοποιήθηκαν στη μονάδα Ιστοχημείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα. Οι ιστοί παραδόθηκαν σε ειδικά εκμαγεία εμποτισμένα σε 75% αιθανόλη.

#### **2.3.2. Κρυτομές**

Μετά τη μονιμοποίηση, ο ιστός τοποθετείται σε ένα εκμαγείο και καλύπτεται με μέσο έγκλεισης OCT (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura). Το OCT είναι ένας σχηματισμός υδατοδιαλυτών γλυκολών και ρητινών που παρέχει μία κατάλληλη μήτρα για τη λήψη κρυτομών σε θερμοκρασίες από -20 °C και κάτω. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η λήψη τομών επιθυμητού πάχους 10 μm σε κρυτόμο. Χρησιμοποιούμε αντικειμενοφόρους πλάκες κατάλληλες για κρυτομές (Superfrost slides) και αποθηκεύουμε τα δείγματά μας στους -20 °C.

### **2.4. Ανοσοφθορισμός.**

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στα ανοσολογικά εργαστήρια. Στις μεθόδους ανοσοφθορισμού τα αντισώματα που ανιχνεύονται αντιδρούν με αντιγόνα που βρίσκονται πάνω σε κύτταρα ή ιστούς. Τα κύτταρα ή ιστοί βρίσκονται προσκολλημένα πάνω σε ειδικά διαμορφωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Το υποστρώμα που να χρησιμοποιεί για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων και τη μελέτη υλικού βιοψίας στον φθορισμό είναι τομές ιστών.

Ένα τυπικό πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Ξεπλένουμε μία φορά σε διάλυμα PBS 1x για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επωάζουμε σε διάλυμα κάλυψης (blocking solution) για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε το πρωτοταγές αντίσωμα σε διάλυμα κάλυψης στην κατάλληλη αραίωση και επωάζουμε ολονύκτια στους 4 °C. Οι συνθήκες επώασης εξαρτώνται από το εκάστοτε αντίσωμα (Πίνακας 1).
- Στη συνέχεια, πραγματοποιούμε 3 εκπλύσεις των 5 λεπτών με PBS 1x 0,1% TritonX-100.
- Προσθέτουμε το δευτεροταγές αντίσωμα (IgG έναντι του ζώου στο οποίο παράχθηκε το πρωτοταγές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα) σε διάλυμα κάλυψης στην κατάλληλη αραίωση και επωάζουμε για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι (Πίνακας 2).
- Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 5 λεπτών με PBS 1x 0,1% TritonX-100.
- Προσθέτουμε DAPI 1x [Appli Chem] και επωάζουμε για 3 λεπτά στο σκοτάδι.
- Μονιμοποιούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα απλώνοντας με την καλυπτρίδα μία σταγόνα Mowiol.
- Η πλάκα είναι έτοιμη προς παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού ή στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Οι εικόνες του ανοσοφθορισμού από το ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο [Leica Sp5] προέκυψαν μέσω του προγράμματος LAS AF Lite και μικροσκόπιο φθορισμού Leica DMRA2.

<i>Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης</i>	<i>Κωδικός</i>	<i>Εταιρεία</i>	<i>Οργανισμός στον οποίο παράχθηκε</i>	<i>Αραίωση</i>
<i>CK14</i>	<i>SIG-3476</i>	<i>Covance</i>	<i>chicken</i>	<i>1:250</i>
<i>CK8</i>	<i>TROMA-I</i>	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>	<i>rat</i>	<i>1:100</i>

<b>CK5</b>	<i>PRB-160P</i>	<i>Covance</i>	<i>rabbit</i>	<i>1:1000</i>
<b>SGLT2</b>	<i>sc-393350</i>	<i>Santa Cruz</i>	<i>rabbit</i>	<i>1:50</i>
<b>Calbindin</b>	<i>CB38a</i>	<i>Swant</i>	<i>rabbit</i>	<i>1:500</i>
<b>E-cadherin</b>	<i>2000-5999</i>	<i>Cell Signaling</i>	<i>rabbit</i>	<i>1:200</i>
<b>Vimentin</b>	<i>ab92547</i>	<i>Abcam</i>	<i>rabbit</i>	<i>1:250</i>
<b>VEGF Receptor 1</b>	<i>ab2350</i>	<i>Abcam</i>	<i>rat</i>	<i>1:100</i>
<b>anti PanK</b>	<i>ab96173</i>	<i>Abcam</i>	<i>rat</i>	<i>1:500</i>

**Πίνακας 1:** Πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού.

<i>Αντίσωμα</i>	<i>Κωδικός</i>	<i>Εταιρεία</i>	<i>Αραίωση</i>
<i>Cy3-conjugated anti-rabbit IgG</i>	<i>donkey 711-165-152</i>	<i>Jackson Immunoresearch</i>	<i>1:1000</i>
<i>AlexaFluor®488-conjugated donkey anti-rabbit IgG</i>	<i>711-546-152</i>	<i>Jackson Immunoresearch</i>	<i>1:500</i>
<i>Alexa Fluor®633-conjugated goat anti-rabbit IgG</i>	<i>A-21070</i>	<i>Molecular Probes</i>	<i>1:1000</i>
<i>Cy-5Goat Anti-rat IgG H&amp;L</i>	<i>ab97078</i>	<i>Jackson Immunoresearch</i>	<i>1:500</i>
<i>Anti-chicken 647</i>			

**Πίνακας 2:** Δευτεροταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού.

### Διάλυμα κάλυψης

PBS 1x

1% BSA (Albumin Fraction V, AppliChem)

0, 1% TritonX-100 (Fischer Scientific)

### 2.5. Απομονωση ολικου γονιδιωματικου DNA απο ουρες των ποντικων

Στα eppendorfs (1,5ml) με τις κομμένες ουρές προσθέτουμε 75 μl Alkaline Lysis Reagent. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 95<sup>0</sup>C για 1 ώρα. Ακολουθεί



ανακίνηση για 10 λεπτά. Προσθέτουμε 75 µl Neutralization buffer και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα είναι έτοιμα για PCR.

## 2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

Οι συμβατικές μέθοδοι μοριακής κλωνοποίησης θεωρούνται εργαλεία *in vivo* πολλαπλασιασμού του DNA. Ωστόσο, με την ανάπτυξη του συνθετικού DNA δημιουργήθηκε μια νέα μέθοδος γρήγορου πολλαπλασιασμού του DNA *in vitro*, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η τεχνική αυτή αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η βασική αρχή της αντίδρασης PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94°C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Εν συνεχεία, δύο κατάλληλα σχεδιασμένα, μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Ακολούθως, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλινο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου το οποίο είναι δίκλινο. Για τη συγκεκριμένη σύνθεση απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων Mg.

Μια τυπική αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα erpendorf (100µl) προστίθενται:

Συστατικά	25 µL αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
PCR-grade water	20.35 µL	N/A
10XKAPATaqBuffer/ PCR ρυθμιστικό διάλυμα	2.5 µL	1X
Μίγμα dNTPs (10mM)	0.5 µL	0.2 mM το καθένα
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10µM)	0.25 µL	0.25 µM
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10µM)	0.25 µL	0.25 µM
Taq DNA πολυμεράση (1unit/µl)	0.15 µL	0.5 U
Γονιδιωµατικό DNA	1 ng	όσο απαιτείται

Οι συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

<b>Βήμα αντίδρασης PCR</b>	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	94°C	3 λεπτά
<b>32-35 Κύκλοι</b>	94°C	30 δευτερόλεπτα
	56°C / 60°C	30 δευτερόλεπτα
	72°C	30 δευτερόλεπτα
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C	3 λεπτά
<b>Διατήρηση προϊόντος</b>	16°C	

Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την PCR προγραμματίζεται στη συσκευή του ειδικού θερμικού κυκλοποιητή.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA, απευθείας από το DNA των υπό μελέτη γονιδίων στελεχών, με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γονιδίων στην παρούσα εργασία είναι οι εξής:

#### **ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ 5'-3' ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

CRE1	CTG CCA CGA CCA AGT GAC AGC	4'94 C, 34 x (1'94C, 1'60 C, 4'72 C), 10'72 C
CRE2	CTT CTC TAC ACC TGC GGT GCT	
TMMT_F	GGCATTAAGCAGCGTATCC	
TMMT_R	CTGTTCTGTACGGCATGG	
TMWT_F	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	
TMWT_R	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC	
KRASLSL1	GTC GAC AAG CTC ATG CGGG	
KRASLSL2	CGC AGA CTG TAG AGC AGCG	
KRASLSL3	CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC	
ROSA WTF	CTC TGC TGC CTC CTG GCT TCT	4'94 C, 34 x (1'94 C, 1'56 C, 4'72' C), 10'72 C
ROSA WTR	CGA GGC GGA TCA CAA GCA ATA	
ROSA MR	TCA ATG GGC GGG GGT CGT T	

## 2.7. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζη

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων, βάσει του μεγέθους και της διαμόρφωσής τους, πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζη. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1-100 kb. Τα τμήματα DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Η προετοιμασία της πηκτής και των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

Ποσότητα αγαρόζης αναμιγνύεται, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x TAE. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης 2% (w/v). Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί. Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να φτάσει έως τους 60°C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, τελικής συγκέντρωσης 0,5mg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματισθούν, στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης. Εν συνεχεία η χτένα απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE έτσι ώστε η πηκτή να παραμείνει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνεια του. Ακολουθεί ανάμιξη των δειγμάτων νουκλεϊνικών οξέων με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (1/10 του όγκου loading buffer) και τα δείγματα τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης. Τέλος στα άκρα της πηκτής εφαρμόζεται κατάλληλη τάση, 120-130 Volt

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Έκφραση του Dll1 σε διάφορους ιστούς διαγονιδιακών ποντικών με γονότυπα *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>* και *Dll1CreERT2;R26tdTomato*

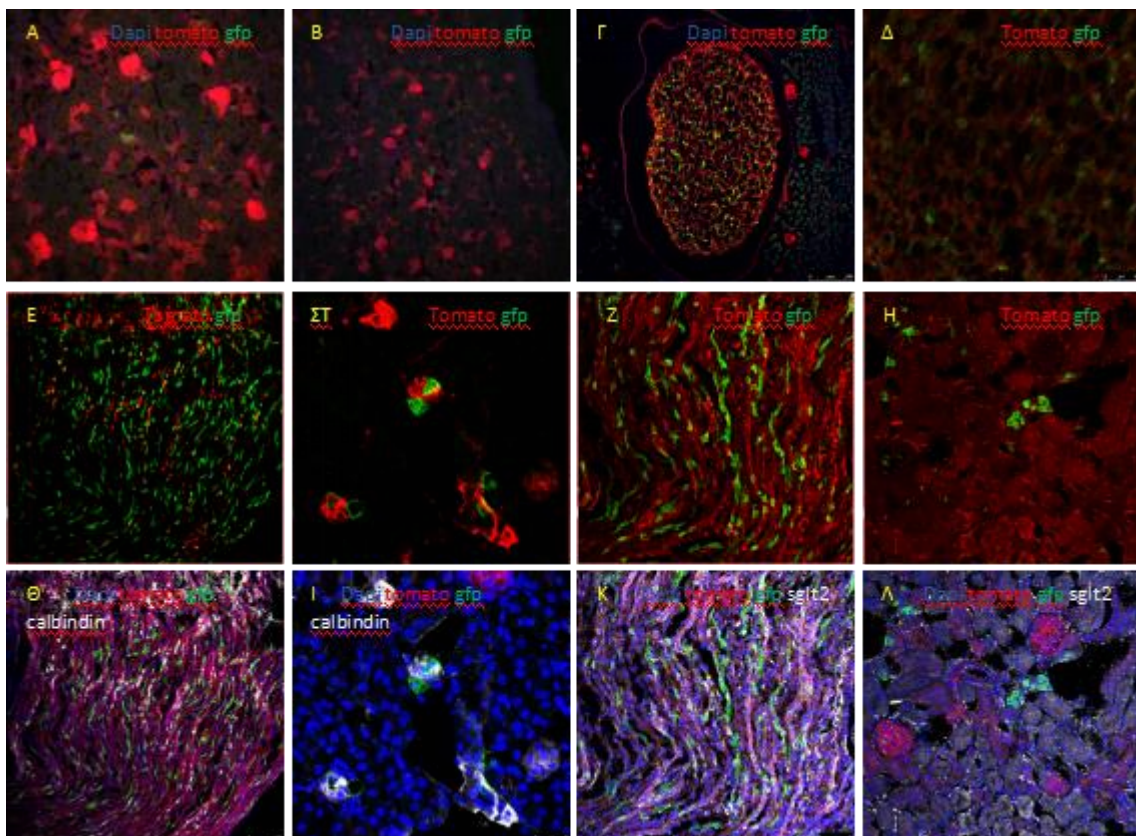
##### 3.1.1. Κρυστομές νεφρού

Το νεφρό αποτελεί όργανο του ουροποιητικού συστήματος και αποτελείται από ένα νεφρικό σωμάτιο και ένα νεφρικό σωληνάριο. Το νεφρικό σωμάτιο αποτελείται από ένα τριχοειδικό δίκτυο που ονομάζεται σπείραμα και περιβάλλεται από την κάψα του Bowman. Το νεφρικό σωληνάριο ξεκινά από την κάψα του Bowman. Τα τμήματά του σε σειρά είναι: το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, η αγκύλη του Henle, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και το συλλεκτικό σωληνάριο, τα οποία περιβάλλονται όλα από περισωληναριακά τριχοειδή. Οι σπειροειδείς περιοχές των νεφρών βρίσκονται στο φλοιό, ενώ οι περιοχές με σχήμα θηλιάς στο μυελό.

Τα επί μέρους τμήματα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην επαναρρόφηση των εν λόγω ουσιών. Για παράδειγμα, το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης επαναρροφάται στα S1 και S2 τμήματα του σωληναρίου σε αναλογία 1:1 με νάτριο, από τους μεταφορείς νατρίου-γλυκόζης-1 (sodium glucose transporters-1, SGLT1), ενώ στο S3 τμήμα επαναρροφάται το υπόλοιπο ποσό γλυκόζης από τους μεταφορείς νατρίου-γλυκόζης-2, (SGLT2) σε αναλογία 2 ιόντα νατρίου προς 1 μόριο γλυκόζης.

Στα σπονδυλωτά τα κανάλια TRPV5 και TRPV6, γνωστά και ως επιθηλιακά κανάλια  $Ca^{2+}ECaCs$  (Epithelial  $Ca^{2+}Channels$ ), υπάρχουν στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών και του λεπτού εντέρου, προς την πλευρά του αυλού, και εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα για το  $Ca^{2+}$ . Τα κανάλια αυτά μεσολαβούν στην επαναρρόφηση του  $Ca^{2+}$  που ρυθμίζεται από τη βιταμίνη D. Το  $Ca^{2+}$ , που εισέρχεται από τον αυλό του εντέρου ή των νεφρών στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω των  $ECaCs$ , επιστρέφει στην κυκλοφορία του αίματος από δύο αντλίες  $Ca^{2+}$ , μία  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη ATPάση και τον ανταλλάκτη  $Na^{+}/Ca^{2+}NCX1$ , που βρίσκονται στη βασοπλευρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Καθώς τα κανάλια TRPV5 και TRPV6 είναι μόνιμως ανοιχτά, για να αποφευχθούν οι αρνητικές παρενέργειες της

αυξημένης συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$  στο κύτταρο, υπάρχει η ρυθμιστική πρωτεΐνη ( $Ca^{2+}$ -Buffering protein) καλμπιντίνη (calbindin), η οποία παροδικά συνδέει το  $Ca^{2+}$ , έως την απομάκρυνσή του από τις αντλίες. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα κανάλια TRPV5, TRPV6 και την καλμπιντίνη βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D συνδέεται στον υποδοχέα της VDR (Vitamin D Receptor), έναν μεταγραφικό παράγοντα που εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο την επαναπρόσληψη του  $Ca^{2+}$  στο αίμα, απαραίτητη για τον σχηματισμό των οστών.



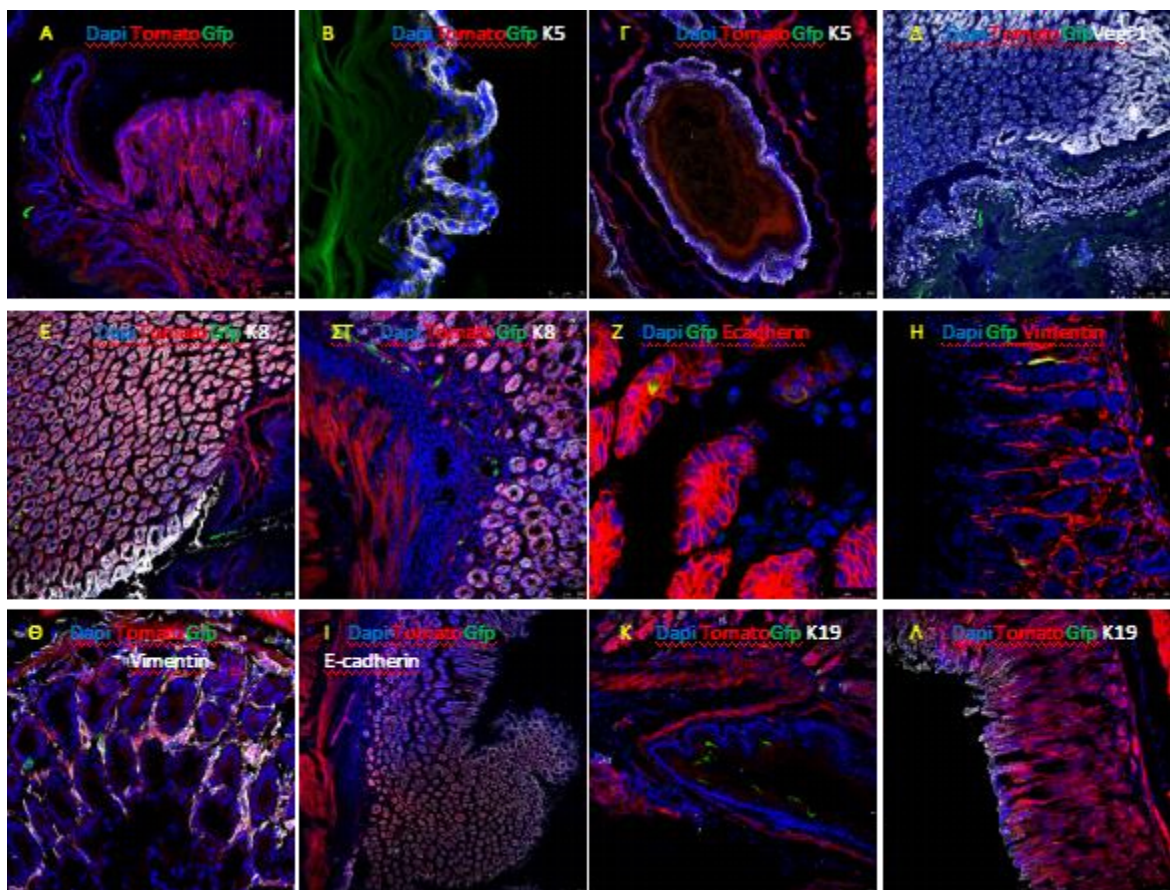
**Εικόνα 9:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυτομές νεφρού διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 ή 11 εβδομάδες. (A-H): (20x) Τα Gfp κύτταρα αντιπροσωπεύουν τα  $DLL1^{+}$  κύτταρα. (K, Λ): (20x) Χρώση με αντίσωμα sgl2. (Θ, Ι): (20x) χρώση με αντίσωμα calbindin. Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.

Τα  $GFP^{+}$  κύτταρα στους *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>* ποντικούς δε φαίνεται να σημαίνονται από το αντίσωμα anti-sgl2 (Εικόνες 9K-9Λ), αλλά φαίνεται να είναι μέρος των άπω εσπειραμένων σωληναρίων που σημαίνονται με calbindin (Εικόνες 9Θ-9Ι).

### 3.1.2. Κρυτομές στομάχου

Ο στόμαχος είναι όργανο του γαστρεντερικού συστήματος και αποτελεί ένα από τα όργανα που παρατηρήθηκε έκφραση του Gfp (D11) σε διάφορα τμήματά του. Με τη χρήση ποικίλων αντισωμάτων, προσπαθούμε να διαχωρίσουμε τους κυτταρικούς τύπους που εκφράζουν το γονίδιο μας. Η Vimentin είναι δείκτης των κυττάρων του στρώματος, ενώ η E-cadherin είναι δείκτης των επιθηλιακών κυττάρων. Τα επιθηλιακά κύτταρα ανάλογα το μέρος του στομάχου σημαίνονται από διαφορετικά αντισώματα κερατίνης. Ο προστόμαχος (forestomach) εκφράζει τις κερατίνες KRT5 και KRT14. Στις λάχνες παρατηρείται έκφραση της KRT8 και στις εξωτερικές λάχνες της KRT19.

Παρατηρώντας την **Εικόνα 10**, βλέπουμε λίγα διπλά θετικά E-cadherin<sup>+</sup>Gfp<sup>+</sup> και KRT8<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> κύτταρα, καθώς και κάποια Vimentin<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> κύτταρα στο στρώμα μεταξύ των λαχνών.



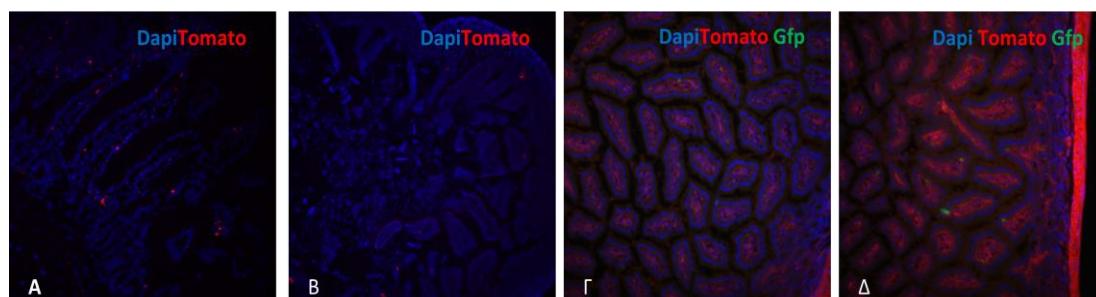
**Εικόνα 10:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυτομές στομάχου διπλά διαγονιδιακών ποντικών *D11CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 ή 11 εβδομάδες. Στις

φωτογραφίες (B, Γ): (40x) Χρήση αντισώματος anti-KRT5. Στις φωτογραφίες (H, Θ) με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται τα διπλά θετικά Gfp κύτταρα. (Δ, Ι): Με το αντίσωμα VEGF1R βλέπουμε τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στις φωτογραφίες (E, Z) Χρήση αντισώματος anti-KRT8. (Λ, Μ):(10x) Χρήση αντισώματος anti-K19. Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.

### 3.1.3. Κρυτομές εντέρου

Το εντερικό επιθήλιο διατηρείται με την ταχεία ανανέωση των κυττάρων που τροφοδοτούνται από τα βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στο κατώτερο τμήμα της κρύπτης (Crosnier, Stamatakis & Lewis, 2006; Barker, 2013). Διάφορα μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου του Notch, διαδραματίζουν ξεχωριστούς ρόλους για τη διατήρηση της ιδιότητας των βλαστικών κυττάρων (Van Dussen, 2012; Clevers, 2013) και για την οργάνωση κατάλληλου πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης (Nakamura, Tsuchiya & Watanabe, Liu & Kopan, 2011).

Στους διπλά διαγονιδιακούς απογόνους των παραπάνω διασταυρώσεων με τους ποντικούς αναφοράς, εντοπίστηκαν  $DLL1^+$  κύτταρα μέσα στις εντερικές κρύπτες, μετά τη χορήγηση Tamoxifen στις 8 εβδομάδες.



**Εικόνα 11:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυτομές εντέρου διπλά διαγονιδιακών ποντικών. (A, B): *Dll1creERT2;R26tdtomato*, τα κόκκινα κύτταρα αντιπροσωπεύουν  $Dll1$ . (Γ, Δ): (20x) *Dll1CreERT2;R26<sup>mTomG</sup>*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 ή 11 εβδομάδες, τα πράσινα κύτταρα αντιπροσωπεύουν  $Dll1$ . Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.

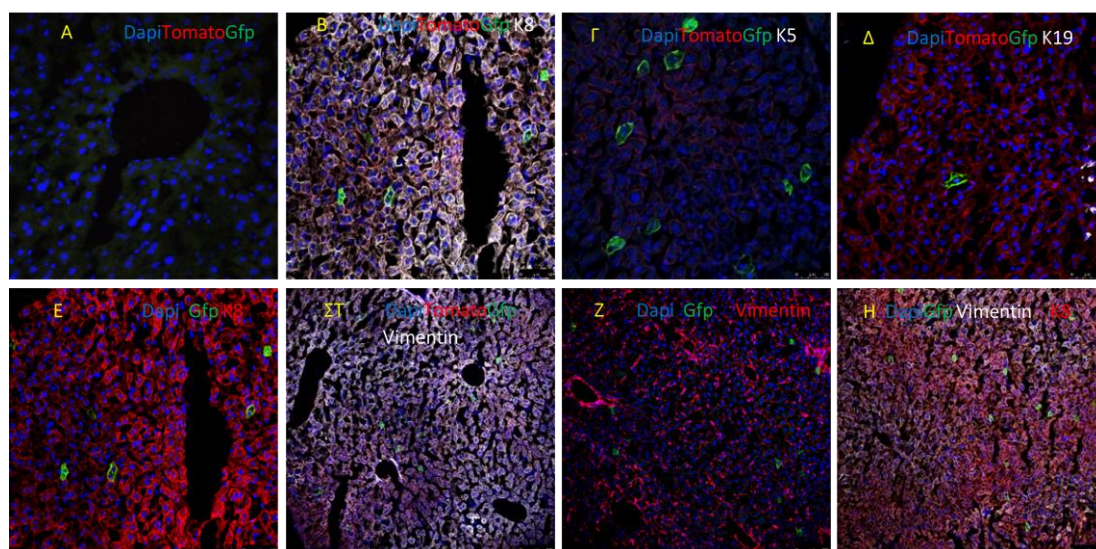
### 3.1.4. Κρυτομές του ήπατος

Επόμενος ιστός που εξετάστηκε είναι το συκώτι. Τα βασικά και πιο κοινά κύτταρα του ήπατος (που αποτελούν το 90% τοις εκατό των κυττάρων του ήπατος)

ονομάζονται ηπατοκύτταρα. Το 35% των ηπατοκυττάρων είναι διπύρρηνα. Αυτά τα πολύ εξελιγμένα κύτταρα διεξάγουν το μεγαλύτερο μέρος των ποικίλων λειτουργιών που εκτελεί το συκώτι. Τα ηπατοκύτταρα χωρίζονται σε ομάδες ή δέσμες για να σχηματίσουν λοβία. Στο εξωτερικό του κάθε λοβίου υπάρχουν κλάδοι τόσο της πυλαίας φλέβας όσο και της ηπατικής αρτηρίας, που θα εισέλθουν διακλαδιζόμενοι στο λοβίο. Τα τριχοειδή κανάλια αίματος που ονομάζονται κολποειδή είναι η κατάληξη από αυτές τις διακλαδώσεις της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής αρτηρίας μέσα στα λοβία.

Τα κολποειδή είναι εσωτερικά επενδυμένα από ιστό που αποτελείται από τα λεγόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα. Άλλα κύτταρα των κολποειδών είναι τα κύτταρα Kupffer, τα κύτταρα Pitt και τα ηπατικά Αστεροειδή κύτταρα ή λιπόδη κύτταρα.

Με τη χρήση του αντισώματος KRT8, παρατηρούμε ηπατοκύτταρα GFP<sup>+</sup> (Εικόνα 12). Στην Εικόνα 12(B,E), διαφαίνεται διπύρρηνο διπλά θετικό κύτταρο (KRT8<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>).



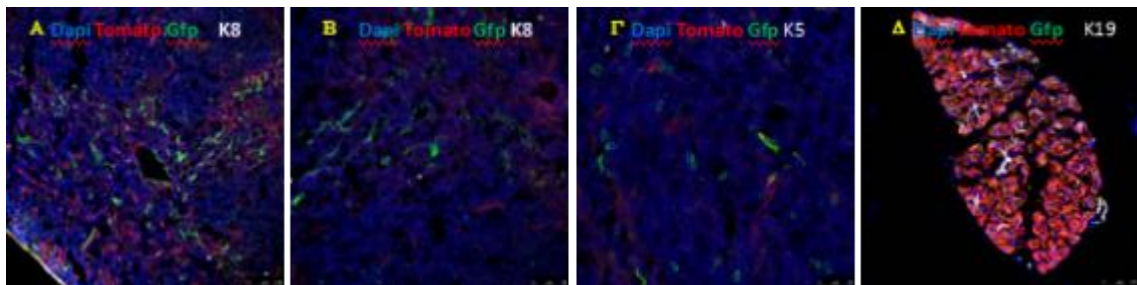
**Εικόνα 12:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυστομές συκωτιού διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;R26<sup>mTomG</sup>*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 ή 11 εβδομάδες. (B, E): (20x) Χρήση αντισώματος anti-KRT8. (Γ): (20x) Χρήση αντισώματος anti-KRT5. (Δ): (20x) Χρήση αντισώματος anti-KRT19. (Z,H): (20x) Χρήση αντισώματος anti-Vimentin. (I): (20x) Χρήση αντισώματος anti-Vimentin και KRT8. Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.



### 3.1.5. Κρυοτομές σπλήνα και παγκρέατος

Ο σπλήνας αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του λεμφικού ιστού του οργανισμού. Ο σπλήνας διαιρείται σε ερυθρό και λευκό πολφό. Ο ερυθρός πολφός αποτελείται από πολφικές χορδές, οι οποίες παρεμβάλλονται ανάμεσα σε κολποειδή, ενώ ο λευκός πολφός αποτελείται από λεμφικό ιστό, ο οποίος συνδέεται στενά με αρτηρίες. Ο εν λόγω λεμφικός ιστός σχηματίζει καλύμματα Τ λεμφοκυττάρων γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία (περιαρτηριακά λεμφικά έλυτρα), ή λεμφοζίδια από Β λεμφοκύτταρα. Η περιοχή μεταξύ ερυθρού και λευκού πολφού είναι γνωστή ως επιχείλια ζώνη και είναι πλούσια σε αγγεία και δραστήρια φαγοκύτταρα. Ο ερυθρός πολφός διαθέτει δενδροειδές δίκτυο αιμοφόρων αγγείων με διευρυμένες περιοχές κατά τόπους, τα σπληνικά κολπώματα. Δεν έχουμε εντοπίσει ακόμη τον κυτταρικό τύπο των GFP<sup>+</sup> (DLL1<sup>+</sup>) κυττάρων σε αυτόν τον ιστό.

Το πάγκρεας είναι ένας αδένας του πεπτικού συστήματος. Είναι μικτός αδένας με ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα. Το Dll1 εκφράζεται στο πάγκρεας μόνο κατά την εμβρυϊκή ηλικία και όχι στο ενήλικο ζώο.

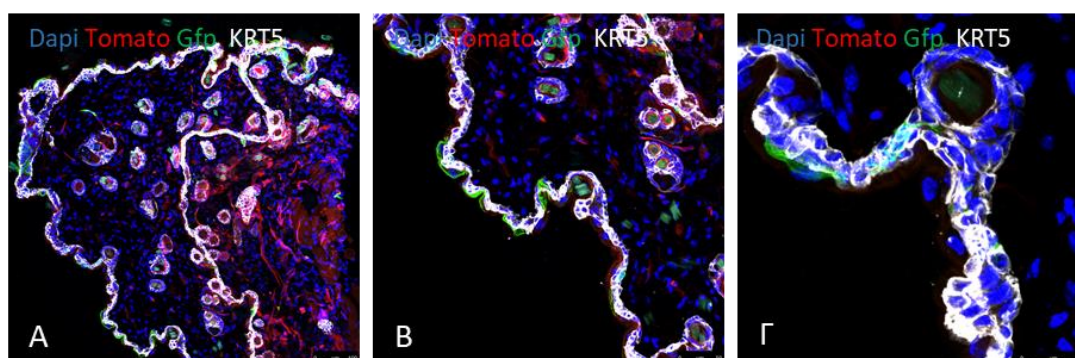


**Εικόνα 13:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυοτομές σπλήνα και παγκρέατος διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 ή 11 εβδομάδες. (Α,Β): (20x) Τομές σπλήνα μετά τη χρήση αντισώματος anti-KRT8. (Γ): (20x) Τομή σπλήνα μετά τη χρήση αντισώματος anti-KRT5. (Δ): (20x) Τομή παγκρέατος με τη χρήση αντισώματος anti-KRT19. Δεν διαφαίνονται GFP<sup>+</sup> κύτταρα. Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.

### 3.1.6. Κρυτομές δέρματος

Η μικρο-ανατομία του δέρματος του ποντικού είναι παρόμοια με το δέρμα άλλων γουνοφόρων ζώων αλλά διαφέρει από το ανθρώπινο δέρμα. Το δέρμα του ποντικού αποτελείται από ένα εξωτερικό επιθήλιο (επιδερμίδα), ένα παχύ στρώμα προσδετικού ιστού (χόριο) και ένα στρώμα λιπώδους ιστού (υποδερμίδα ή *ranniculus adiposus*). Ένα λεπτό στρώμα από γνωστό ως *ranniculus carnosus*, διαχωρίζει το δέρμα από άλλες δομές. Στους ποντικούς (με εξαίρεση στελεχών αλμπίνο), τα μελανοκύτταρα που δημιουργούν τη χρωστική μελανίνη είναι παρόντα στα βασικά κύτταρα της επιδερμίδας. Το δέρμα του ποντικού δεν έχει ιδρωτοποιούς αδένες, πάρα μόνο στο πέλμα.

Στο δέρμα παρατηρήσαμε ότι υπάρχουν λίγα διπλά θετικά KRT5<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> κύτταρα (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυτομές δέρματος διπλά διαγονιδιακών ποντικών *D111CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>*, επαγόμενων από Ταμοξιφεν στις 8 ή 11 εβδομάδες. (Α, Β, Γ): Τομές δέρματος με την χρήση αντισώματος anti-KRT5. Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.

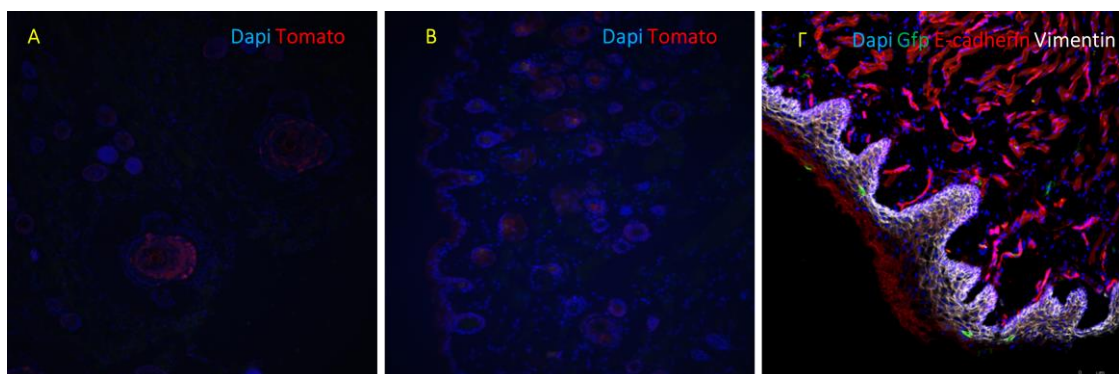
### 3.1.7. Κρυτομές στόματος του ποντικού

Το στόμα αποτελείται από δύο μέρη, το προστόμιο και την κυρίως κοιλότητα του στόματος. Ο στοματικός βλεννογόνος είναι το στοματικό επιθήλιο που καλύπτει το εσωτερικό του στόματος. Το στόμα, που φυσιολογικά είναι πάντα υγραμμένο, είναι επενδεδυμένο με βλεννώδη μεμβράνη και περιέχει τα δόντια.

Τα χείλη είναι τα τμήματα μαλακού ιστού που αποτελούν το εμπρός όριο και ορίζουν την είσοδο του στόματος. Καλύπτονται εξωτερικά από δέρμα και εσωτερικά από μη κερατινοποιημένη επιθηλιακή μεμβράνη που καλύπτει και το υπόλοιπο εσωτερικό του στόματος. Το μυϊκό υπόστρωμα των χειλιών διαμορφώνεται από τον σφικτήρα του στόματος και τα προσκείμενα σε αυτόν μέρη των υπολοίπων μυών του στόματος. Η εξωτερική επιφάνεια του δέρματος των χειλιών έχει συνήθως μια λεπτή επιδερμίδα, που αποτελείται από δύο στρώματα μικρών, αδιαφοροποίητων επιθηλιακών κυττάρων που καλύπτονται από κερατίνη. Υπάρχει περιστασιακή μιτωτική μορφή στο βασικό στρώμα. Οι σηγηματογόνοι αδένες και τα θυλάκια τρίχας είναι παρόντα σε μεγάλους αριθμούς στο χόριο. Ο σηγηματογόνος αδένας αποτελείται από σηγηματογόνα κύτταρα, τα οποία είναι επιθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν το σμήγμα.

Το εξωτερικό τμήμα του θύλακα της τρίχας είναι μία εξοχή της επιδερμίδας που ονομάζεται εξωτερική θήκη ριζών (ERS). Η εσωτερική θήκη ριζών (IRS) είναι μια πολυστρωματική κυτταρική κάλυψη που περιβάλλει την επιδερμίδα και τον φλοιό των τριχών. Η εξωτερική θήκη ρίζας είναι συνεχής με το στρώμα της επιδερμίδας και η εσωτερική θήκη ρίζας είναι συνεχής με την κεράτινη στιβάδα της τρίχας.

Η επιφάνεια των βλεννογόνων μεμβρανών έχει ένα επιθήλιο πολύ παχύτερο από το δέρμα. Είναι καλά διαφοροποιημένη, αποτελούμενη από ένα βασικό στρώμα κυττάρων του οποίου οι άξονες είναι περισσότερο ή λιγότερο κάθετοι στην μεμβράνη του υποστρώματος. Μια ζώνη από 5-8 πολυγωνικά κύτταρα, που αντιστοιχούν στην ακανθωτή στιβάδα δέρματος και βλεννογόνου στον άνθρωπο. Ένα στρώμα από 6-8 κύτταρα με άξονες παράλληλους προς την επιφάνεια, που έχει κοκκία στο κυτταρόπλασμα και ένα λεπτό κολλημένο επιφανειακό στρώμα.



**Εικόνα 15: (A, B):** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από φυσιολογικούς κρυστομές χειλιών, διπλά διαγωνιδιακών

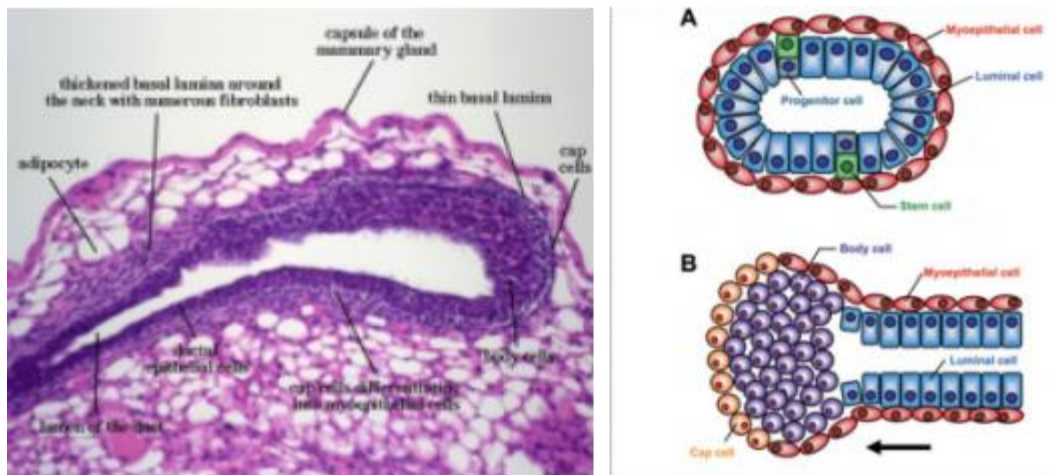
ποντικών *Dll1creERT2;R26tdtomato*. (Γ): Φοτογραφία μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυοτομή χειλιών, διπλά διαγονιδιακών *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 ή 11 εβδομάδες.(Γ): (20x) Χρήση αντισώματος E-cadherin και Vimentin.

### 3.1.8. Κρυοτομές μαστικού αδένου

Όπως και στον άνθρωπο, ο μαστικός αδένου του ποντικού αποτελεί ένα δυναμικό όργανο που επιδέχεται πολλές αλλαγές στη διάρκεια της ζωής του. Στον ποντικό σχηματίζονται πέντε ζεύγη μαστικών αδένων που εκτείνονται από το λαιμό έως τη βουβωνική χώρα. Ο μαστικός αδένου αποτελείται από επιθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανόμενων λιποκυττάρων, ινοβλαστών, αιμοφόρων αγγείων και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά την εφηβεία, ο μαστικός αδένου αναπτύσσεται σημαντικά για να σχηματίσει μια υψηλά διακλαδισμένη σωληνοειδή δομή (mammary tree), η οποία σταδιακά θα καλύψει τον λιπώδη ιστό (fatpad). Στη διάρκεια

της εγκυμοσύνης, ο μαστικός αδένου επεκτείνεται περισσότερο και οι τελικές σωληνοειδείς δομές (TEB – Terminal End Bud) μετατρέπονται σε κύτταρα που παράγουν γάλα (alveolar buds). Με το πέρας της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας, τα κύτταρα που έχουν πολλαπλασιαστεί αποπίπτουν και ο ιστός επανέρχεται στην αρχική του μορφή.

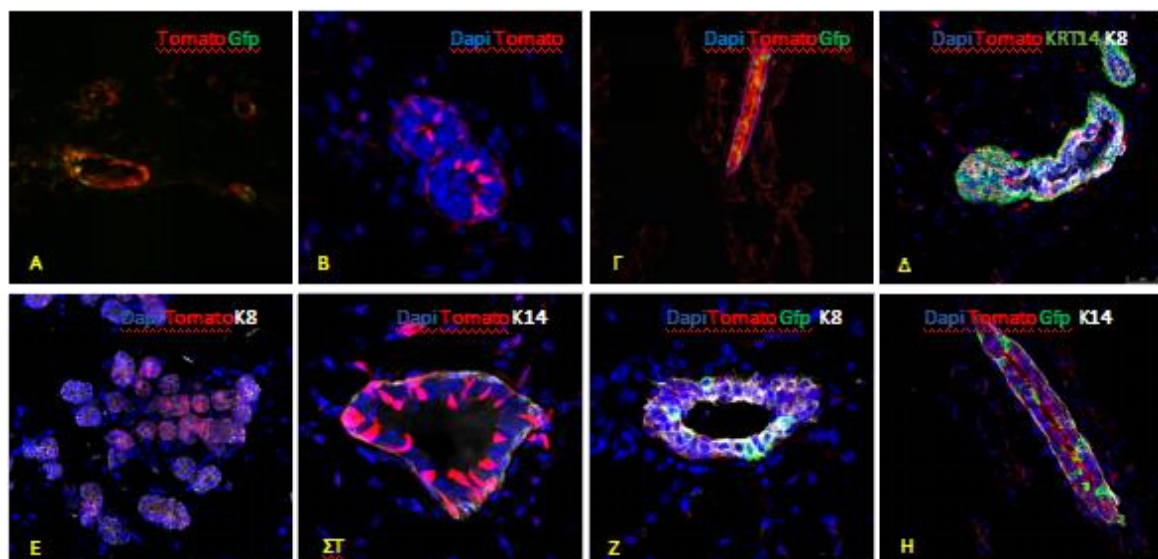
Το επιθήλιο του μαστικού αδένου αποτελείται από δύο κυτταρικούς τύπους: τα βασικά μυοεπιθηλιακά (myoepithelial) κύτταρα και τα κύτταρα του αυλού (luminal), τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα αγωγού ή σε κύτταρα που παράγουν γάλα (**Εικόνα 16**).



**Εικόνα 16:** (16α) Κυτταρικοί τύποι στις τελικές σωληνοειδείς δομές. (16β) Οι δύο βασικές επιθηλιακές στιβάδες φαίνεται να προέρχονται από ένα κοινό προγονικό κύτταρο. Στην εξωτερική στιβάδα βρίσκονται τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα και στην εσωτερική συναντάμε τα κύτταρα του αυλού.

Στον μαστικό αδένα, τα κύτταρα της βασικής στιβάδας χαρακτηρίζονται από την έκφραση της Κερατίνης 14 (KRT14), ενώ τα κύτταρα του αυλού εκφράζουν την Κερατίνη 8 (KRT8). Η έκφραση του Dll1 παρατηρείται και στους δύο κυτταρικούς τύπους του επιθηλίου του ιστού.

Τέλος, παραθέτουμε φωτογραφίες του μαστικού αδένα μετά τη διασταύρωση του *Dll1CreERT2* και με αυτόν τον ποντικό - μάρτυρα *R26<sup>mTmG</sup>* (Εικόνα 18). Επιβεβαιώνεται η ύπαρξη *Dll1<sup>+</sup>* βασικών κυττάρων, αλλά και κυττάρων αυλού.



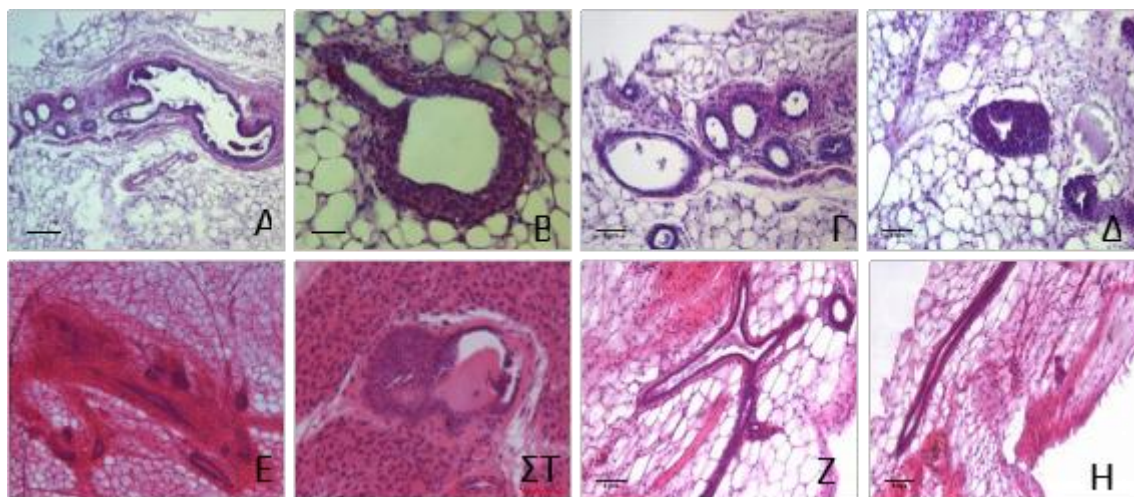
**Εικόνα 17:** (A, Γ, Z, H): Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυτομές μαστικού αδένα, δίπλα διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 ή 11

εβδομάδες, τα πράσινα κύτταρα αντιπροσωπεύουν Dll1. (B, Δ, E, ΣΤ): Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser αγωγών από κρυτομές μαστικού αδένου, διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1creERT2;R26tdtomato*, τα κόκκινα κύτταρα αντιπροσωπεύουν Dll1. (Δ): (40x) Χρήση αντισώματος anti-KRT14 και anti-KRT8. (E-Z): (40x) Χρήση αντισώματος anti-KRT8. (ΣΤ, Η): (40x) Χρήση αντισώματος anti-KRT14. Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.

### 3.2 Τομές από ιστούς ποντικού με γονότυπο *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>*

Με τη χορήγηση Tamoxifen στους διπλά διαγονιδιακούς απογόνους, στα κύτταρα που λαμβάνει χώρα ο ανασυνδυασμός, το Kras ενεργοποιείται στα κύτταρα στα οποία είναι μεταγραφικώς ενεργό το Dll1.

Στις τομές παραφίνης των μαστικών αδένων, παρατηρήθηκαν υπερπλαστικοί αγωγοί (Εικόνα 18).



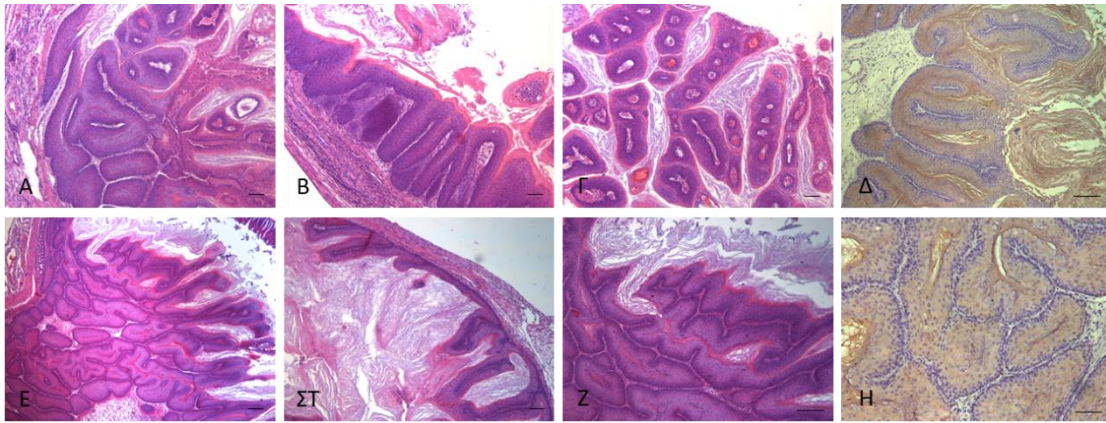
**Εικόνα 18:** Μαστικοί αδένες διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>* και των αντίστοιχων ποντικών - μαρτύρων (*Dll1creER* ή *Kras<sup>LSL-G12D</sup>*), 7 και 12 εβδομάδων που τους δόθηκε Tamoxifen την 3η με 4η εβδομάδα της ζωής τους. (A-H): Φωτογραφίες φωτονικού μικροσκοπίου (10x-20x) από τομές παραφίνης με χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης (A, Γ-ΣΤ): του *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>*, (Z-H): του ποντικού - μάρτυρα και (B): του *KRT5CreER; Kras<sup>LSL-G12D</sup>*.

### 3.2.1 Όγκοι στομάχου

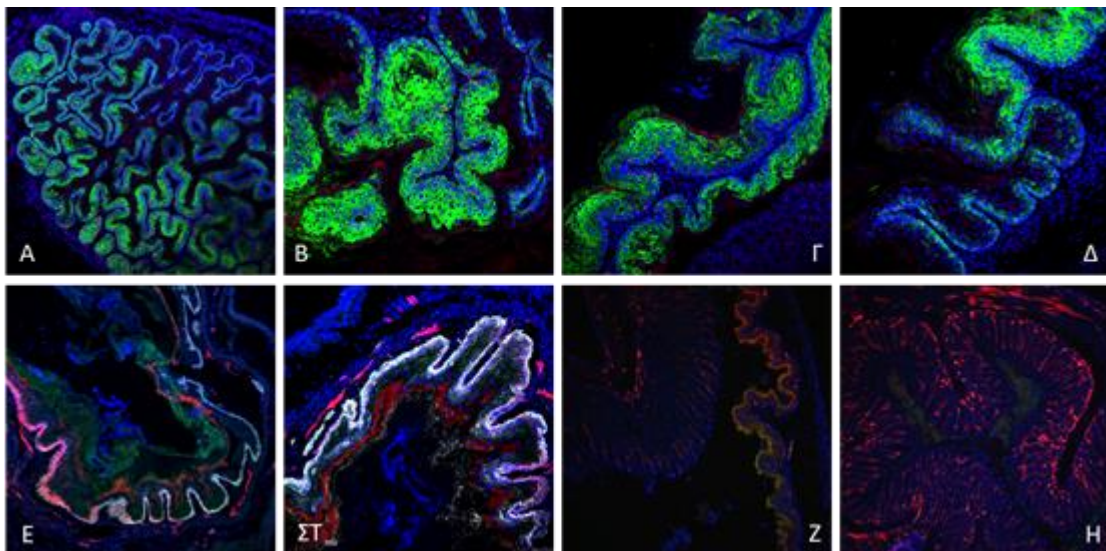
Έρευνες για τη μετάλλαξη  $Kras^{G12D}$  βασίστηκαν στην έκφρασή της στα βασικά κύτταρα του επιθηλίου, χρησιμοποιώντας τους  $K5teto;Kras (LSL-G12D)$  ποντικούς. Μετά τη χορήγηση Doxycycline, παρατηρήθηκαν από υπερπλασίες, θηλώματα και δυσπλασίες μέχρι μεταστατικά καρκινώματα που αναπτύχθηκαν στο πλακώδες επιθήλιο του δέρματος, στο βλεννογόνο του στόματος, στους σιελογόνους αδένες, στη γλώσσα, στον οισοφάγο, στον προστόμαχο (forestomach) και στον τράχηλο της μήτρας μέσα σε 20 ημέρες (LynnVitale-Crossetal, 2004). Στα  $Dll1CreERT2;Kras^{LSL-G12D}$  πειραματόζωά μας είδαμε αντίστοιχες εικόνες σε κάποιους ιστούς, όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 19**. Επικεντρωθήκαμε στον στόμαχο, όπου από τα 40 ζώα που θυσιάστηκαν, 1-8 εβδομάδες μετά την ένεση του Tamoxifen, τα 38 διέθεταν όγκο στον στομάχο. Στην τρίτη φωτογραφία παρουσιάζεται η αρχή ενός τέτοιου όγκου, που φαίνεται να ξεκινάει στον προστόμαχο, απέναντι από την ένωση του στομάχου με τον οισοφάγο. Στους ποντικούς που δεν δόθηκε Tamoxifen, δεν παρατηρήθηκαν όγκοι στον στόμαχο.



**Εικόνα 19:** Φωτογραφίες από  $Dll1CreERT2;Kras^{LSL-G12D}$  ποντίκια (η πρώτη και η τελευταία) και από όγκους στη στομαχική κοιλότητα.



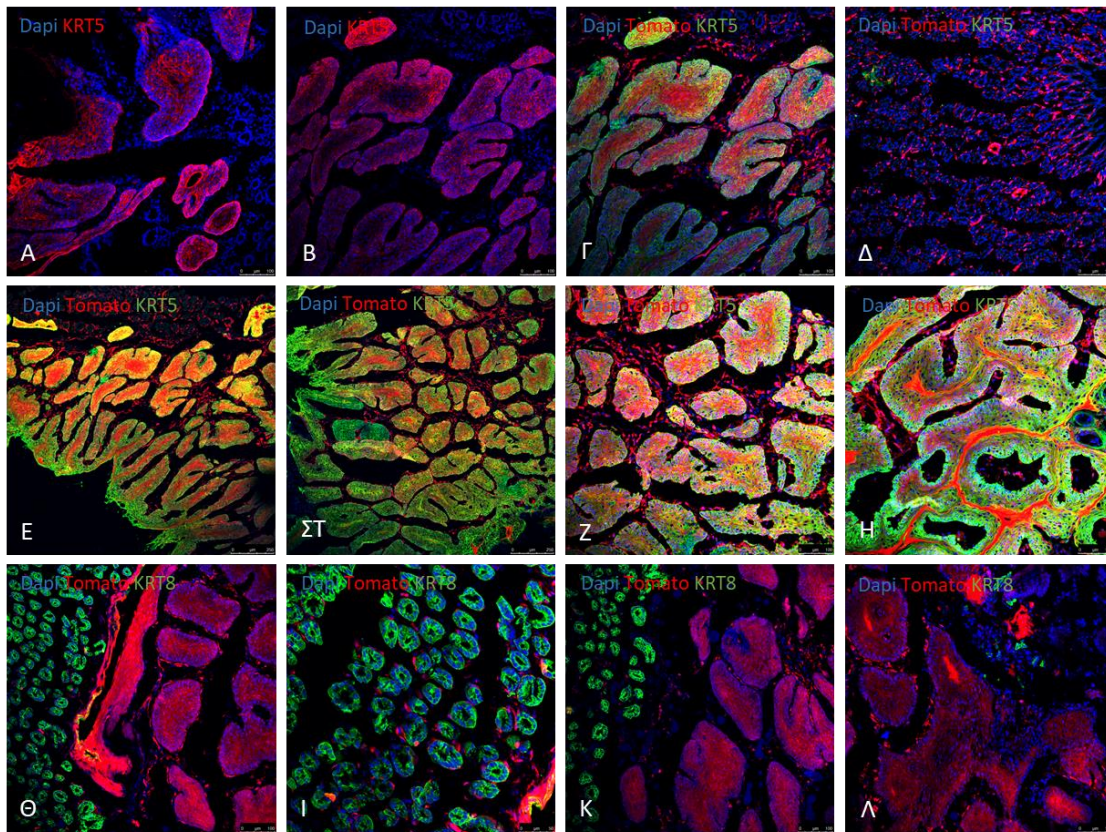
**Εικόνα 20:** Φωτογραφίες φωτονικού μικροσκοπίου (10x και 20x) όγκων στομάχου *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>* ποντικών, που τους δόθηκε Tamoxifen την 8η εβδομάδα της ζωής τους, μετά τη χρήση αιματοξυλίνης ηωσίνης. (Δ και Η): Χρήση αντισώματος anti-PanK (με καφέ χρώμα τα επιθηλιακά κύτταρα).



**Εικόνα 21:** Τομές από στομάχους διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>* (Α-Δ) και των αντίστοιχων ποντικών - μαρτύρων (*Dll1CreERT2;R26tdTomato*) (Ε-Η). Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser (20x-40x). (Α-Δ): Το KRT5 αντιπροσωπεύεται με το πράσινο χρώμα. (Ε-ΣΤ): Τομές από φυσιολογικά στομάχια *Dll1CreERT2;R26tdTomato* ζώων, με τη χρήση KRT5 αντισώματος (λευκό χρώμα).

Στις **Εικόνες 21Ε** και **21ΣΤ**, παρατηρείται ότι τα  $DLL1^{+}td\text{-Tomato}^{+}$  κύτταρα αποτελούν υποπληθυσμό της KRT5 στιβάδας. Στις εικόνες που ακολουθούν διαφαίνεται ότι υπάρχουν  $DLL1^{+}$  κύτταρα και σε άλλες περιοχές του στομαχιού, όπως στις κρύπτες.





**Εικόνα 22:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser (10x-20x) από όγκους στομάχων, διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>;R26tdTomato*, επαγόμενων από Tamoxifen στις 8 εβδομάδες. (Α-Β): Το K5 αντιπροσωπεύεται με το κόκκινο χρώμα. (Γ-Η): Με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύεται το KRT5 και στις (Θ-Λ): το K8.

### 3.2.2. Όγκοι στην περιοχή του στόματος

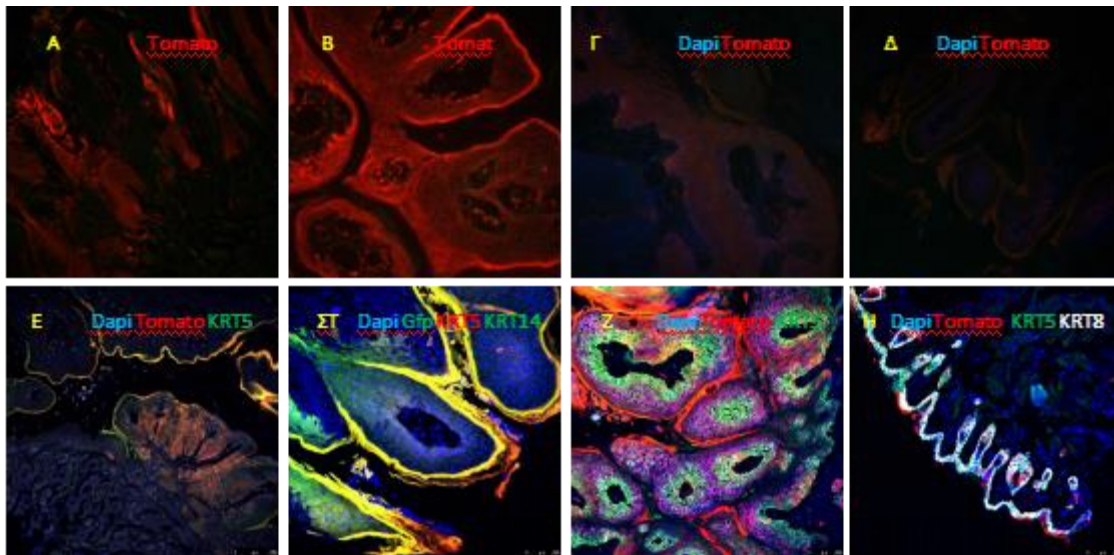
Ο καρκίνος του στόματος εμφανίζεται ως μια πληγή στο στόμα που εξαπλώνεται στα χείλη, στη γλώσσα, στα μάγουλα, στα ιγμόρεια και στο φάρυγγα (λαιμό). Τα μοντέλα καρκίνου στα ποντίκια αποτελούν ισχυρά εργαλεία για την ανάλυση του ρόλου των γενετικών αλλαγών στην καρκινογένεση. Σε μια δημοσίευση έχουν αναπτύξει ένα καινοτόμο μοντέλο ποντικού που επιτρέπει ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή/και απενεργοποίηση καταστολέα όγκου αποκλειστικά σε στρωματοποιημένα επιθήλια της στοματικής κοιλότητας. Για να προσδιορίσουν αν οι Ras μπορούν να προκαλέσουν σχηματισμό καρκίνου του στόματος, χρησιμοποίησαν αυτό το σύστημα που προκαλεί την ενεργοποίηση ενός ογκογόνου αλληλόμορφου Kras στην στοματική κοιλότητα. Τα αποτελέσματά έχουν δείξει ότι

ο ογκογόνος Kras έχει έναν αιτιώδη ρόλο στην στοματική ανάπτυξη όγκων (Carlos Caulin, 2015).

Σε άλλη μελέτη, διασταυρώσαν τους ποντίκους *Kras<sup>LSL-G12D</sup>* με ποντικού που φέρουν επαγωγίμη Cre recombinase (*RosaCreERT2*). Μετα τη χορήγηση Tamoxifen σε αυτούς ποντίκους παρατηρήσαν πλακώδη θηλώματα που εμφανίζουν δυσπλασία με περιοχές εστιακής διήθησης (το καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο). Εναλλακτικά, η σποραδική έκφραση του αλληλόμορφου *Kras<sup>G12D</sup>* (λόγω αυθόρμητου ανασυνδυασμού) είχε ως αποτέλεσμα μόνο την ανάπτυξη πλακωδών θηλωμάτων με ήπια δυσπλασία, μετά από μακρά λανθάνουσα κατάσταση. Έτσι, αποδείχθηκε η οξεία ευαισθησία του στοματικού βλεννογόνου στο ογκογόνιο Kras στην ανάπτυξη ενός στοματικού όγκου.

Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος χαρακτηρίζεται ιστοπαθολογικά από διήθηση κακοήθων επιθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα όγκου έχουν ένα υαλώδες ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και διευρυμένους πυρήνες, συχνά υπερχρωματικούς, καθώς και έναν αυξημένο λόγο πυρήνα-κυτταρόπλασμα. Διαφορετικοί βαθμοί πυρηνικού και κυτταρικού πολυμορφισμού παρατηρούνται, καθώς και η παρουσία και η ένταση της κερατίνης ποικίλλουν. Επίσης, μπορεί να υπάρχει κερατινοποίηση σε μεμονωμένο κύτταρο. Η εισβολή χαρακτηρίζεται από ακανόνιστη μεγέθυνση του όγκου μέσω της βασικής μεμβράνης στον προσδετικό ιστό -χόριο. Πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα και φωλιές ή νησίδες κυττάρων φαίνεται να αναπτύσσονται αποσπασμένα από το επιθήλιο της επιφανείας.

Στην παρούσα μελέτη μετά τη χορήγηση Tamoxifen στις 4 και 8 εβδομάδες, οι ποντίκοι αυτοί παρουσίαζαν όγκους στα χείλη οπότε η θυσία του ζώου εξαρτάται από το γεγονός αυτό, καθώς τα ζώα λόγω της ανικανότητάς τους να τραφούν οδηγούνται στο θάνατο (**Εικόνα 23**). Εσωτερικά στο στόμα δεν παρατηρήθηκε όγκος.



**Εικόνα 23:** Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και σαρωτικού συνεστιακού μικροσκοπίου laser (10x-20x) από τομές χειλιών, διπλά διαγονιδιακών ποντικών *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>;R26tdTomato*, επαγόμενων από Ταμοξιφεν στις 8 εβδομάδες. Στις (Α-Δ): Κρυοτομές από φυσιολογικούς όγκους των χειλιών. Στην (Ε): Το KRT5 αντιπροσωπεύεται με το πράσινο χρώμα, και το Tomato με κόκκινο χρώμα. Στην (ΣΤ): με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται τα διπλά θετικά GFP και KRT14 κύτταρα, το KRT5 αντιπροσωπεύεται με κόκκινο χρώμα. Στην (Ζ): Το KRT5 αντιπροσωπεύεται με το πράσινο χρώμα, το Tomato με κόκκινο χρώμα. Στην (Η): το λευκό χρώμα αντιπροσωπεύει το KRT8 αντίσωμα, το KRT5 αντιπροσωπεύεται με το πράσινο χρώμα. Με μπλε χρώση (DAPI) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων σε όλες τις εικόνες.

Οι όγκοι στον στόμαχο και στα χείλη του *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>;R26tdTomato* κατά το μεγαλύτερο μέρος τους Tomato<sup>+</sup>. Επειδή βρέθηκαν ζώα που εξέφραζαν tomato, πριν τη χρήση του Ταμοξιφεν, τα πειράματα αυτά θα γίνουν και με *Dll1CreERT2;Kras<sup>LSL-G12D</sup>;R26<sup>mTmG</sup>*.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος είναι μία σύνθετη και πολυπαραγοντική νόσος που προκαλείται τόσο από γενετικές (γενωμικές) όσο και από επιγενετικές βλάβες του DNA. Η αδυναμία ρύθμισης της κυτταρικής συμπεριφοράς έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκινικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων εμπλέκει μηχανισμούς που αποσκοπούν στην αλλαγή της δομής ή της έκφρασης των κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων και επιφέρει ένα πλεονέκτημα αύξησης στο κύτταρο. Λόγω της πολυπλοκότητας της διαδικασίας της καρκινογένεσης, συχνά παρατηρείται συνεργασία τέτοιων μηχανισμών για τη μετατροπή γονιδίων σχετιζόμενων με τον καρκίνο και την ογκογένεση. Η πλήρης έκφραση του νεοπλασματικού φαινοτύπου περιλαμβάνει από τη μια την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων, και από την άλλη απενεργοποίηση ή απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ρυθμίζει αποφάσεις κυτταρικής τύχης μεταξύ αλληλεπιδρώντων γειτονικών κυττάρων επηρεάζοντας θετικά ή αρνητικά, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Καθώς ο καρκίνος μπορεί να θεωρηθεί ως μια ασθένεια δυσλειτουργικής κυτταρικής σηματοδότησης, είναι αναμενόμενο ότι αναπτυξιακά μονοπάτια-κλειδιά, όπως το Notch, συνδέονται ποικιλοτρόπως με ογκογενετικά φαινόμενα.

Ο αιτιακός ρόλος του μονοπατιού Notch στην καρκινογένεση έχει αποδειχθεί στην T-κυτταρική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, όπου περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς φέρουν μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον υποδοχέα Notch1. Ογκογενετική δράση του μονοπατιού έχει αναφερθεί και σε άλλους ιστούς (π.χ. μαστός, πάγκρεας, παχύ έντερο), όπου παρατηρείται αυξημένη έκφραση των υποδοχέων, συνδετών ή γονιδίων-στόχων του στους αντίστοιχους καρκίνους.

Από την άλλη, είναι γνωστό ότι η σηματοδότηση μέσω Notch δρα ογκοκατασταλτικά στο δέρμα, γεγονός που υπογραμμίζει ότι η δράση του μονοπατιού εξαρτάται αυστηρά από τον ιστό. Η υψηλή έκφραση του Delta-like 1 (Dll1) συνδέτη Notch είναι ένας δείκτης ανθρώπινων επιδερμικών βλαστικών κυττάρων και παίζει ένα διπλό ρόλο στην προώθηση της συνοχής των στελεχειακών

κυττάρων και στην διέγερση της διαφοροποίησης των γειτονικών επιδερμικών κυττάρων στην καλλιέργεια (Estrach et al., 2008, Lowell and Watt, 2001). Συγκεκριμένα, στους ιστούς στους οποίους προωθεί την ογκογένεση, ο φυσιολογικός του ρόλος αφορά την αυτο-ανανέωση και την επιβίωση των βλαστικών/προγονικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη ή την ομοιόσταση, ενώ στους ιστούς στους οποίους η ενεργοποίηση του Notch επάγει την τελική διαφοροποίηση, ασκεί ογκοκατασταλτική δράση. Πρόσφατα δείχθηκε ότι το μονοπάτι Notch μπορεί να εξασκεί διττό ρόλο ακόμη και μέσα στον ίδιο ιστό, καθώς ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις που το απενεργοποιούν σε μία μερίδα ασθενών με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Klinakis et al., 2011). Νεότερα δεδομένα ενδυναμώνουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του Notch, έπειτα από την ταυτοποίηση μεταλλαγών που απενεργοποιούν το μονοπάτι σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα. Ειδικότερα, βρέθηκαν μεταλλάξεις στο Notch1 που έχουν ως αποτέλεσμα την αποκοπή του εξωκυτταρικού του τμήματος και κατά συνέπεια την απενεργοποίησή του σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου (Stransky et al., 2011, Agrawal et al., 2011) ή στο Notch2 στο 75% των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του δέρματος και σε μικρότερο ποσοστό του πνεύμονα, οι οποίες οδηγούν σε καταστολή της σηματοδότησης (Wang et al., 2011).

Το Dll1 είναι ένας διαμεμβρανικός συνδέτης της σηματοδοτικής οδού Notch που επίσης υπερεκφράζεται σε άλλους τύπους όγκων, όπως το χοριοκαρκίνωμα, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και το μυελοβλάστωμα, υποδεικνύοντας μια πιθανή ισχυρή συμμετοχή αυτού του Notch κατά την έναρξη τέτοιων όγκων. Επίπλέον, το Dll1 δεν εμπλέκεται μόνο στην ογκογένεση, συμμετέχει επίσης στην ανάπτυξη συμπαθητικών γαγγλίων όπου η πρωτεΐνη διατηρεί την κατάσταση πολλαπλασιασμού εμβρυϊκών κύτταρων.

Κύριος στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση του συνδέτη Dll1 *in vivo* σε διάφορους ιστούς του ποντικού και να διερευνηθεί η ανίχνευση του ως υποψήφιος δέκτης των βλαστικών κυττάρων, με τη βοήθεια της γονιδιακής κατασκευής *Dll1creER;Ires-gfp*.

Για να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση του συνδέτη Dll1 *in vivo* σε διάφορους ιστούς του ποντικού, οι Dll1CreER ποντικοί διασταυρώθηκαν με ποντικούς μάρτυρες. Για το δεύτερο σκέλος της εργασίας, οι ποντικοί Dll1CreER διασταυρώθηκαν με ποντικούς που φέρουν ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια που επάγονται από τη δράση της ρεκομπινάσης Cre, κατόπιν χορήγησης

Tamoxifen, με το σκοπό να γίνει έρευνα στην επίδραση των γενετικών μεταλλαγών στη διαδικασία μετασχηματισμού των συγκεκριμένων βλαστικών κυττάρων.

Φυσιολογικά, στο έντερο (Fre et al., 2011) και στον στόμαχο (Demitrack et al., 2015; Gifford et al., 2016), πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης σε γενετικά μοντέλα ποντικών έχουν αποκαλύψει ενεργή σηματοδότηση του υποδοχέα Notch σε ενήλικα βλαστικά κύτταρα, υποδεικνύοντας μια σημαντική λειτουργία αυτής της οδού σηματοδότησης στην ομοιοστασία βλαστικών κυττάρων και στους δύο ιστούς.

Η υπερέκφραση των συστατικών της οδού Notch έχει αποδειχθεί σε γαστρικούς και εντερικούς καρκίνους (Reedijk et al., 2008; Piazzini et al., 2011; Hsu et al., 2012; Bauer et al., 2015), γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία αυτής της οδού σηματοδότησης για την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Στο έντερο υπάρχουν δύο διαφορετικές κατηγορίες διαφοροποιημένων κυτταρικών σειρών: απορροφητικά (εντεροκύτταρα) και εκκριτικά κύτταρα (καλικοειδή, εντεροενδοκρινή, κύτταρα Paneth και θυσανωτά κύτταρα). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η οδός Notch είναι το κλειδί για τη διεύθυνση της διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων σε απορροφητική έναντι εκκριτικής κυτταρικής μοίρας (Noah & Shroyer, 2011). Στην έρευνα μας παρατηρήθηκαν GFP<sup>+</sup> κύτταρα στις αναμενόμενες θέσεις των λαχνών και των κρυπτών του λεπτού εντέρου. Παρατηρώντας κρυστομές εντέρου, τα Dll1<sup>+</sup> εντερικά επιθηλιακά κύτταρα IECs διέμεναν αποκλειστικά στη βάση της κρύπτης του λεπτού και του παχύ εντέρου, υποδεικνύοντας ότι μπορούν να συνεισφέρουν στη δημιουργία της θέσης των εντερικών βλαστικών κυττάρων.

Στον στόμαχο, η σηματοδότηση Notch φαίνεται να επηρεάζει ομοιόμορφα όλες τις κυτταρικές σειρές μέσω ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των στελεχών και των προγονικών κυττάρων έναντι της διαφοροποίησης χωρίς να επηρεάζεται την επιλογή της μοίρας των κυττάρων. Σήμανση του συνδέτη Dll1;CreERT νεογεννηθέντων κυττάρων (Lineage marking cells) έδειξε έκφραση σε ένα υποσύνολο εκκριτικών προγονικών κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι τα δεσμευμένα μεταβατικά-πολλαπλασιαστικά κύτταρα (TA) μπορούν επίσης να είναι πηγή του συνδέτη Notch για το γαστρεντερικό βλαστικό κύτταρο GI (van Es et al., 2012). Στους στομάχους *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>* ποντικών παρατηρήσαμε διπλά θετικά GFP<sup>+</sup> κύτταρα στις λάχνες, καθώς και ελάχιστα στα επιθηλιακά κύτταρα του προστόμαχου.

Στο νεφρό, παρατηρήσαμε τα Dll1<sup>+</sup> κύτταρα φαίνεται να σημαίνονται στα άπω εσπειραμένα σωληνάκια και σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι ήδη γνωστό ότι το Dll1 εκφράζεται σε πιο απομακρυσμένα τμήματα (άπω τμήμα) του αναπτυσσόμενου νεφρώνα (Andreas Schedl, 2007). Το Notch1, Notch2, Dll1 και Jag1 εκφράζονται όλα στο νεφρικό κυστίδιο (RV), η πρώτη δομή που παρουσιάζει επιθηλιακά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της μεσεγχυματικής προς επιθηλιακής μετάβασης. Σε προηγούμενες αναφορές έδειξαν ότι σε νεφρούς, τα Notch1 και Notch2 ενεργοποιήθηκαν κατά τη νεφρογένεση των θηλαστικών (Hui-Teng Cheng et al., 2007). Στη συνέχεια, στα ώριμα σπειράματα, η οδός Notch γίνεται σιωπηλή.

Αναφορικά με τον κυτταρικό τύπο του DLL1 (GFP) κυττάρου στο ήπαρ παρατηρούμε στους *Dll1CreERT2;R26<sup>mTmG</sup>* ποντικούς ότι υπάρχουν GFP<sup>+</sup> ηπατοκύτταρα, κάποια εκ των οποίων είναι διπύρρηνα. Τα ηπατοκύτταρα είναι ένα σημαντικό φυσιολογικό παράδειγμα της αξιολόγησης των βιολογικών αλλά και των μεταβολικών αποτελεσμάτων των ξενοβιοτικών ουσιών. Δεν πολλαπλασιάζονται στην καλλιέργεια, αλλά διατηρούν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται σε απάντηση στον τοξικό τραυματισμό και τη μόλυνση. Έτσι η αναγέννηση του ήπατος δεν απαιτεί τη στρατολόγηση των βλαστικών κυττάρων του ήπατος, αλλά περιλαμβάνει τον αναδιπλασιασμό των ώριμων λειτουργικών ηπατικών κυττάρων.

Σχετικά με τη γονιδιακή έκφραση στο πάγκρεας δεν διαφαίνονται GFP<sup>+</sup> κύτταρα, αυτό σημαίνει ότι το Dll1 εκφράζεται μόνο κατά την εμβρυϊκή ηλικία και όχι στο ενήλικο ζώο (E.Lammert, et al., 2000).

Αρκετοί υποδοχείς Notch και συνδέτες εκφράζονται τόσο σε αναπτυσσόμενο όσο και σε ενήλικο δέρμα, το Dll1 εκφράζεται στην δερματική θηλή κατά τη διάρκεια ανάπτυξης θυλακίων τριχών (B.C. Powell et al., 1998), επίσης στα επιθηλιακά κύτταρα και σε συστοιχίες κυττάρων στο βασικό στρώμα τη μεσο-τριχοθυλακιακή επιδερμίδα (IFE). Σε αντίστοιχες θέσεις το συναντήσαμε και εμείς στις πανομοιότυπες τομές των ποντικών μας.

Μελετήθηκαν οι διπλά διαγονιδιακά *Dll1CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup>* ποντικοί. Το Kras είναι πρωτο-ογκογονιδίο που εμφανίζεται ενισχυμένο σε διάφορους όγκους. Η ενισχυμένη παρουσία πρωτο-ογκογονιδίου σε περιοχές πολλών μεμονωμένων όγκων του ίδιου τύπου, συνηγορεί στο γεγονός ότι η αυξημένη έκφρασή του σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό των όγκων αυτών. Περισσότερες από 54 μετάλλαξεις του Kras επηρεάζουν τα κωδικόνια 12 και 13 (80% και 20%,

αντιστοίχως), και η G12D είναι η πιο κοινή αλλαγή αμινοξέος που προκύπτει σε τέτοιες μεταλλάξεις (C.P. Vaughn, 2011).

Οι μεταλλάξεις του Kras είναι πιο διαδεδομένες σε γαστρικούς καρκίνους εντερικού τύπου. Η ενεργοποίηση του Kras έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οδού MAPK και τον υπερπολλαπλασιασμό του πλακώδους επιθηλίου στο προστόμαχο και τη μεταπλασία του αδενικού στομάχου. Τα τοιχωματικά κύτταρα σχεδόν εξαφανίζονται από το ανώτερο τμήμα του στομάχου, δίπλα στο προστόμαχο των ενεργοποιημένων ποντικών Kras (S.Smita et al., 2011).

Το μεταλλαγμένο Kras αποτελεί ίσως το πιο ισχυρό ογκογονίδιο στους ανθρώπινους καρκίνους, κυρίως στον καρκίνο του παγκρέατος, του πνεύμονα και του παχύ εντέρου. Παρόλο που δεν αποτελεί συχνό φαινόμενο στους επιθηλιακούς όγκους στον άνθρωπο, στον ποντικό το επιθήλιο είναι ευαίσθητο σε Kras μεταλλάξεις. Παρατηρήσαμε ότι από τον *D111CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup>* υποπληθυσμό στα χείλη και στον στόμαχο, ξεκινάνε όγκοι, σε ίδιο ή σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα από τις αντίστοιχες μελέτες της βιβλιογραφίας.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον όγκο στον στόμαχο φαίνεται να ξεκινάει στον προστόμαχο, απέναντι από την ένωση του στομάχου με τον οισοφάγο. Με τη βοήθεια αντισωμάτων, διαπιστώθηκε ότι οι όγκοι αυτοί είναι KRT5<sup>+</sup>. Εφόσον επιβεβαιωθεί με περαιτέρω πειραματόζωα, η υπόθεση ότι τα D111<sup>+</sup> κύτταρα αποτελούν υποπληθυσμό των KRT5<sup>+</sup> κυττάρων και με δεδομένο ότι τα *D111CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup>* δίνουν σχεδόν 100% όγκους στον στόμαχο, μπορούμε να υποθέσουμε τα D111<sup>+</sup> κύτταρα του επιθηλίου είναι αυτά που προωθούν τους όγκους στο στομάχι. Το ίδιο ισχύει και για τα χείλη των ποντικών αυτών.

Το D111 μπορεί να αποτελεί υποψήφιο δείκτη βλαστικών κυττάρων, υπεύθυνων για την έναρξη του καρκίνου στον στόμαχο, στο δέρμα και στα χείλη του ποντικού. Επίσης τα ευρήματα αποτελούν ότι τα D111<sup>+</sup> κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στις ογκογόνες μεταλλάξεις.

Τέλος, στους *D111CreERT2xKras<sup>LSL-G12D</sup>* ποντικούς, με τη χορήγηση Tamoxifen παρατηρήθηκαν υπερπλαστικοί αγωγοί. Το Kras ενεργοποιείται στα κύτταρα στα οποία είναι μεταγραφικώς ενεργό το D111. Το D111 χαρακτηρίζει ένα δυναμικό κυτταρικό υποπληθυσμό της βασικής στιβάδας του μαστικού αδένου, καθώς και των κυττάρων του αυλού.



## ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agrawal, N. (2011), Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1, *Science* 333(6046):1154-7. doi: 10.1126/science.1206923.

Ahnfelt-Roenne, J. (2012), Ptf1a-mediated control of Dll1 reveals an alternative to the lateral inhibition mechanism, *Development*, 139:33-45 1.

Andre, F., Job, B., et al. (2009), Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array, *Clin. Cancer, Res.* 15:441-51.

Aram, F., Hezel et al.(2006), Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Genes & Dev.*, 20: 1218-1249.

Bauer, L., Takacs, A., Slotta-Huspenina, J., et al. (2015), Clinical significance of NOTCH1 and NOTCH2 expression in gastric carcinomas: an immunohistochemical study, *Front Oncol* 5, 94.

Benedito, R., Roca, C., Sørensen, I., Adams, S., Gossler, A. (2009), The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis, *Cell*, Vol.137, (pp. 1124–1135).

Bettenhausen, B., et al. (1995), Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta, *Development*, Aug; 121(8):2407-18.

Brendan, J., Collins, Wolfram Kleeberger, Douglas Wall (2004), Notch in lung development and lung cancer, *Seminars in Cancer Biology*, (pp. 357-364).

Brooker, R., Hozumi, K., Lewis, J. (2006), Notch ligands with contrasting functions: Jagged1 and Delta1 in the mouse inner ear, *Development*, 133:1277-1286.

Cheryll Sanchez-Irizarry, Andrea, C., et al. (2004), Notch Subunit Heterodimerization and Prevention of Ligand-Independent Proteolytic Activation Depend, Respectively, on a Novel Domain and the LNR, *Mol. Cell. Biol.*, 24 no. 21: 9265-9273.

Chunyan Hu, Anne Diévar (2006), Overexpression of Activated Murine Notch1 and Notch3 in Transgenic Mice Blocks Mammary Gland Development and Induces Mammary Tumors, *The American journal of pathology*, Vol. 168, Issue 3, (pp 973–990).

Demitrack, E.S., Gifford, G.B., Keeley, T.M., Carulli, A.J., Van Dussen, K.L., Thomas, D. (2015), Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function, *EMBO J* 34, 2522–2536.

Diévar et al. (1999), Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. *Oncogene*, 18, (pp.5973 -5981).

Doug Barrick, Raphael Kopan (2006), The Notch Transcription Activation Complex Makes Its Move, *Cell*, (pp. 883-885).

Emil, M., Hansson, Urban Lendahl, Gavin Chapman (2004), Notch signaling in development and disease, *Seminars in Cancer Biology*, 14: 320–328.

Estrach, S., Cordes, R., et al. (2008), Role of the Notch ligand Delta1 in embryonic and adult mouse epidermis, *J Invest Dermatol.* Apr;128(4):825-32.

Feil et al. (1997), Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 237; (3), 752–757.

Fre, S., Hannezo, E., Sale, S., Huyghe, M., Lafkas, D., Kissel, H., Louvi, A., Greve, J., Louvard, D & Artavanis-Tsakonas S. (2011), Notch lineages and activity in intestinal stem cells determined by a new set of knock-in mice, *PLoS One* 6, e25785.

Gaetani et al. (2010), Expression of the transcription factor HEY1 in glioblastoma: a preliminary clinical study, *Tumori*, 96: 97-102.

Galluzzo and Bocchetta (2011), Notch signaling in lung cancer, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 533-540.

Gao et al. (2007), Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of pro-survival Akt, NF- $\kappa$ B and Notch1 signaling, *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 84, 147–157.

Gifford, G.B., Demitrack, E.S., Keeley, T.M., Tam, A., et al. (2016), Notch1 and Notch2 receptors regulate mouse and human gastric antral epithelial cell homeostasis, *Gut* (in press), doi: 10.1136/gutjnl-2015-310811.

Jin, G., Zhang, F. (2011), MT1-MMP cleaves Dll1 to negatively regulate Notch signalling to maintain normal B-cell development, *The EMBO Journal*, 30, 2281-2293.

Hannah Harrison (2010), Regulation of Breast Cancer Stem Cell Activity by Signaling through the Notch4 Receptor, *Cancer research*, Vol. 70, 2.

Hiraoka Y., et al. (2013), Delta-like 1 regulates Bergmann glial monolayer formation during cerebellar development, *Mol. Brain*, 6:25-25.

Hiromichi Shimizu et al. (2014), Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mouse intestine, *PubMed*, 24860699.

Hsu, K.W., Hsieh, R.H., Huang, K.H., et al. (2012), Activation of the Notch1/STAT3/Twist signaling axis promotes gastric cancer progression, *Carcinogenesis* 33, 1459–1467.

Hu, C., Diévert, A., et al. (2006), Overexpression of activated murine Notch1 and Notch3 in transgenic mice blocks mammary gland development and induces mammary tumors, *Am J Pathol*, 168(3):973-90.

Hui-Teng Cheng et al. (2007), Notch2 (but not Notch1) is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron, *Development*, 134(4): 801–811.

Hulleman et al. (2009), A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma, *J. Cell. Mol. Med.* Vol 13, 136–146.

Kanamori et al. (2007), Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme, *Journal of Neurosurgery*. Vol. 106 / No. 3 / 417-427.

Kato, M. (2007), Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis, *Stem Cell, Rev.* 3:30–38.

Kawaguchi, D., et al. (2013), Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis, *Nature Communications*, 4:1880-1880.

Keli Xu (2010), Lunatic Fringe-mediated Notch signaling is required for lung alveogenesis, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol. 298, L45-L56.

Kevin, G., Leong and Aly Karsan (2006), Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis, *Blood*, 107:2223-2233.

Klinakis, A., et al. (2006), Myc is a Notch1 transcriptional target and a requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice, *PNAS*, vol. 103 no. 24, 9262–9267.

Klinakis, A., et al. (2011), A novel tumor suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukemia, *Nature*, 473(7346): 230–233.

Konish, J., et al. (2010), Notch3 Cooperates with the EGFR Pathway to Modulate Apoptosis Through the Induction of Bim, *Oncogene*, 29(4): 589–596.

Kopan, R., Ilagan, M.X.G. (2009), The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism, *Cell*, 137:216-233.

Lammert, E., Brown, J., Melton, D.A. (2000), Notch gene expression during pancreatic organogenesis, *Mech Dev*. 94(1-2):199-203.

Leethanakul, C., Patel, V., et al. (2000), Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays, *Oncogene*, 19(28): 3220-3224.

Lowell, S., F.M. Watt (2001), Delta regulates keratinocyte spreading and motility independently of differentiation, *Mech Dev*, 107, 133-140.

Luca Pellegrinet (2011), Dll1- and Dll4-Mediated Notch Signaling Are Required for Homeostasis of Intestinal Stem Cells, *Gastroenterology*, 140, (4), 1230–1240.

Lucio Miele (2006), Notch signaling, *American Association for Cancer Research*, 1074-1079.

Mangues, R., Pellicer, A. (1992), Ras activation in experimental carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, Aug 3(4):229-39.

Marklund, U., et al. (2010), Domain-specific control of neurogenesis achieved through patterned regulation of Notch ligand expression, *Development*, 137:437-445.

Miele Lucio, Golde Todd, Osborne Barbara (2006), Notch Signaling in Cancer. *Current Molecular Medicine*, 905-918.

Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., et al. (2003), Notch mediates TGF $\alpha$ -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis, *Cancer Cell*, 565-576.

Napp, L.C., et al. (2012), Extrinsic Notch ligand Delta-like 1 regulates tip cell selection and vascular branching morphogenesis, *Circulation Research*, 110:530-535.

Nelson, B.R., et al. (2013), Dynamic interactions between intermediate neurogenic progenitors and radial glia in embryonic mouse neocortex: potential role in Dll1-Notch signaling, *Journal of Neuroscience*, 33 (21) 9122-9139.

Noah, T.K., Donahue, B., Shroyer, N.F. (2011), Intestinal development and differentiation, *Exp Cell Res.*, doi: 10.1016/j.yexcr.2011.09.006.

Nobuhiro Haruki, Keiko,S., Kawaguchi, Shannon Eichenberger, et.al. (2005). Dominant-Negative Notch3 Receptor Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and the Growth of Human Lung Cancers. *Cancer Research*, PubMed 15867348.

Osipo, C., Patel, P., Rizzo, P., Clementz, A.G., Hao, L., Golde, T.E., Miele, L. (2008), ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor, *Oncogene*, 27:5019-32.

Parr, C., Watkins, G., Jiang, W.G. (2004), The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer, *International Journal of Molecular Medicine*, 14:779–786.

Pece et al.(2004), Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis, *JCB Home*, 167 (2): 215.

Phillips, H. S, et al. (2006), Roots and stems: stem cells in cancer, *Nature Medicine*, New York12.3: 296-300.

Piazzzi, G., Fini, L., Selgrad, M., et al. (2011), Epigenetic regulation of Delta-Like1 controls Notch1 activation in gastric cancer, *Oncotarget* 2, 1291–1301.

Powell, B.C., E.A.Passmore (1998), The Notch signalling pathway in hair growth, *Mechanisms of Development*, Vol. 78, Issues 1–2, (pp. 189-192).

Purow, B.W. et al (2005), Expression of Notch-1 and Its Ligands, Delta-Like-1 and Jagged-1, Is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation, *Cancer Research*, Vol.65.

Radtke, F., Freddy Raj, Kenneth (2003), The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nature Reviews*, 3:756-67.

Rampias, T. et al. (2014), A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer, *Nature Medicine*, 20, 1199–1205.

Reedijk, M. et al. (2005), High-level Co Expression of JAG1 and NOTCH1 Is Observed in Human Breast Cancer and Is Associated with Poor Overall Survival. *Cancer Research*, Vol. 65, 18.

Reedijk, M., Odorcic, S., Zhang, H., et al. (2008), Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma, *Int J Oncol* 33, 1223–1229.

Reedijk, M. (2012), Notch Signaling and Breast Cancer, *Notch Signaling in Embryology and Cancer*, 241-257.

Riccio, O. (2008), Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2, *EMBO reports*, Vol. 9, 377-383.

Rizzo, P., Miao, H., D'Souza, G., et al. (2008), Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches, *Cancer Res.* 68:5226-35.

Rocha, S.F. et al. (2009), Dll1 and Dll4 function sequentially in the retina and pV2 domain of the spinal cord to regulate neurogenesis and create cell diversity, *Dev. Biol.* 328:54-65.

Ruben Plentz et al. (2009), Inhibition of  $\gamma$ -Secretase Activity Inhibits Tumor Progression in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Gastroenterology*, 1741-1749.

Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S., Katsube, K. (2002), Intracellular cell autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification, *Developmental Biology*, 313-326.

Sansone et al. (2007), IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland, *J Clin Invest*, 117(12): 3988–4002.



Santagata, S., Demichelis, F., Riva, A., et al. (2004), JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence, *Cancer Research*, 64:6854-6857.

Schedl, A. (2007), Renalab normalities and their developmental origin, *Nature reviews genetics*, vol.8.

Shipitsin et al. (2007), Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity, *Cancer Cell*, 259-273.

Schuster-Gossler K., et al. (2007), Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants, *PNAS*, 537–542, doi: 10.1073.

Smita, S., Matkar, Am J. (2011), Systemic activation of K-ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice, *Cancer Res*, 1(4): 432–345.

Somasundaram et al. (2005), Upregulation of ASCL1 and inhibition of Notch signaling pathway characterize progressive astrocytoma, *Oncogene*, 24, 7073–7083.

Spyros Artavanis-Tsakonas, Matthew, D., Rand, Robert J. Lake (1999), Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science*, 770-776.

Sriuranpong, V., Borges, M.W., Ravi, R.K., et al. (2001), Notch Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Small Cell Lung Cancer Cells, *Cancer Research*, 3200-3205.

Stamatakis, D. (2011), Delta1 Expression, Cell Cycle Exit, and Commitment to a Specific Secretory Fate Coincide within a Few Hours in the Mouse Intestinal Stem Cell System, *Plos one*, Sep. 7.

Stransky, N. (2011), The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma, *Science*, 333(6046):1157-60. Doi: 10.1126/science.1208130.

Tan, J.B., et al. (2009), Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like 1 in splenic endothelial niches, *Immunity*, 30:254-263.

Teodorczyk and Schmid, Jan. (2015), Notching on cancer's door: Notch signaling in brain tumors, *Frontiers in Oncology*, 05.

Vaughn, C.P., Zobell, S.D., Furtado, L.V., Baker, C.L., Samowitz, W.S. (2011), Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer, *Genes Chromosomes Cancer*. 50(5):307-12.

Visbal, A.P., Lewis, M.T. (2010), Hedgehog Signaling in the Normal and Neoplastic Mammary Gland, *Current Drug Targets*, 11:1103–1111.

Wang, H. (2011), The Role of Notch Receptors in Transcriptional Regulation, *J Cell Physiol*, 230(5): 982–988. doi: 10.1002/jcp.24872.

Yao, K., Rizzo, P., Rajan, P., et al. (2011), Notch-1 and notch-4 receptors as prognostic markers in breast cancer, *Int J Surg Pathol*, 19:607-613.

Zang, S., Chen, F., Dai, J. (2010), RNAi-mediated knockdown of Notch-1 leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer, *Oncol. Rep.* 23:893-9.

Zhao, C., Chen ,A., Jamieson, C.H., et al. (2009), Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia, *Nature*, 458:776-779.

