



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**“Μελέτη ενός lncRNA – mRNA άξονα στον γαστρικό  
καρκίνο με συστήματα λεντιϊών”**

**“Study of a lncRNA – mRNA axis in gastric cancer  
through lentivirus systems”**

*Πτυχιακή εργασία για την απόκτηση τίτλου σπουδών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

*Σπαχίου Κλαούντια του Ντουρίμ*

*Επιβλέπων Καθηγητής: Αντώνιος Γιακουντής*

*Λάρισα 2023*

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

### **Επιβλέπων Καθηγητής:**

**Γιακουντής Αντώνιος:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Μπελούκας Απόστολος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Αντώνιο Γιακουντή, για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να συμμετάσχω στο ερευνητικό του έργο καθώς και για την καθοδήγηση και υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Ομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Καλλιόπη Λιαδάκη και τον κύριο Απόστολο Μπελούκα για την συμμετοχή τους στην συμβουλευτική επιτροπή. Επιπλέον, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου και πλέον φίλες μου Ελένη-Ροντιόλα Μπεγγόλι και Μυρτώ Χατζηαγγέλου για τις συμβουλές τους και την αμέριστη βοήθεια και στήριξη τους σε όλους τους τομείς, καθιστώντας έτσι ιδανική την συνεργασία μας. Στο ίδιο πλαίσιο, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες και φίλες μου Τριανταφυλλιά (Φιλίνα) Σακκά, Μαριάνθη Μαρούλη και Ioana Grigoras για την υπέροχη συνεργασία μας σε αυτή την πρώτη κοινή ερευνητική προσπάθεια. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου που έχει υπάρξει δίπλα μου σε κάθε μου βήμα και έχει πιστέψει την κάθε μου προσπάθεια.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>8</b>
1.1 Ο γαστρικός καρκίνος.....	9
1.1.1 Επιδημιολογικά δεδομένα του γαστρικού καρκίνου.....	9
1.1.2 Παράγοντες κινδύνου.....	10
1.1.3 Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου.....	11
<b>2. Συμπτώματα, διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (long non-coding RNA)</b>	
3.1 Χαρακτηριστικά των lncRNA (long non – coding RNAs).....	15
3.2 Ταξινόμηση των lncRNA ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης.....	17
3.3 Ταξινόμηση των lncRNA ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό.....	21
3.4 LncRNA στον καρκίνο.....	23
3.5 LncRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες.....	24
3.6 HOX γονίδια.....	25
<b>4. Ερευνητική υπόθεση και σκοπός.....</b>	<b>27</b>
<b>5. Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>29</b>
5.1 Υλικά.....	30
5.1.1 Αλληλουχίες.....	31
5.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς.....	31
5.1.3 Κυτταρικές σειρές.....	31
5.1.4 Βακτηριακά στελέχη.....	31
5.1.5 Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες.....	31
5.2 Μέθοδοι.....	32
5.2.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	32
5.2.2 Αντίδραση Annealing για shRNA.....	32
5.2.3 Αντίδραση λιγάσης για shRNA.....	32

5.2.4	Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών με πλασμιδιακές κατασκευές.....	33
5.2.5	Απομόνωση πλασμιδίου.....	33
5.2.6	Διαγνωστική PCR.....	34
5.2.7	Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με την χρήση JetPrime.....	36
5.2.8	Υποκυτταρική κλασμάτωση.....	37
5.2.9	Απομόνωση RNA, κατεργασία με DNAάση, σύνθεση cDNA.....	38
5.2.10	qPCR.....	40
6	<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>42</b>
7	<b>Συζήτηση.....</b>	<b>65</b>
	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b></b>

## Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μία από τις σοβαρότερες μορφές καρκίνου. Η σοβαρότητα του έγκειται κυρίως στο υψηλό ποσοστό θνησιμότητας που εμφανίζει το οποίο οφείλεται στην καθυστερημένη διάγνωση της νόσου όταν αυτή βρίσκεται ήδη σε μεταστατικό στάδιο. Η καθυστερημένη διάγνωση οφείλεται στην ομοιότητα των συμπτωμάτων του γαστρικού καρκίνου με άλλες παθολογικές καταστάσεις ενώ παράλληλα οι υπάρχουσες μέθοδοι διάγνωσης είναι αρκετά επεμβατικές και δυσάρεστες για τον ασθενή. Συνεπώς, η εύρεση νέων μη επεμβατικών μεθόδων για την έγκαιρη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου είναι μία από τις προκλήσεις που προσπαθεί να αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα όσον αφορά τον καρκίνο του στομάχου. Το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην εύρεση μοριακών βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά του ανθρώπου με σκοπό την μείωση της επεμβατικότητας της διάγνωσης. Ένα από τα μόρια που εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως μοριακοί βιοδείκτες σε όλες τις μορφές καρκίνου, κατ' επέκταση και στον γαστρικό καρκίνο, είναι τα long non-coding RNA (lncRNA). Τα lncRNA έχουν βρεθεί να συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διαδικασιών ενώ η έκτοπη έκφραση τους συνάδει σε αρκετές περιπτώσεις με την καρκινογένεση. Επιπλέον, τα lncRNA παρουσιάζουν ιστο-ειδική έκφραση με αποτέλεσμα να μπορούν να συμβάλλουν στην εξειδικευμένη διάγνωση της ασθένειας. Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, η παρούσα πτυχιακή εργασία εστίασε στην μελέτη του lncRNA, GREAT4\_2. Επιπρόσθετα, εκτός από την μελέτη του GREAT4\_2 εξετάστηκε και η πιθανότητα ρύθμισης της έκφρασης δύο γονιδίων (TG1 και TG2) από το GREAT4\_2. Τα γονίδια αυτά εντοπίζονται γειτονικά του GREAT4\_2 πάνω στο χρωμόσωμα εγείροντας την πιθανότητα δράσης αυτού του lncRNA *in cis*, γεγονός που έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μορφές καρκίνου.

## Abstract

Stomach cancer is one of the most serious forms of cancer. Its seriousness lies mainly in its high mortality rate, which results from late diagnosis of gastric cancer in an already metastatic stage. This delayed diagnosis is due to the similarity of the symptoms of gastric cancer with other pathological conditions, while the existing methods of diagnosis are quite invasive and unpleasant for the patient. Therefore, finding new non-invasive methods for the early diagnosis of gastric cancer is one of the challenges that the scientific community is trying to address regarding gastric cancer. Interest has turned to finding molecular biomarkers derived from human biological fluids to reduce the invasiveness of diagnosis. One of the molecules identified in biological fluids that could be exploited as molecular biomarkers in all forms of cancer, including gastric cancer, is long non-coding RNA (lncRNA). lncRNAs have been found to be involved in a wide range of cellular processes and their ectopic expression is in several cases consistent with carcinogenesis. Furthermore, lncRNAs exhibit tissue-specific expression and thus may contribute to the specific diagnosis of disease. Taking these into consideration, this thesis focused on the study of the lncRNA, GREAT4\_2. In addition to the study of GREAT4\_2, the possibility of regulation of the expression of two genes (TG1 and TG2) by GREAT4\_2 was also examined. These genes are located adjacent to GREAT4\_2 on the chromosome raising the possibility that this lncRNA may act *in cis*, which has been observed in several types of cancer.

---

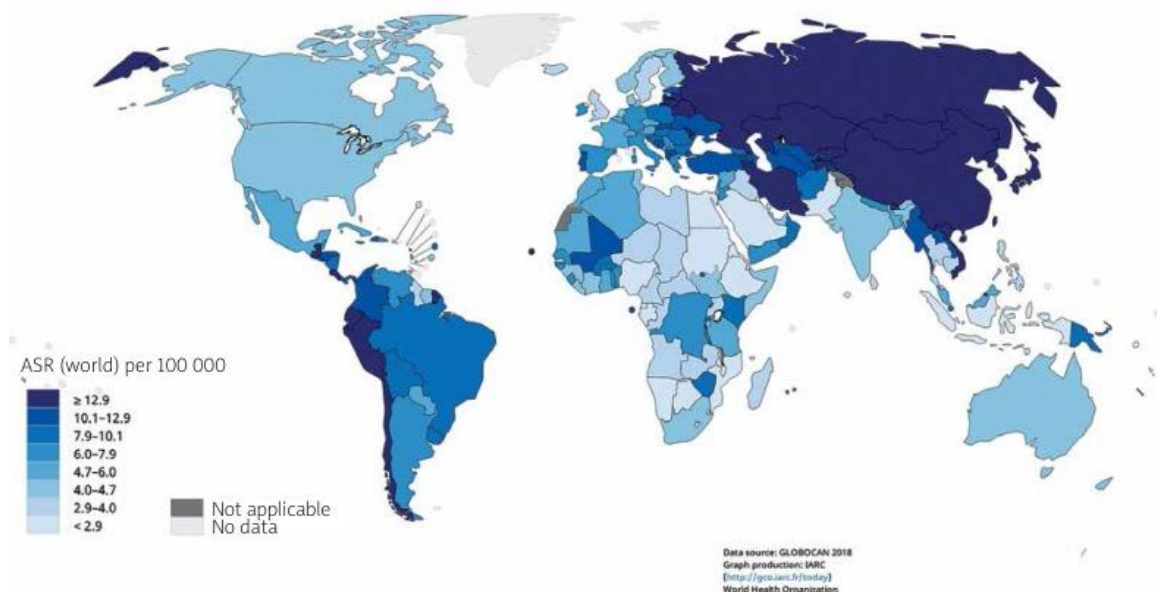
# ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

---

## 1.1 Ο γαστρικός καρκίνος

### 1.1.1 Επιδημιολογικά δεδομένα του γαστρικού καρκίνου

Ο καρκίνος του στομάχου ή αλλιώς γαστρικός καρκίνος, είναι ένας από τους πιο συχνούς και θανατηφόρους τύπους καρκίνου με πενταετές ποσοστό επιβίωσης ίσο με 20% [1]. Κάθε χρόνο, περίπου ένα εκατομμύριο νέες περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου διαγιγνώσκονται σε παγκόσμιο επίπεδο. Συγκεκριμένα, αποτελεί τον πέμπτο κατά σειρά καρκίνο σε συχνότητα εμφάνισης και τον τρίτο πιο θανατηφόρο τύπο καρκίνου ακολουθώντας τον καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου αντίστοιχα. Η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου φαίνεται να ποικίλλει από περιοχή σε περιοχή, με την Λατινική Αμερική, την Ανατολική και Κεντρική Ασία να είναι οι πιο επιβαρυνμένες [2]. Σε αυτές τις περιοχές η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου και ο δείκτης θνησιμότητας φαίνεται να είναι υψηλότερος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες.



**Εικόνα 1:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου σε όλο τον κόσμο.

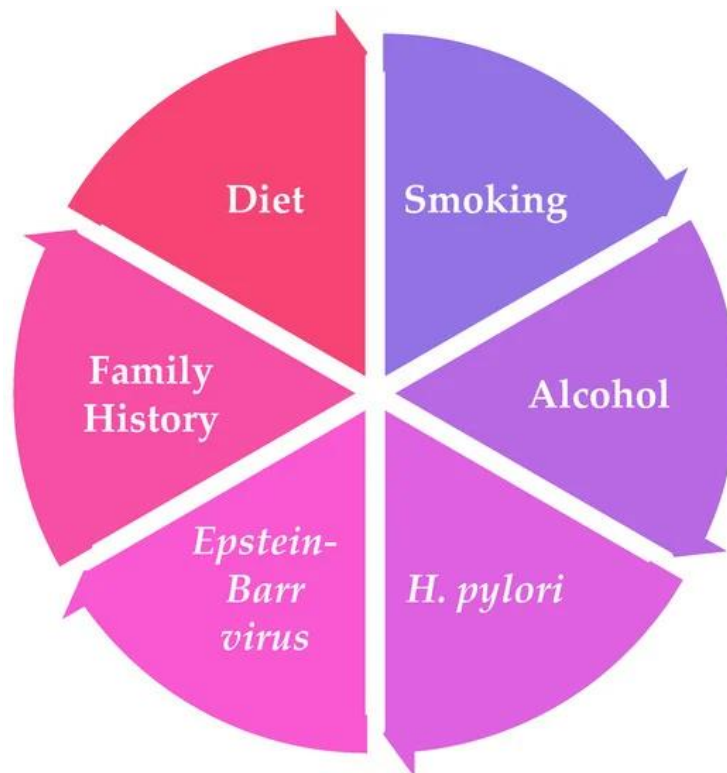
Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Przegląd gastroenterologiczny*, 14(1), 26–38.

Η μειωμένη πενταετής επιβίωση των ασθενών από την στιγμή της διάγνωσης οφείλεται στην ήδη καθυστερημένη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου και ως εκ τούτου την ανίχνευση της νόσου σε μεταστατικό στάδιο. Συνεπώς, η έγκαιρη διάγνωση σε προ-μεταστατικά στάδια, σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση για τον ασθενή και κατ' επέκταση

αυξημένα ποσοστά επιβίωσης. Επομένως, είναι πρόδηλη η άρρηκτη σχέση μεταξύ της έγκαιρης διάγνωσης και της πρόγνωσης για τον ασθενή [3].

### 1.1.2 Παράγοντες Κινδύνου

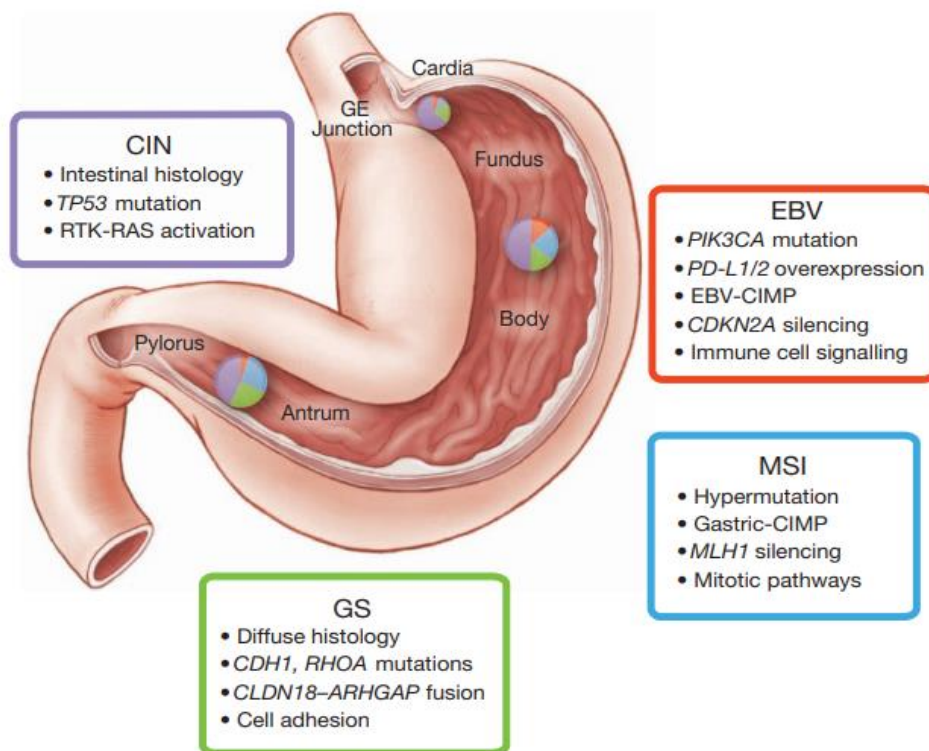
Αρχικά, ως παράγοντες κινδύνου ορίζονται όλοι οι παράγοντες, η συμβολή των οποίων μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου του στομάχου. Οι παράγοντες κινδύνου, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου του στομάχου. Οι παράγοντες κινδύνου, **Εικόνα 2**, μπορούν να χωριστούν σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες ενώ ρόλο παίζει και το περιβάλλον μαζί με τον τρόπο ζωής [4], [5].



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση των παραγόντων κινδύνου που δυνητικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε γαστρικό καρκίνο. Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., & Sitarz, R. (2020). Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4012.

## 1.2 Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Η κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA), κατηγοριοποίησε μοριακά τον γαστρικό καρκίνο σε τέσσερις υποκατηγορίες. Αυτές αφορούν: i) όγκους θετικούς στον ιό Epstein Barr (Epstein Barr virus positive tumors → EBV), ii) όγκους με αστάθεια μικροδορυφόρων (Microsatellite instable tumors → MSI), iii) όγκους που είναι γονιδιωματικά σταθεροί (Genomically stable tumors → GS) και iv) όγκους με χρωμοσωμική αστάθεια (Tumors with chromosomal instability → CIN) [6].



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση των τεσσάρων μοριακών υποκατηγοριών του γαστρικού καρκίνου:

- i) CIN → Tumors with **chromosomal instability**,
- ii) GS → **Genomically stable tumors**,
- iii) MSI → **Microsatellite instable tumors**,
- iv) EBV → **Epstein Barr virus positive tumors**.

Cancer Genome Atlas Research Network (2014). *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 513(7517), 202–209.

### i) Όγκοι θετικοί στον ιό Epstein Barr (EBV)

Ο συγκεκριμένος υπότυπος γαστρικού καρκίνου εντοπίζεται συνήθως στον θόλο ή το σώμα του στομάχου ενώ φαίνεται να προσβάλλει σε μεγαλύτερη συχνότητα άνδρες κάτω των εξήντα χρόνων. Ο ιός δεν προκαλεί απευθείας την εκδήλωση του γαστρικού καρκίνου αλλά

μέσω των γονιδίων και των miRNA του ελέγχει την μεθυλίωση του γονιδιώματος του ξενιστή και μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία καρκινώματος [7]. Οι θετικοί στον EBV όγκοι παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση γονιδίων και υποκινητών, καθώς και σημειακές μη-σιωπηλές μεταλλάξεις σε γονίδια όπως η α-καταλυτική υπομονάδα της 4,5-διφωσφορικής, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3-κινάσης (**PIK3CA**), η πλούσια σε AT επικράτεια αλληλεπίδρασης 1A (**ARID1A**), ο συν-καταστολέας (**BCL 6 Corepressor**) των Β-λεμφοκυττάρων (**BCOR**) και σπανιότερα το γονίδιο **TP53**. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ενίσχυση σε επίπεδο DNA (και κατ' επέκταση αύξηση της έκφρασης) του προσδέτη προγραμματισμένου θανάτου (**PDL 1/2**) καθώς και της κινάσης **JAK2**. Τέλος, στα γονίδια **PIK3CA** και **ARID1A** παρατηρείται η πιο συχνή μεθυλίωση [8].

## ii) Όγκοι με αστάθεια μικροδορυφόρων

Οι μικροδορυφόροι του γονιδιώματος παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια εξαιτίας του αυξημένου ρυθμού μεταλλάξεων που προκύπτουν κατά την αντιγραφή από την διολίσθηση της DNA πολυμεράσης. Τα κύτταρα τις αντιμετωπίζουν με το μηχανισμό Mismatch Repair System (MMR), που είναι υπεύθυνος για επιδιόρθωση των λαθών που προκύπτουν κατά την αντιγραφή του DNA. Ωστόσο, τα ίδια τα γονίδια του MMR συστήματος περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρόμοιες με αυτές των μικροδορυφόρων επιτείνοντας το φαινόμενο της αστάθειας των μικροδορυφόρων. Παρόλα αυτά, η μικροδορυφορική αστάθεια στον γαστρικό καρκίνο φαίνεται να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου **MLH1**, που κωδικοποιεί την MutL πρωτεΐνη και η οποία συμμετέχει στο MMR σύστημα επιδιόρθωσης του DNA συμβάλλοντας έτσι, στην προερχόμενη από λάθη της DNA πολυμεράσης, μικροδορυφορική αστάθεια [9].

## iii) Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι

Η πλειονότητα των γονιδιωματικά σταθερών όγκων στο στομάχι αφορά διάχυτου-τύπου περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μπορεί να επιτευχθεί διάγνωση σε νεότερη ηλικία εξαιτίας της επιθετικότητας του συγκεκριμένου διηθητικού τύπου καρκίνου του στομάχου, περιορίζοντας έτσι, τον διαθέσιμο χρόνο για συσσώρευση μεταλλάξεων. Οι συχνότερες μεταλλάξεις στους γονιδιωματικά σταθερούς όγκους, αφορούν γονίδια όπως αυτό της πλούσιας σε AT επικράτεια αλληλεπίδρασης 1A (**ARID1A**), το γονίδιο **CDH1** που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E-καντχερίνη, ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης και το γονίδιο **RHOA** που κωδικοποιεί μία Ras GTPάση, υπεύθυνη για την κυτταρική κινητικότητα. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο **CDH1**, που

συνήθως αφορούν την δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης ή την μείωση της έκφρασης των αντίστοιχων mRNA στην γαμετική σειρά, είναι υπεύθυνες για την κληρονόμηση του διάχυτου τύπου γαστρικού καρκίνου. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορούν να αιτιολογήσουν και την έλλειψη κυτταρικής προσκόλλησης των αντίστοιχων καρκινικών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις που αφορούν το γονίδιο RHOA συμβαίνουν σε «hotspot» σημεία του γονιδιώματος και επηρεάζουν τελικά τις επικράτειες αλληλεπίδρασης της Ras πρωτεΐνης με άλλους παράγοντες. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχει δειχθεί ότι προσφέρουν στα καρκινικά κύτταρα το πλεονέκτημα της αποφυγής μιας μορφής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, (anoikis), που εκκινείται μετά την κυτταρική αποκόλληση επιτρέποντας έτσι την κινητικότητα των κυττάρων και την διήθηση τους [10].

#### **iv) Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια**

Αυτός ο υπότυπος γαστρικών όγκων συναντάται στο 50% των ασθενών με καρκίνο του στομάχου, με την πλειονότητα αυτών των όγκων να έχει προκύψει από εντερική μεταπλασία. Χαρακτηρίζεται από αλλαγές στην ποσότητα του χρωμοσωμικού υλικού (διπλασιασμοί και ελλείμματα) που επηρεάζουν συχνότερα γονίδια όπως το **TP53**, οι μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν σε χρωμοσωμική αστάθεια, γονίδια υποδοχέων με δράση κινάσης-τυροσίνης (**RTKs**) όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (**EGFR**), ο υποδοχέας κινάσης-τυροσίνης erbB-2 (**ERBB2**), ο υποδοχέας κινάσης-τυροσίνης erbB-3 (**ERBB3**) καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα δύο του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (**FGFR2**), τον αυξητικό παράγοντα Α των ενδοθηλιακών αγγείων (**VEGFA**) και την **KRAS**. Τέλος, συχνά προκύπτουν μεταλλάξεις σε μεταγραφικούς παράγοντες-ογκογονίδια όπως είναι οι **MYC**, **GATA4** και **GATA6** [10].

## **2 Συμπτώματα, διάγνωση και θεραπεία γαστρικού καρκίνου**

### **Συμπτώματα**

Στα πρώτα στάδια της νόσου οι ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί. Παρόλα αυτά, μερικά από τα συμπτώματα που παρατηρούνται σε κάποιους ασθενείς με προσωρημένο καρκίνο του στομάχου είναι: i) πόνος στην στομαχική περιοχή, ii) δυσκολία στην κατάποση, iii) απώλεια βάρους, iv) ναυτία και εμετοί, και v) αίσθημα κορεσμού μετά την κατανάλωση μικρής ποσότητας φαγητού. Τα συμπτώματα αυτά δεν είναι εξειδικευμένα για την συγκεκριμένη ασθένεια. Αντιθέτως, αποτελούν κοινά συμπτώματα δυσπεψίας που

εμφανίζονται σε περιπτώσεις όπως η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, το έλκος του στομάχου και η λειτουργική δυσπεψία ενώ πιο σπάνια οφείλονται στον γαστρικό καρκίνο. Επομένως, εξαιτίας της γενικότητας των συμπτωμάτων, στις περισσότερες περιπτώσεις στους ασθενείς χορηγούνται φάρμακα όπως αναστολείς της αντλίας πρωτονίων και δεν πραγματοποιούνται περαιτέρω εξετάσεις με αποτέλεσμα την μη έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου [11]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποια συμπτώματα όπως η απώλεια βάρους, οι συνεχόμενοι εμετοί, η αναιμία και η παρατήρηση αίματος στα κόπρανα που αποτελούν αφορμή για την εξέταση της περίπτωσης του γαστρικού καρκίνου. Ωστόσο, η εμφάνιση αυτών των συμπτωμάτων συνάδει με προχωρημένα στάδια της νόσου [12].

### **Διάγνωση**

Ο τρόπος με τον οποίο διαγιγνώσκεται ο καρκίνος του στομάχου είναι η γαστρεντερική ενδοσκόπηση (γαστροσκόπηση), με την οποία εντοπίζεται ο όγκος και ακολουθεί ιστολογική επαλήθευση στην περιοχή γύρω από αυτόν [13]. Η γαστροσκόπηση αποτελεί μία επεμβατική μέθοδο διάγνωσης και συχνά δυσάρεστη για τους ασθενείς. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν καρκινικοί βιοδείκτες που κυκλοφορούν στο αίμα όπως το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (CEA) που όμως δεν εμφανίζουν εξειδίκευση για τον γαστρικό καρκίνο. Ωστόσο, μόρια όπως τα microRNAs, τα long non-coding RNAs (lncRNA), τα καρκινικά κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα καθώς και το καρκινικό γενετικό υλικό αποτελούν την βάση για την ανάπτυξη σύγχρονων μοριακών βιοδεικτών με εξειδίκευση και ευαισθησία για τον γαστρικό καρκίνο, λόγω των μοριακών τους ιδιοτήτων. Οι νέοι αυτοί βιοδείκτες μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην μη επεμβατική (με λήψη βιολογικών υγρών όπως το αίμα) και άρα έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου με έναν οικονομικά βιώσιμο τρόπο για τα ασφαλιστικά συστήματα [14].

### **Θεραπεία**

Για τον γαστρικό καρκίνο δεν υπάρχει μία γενικευμένη θεραπεία αλλά η απόφαση για το είδος της θεραπείας λαμβάνεται ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Σε αρχικά στάδια του καρκίνου, επιλέγεται η πραγματοποίηση χειρουργείου που αποτελεί και την μοναδική μορφή θεραπείας. Ανάλογα με το σημείο στο οποίο έχει εμφανιστεί ο πρωτογενής όγκος επιλέγεται και διαφορετικό είδος γαστρεκτομής. Υπάρχουν συνολικά τέσσερα είδη χειρουργείου με σκοπό την θεραπεία σε αρχικά στάδια. Συγκεκριμένα, υπάρχει η ενδοσκοπική εκτομή του βλεννογόνου, η μερική και η ολική γαστρεκτομή και η εκτομή λεμφαδένων [15]. Σε πιο προχωρημένα στάδια του καρκίνου, επιλέγεται η χημειοθεραπεία

με φθοροπυριμιδίνη ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πιο στοχευμένοι τρόποι αντιμετώπισης της ασθένειας, όπως η τραστουζουμάμπη για τους HER2-θετικούς υποτύπους γαστρικού καρκίνου. Πολλές φορές μπορεί να χορηγηθεί ένας συνδυασμός χημειοθεραπείας με μία πιο στοχευμένη μορφή φαρμακευτικής αγωγής (π.χ. τραστουζουμάμπη) [16].

### **3 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (long non-coding RNA)**

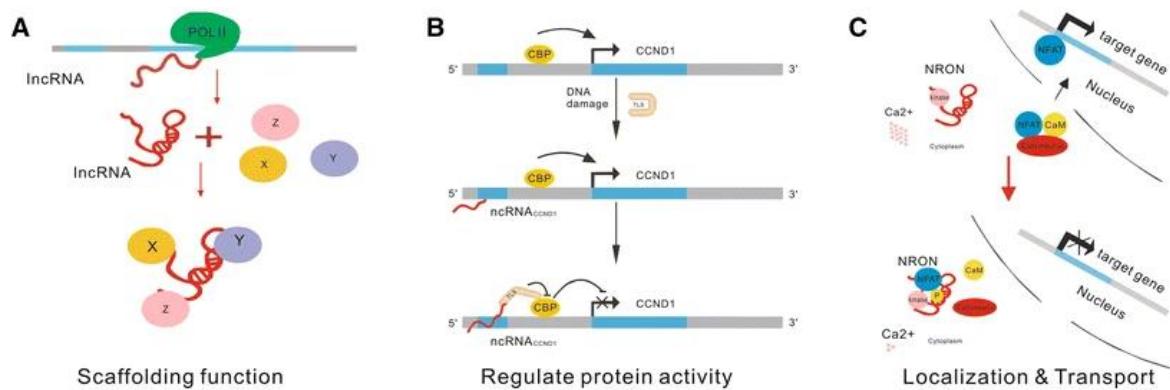
#### **3.1 Χαρακτηριστικά των lncRNA (long non – coding RNA)**

Για αρκετό καιρό, το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος θεωρούνταν ως «άχρηστο DNA». Με την βοήθεια όμως της αλληλούχησης νέας γενιάς, έγινε γνωστό ότι το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος μεταγράφεται ενώ μόνο το 2% αντιστοιχεί σε κωδικοποιητικές αλληλουχίες. Τα long non-coding RNA (lncRNA) αφορούν μη-κωδικοποιητικά μετάγραφα διακοσίων ή και παραπάνω νουκλεοτιδίων, με μόνο κάποιες εξαιρέσεις στις οποίες κωδικοποιούνται κάποια μικροπεπίδια από αυτά. Εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα διαφέροντας έτσι από τα microRNA ή τα mRNA. Επιπλέον, η βιογένεση τους, η ιστοειδικότητα τους, η σταθερότητά τους καθώς και η επιγενετική τους ρύθμιση διαφέρει σε σχέση με τα microRNAs. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: (i) τα μακρά μεσογονιδιακά μη-κωδικοποιητικά RNA (**long intergenic non-coding RNA**) και (ii) τα μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA που επικαλύπτονται με αλληλουχίες άλλων (κωδικοποιητικών ή μη) γονιδίων [17]. Στα πλαίσια αυτής της πτυχακής, το ενδιαφέρον στρέφεται στα **long intergenic non-coding RNA** τα οποία όντας σε μεσογονιδιακές περιοχές συσσωρεύουν πολλές μεταλλάξεις, παρουσιάζοντας μεγάλη ποικιλομορφία.

Τα lncRNA φαίνεται να επιτελούν πολλές λειτουργίες εντός του κυττάρου [18]. Μπορούν να υποστούν μάτισμα και πολυαδενυλίωση, ενώ μπορούν να δράσουν είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα. Στον πυρήνα τα lncRNA μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων δρώντας ως cis ή trans ρυθμιστές της έκφρασης. Έχει βρεθεί ότι τα lncRNA μπορούν να δράσουν ως μόρια-σκαλωσιά πάνω στα οποία μπορούν να προσελκυσθούν άλλα βιομόρια [19]. Επιπλέον, εκτός από την δυνατότητα προσέλκυσης άλλων βιομορίων έχουν την δυνατότητα να τροποποιούν την δραστηριότητα πρωτεϊνών ή ακόμα και να αλλάζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό αυτών. Τέλος, μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση άλλων γονιδίων συμμετέχοντας σε διάφορους προ-

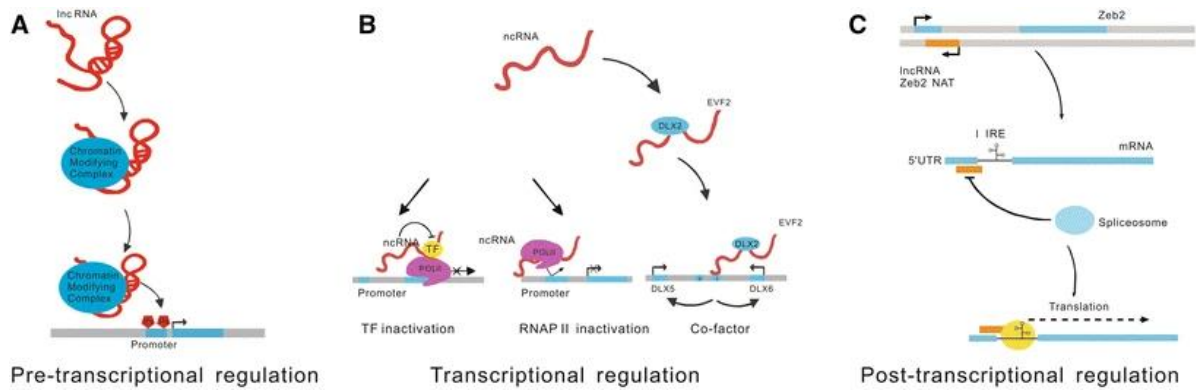
μεταγραφικούς, μεταγραφικούς και μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς [20]. Μπορούν να συμμετάσχουν σε διαδικασίες επιγενετικών τροποποιήσεων προσελκύοντας τροποποιητές της χρωματίνης, να επηρεάσουν την πρόσδεση και την δραστικότητα της RNAPolIII και να μεσολαβήσουν στο μάτισμα των mRNA [21]. Επιπρόσθετα, αντιπαράλληλα μεταγραφόμενα lncRNA έχει βρεθεί να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με mRNA ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση γονιδίων μετα-μεταγραφικά [22].

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των lncRNA. Η πρώτη ταξινόμηση γίνεται με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα κατηγοριοποιώντας τα σε ιντρονικά, μεσογονιδιακά, παράλληλα και αντιπαράλληλα μεταγραφόμενα lncRNA (σε σχέση με την φορά μεταγραφής κωδικοποιητικών γονιδίων) [23]. Η δεύτερη ταξινόμηση γίνεται ανάλογα με την δράση τους πάνω σε άλλες γονιδιωματικές αλληλουχίες, δηλαδή ανάλογα αν δρουν ως cis ή trans ρυθμιστές. Η τρίτη ταξινόμηση αφορά την συμμετοχή τους σε μεταγραφικούς, μετα-μεταγραφικούς ή και άλλους μηχανισμούς. Ένας τέταρτος τρόπος ταξινόμησης είναι ο μηχανισμός δράσης τους. Τα lncRNA στην τελευταία περίπτωση μπορούν να δράσουν ως: α) σηματοδοτικά lncRNA (**signal lncRNA**), β) lncRNA-δολώματα (**decoy lncRNA**), γ) lncRNA-οδηγοί (**guide lncRNA**) και γ) lncRNA-ικριώματα (**scaffold lncRNA**) [24]. Τέλος ένας άλλος μηχανισμός κατηγοριοποίησης είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός εφόσον μπορούν να βρεθούν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα [25].



**Εικόνα 4:** Απεικόνιση μερικών ιδιοτήτων που μπορούν να παρουσιάσουν τα lncRNA.

Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.



**Εικόνα 5:** Απεικόνιση ορισμένων μηχανισμών που μπορούν να συμμετάσχουν τα lncRNA.

Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.

### 3.2 Ταξινόμηση των lncRNA ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης

Έχει δειχθεί ότι τα lncRNA μπορούν να δράσουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης είτε «in cis» είτε «in trans», όντας ένα κριτήριο για την κατηγοριοποίησή τους. Τα cis-acting lncRNA ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων γειτονικών περιοχών του γονιδιώματος ενώ τα trans-acting lncRNA συμμετέχουν σε περισσότερες βιολογικές διαδικασίες εντός του κυττάρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι αποτελεί πρόκληση η εύρεση του υπεύθυνου, τελικά, μορίου για την ρύθμιση της έκφρασης άλλων γονιδίων καθώς όχι πάντα το ίδιο το RNA μετάγραφο είναι αυτό που παρουσιάζει τις ρυθμιστικές ιδιότητες.

#### ➤ *Cis-acting* lncRNA

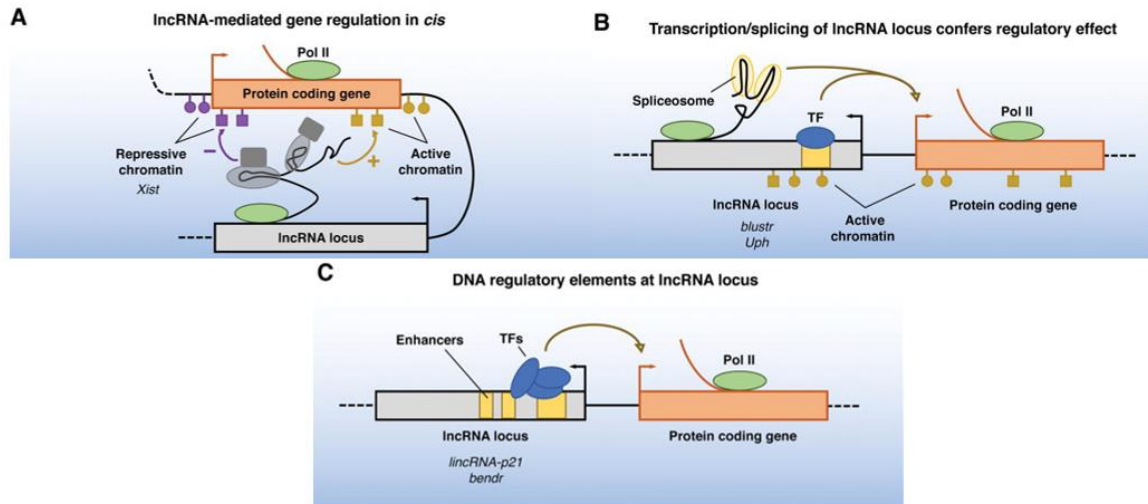
Τα *cis-acting* lncRNA δρουν μόνο σε κοντινές περιοχές του γονιδιώματος. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω διάφορων μηχανισμών όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 8** [26].

Συγκεκριμένα:

- I. Το ίδιο το lncRNA μετάγραφο καταφέρνει να επηρεάσει την δομή της χρωματίνης, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας την [27]. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι το XIST lncRNA που είναι υπεύθυνο για την απενεργοποίηση ενός εκ των δύο X χρωμοσωμάτων στα θηλυκά θηλαστικά. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, έχει αποδειχθεί ότι η μεταγραφική καταστολή του X χρωμοσώματος επιτυγχάνεται μέσω της εξάπλωσης του XIST lncRNA σε όλο το X χρωμόσωμα, προσελκύνοντας τελικά τροποποιητές της διαμόρφωσης της χρωματίνης π.χ. αποακετυλάσες ή

αλληλεπιδρώντας με άλλους ρυθμιστές που οδηγούν στην ενεργοποίηση αποακετυλασών όπως η HDAC3 [28].

- II. Ένας άλλος τρόπος επίτευξης της γονιδιακής ρύθμισης από τα lncRNA είναι μέσω της ίδιας της διαδικασίας της μεταγραφής ή του ματίσματος τους [26]. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί περιπτώσεις στις οποίες η μεταγραφική καταστολή δεν οφείλεται ούτε στο lncRNA μετάγραφο αλλά ούτε και στον γονιδιακό τόπο του lncRNA. Αντιθέτως, η γονιδιακή ρύθμιση κρύβεται στην ίδια την διαδικασία της μεταγραφής του lncRNA. Το Airn lncRNA αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα, με την μεταγραφή του να επικαλύπτει την μεταγραφή του Igfr2 γονιδίου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης της RNAPolIII στον εκκινητή του Igfr2 υποκινητή. Η επικαλυπτόμενη αυτή μεταγραφή, σε δομή ανοιχτής χρωματίνης, επιτρέπει στο Airn γονίδιο να μεταγραφεί καταστέλλοντας όμως την έκφραση του Igfr2 [29]. Ένα επιπρόσθετο παράδειγμα κατά το οποίο η διαδικασία της μεταγραφής και του ματίσματος του lncRNA μεταγράφου επηρεάζει την έκφραση γειτονικών γονιδίων είναι το Blustr lncRNA με το γειτονικό γονίδιο Sfmbt2. Μέσα από εισαγωγή αλληλουχιών πολυαδενυλίωσης σε διάφορα σημεία και τροποποιώντας τα 5' σημεία ματίσματος, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι αλλαγές που προκαλούνταν τελικά στο μήκος του lncRNA μεταγράφου επηρέαζαν και τα επίπεδα έκφρασης του Sfmbt2 γονιδίου. Το αντίκτυπο αυτό στα επίπεδα έκφρασης του Sfmbt2, δεν φαίνεται να εξαρτάται από την αλληλουχία του lncRNA αλλά από την διαδικασία στρατολόγησης πολυμερασών και τροποποιητών της δομής της χρωματίνης [30].
- III. Μία τελευταία περίπτωση γονιδιακής ρύθμισης από τα lncRNA είναι η ύπαρξη DNA ρυθμιστικών στοιχείων στον γονιδιακό τόπο των lncRNA [31]. Η ρύθμιση της έκφρασης γειτονικών γονιδίων από αυτά τα DNA ρυθμιστικά στοιχεία πραγματοποιείται ανεξάρτητα από την έκφραση ή μη του lncRNA. Το lncRNA-p21 ρυθμίζει την έκφραση του p21 μέσω ρυθμιστικών στοιχείων που βρίσκονται στον γενετικό του τόπο. Συγκεκριμένα, μία έλλειψη 127 νουκλεοτιδίων στο πρώτο εξόνιο του lincRNA-p21 οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης του p21 σε αντίθεση με την μείωση της έκφρασης του lncRNA-p21 που δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης του p21 γονιδίου [32].



**Εικόνα 6:** Μηχανισμοί δράσης cis-acting lncRNA.

Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.

### ➤ **Trans-acting lncRNA**

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν και τα lncRNA που αφήνουν το σημείο της μεταγραφής τους και δρουν σε απομακρυσμένα σημεία του γονιδιώματος και ονομάζονται **trans-acting** lncRNA. Αντίστοιχα με τα cis-acting lncRNA, διαχωρίζονται και αυτά σε τρεις υποκατηγορίες.

#### **I. lncRNA που ρυθμίζουν την δομή της χρωματίνης και την έκφραση γονιδίων σε απομακρυσμένα σημεία του γονιδιώματος**

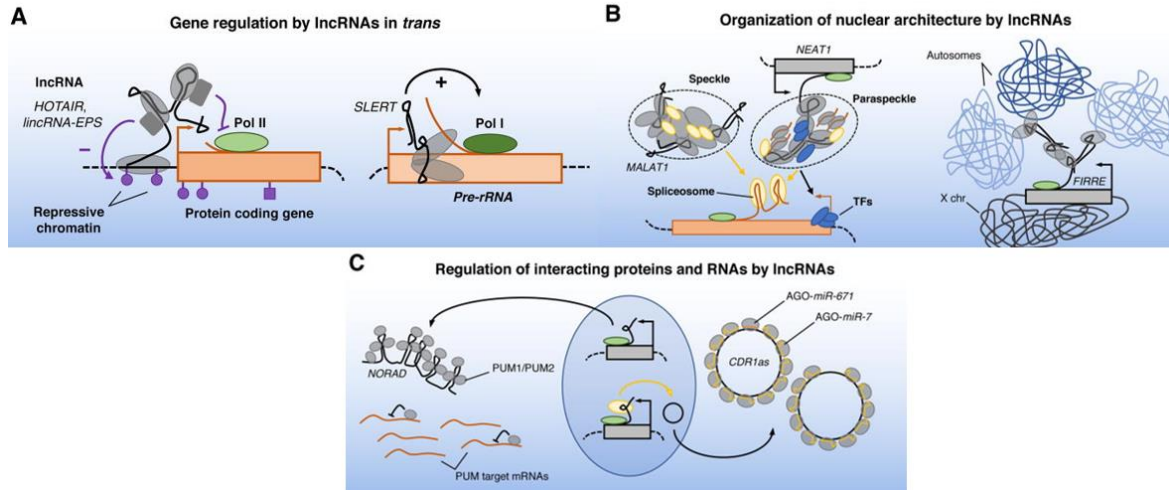
Ένα από τα πρώτα lncRNA που έχουν βρεθεί ότι δρουν in trans είναι το HOTAIR. Το HOTAIR lncRNA είναι ένα, αντιπαράλληλα μεταγραφόμενο, γονίδιο που προκύπτει από τον γενετικό τόπο του συμπλέγματος των HOXC γονιδίων, ματίζεται και πολυαδενυλιώνεται. Από πειράματα φάνηκε ότι το HOTAIR καταστέλλει την έκφραση του HOXD συμπλέγματος γονιδίων μέσω κατασταλτικών τροποποιήσεων-σημαδιών στην χρωματίνη, δηλαδή H3K27me3. Το lncRNA δρα ως σημείο στο οποίο μπορούν να «αγκυροβολήσουν» ένζυμα που τροποποιούν την χρωματίνη όπως το **PRC2** [33], [34]. Επιπλέον, έχουν βρεθεί και άλλα lncRNA που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων in trans με αυτόν τον μηχανισμό. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι τα trans-acting lncRNA δεν περιορίζονται στην ρύθμιση γονιδίων που μεταγράφονται μόνο από την RNA Pol II.

## II. LncRNA που ελέγχουν την δομή και την οργάνωση του πυρήνα

Τα lncRNA έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό και την δυναμική οργάνωση του πυρήνα. Συγκεκριμένα, το MALAT1, το οποίο παρόλο που εντοπίζεται σε περιοχές του πυρήνα που ονομάζονται **nuclear speckles** δεν φαίνεται να συμβάλλει στον σχηματισμό τους αλλά αντίθετα έχει βρεθεί ότι μπορεί να «μετατοπίζει γονίδια» από κατασταλτικές περιοχές (polycomb bodies) του γονιδιώματος σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές. Άλλο ένα αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί το NEAT1 lncRNA το οποίο αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό και την διατήρηση άλλων δυναμικών πυρηνικών διαμερισμάτων (**paraspeckles**). Στα πυρηνικά αυτά διαμερίσματα περιέχονται πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την μεταγραφή και την επεξεργασία RNA μεταγράφων [35].

## III. LncRNA που αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν την δραστικότητα και λειτουργία άλλων πρωτεϊνών και RNA μορίων

Σε αυτή την περίπτωση τα lncRNA μπορούν να τροποποιήσουν την δραστικότητα ή την διαθεσιμότητα διάφορων μορίων μέσω της αλληλεπίδρασης τους με αυτά. Ένα παράδειγμα μείωσης της διαθεσιμότητας των μορίων, είναι το lncRNA **NORAD (Non-coding RNA activated by DNA damage)**. Το συγκεκριμένο lncRNA δρα ως μόριο δόλωμα πάνω στο οποίο «στρατολογούνται» οι πρωτεΐνες PUM1 και PUM2 (RNA-binding proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοτίβα στο 3' άκρο των mRNA και προωθούν την αποικοδόμηση του mRNA και κατ' επέκταση την αναστολή της μετάφρασης αυτών. Το NORAD λοιπόν περιέχει αντίστοιχα μοτίβα αναγνώρισης επιτρέποντας σε αυτές τις πρωτεΐνες να προσδεθούν πάνω σε αυτό και όχι πάνω στους mRNA-στόχους τους αυξάνοντας έτσι την σταθερότητα και την μετάφραση τους.



**Εικόνα 7:** Συνοπτική απεικόνιση των μηχανισμών των lncRNA που δρουν in trans.

Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.

### 3.3 Ταξινόμηση των lncRNA ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους

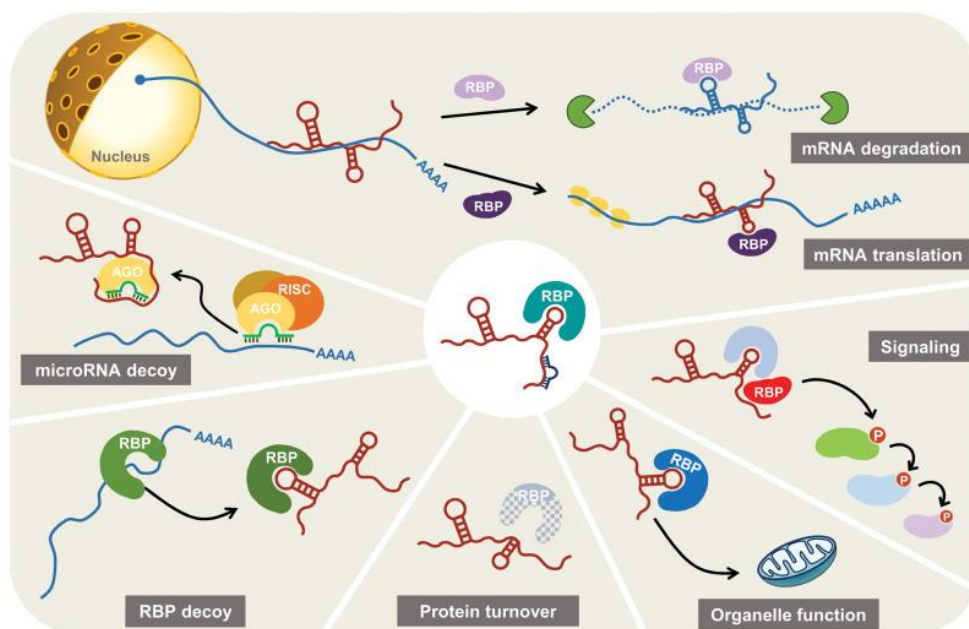
Τα lncRNA είναι μη κωδικοποιητικά μετάγραφα των οποίων η δραστηριότητα πολλές φορές κρύβεται στο ίδιο το μετάγραφο. Επομένως, ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την δράση τους [36]. Υπάρχουν lncRNA που εντοπίζονται στον πυρήνα. Τα πυρηνικά lncRNA διαδραματίζουν ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων και στην δομή της χρωματίνης. Επιπλέον, υπάρχουν lncRNA τα οποία εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα με ποικίλους ρόλους όπως η ρύθμιση της μετάφρασης, η σηματοδότηση και η αναπνοή [25].

#### ➤ Πυρηνικά lncRNA

Τα πυρηνικά lncRNA ελέγχουν την έκφραση γονιδίων, ρυθμίζοντας την μεταγραφή τους και την δομή της χρωματίνης. Τα *cis* πυρηνικά lncRNA επηρεάζουν την έκφραση γειτονικών και μόνο γονιδίων ενώ τα *trans* πυρηνικά μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση απομακρυσμένων γονιδίων ή ακόμα και να συμμετάσχουν στην δημιουργία πυρηνικών διαμερισμάτων όπως τα nuclear speckles (**MALAT1**) [37].

### ➤ Κυτταροπλασματικά lncRNA

Τα κυτταροπλασματικά lncRNA προκύπτουν είτε από γονίδια τα οποία εντοπίζονται στο γονιδιωματικό DNA είτε από γονίδια τα οποία μπορούν να εντοπιστούν στο μιτοχονδριακό DNA. Όπως συμβαίνει και με τα πυρηνικά lncRNA, τα κυτταροπλασματικά lncRNA αλληλεπιδρούν με RBPs (RNA-binding proteins). Όσα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα φαίνεται να συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 10**. Μπορούν να ρυθμίσουν την μετάφραση ενός γονιδίου είτε μέσω της ρύθμισης της αποικοδόμησης του mRNA είτε επηρεάζοντας την ίδια την διαδικασία της μετάφρασης. Επιπλέον, μπορούν να ρυθμίσουν την διαθεσιμότητα κυτταροπλασματικών παραγόντων καθώς και να αποτελέσουν μόρια-«σκαλωσιά» πάνω στα οποία θα αγκυροβολήσουν μόρια που συμμετέχουν σε διάφορα μονοπάτια [38].



**Εικόνα 8:** Συνοπτική απεικόνιση των ρόλων που διαδραματίζουν τα κυτταροπλασματικά lncRNA.

Noh, J. H., Kim, K. M., McClusky, W. G., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2018). Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 9(3), e1471.

### 3.4 LncRNA στον καρκίνο

Οι περισσότερες μεταλλάξεις στον οργανισμό συμβαίνουν σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος. Σε αυτές τις μη κωδικοποιητικές περιοχές όμως, υπάρχουν πολλά γονίδια lncRNA τα οποία επηρεάζονται από αυτές τις μεταλλάξεις. Πράγματι, έχει δειχθεί η συσχέτιση της παρεκκλίνουσας έκφρασης διάφορων lncRNA με την εμφάνιση καρκίνου [39]. Συνεχώς, συλλέγονται νέες πληροφορίες οι οποίες δείχνουν την συμμετοχή των lncRNA σε μία σειρά φυσιολογικών διαδικασιών του κυττάρου, τις οποίες τελικά καταφέρνει να εκμεταλλευτεί ένα καρκινικό κύτταρο. Συγκεκριμένα, τα lncRNA έχουν εξέχοντα ρόλο στην ρύθμιση γονιδίων που μπορεί με την σειρά τους να συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική ομοιόσταση, την κυτταρική επιβίωση, την απόπτωση και την γονιδιωματική σταθερότητα.

Υπάρχουν παραδείγματα lncRNA με ογκοεπαγωγικό ρόλο. Στον μη μικροκυτταρικό τύπο καρκίνου του πνεύμονα, έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση του LINC00152 οδηγεί στην υπερέκφραση του **EGFR** (**E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor), το οποίο με την σειρά του προκαλεί την υπερενεργοποίηση του EGFR/PI3K/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού με αποτέλεσμα τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ένα άλλο παράδειγμα ογκοεπαγωγικής δράσης των lncRNA είναι **SNHG1** (**S**mall **N**ucleolar **R**NA **h**ost **g**ene **1**) που αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Το SNHG1 δρα ως μόριο-δόλωμα για την προσέλκυση και τελικά αναστολή του microRNA mir-145, που εμφανίζει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες στοχεύοντας τον IGF-1R (**I**nsulin-like **G**rowth **F**actor **1** **R**eceptor) και η κινάση 4 που ενεργοποιείται από τον παράγοντα p-21 [40].

Από την άλλη πλευρά, έχουν βρεθεί και lncRNA με ογκοκατασταλτικό ρόλο. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το PTENP1 lncRNA. Το PTENP1 έχει ομόλογη αλληλουχία με το 3' άκρο του PTEN mRNA, αποτελώντας έτσι δόλωμα για τα microRNA (miR-19b και miR-20a) που στοχεύουν το PTEN mRNA μετάγραφο για αποικοδόμηση. Έχει παρατηρηθεί η απαλοιφή του γονιδιακού τύπου του PTENP1 lncRNA σε περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη και του παχέος εντέρου [41].

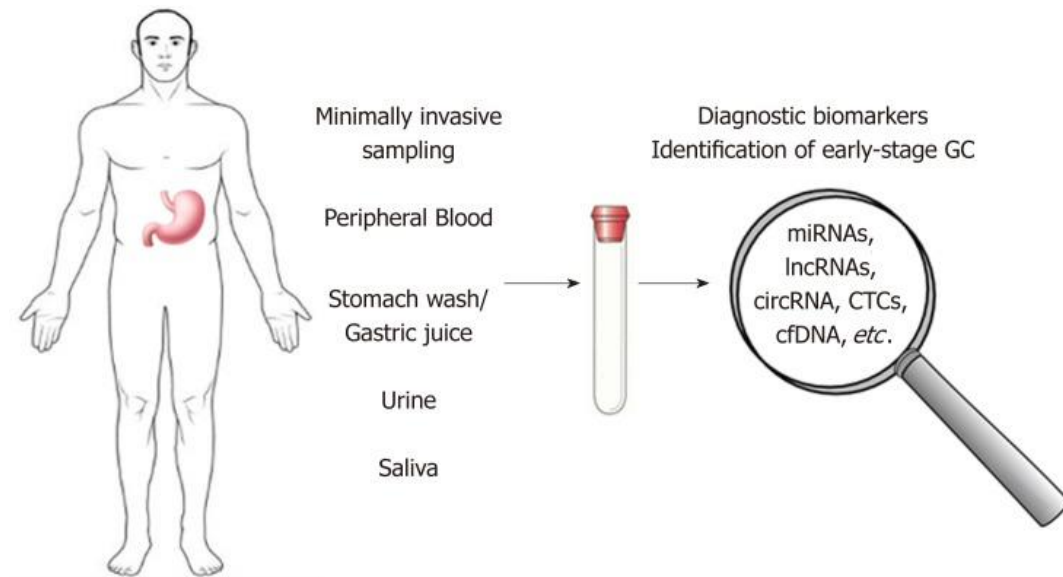
### 3.5 lncRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες

Έχει υπάρξει μεγάλη πρόοδος τόσο στις στρατηγικές διάγνωσης όσο και θεραπείας. Ωστόσο, αρκετές από αυτές παραμένουν ιδιαίτερα επεμβατικές και δυσάρεστες για τον ασθενή ή συνοδεύονται από υψηλό κόστος για το εθνικό σύστημα υγείας. Στο κομμάτι της διάγνωσης, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της προς την υγρή βιοψία με τον έλεγχο των βιολογικών υγρών [42]. Γνωρίζουμε πλέον, ότι τα lncRNA ως ρυθμιστές διάφορων φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση μπορούν να συμβάλλουν άμεσα στην καρκινογένεση. Πολλά lncRNA εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα και καταλήγουν στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά. Τα κυκλοφορούντα αυτά lncRNA μπορούν να βρεθούν σε μικροκυστίδια, σε εξωσώματα ή ακόμα και σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες καθιστώντας τα έτσι σταθερά [43].

Οι προσπάθειες για υγρές βιοψίες δεν ξεκινάνε με τα lncRNA. Υπάρχουν ήδη καρκινικοί βιοδείκτες όπως το καρκινικό εμβρυονικό αντιγόνο (Cancer Embryonic Antigen → CEA), που εξετάζεται ως ένδειξη κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου, καθώς και η άλφα εμβρυϊκή πρωτεΐνη (alpha fetoprotein → AFP), που αντίστοιχα με το CEA χρησιμοποιείται ως ένδειξη για την ενδεχόμενη εμφάνιση καρκίνου του στομάχου και του παχέος εντέρου [44]. Τα προαναφερθέντα μόρια εξετάζονται και αυτά σε βιολογικά υγρά του ανθρώπου. Ωστόσο, το πρόβλημα σε αυτά έγκειται στην χαμηλή εξειδίκευση και ευαισθησία με αποτέλεσμα την πιθανότητα εσφαλμένης διάγνωσης. Αντίθετα, τα lncRNA προσφέρουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και ευαισθησία ενώ παράλληλα έχουν ιδιότητες που τα απαλλάσσουν από την αποικοδόμηση από νουκλεάσες. Επιπλέον, μπορούν να εντοπιστούν στο πλάσμα, στον ορό και στα ούρα έχοντας μία πλούσια και απλή πηγή έκκρισης που τα καθιστά πολλά υποσχόμενα ως καρκινικοί βιοδείκτες [45].

Ως εκ τούτου, υπάρχουν κάποια lncRNA για τον γαστρικό καρκίνο όπως το H19 το οποίο υπερεκφράζεται στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα και τα γαστρικά υγρά σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Οι ερευνητές κατέληξαν στο γεγονός ότι το H19 αποτελεί καλύτερο διαγνωστικό βιοδείκτη σε σχέση με αυτά που χρησιμοποιούνται ήδη για τον γαστρικό καρκίνο ενώ παράλληλα ελέγχουν την αξία του H19 και ως προγνωστικό δείκτη [46]. Τέλος, το lncRNA H19 δεν είναι το μοναδικό που εμφανίζει ειδικότητα για τον

γαστρικό καρκίνο και θα μπορούσε να αποτελέσει διαγνωστικό βιοδείκτη για την συγκεκριμένη ασθένεια.



**Εικόνα 9:** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της θεωρίας για την εύρεση νέων πιθανών βιοδεικτών.

Necula, L., Matei, L., Dragu, D., Neagu, A. I., Mambet, C., Nedeianu, S., Bleotu, C., Diaconu, C. C., & Chivu-Economescu, M. (2019). Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World journal of gastroenterology*, 25(17), 2029–2044.

### 3.6 HOX γονίδια

Τα HOX γονίδια κωδικοποιούν την έκφραση μιας εξαιρετικά συντηρημένης οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη και στην ομοιοστάση των ιστών. Τα γονίδια αυτά οργανώνονται σε τέσσερις συστοιχίες γονιδίων (**HOXA, HOXB, HOXC, HOXD**) και βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι HOX μεταγραφικοί παράγοντες έχει φανεί ότι συμμετέχουν στην καρκινογένεση. Μεταλλάξεις στην επικράτεια πρόσδεσης στο DNA ή στην επικράτεια αλληλεπίδρασης με άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες καθώς και η ιδιόρρυθμη έκφραση τους εξαιτίας αλλαγών στην γονιδιακή ρύθμιση, μπορούν να συμβάλλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας [47]. Έχουν καταγραφεί παραδείγματα HOX γονιδίων με όγκο-επαγωγικό χαρακτήρα. Συγκεκριμένα, ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο HOXA9 το οποίο συμβάλλει στην αυτό-ανανέωση των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Το

HOTTIP lncRNA προσδένεται στην WDR5 (WD repeat-containing protein 5) ώστε να ενισχύσουν την έκφραση του HOXA9 μεταγραφικού παράγοντα που με την σειρά του θα συμμετάσχει στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης προωθώντας τον βλαστικό χαρακτήρα των καρκινικών κυττάρων στο πάγκρεας [48]. Ένα επιπλέον παράδειγμα HOX γονιδίου με όγκο-επαγωγικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο είναι το HOXA11. Ειδικότερα, το HOXA11-AS lncRNA κωδικοποιείται από το HOXA11 με αντιπαράλληλη φορά μεταγραφής. Το HOXA11-AS lncRNA λειτουργεί ως δόλωμα για την προσέλκυση των miRNA-124-3p με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του mRNA της ιντεγκρίνης  $\beta 3$  (ITGB3) που προωθεί την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στους γειτονικούς ιστούς και την μετάσταση [49].

Ωστόσο, υπάρχουν και HOX μεταγραφικοί παράγοντες με όγκο-κατασταλτικό ρόλο. Ο HOXD10 μεταγραφικός παράγοντας δρα όγκο-κατασταλτικά και έχει παρατηρηθεί η υπερμεθυλίωση του hoxd10 γονιδίου σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου σε ποντικούς. Σε πειράματα απο-μεθυλίωσης του hoxd10 γονιδίου παρατηρήθηκε μειορρύθμιση του RHOC/Akt/MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού και επόμενος κυτταρικός θάνατος των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου [50].

Τέλος, έχει αναφερθεί ο ρόλος των γονιδίων HOX ως έμμεσοι ρυθμιστές της καρκινογένεσης. Ο HOXB3 μεταγραφικός παράγοντας ελέγχει την έκφραση της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 3 B (DNMT3B) επηρεάζοντας έτσι την έκφραση άλλων γονιδίων εξαιτίας της μεθυλίωσης τους από την συγκεκριμένη DNA μεθυλοτρανσφεράση [51].

---

## ***4. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ***

---

Η αναζήτηση νέων μη επεμβατικών εξειδικευμένων μοριακών βιοδεικτών για την διάγνωση και πρόγνωση του γαστρικού καρκίνου αποτελεί μείζον ζήτημα της επιστημονικής κοινότητας. Στην προσπάθεια αυτή εντάσσεται και η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο πλήρης χαρακτηρισμός ενός μη μελετημένου lncRNA, του GREAT4\_2. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται τόσο βιοπληροφορικές αναλύσεις καθώς και πειραματικές μέθοδοι για να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου lncRNA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, ο υποκυτταρικός εντοπισμός του, η μετα-μεταγραφική του σταθερότητα καθώς και η ρύθμιση του από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας εξετάζεται και η σχέση που εμφανίζει το GREAT4\_2 με δύο γειτονικά του γονίδια. Συγκεκριμένα, εξετάζεται εάν το υπό μελέτη lncRNA ρυθμίζει την έκφραση των δύο αυτών γονιδίων.

Τα αποτελέσματα από τον χαρακτηρισμό αυτού του lncRNA μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο ενδεχομένως στην ανάδειξη ενός νέου εξειδικευμένου μοριακού βιοδείκτη για τον γαστρικό καρκίνο. Παρόλα αυτά, απαιτούνται επιπλέον αρκετές πειραματικές ενέργειες για την αξιοποίηση του GREAT4\_2 ως διαγνωστικό ή θεραπευτικό εργαλείο.

---

## ***5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ***

---

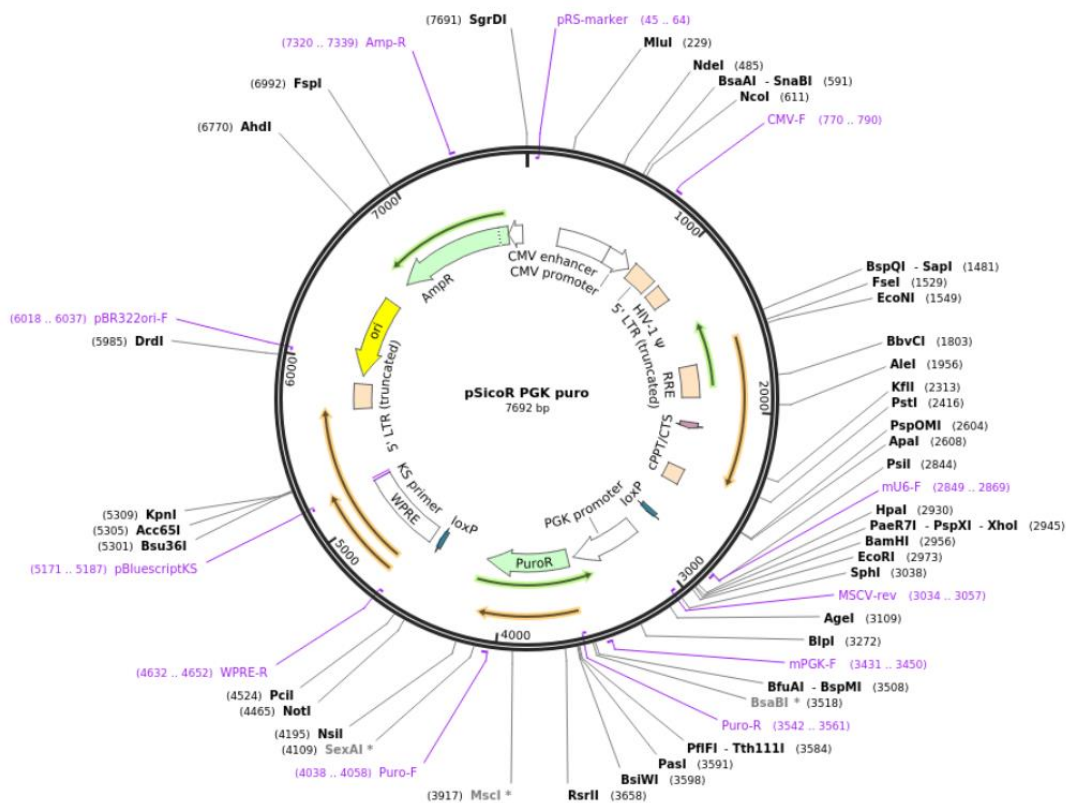
## 5.1 Υλικά

### 5.1.1 Αλληλουχίες

Οι αλληλουχίες που σχεδιάστηκαν αφορούσαν short hairpin RNA (shRNA) και χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση παροδικής σίγησης του GREAT4\_2 για τον προσδιορισμό των γονιδίων στόχων του. Η αλληλουχία shRNA έφερε κατάλληλα άκρα ώστε να είναι εφικτή η ένθεση της στον πλασμιδιακό φορέα **psicoR PGK puro**. Το shRNA που αξιοποιείται για την πραγματοποίηση παροδικής σίγησης, σχεδιάστηκε με την βοήθεια του siDESIGN Center-Horizon Discovery. Ο υπερσύνδεσμος του προγράμματος είναι ο εξής: <https://horizondiscovery.com/en/ordering-and-calculation-tools/sidesign-center>. Τέλος, σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του GREAT4\_2 lncRNA με την βοήθεια του UCSC.

### 5.1.2 Πλασμιδιακός φορέας: **psicoR PGK puro** (Αριθμός καταλόγου Addgene: **12084**)

Ο πλασμιδιακός φορέας **psicoR PGK puro**, μεγέθους 7692 ζευγών βάσεων, χρησιμοποιείται για την παροδική σίγηση γονιδίων μέσω της χρήσης συστημάτων λεντιϊών για την διαμόλυνση κυτταρικών σειρών θηλαστικών. Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για την επιλογή των μετασχηματισμένων με πλασμίδιο βακτηριακών αποικιών. Τέλος, περιλαμβάνει και θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα ώστε να επιτευχθεί και η ενσωμάτωση του shRNA.



**Εικόνα 10:** Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα psicoR PGK puro.

### 5.1.3 Κυτταρικές σειρές

Για την εκπόνηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές:

**HFE:** Ανθρώπινη κυτταρική σειρά προερχόμενη από φυσιολογικά κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου

**AGS:** επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα

**NUGC4:** κύτταρα με επιθηλιακή μορφολογία που προέρχονται από γαστρικό καρκίνωμα με την μορφή «μικρής σφραγίδας»

**ΚΑΤΟIII:** γαστρικά καρκινικά κύτταρα με σφαιρική μορφολογία

**MKN45:** κύτταρα από «φτωχά» διαφοροποιημένο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα με ατρακτοειδή μορφολογία

**Ls174:** καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου με επιθηλιακή μορφολογία

**HepG2:** ηπατικά καρκινικά κύτταρα με επιθηλιακή μορφολογία

**Hela:** καρκινικά κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας με επιθηλιακή μορφολογία

**MCF7:** καρκινικά κύτταρα με επιθηλιακή μορφολογία από αδеноκαρκίνωμα του μαστού

**SKBR3:** : καρκινικά κύτταρα (με υπερέκφραση του HER2) με επιθηλιακή μορφολογία από αδеноκαρκίνωμα του μαστού

**NCIH520:** καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα με επιθηλιακή μορφολογία

**HEK293:** καρκινικά κύτταρα των νεφρών με επιθηλιακή μορφολογία

#### 5.1.4 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των πλασμιδίων με το επιθυμητό ένθεμα καθώς και για τον πολλαπλασιασμό αυτών, είναι τα στελέχη **XL1Blue**. Τα συγκεκριμένα βακτήρια υπολείπονται συστημάτων περιορισμού καθώς φέρουν μεταλλάξεις στο *endA* γονίδιο που κωδικοποιεί για μία ενδονουκλεάση. Επιπλέον, η *hsdR* μετάλλαξη αποτρέπει την αποικοδόμηση του πλασμιδίου από το σύστημα *EcoK* ενδονουκλεασών. Τέλος, η μετάλλαξη σε γονίδιο ρεκομπινάσης (*recA*) αποτρέπει τους ανεπιθύμητους ανασυνδυασμούς. Επομένως, η έλλειψη συστημάτων περιορισμού και ανασυνδυασμού επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό και την σταθερότητα των πλασμιδίων που εισάγονται.

#### 5.1.5 Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Τα δείγματα *pSicoR KLF5 midi* και *+ con CENTRIC2* που προϋπήρχαν στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες για την εύρεση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με ένθεμα ένα *shRNA* που στοχεύει έναντι του υπό μελέτη *lncRNA*. Τα συγκεκριμένα δείγματα περιέχουν ως ένθεμα ένα διαφορετικό *shRNA* που στοχεύει κάποιο άλλο γονίδιο και είναι κλωνοποιημένα στον φορέα *psicoR* που αξιοποιείται και στην παρούσα πτυχιακή. Χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες καθώς το *shRNA* που περιέχουν έχει ίδιο μέγεθος (50 βάσεις) με το *shRNA* που χρησιμοποιείται για την παροδική σίγηση του *lncRNA*, με αποτέλεσμα να μπορεί να υποδείξει έναν επιτυχώς ανασυνδυασμένο φορέα. Τα δείγματα – *con pSicoR mini* και *SL (Self Ligation)* είναι οι αρνητικοί μάρτυρες οι οποίοι δεν περιέχουν ένθεμα (υπολείπονται 50 βάσεις).

## 5.2 Μέθοδοι

### 5.2.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Πρωτίστως, για να εξεταστεί το GREAT4\_2 lncRNA χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί ανάλυση RNA-seq δεδομένων ώστε να φανεί εάν το συγκεκριμένο lncRNA διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του στομάχου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν δεδομένα RNA από φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς από διαφορετικούς τύπους καρκίνων και από διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες στην βάση των δημόσια διαθέσιμων δεδομένων της ερευνητικής κοινοπραξίας TCGA (The Cancer Genome Atlas). Παράλληλα, ελέγχθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης δύο πιθανών στόχων του GREAT4\_2 και εξετάστηκε πιθανή συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης τους με το υπό μελέτη lncRNA. Οι αναλύσεις έγιναν με την βοήθεια του υπολογιστικού φύλλου Microsoft Excel. Παράλληλα, αξιοποιήθηκε και η σελίδα GEPIA για την ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου GREAT4\_2 στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος.

### 5.2.2 Αντίδραση annealing για shRNA

Αρχικά, πρέπει να πραγματοποιηθεί το annealing των δύο ξεχωριστών sense και antisense oligos για να δημιουργηθεί ένα δίκλωνο μόριο DNA το οποίο θα ενσωματωθεί στον πλασμιδιακό φορέα. Συγκεκριμένα, πρέπει να πραγματοποιηθεί η ανάμειξη των sense και antisense oligos μαζί με το Annealing Buffer (KAc 100 mM, HepesKOH 30 mM/pH 7.4, MgAc 2 mM). Στην συνέχεια, ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στους 95°C για την πραγματοποίηση της υβριδοποίησης. Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον **Πίνακα 1**.

**Πίνακας 1:** Σύσταση αντίδρασης Annealing.

Σύσταση αντίδρασης annealing	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Sense Oligos	2 μl
Antisense Oligos	2 μl
Annealing Buffer	96 μl

### 5.2.3 Αντίδραση λιγάσης για shRNA

Είχε πραγματοποιηθεί ήδη πέψη του πλασμιδιακού φορέα psicoR με τα ένζυμα HpaI/XhoI. Επομένως, μετά την αντίδραση του Annealing πραγματοποιήθηκε η αντίδραση λιγάσης με την σύστασή της να φαίνεται στον **Πίνακα 2**.

**Πίνακας 2:** Σύσταση αντίδρασης λιγάσης για shRNA με psicoR HpaI/XhoI φορέα.

Σύσταση αντίδρασης λιγάσης	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Ένθεμα dsOligo (shRNA)	4 µl
Πλασμιδιακός φορέας psicoR HpaI/XhoI	1 µl
T4 ligase (400 u/µL), EnzyQuest	0,5 µl
T4 ligase buffer (10X), NEB	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	3,5 µl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 µl

#### 5.2.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών με πλασμιδιακές κατασκευές

Μετά την αντίδραση λιγάσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων XL1Blue μέσω θερμικού σοκ. Μετά από αυτή τη διαδικασία επιλέχθηκαν τα μετασχηματισμένα βακτήρια (παρουσία ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη) για την ανάπτυξη τους σε υγρή καλλιέργεια (2 ml LB θρεπτικό με αμπικιλίνη και ολονύχτια επώαση στους 37°C). Μετά την ολονύχτια επώαση ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίου μέσω αλκαλικής λύσης.

#### 5.2.5 Απομόνωση πλασμιδίου

Η απομόνωση των πλασμιδίων από τα μετασχηματισμένα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση μέσω διαγνωστικής PCR των μετασχηματισμένων, με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, βακτηρίων.

Η πειραματική διαδικασία περιέχει τα εξής βήματα:

1. Σε tubes τύπου eppendorf των 1,5 ml προστίθενται δείγματα από τις βακτηριακές καλλιέργειες.
2. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται.
3. Στο ίζημα που παρατηρείται μετά την φυγοκέντρηση προστίθενται 100 µl Buffer I που πρέπει να περιέχει RNAάση A.
4. Ακολουθεί vortex των δειγμάτων.
5. Έπειτα, προστίθενται 200 µl Buffer II και γίνεται ήπια ανάδευση στα δείγματα. Το Buffer II πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα της πραγματοποίησης της διαδικασίας απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.

6. Ακολουθεί επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου για την επίτευξη της λύσης των βακτηρίων.
7. Ύστερα, προστίθενται 150 μl παγωμένου Buffer III και έπεται ήπια ανάδευση.
8. Ακολουθεί επώαση 5 λεπτών στον πάγο.
9. Μετά την επώαση του **Βήματος 8**, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm.
10. Το υπερκείμενο που δημιουργείται μετά την φυγοκέντρηση συλλέγεται και προστίθεται σε νέα tubes ενώ τα tubes με το εναπομείναν ίζημα απορρίπτονται.
11. Στα tubes που υπάρχει πλέον το υπερκείμενο από το **Βήμα 10**, προστίθενται 1000 μl 100% παγωμένης αιθανόλης. Μετά την προσθήκη της αιθανόλης τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά στους -80°C.
12. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm.
13. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 600 μl 70% παγωμένης αιθανόλης.
14. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm
15. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί στέγνωμα του ιζήματος για περίπου 10 λεπτά.
16. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 μl ddH<sub>2</sub>O και επωάζεται στους 65°C για 5 λεπτά.

### 5.2.6 Διαγνωστική PCR

Μετά την απομόνωση πλασμιδίων από τις διαφορετικές βακτηριακές αποικίες XL1Blue, ακολούθησε διαγνωστική PCR για την επιβεβαίωση των θετικών κλώνων (των πλασμιδίων που έλαβαν το ένθεμα του shRNA). Η σύσταση της Διαγνωστικής PCR φαίνεται στον **Πίνακα 3**.

**Πίνακας 3:** Σύσταση Διαγνωστικής PCR

Σύσταση Διαγνωστικής PCR	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Taq buffer (10X), Kara Biosystems	5 μl
dNTPs (10 mM)	0,5 μl

plb_unmod screen F1 7/11/2022 (10 $\mu$ M) (Forward primer)	1 $\mu$ l
MSCV_Rev 28/04/2023 (Reverse primer)	1 $\mu$ l
Taq polymerase (5u/ $\mu$ l), Kapa Biosystems	0,15 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	41,35 $\mu$ l
Απομονωμένο Πλασμιδιακό DNA	1 $\mu$ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 $\mu$ l

Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι ώστε να υβριδοποιούν στο κομμάτι του φορέα psicoR. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 2 θετικά controls δηλαδή ο φορέας psicoR που περιέχει ένα διαφορετικό shRNA ίδιου όμως μεγέθους και 2 αρνητικά controls με το πρώτο να είναι ο φορέας psicoR χωρίς ένθεμα και το δεύτερο να είναι ο φορέας psicoR ο οποίος δεν υπέστη πέψη οπότε παρέμεινε κυκλικός και δεν έλαβε ένθεμα.

Οι συνθήκες για την συγκεκριμένη διαγνωστική PCR φαίνονται στον **Πίνακα 4**.

**Πίνακας 4:** Συνθήκες της Διαγνωστικής PCR για την εύρεση θετικών κλώνων.

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Χρονική Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	2 λεπτά
Αποδιάταξη	95 °C	20 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση εκκινητών	60 °C	10 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 °C	15 δευτερόλεπτα
Κύκλοι	25	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	2 λεπτά

Μετά την ολοκλήρωση της PCR, προστίθενται 10  $\mu$ l Loading Dye (6X) στα δείγματα της PCR ώστε αυτά να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Επιλέχθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2% καθώς ο ανασυνδυασμένος φορέας διαφέρει μόνο 50 βάσεις από τον μη-ανασυνδυασμένο φορέα οπότε χρειάζεται πυκνό πήκτωμα για τον καλό διαχωρισμό τους.

Μετά την εύρεση των θετικών κλώνων ακολουθεί ανακαλλιέργεια τους (3ml LB θρεπτικό με αμπικιλίνη) και απομόνωση του πλασμιδίου με NucleoSpin Plasmid mini kit for plasmid DNA της εταιρίας Macherey-Nagel.

### 5.2.7 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με την χρήση JetPrime

Μετά την κλωνοποίηση του shRNA, που θα στοχεύσει το GREAT4\_2, στον φορέα psicoR, θα ακολουθήσει η διαμόλυνση των MKN45 και NUGC4 καρκινικών σειρών με τον ανασυνδυασμένο φορέα με την βοήθεια λεντιϊών. Για την παρασκευή των λεντιϊών που θα φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο χρησιμοποιούνται αρχικά κύτταρα HEK. Η κυτταρική σειρά HEK μετασχηματίζεται με τα εξής τρία πλασμίδια ταυτόχρονα: α) τον ανασυνδυασμένο φορέα psicoR που φέρει το shRNA για την στόχευση του GREAT4\_2, β) το πλασμίδιο PAX2 που φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για το πακετάρισμα του ιού και γ) το πλασμίδιο PMD2G που φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του φακέλου του ιού. Ακολούθως, πραγματοποιείται συλλογή των κυττάρων και ακολουθεί RNA extraction για να πραγματοποιηθεί qPCR ώστε να αναδείξει την πραγματοποίηση ή μη της σίγησης.

### 5.2.8 Υποκυτταρική κλασμάτωση

Το πρωτόκολλο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης χρησιμοποιήθηκε για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των μεταγράφων του GREAT4\_2 lncRNA σε NUGC4 κύτταρα ενώ αντίστοιχα για MKN45 προϋπήρχαν δείγματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Συγκεκριμένα, από αυτή την πειραματική διαδικασία συλλέγονται 3 διαφορετικά κλάσματα. Το πρώτο κλάσμα είναι το **κυτταροπλασματικό** και αναφέρεται ως **S2** (υπερκείμενο 2), το δεύτερο κλάσμα είναι το **πυρηνοπλασματικό** και αναφέρεται ως **S3** (υπερκείμενο 3) και το τρίτο είναι το **χρωματινικό** και αναφέρεται ως **P3** (ίζημα 3).

Το πειραματικό πρωτόκολλο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης έχει τα εξής βήματα:

1. Αρχικά, από τα τρυβλία ανάπτυξης των NUGC4 κυττάρων απορρίπτεται το θρεπτικό ανάπτυξης και προστίθενται 5 ml PBS 4°C. Αφαιρείται το αρχικό PBS και προστίθενται εκ νέου άλλα 5 ml. Ύστερα, μέσω μίας ορολογικής πιπέτας το δείγμα μεταφέρεται από τα τρυβλία σε ένα falcon των 15ml.
2. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του δείγματος για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 1500 rpm.
3. Συλλέγεται το υπερκείμενο από το falcon και απορρίπτεται ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml Buffer A.

4. Ακολουθεί μηχανική ρήξη των κυττάρων για την διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης.
5. Το μείγμα από την μηχανική ρήξη των NUGC4 κυττάρων χωρίζεται σε 2 tubes τύπου erpendorf για να δημιουργηθούν δύο βιολογικές επαναλήψεις.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των 2 tubes για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 3000 rpm.
7. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλέγεται από κάθε tube και μεταβιβάζεται σε ένα άλλο tube και αποτελεί πλέον στο S2 (Supernatant 2) Bio1 και Bio2 αντίστοιχα. Στις δύο βιολογικές επαναλήψεις του S2 κλάσματος προστίθενται 900 µl TRI Reagent, MRC και αποθηκεύονται τελικά στους -20°C.
8. Στα tubes που είχε πραγματοποιηθεί η φυγοκέντρηση του **Βήματος 6** προστίθενται 500 µl Buffer A. Το υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση απορρίπτεται. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται ως «πλύση» για τον καλύτερο διαχωρισμό των κλασμάτων.
9. Στο ίζημα που υπάρχει στο tube και θα αποτελεί και το P3 υποκυτταρικό κλάσμα προστίθενται 200 µl NLB800 (η προστιθέμενη ποσότητα NLB800 πρέπει να είναι 10 με 20 φορές ο όγκος του ιζήματος).
10. Ακολουθεί ανάδευση με την πιπέτα για την επαναδιάλυση του ιζήματος στο NLB800.
11. Το δείγμα τοποθετείται σε κεφαλή μη σταθερής γωνίας και φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές, στους 4°C για μισή ώρα.
12. Έπεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm.
13. Το υπερκείμενο από την φυγοκέντρηση του **Βήματος 12** συλλέγεται και τοποθετείται σε νέα tubes. Στα δύο υπερκείμενα από τις δύο βιολογικές επαναλήψεις προστίθενται 900 µl TRI Reagent, MRC και αποθηκεύονται στους -20°C.
14. Το ίζημα που έμεινε μετά την φυγοκέντρηση (**Βήμα 12**) επαναδιαλύεται απευθείας σε 900 µl TRI, Reagent, MRC. Ακολουθεί vortex για την διάλυση του ιζήματος και τελικά αποθήκευση στους -20°C.

### 5.2.9 Απομόνωση RNA, κατεργασία με DNAάση και σύνθεση cDNA

#### Απομόνωση RNA

Για να πραγματοποιηθεί η απομόνωση RNA από τα κύτταρα προστίθεται, στα τρυβλία στα οποία αναπτύσσονται, 1ml TRI reagent, MRC. Αφού τα τρυβλία επωαστούν για περίπου 1 λεπτό με αυτόν τον παράγοντα, στην συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο των τρυβλίων

και προστίθεται σε erpendorf tubes. Τα δείγματα μεταφέρονται καθόλη τη διάρκεια μέσα σε πάγο. Έπειτα, σε κάθε δείγμα προστίθεται 200μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί vortex. Το χλωροφόρμιο συμβάλλει στην δημιουργία δύο διακριτών φάσεων, την υδατική και την οργανική. Μετά, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C και στα 13.000 rpm. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, συλλέγεται η υδατική φάση που περιέχει το RNA. Το επόμενο βήμα, συγκαταλέγεται ως βήμα καθαρισμού κατά το οποίο στα δείγματα προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλη και 1 μl γλυκογόνο. Χρειάζεται μία δεκάλεπτη επώαση στον πάγο και ύστερα ξανά φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται ώστε να προστεθούν 500 μl 70% παγωμένης αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4°C και στα 13.000 rpm. Ακολουθεί στέγνωμα του ιζήματος, δηλαδή απόρριψη υπερκείμενου, επαναδιάλυση του σε ddH<sub>2</sub>O, επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και τέλος αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

### **Κατεργασία με DNAάση**

Η κατεργασία με DNAάση πραγματοποιείται για την απομάκρυνση τυχόν υπολειπόμενου DNA. Συγκεκριμένα, η DNAάση θα αποικοδομήσει οποιοδήποτε υπόλειμμα DNA. Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον **Πίνακα 6** ενώ η αντίδραση χρειάζεται για την πραγματοποίησή της επώαση για 1 ώρα στους 37°C.

**Πίνακας 5:** Σύσταση αντίδρασης κατεργασίας με DNAάση.

<b>Σύσταση αντίδρασης κατεργασίας με DNAάση</b>	<b>Ποσότητες αντιδραστηρίων</b>
Δείγμα RNA	25 μl
DNAase (1u/ μl), Thermo	1 μl
Buffer 10X, Thermo	3 μl
RNAase out (40 u/ μl), Invitrogen	0,5 μl
ddH <sub>2</sub> O	0,5 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	30 μl

Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί προσθήκη 40 μl οξικού νατρίου 3M/pH 5.2, 330 μl ddH<sub>2</sub>O και 400 μl Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισομυλική (25:24:1) με επακόλουθη

φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm. Ύστερα, χρειάζεται η συλλογή της υπερκείμενης φάσης, προσθήκη σε αυτήν 1000 µl 100% παγωμένης αιθανόλης και τέλος επώαση στους -80°C για 1 ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας έπεται φυγοκέντρηση 30 λεπτών, στους 4°C, στα 13.000 rpm, απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη 70% παγωμένης αιθανόλης και ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4°C, στα 13.000 rpm. Τελικό στάδιο αυτής της διαδικασίας είναι το στέγνωμα του ιζήματος, δηλαδή απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη ddH<sub>2</sub>O, επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

### **Σύνθεση cDNA**

Στην αντίδραση της σύνθεσης του cDNA απαιτούνται 1000 ng RNA σε 10 µl όγκο. Στα 10 µl δείγματος RNA προστίθενται 1 µl Random hexamers (100 mM), Takara και 1 µl dNTPs (10 mM) και ακολουθεί επώαση στους 65°C για 5 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 7**, ακολουθεί επώαση 2 ωρών στους 37°C, προσθήκη 380 µl ddH<sub>2</sub>O και τελική αποθήκευση των cDNA δειγμάτων στους -20°C.

**Πίνακας 6:** Σύσταση αντίδρασης σύνθεσης cDNA.

<b>Σύσταση αντιδραστηρίων</b>	<b>Ποσότητες αντιδραστηρίων</b>
DTT 0.1 M (500 u/ µL), Invitrogen	2 µl
Buffer (First Run Buffer) 5X, Invitrogen	2 µl
M-MLV (200 u/ µL), Invitrogen	1 µl
RNAase out (40 u/ µL), Invitrogen	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	0,5 µl

### **5.2.10 qPCR**

Η qPCR (Real time quantitative PCR – qPCR), χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του GREAT4\_2 στις διάφορες κυτταρικές σειρές, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό, για την μεταγραφική του σταθερότητα καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των στόχων του GREAT4\_2. Επιπλέον, μετά την παροδική σίγηση χρησιμοποιήθηκε ξανά qPCR για την επιβεβαίωση της σίγησης. Η qPCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα της εταιρείας BioRad ενώ η ανάλυση των

αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα CFX Manager της BioRad και μέσω της χρήσης του Microsoft Excel. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH ή και το RPLP1. Τέλος, η σύσταση της qPCR φαίνεται στον **Πίνακα 8**.

**Πίνακας 7:** Σύσταση αντίδρασης qPCR.

Σύσταση qPCR	Ποσότητες αντιδραστηρίων
SYBR Mix, KAPA	10 $\mu$ l
Forward και Reverse primers (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
DDH <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l
Δείγμα	4 $\mu$ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	20 $\mu$ l

Οι συνθήκες της αντίδρασης της qPCR φαίνονται στον **Πίνακα 9**.

**Πίνακας 8:** Συνθήκες αντίδρασης qPCR.

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Χρονική Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	5 λεπτά
Αποδιάταξη	95	20 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση Εκκινητών	58	2 λεπτά
Επιμήκυνση	72	15 δευτερόλεπτα
Κύκλοι	45	

---

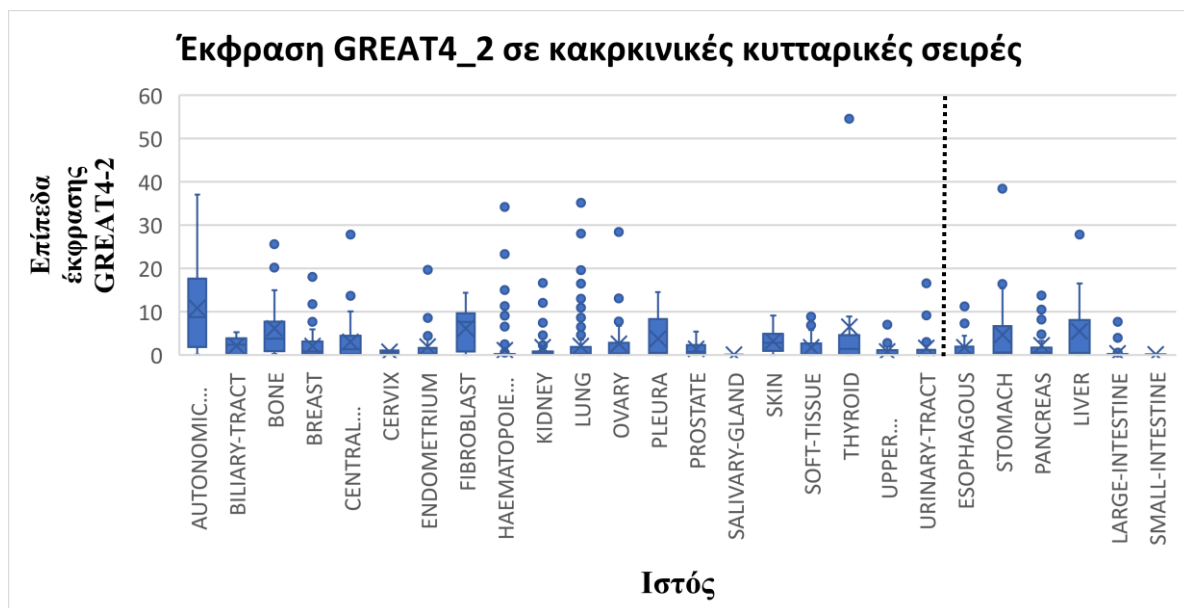
## ***6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ***

---

## 6.1 Ανάλυση RNA-seq δεδομένων

### 6.1.1 Πρότυπο έκφρασης GREAT4\_2

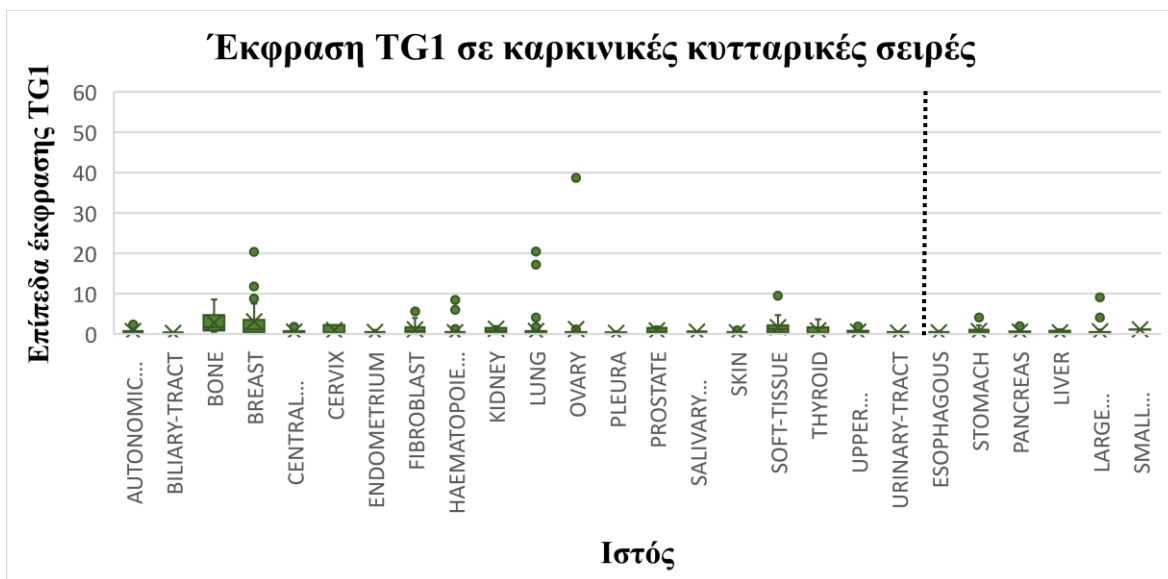
Αρχικά, για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα RNA προερχόμενα είτε από κυτταρικές σειρές διαφορετικών τύπων καρκίνου είτε από καρκινικές και παρακαρκινικές βιοψίες ασθενών. Το πρώτο βήμα ήταν να αναλυθεί η έκφραση του GREAT4\_2 και των γονιδίων στόχων του TG1 και TG2 (Target Gene 1 και 2) σε καρκινικές σειρές διαφορετικών ιστών του ανθρώπου. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 11**, το υπό μελέτη lncRNA έχει μία υψηλότερη έκφραση στα αυτόνομα γάγγλια, τους ινοβλάστες και τα πλευρά. Όσον αφορά το γαστρεντερικό σύστημα, παρατηρείται ότι το GREAT4\_2 εκφράζεται παραπάνω στο στομάχι και το συκώτι σε σχέση με τους άλλους ιστούς αυτού του συστήματος.



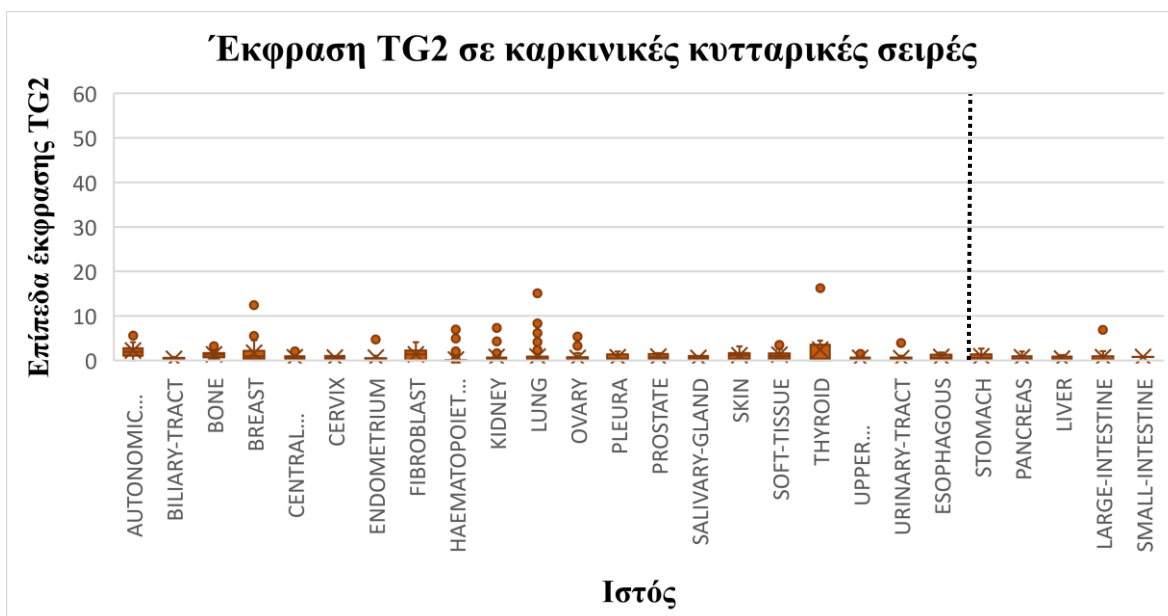
**Εικόνα 11:** Θηκόγραμμα (Box Plots) έκφρασης του GREAT4\_2 σε καρκινικές σειρές διαφορετικών ιστών.

### 6.1.2 Πρότυπο έκφρασης Target Gene 1 και Target Gene 2 (TG1 και TG2)

Στις **Εικόνες 12** και **13** φαίνεται το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων TG1 και TG2 αντίστοιχα, στους διαφορετικούς ιστούς. Συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά παρουσιάζουν πολύ χαμηλή έκφραση στις διαφορετικές καρκινικές σειρές των ιστών του ανθρώπου.



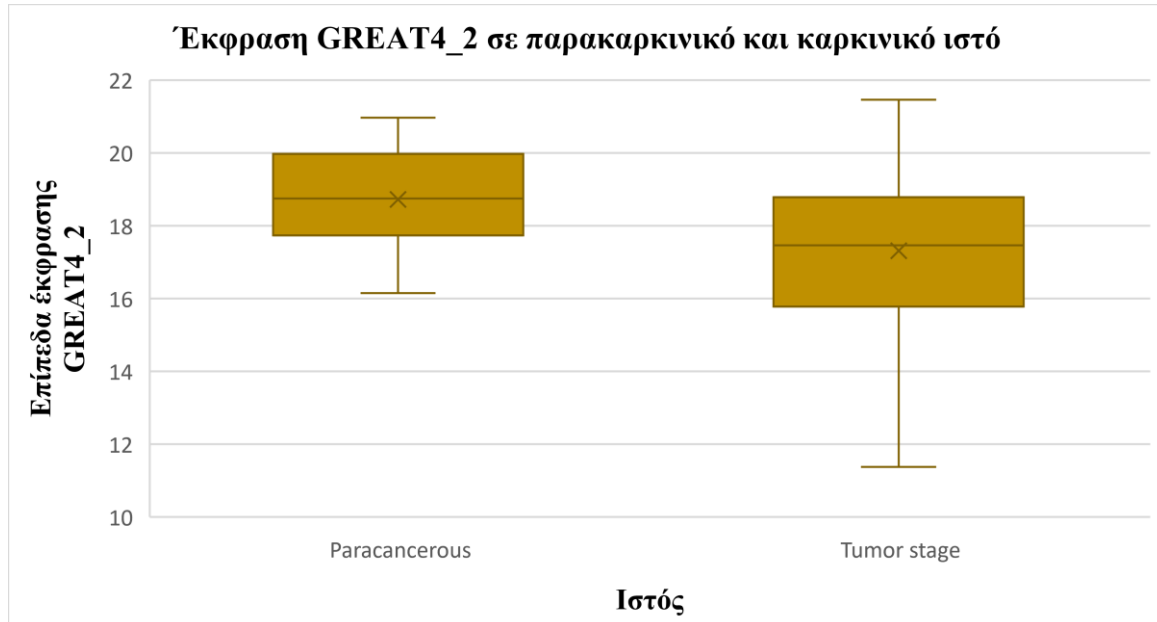
**Εικόνα 12:** Θηκόγραμμα (Box Plots) έκφρασης του γονιδίου TG1.



**Εικόνα 13:** Θηκόγραμμα (Box Plots) έκφρασης του γονιδίου TG2.

### 6.1.3 Πρότυπο έκφρασης GREAT4\_2 σε καρκινικό και παρακαρκινικό ιστό

Τα RNAseq δεδομένα προσέφεραν την δυνατότητα σύγκρισης της έκφρασης του Great4\_2 σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 14*, το lncRNA εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στον παρακαρκινικό ιστό σε σχέση με τον καρκινικό.



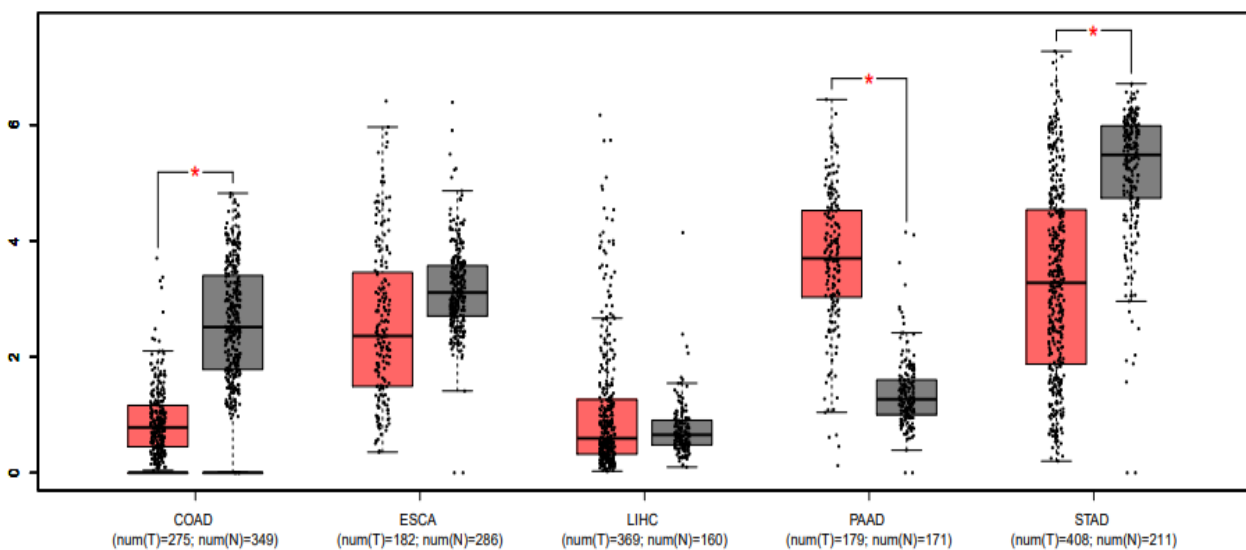
**Εικόνα 14:** Διάγραμμα έκφρασης του GREAT4\_2 σε παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό. Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με την αξιοποίηση RNAseq δεδομένων.

### Ανάλυση έκφρασης του lncRNA στην σελίδα GEPIA

#### 6.1.4 Πρότυπο έκφρασης GREAT4\_2 σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος

Εκτός από τα RNAseq δεδομένα, αξιοποιήθηκε και η σελίδα GEPIA για την διερεύνηση της έκφρασης του GREAT4\_2 σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς. Η σελίδα αυτή, που αντλεί δεδομένα από την βάση δεδομένων TCGA, αξιοποιήθηκε για την μελέτη της έκφρασης του GREAT4\_2 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς του γαστρεντερικού συστήματος. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης αυτής φαίνονται στην *Εικόνα 15*. Οι συντομογραφίες της *Εικόνας 15* αντιστοιχούν στους εξής τύπους καρκίνου: α) **COAD**: Colon adenocarcinoma, β) **ESCA**: Esophageal carcinoma, γ) **LIHC**: Liver hepatocellular carcinoma, δ) **PAAD**: Pancreatic adenocarcinoma, και ε) **STAD**: Stomach adenocarcinoma. Παρατηρούμε ότι επικρατεί ένα κοινό μοτίβο όπου το GREAT4\_2 εκφράζεται υψηλότερα σε φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με τους αντίστοιχους

παθολογικούς. Εξαίρεση αποτελούν το ήπαρ και το πάγκρεας όπου το GREAT4\_2 υπερεκφράζεται στους καρκινικούς ιστούς. Τέλος, στο στομάχι, φαίνεται το υπό μελέτη lncRNA να εκφράζεται υψηλότερα στον φυσιολογικό ιστό. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης αυτής αντιστοιχούν σε Pvalue μικρότερο του 0,01. Το αποτέλεσμα που προκύπτει από την ανάλυση στην σελίδα GEPIA συμβαδίζει με το αποτέλεσμα της **Εικόνας 14** από την ανάλυση των RNAseq δεδομένων που αναδεικνύουν υψηλότερη έκφραση του GREAT4\_2 στον παρακαρκινικό ιστό σε σχέση με τον καρκινικό.



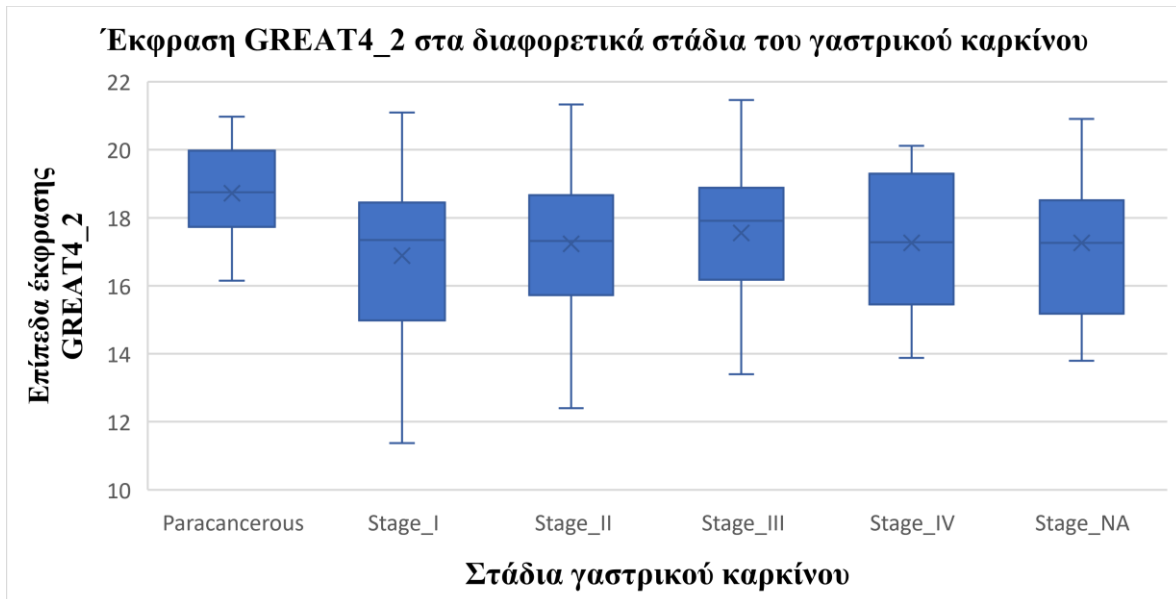
**Εικόνα 15:** Αποτελέσματα της αναζήτησης της έκφρασης του GREAT4\_2 σε ιστούς του γαστρεντερικού συστήματος στην σελίδα GEPIA. Το ροζ αντιστοιχεί σε καρκινικό ιστό ενώ το γκρι σε φυσιολογικό.

### 6.1.5 Ανάλυση έκφρασης του lncRNA στα διαφορετικά στάδια του γαστρικού καρκίνου

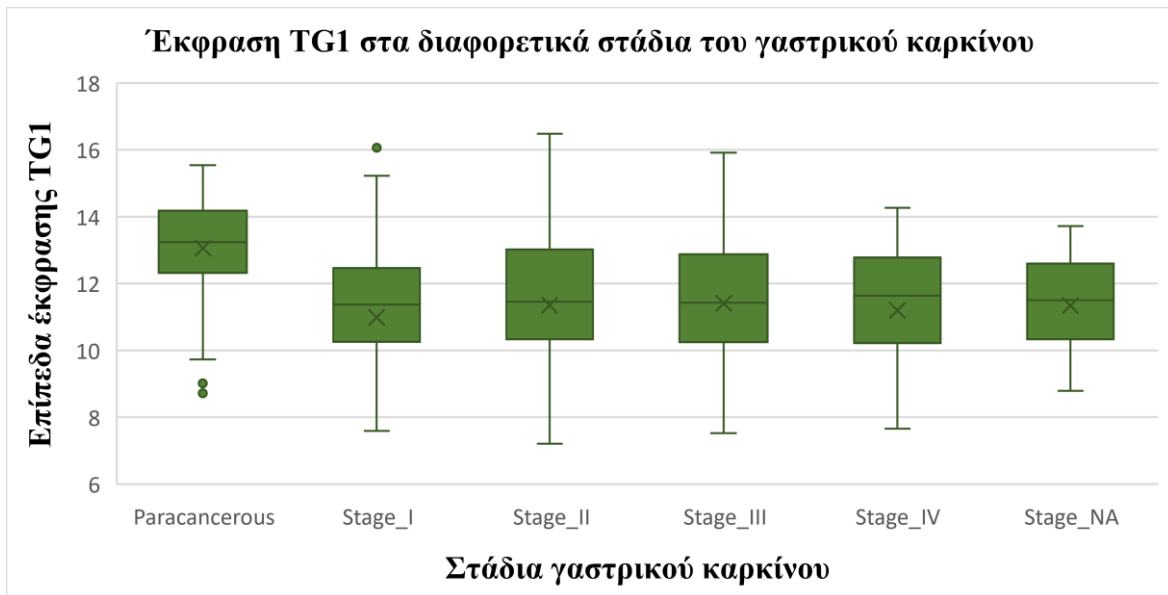
Αφού εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης του GREAT4\_2 μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού, στην συνέχεια αναλύθηκε η έκφραση τόσο του GREAT4\_2 όσο και των γονιδίων στόχων του στα διαφορετικά στάδια του γαστρικού καρκίνου. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ένα κοινό πρότυπο στην έκφραση και των τριών γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών σταδίων. Στην **Εικόνα 16**, φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του GREAT4\_2. Φαίνεται να υπάρχει μία μικρή διαφορά στην έκφραση του lncRNA μεταξύ του φυσιολογικού ιστού και των υπόλοιπων σταδίων του γαστρικού καρκίνου. Συγκεκριμένα, στον παρακαρκινικό ιστό φαίνεται να υπάρχει μία υψηλότερη έκφραση του GREAT4\_2. Στα υπόλοιπα στάδια η έκφραση παραμένει σε παρόμοια επίπεδα με μικρές διακυμάνσεις. Τα επίπεδα έκφρασης των TG1 και TG2 φαίνεται να ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο με το GREAT4\_2. Συγκεκριμένα, στις **Εικόνες 17 και 18** φαίνεται ότι το TG1 και το TG2,

αντίστοιχα, εκφράζονται περισσότερο στον παρακαρκινικό ιστό όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του GREAT4\_2.

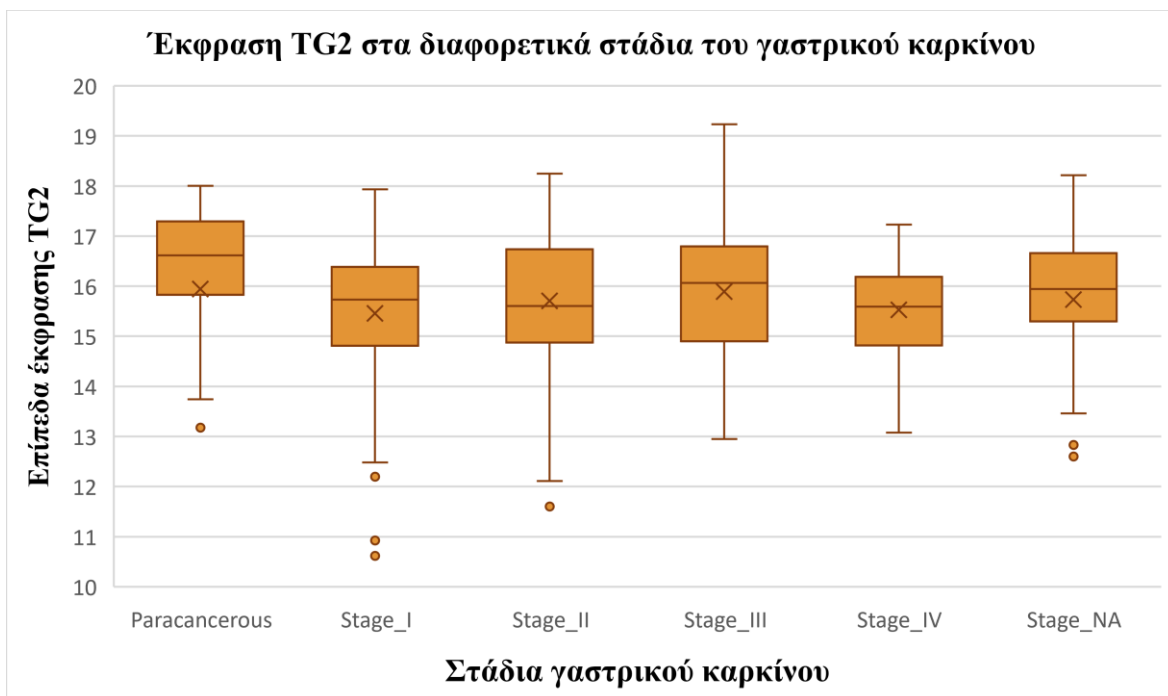
Η ανάλυση αυτή επιβεβαιώνει τις προηγούμενες αναλύσεις, οι οποίες υποδηλώνουν πιθανώς μία ογκοκασταλτική δράση του GREAT4\_2 στον γαστρικό καρκίνο εφόσον φαίνεται να εκφράζεται περισσότερο στον φυσιολογικό ιστό σε σχέση με τον καρκινικό.



**Εικόνα 16:** Box Plots του προτύπου έκφρασης του GREAT4\_2 σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό του στομάχου από ασθενείς στα διάφορα στάδια εξέλιξης της νόσου. Τα στάδια διακρίνονται από I έως IV ενώ στο στάδιο NA συμπεριλαμβάνονται όγκοι απροσιδόριστου σταδίου.



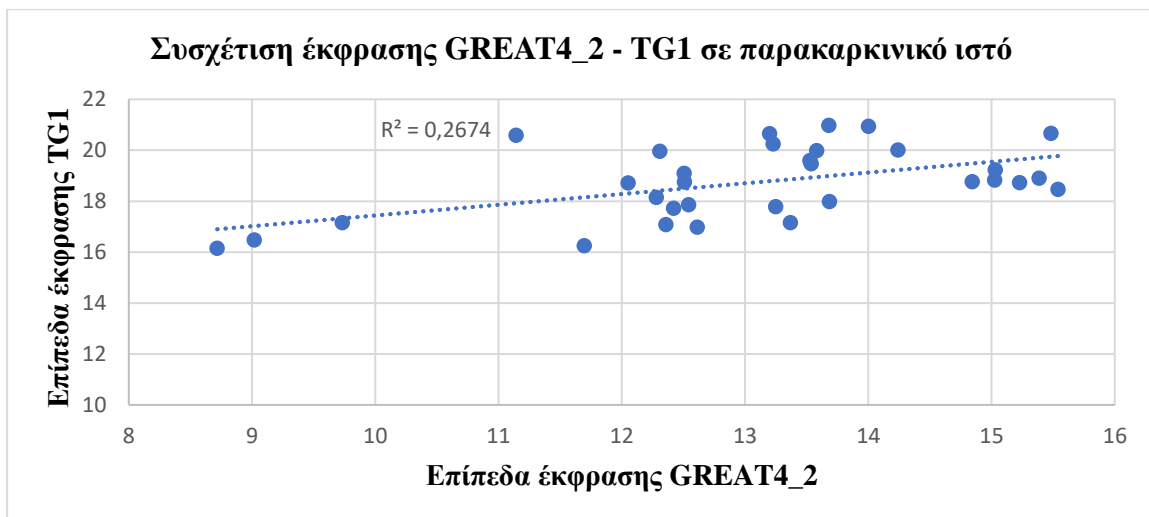
**Εικόνα 17:** Box Plots του προτύπου έκφρασης του TG1 σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό του στομάχου από ασθενείς στα διάφορα στάδια εξέλιξης της νόσου. Τα στάδια διακρίνονται από I έως IV ενώ στο στάδιο NA συμπεριλαμβάνονται όγκοι απροσδιόριστου σταδίου.



**Εικόνα 18:** Box Plots του προτύπου έκφρασης του TG2 σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό του στομάχου από ασθενείς στα διάφορα στάδια εξέλιξης της νόσου. Τα στάδια διακρίνονται από I έως IV ενώ στο στάδιο NA συμπεριλαμβάνονται όγκοι απροσδιόριστου σταδίου.

### 6.1.6 Ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των τριών γονιδίων

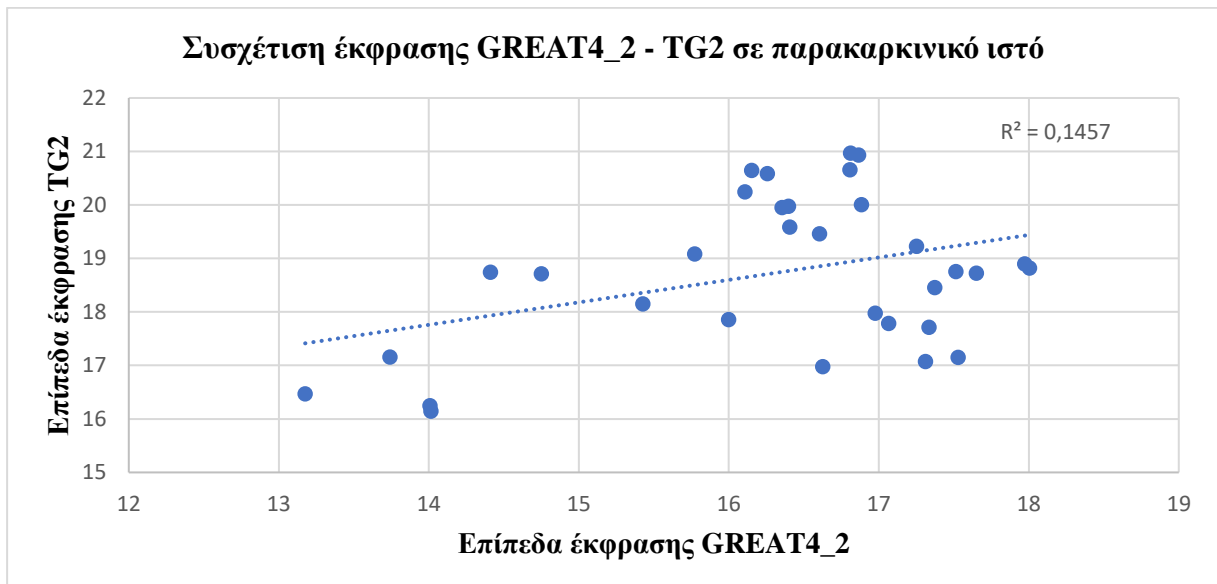
Μετά την ολοκλήρωση των αναλύσεων των προτύπων έκφρασης των τριών γονιδίων, ακολούθησαν διαγράμματα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης του lncRNA με τα υποψήφια γονίδια στόχους του με δεδομένα τόσο από φυσιολογικούς ιστούς όσο και από βιοψίες από ασθενείς με καρκίνο του στομάχου (αξιοποίηση RNAseq δεδομένων). Παρατηρείται σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των προτύπων έκφρασης του GREAT4\_2 και των γονιδίων στόχων. Η μεγαλύτερη θετική συσχέτιση παρατηρείται στην **Εικόνα 22** μεταξύ του GREAT4\_2 και του TG2 σε καρκινικό ιστό. Από τα τέσσερα διαγράμματα συσχέτισης παρατηρείται ότι το lncRNA παρουσιάζει μεγαλύτερη θετική συσχέτιση με το γονίδια στόχους του στις καρκινικές βιοψίες σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς.



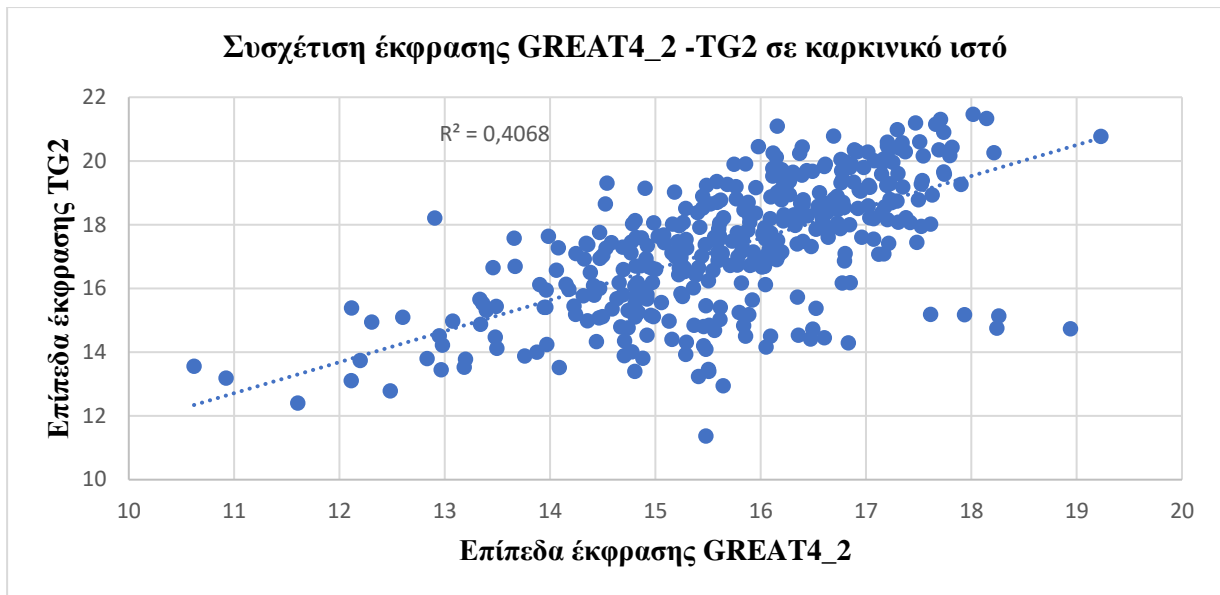
**Εικόνα 19:** Διάγραμμα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των GREAT4\_2 και TG1 σε φυσιολογικό ιστό.



**Εικόνα 20:** Διάγραμμα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των GREAT4\_2 και TG2 σε βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο στα διαφορετικά στάδια της νόσου.



**Εικόνα 21:** Διάγραμμα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των GREAT4\_2 και TG2 σε φυσιολογικό ιστό.



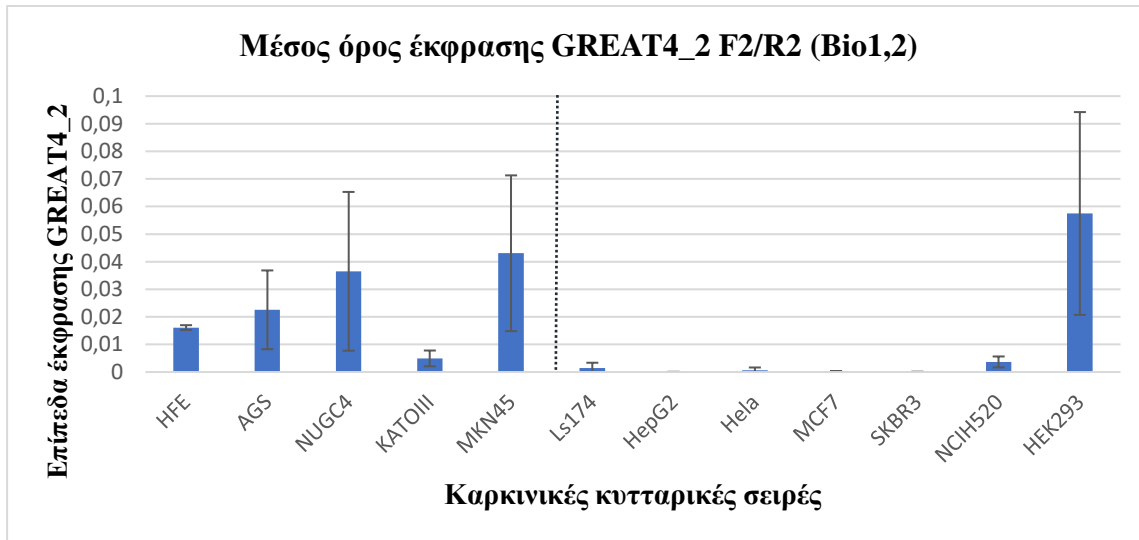
**Εικόνα 22:** Διάγραμμα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των GREAT4\_2 και TG2 σε βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο στα διαφορετικά στάδια της νόσου.

Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων παρείχαν μία πρώτη εικόνα για την έκφραση του GREAT4\_2 σε διάφορους ιστούς, με ιδιαίτερη προσοχή να δίνεται στους ιστούς του γαστρεντερικού συστήματος, στα διαφορετικά στάδια της νόσου ενώ εξετάστηκε και η συσχέτιση της έκφρασης του με την έκφραση των υπόλοιπων δύο γονιδίων. Επόμενο, βήμα είναι η προσπάθεια χαρακτηρισμού της έκφρασης αυτού του lncRNA.

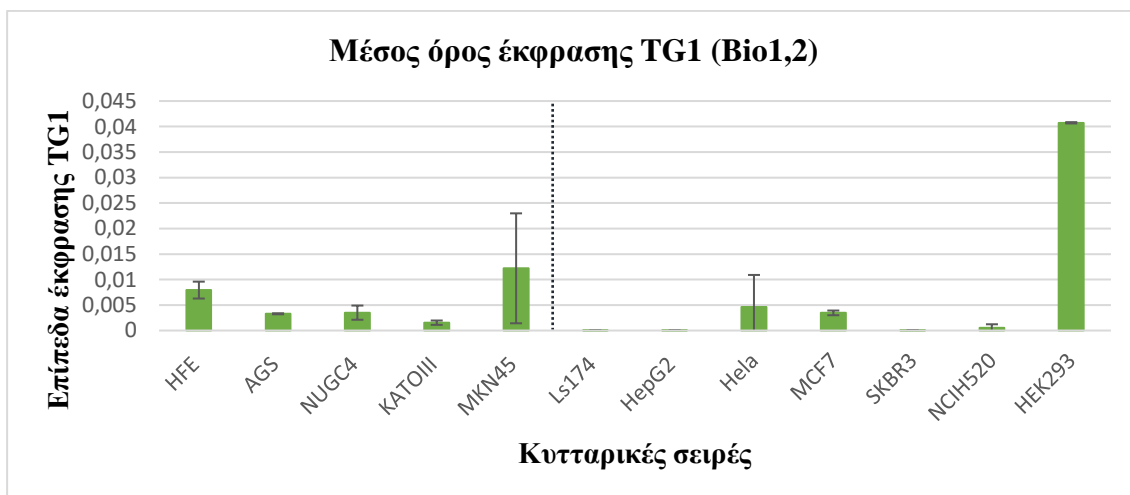
## 6.2 Ανάλυση της έκφρασης του lncRNA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές με RT-qPCR

Ακολούθησαν διαδοχικές qPCR για να προσδιοριστεί η έκφραση των τριών γονιδίων σε δώδεκα διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Χρησιμοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις για κάθε κυτταρική σειρά. Το GREAT4\_2 όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της **Εικόνας 23**, εκφράζεται περισσότερο στην κυτταρική σειρά **MKN45**. Επιπλέον, το lncRNA φαίνεται να εμφανίζει υψηλότερη έκφραση σε γαστρικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με κυτταρικές σειρές άλλων ιστών. Το TG1 φαίνεται να ακολουθεί ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με αυτό του lncRNA (**Εικόνα 24**) ενώ το TG2 διαφοροποιείται ελαφρώς (**Εικόνα 25**). Συμπερασματικά, από τα παραπάνω προκύπτει μέγιστη έκφραση του lncRNA ενδιαφέροντος στις γαστρικές καρκινικές σειρές NUGC4 και MKN45, πρότυπο που σε γενικές γραμμές είναι κοινό και με τα υποψήφια γονίδια στόχους. Επιπλέον, από τα πειράματα qPCR, φάνηκε η έκφραση του GREAT4\_2 να είναι σχετικά

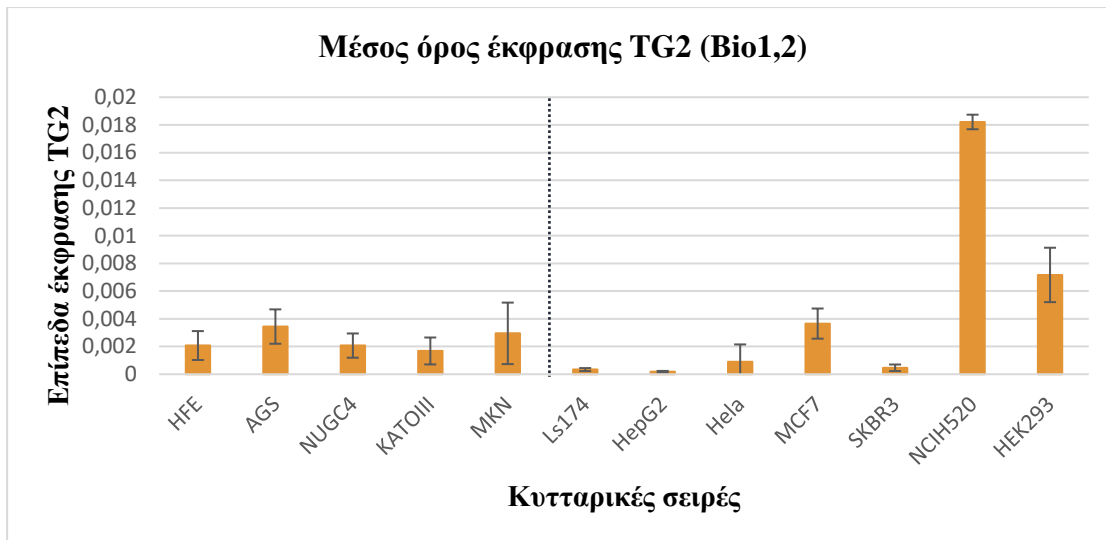
πιο υψηλή στις γαστρικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με τις υπόλοιπες, αναδεικνύοντας έτσι την πιθανότητα εξειδίκευσης του συγκεκριμένου lncRNA.



**Εικόνα 23:** Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του GREAT4\_2 στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.



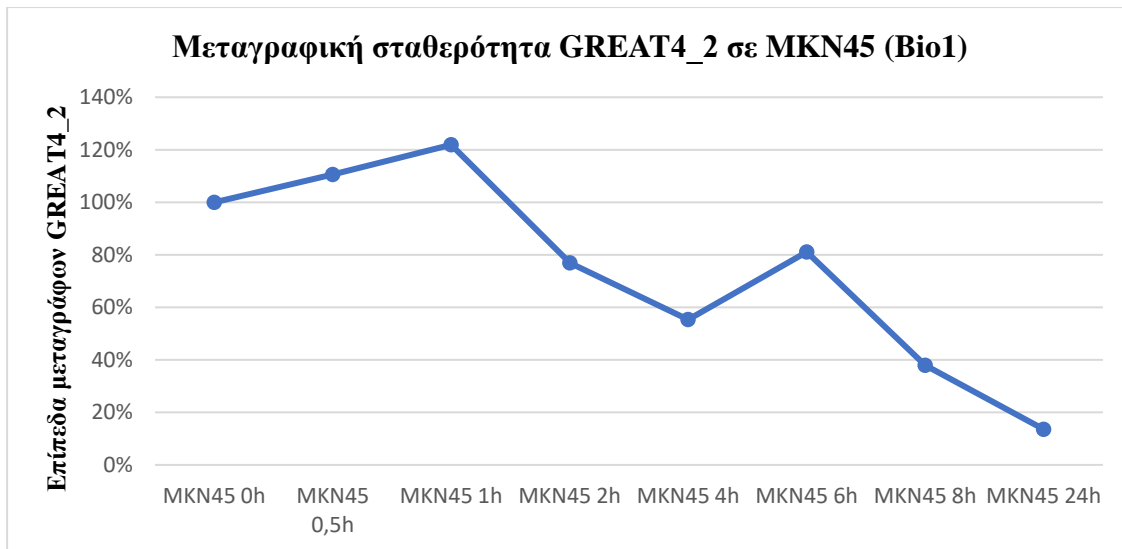
**Εικόνα 24:** Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του TG1 στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.



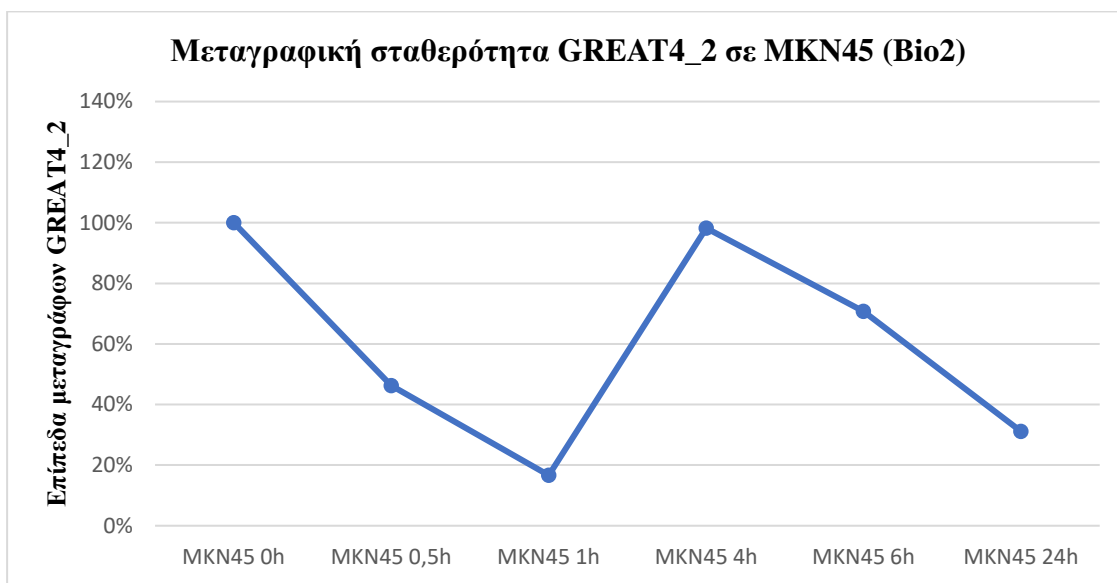
**Εικόνα 25:** Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του TG2 στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.

### 6.3 Ανάλυση της μετα-μεταγραφικής σταθερότητας του lncRNA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές με RT-qPCR

Αφού ελέγχθηκε η έκφραση του υποψήφιου lncRNA σε μια συλλογή καρκινικών κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε qPCR για να διαπιστωθεί η μετα-μεταγραφική σταθερότητα του μεταγράφου GREAT4\_2 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα στα οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα. Χρησιμοποιήθηκαν οι δύο βιολογικές επαναλήψεις της κυτταρικής σειράς MKN45, στην οποία προηγουμένως είχε διαπιστωθεί ότι το GREAT4\_2 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα. Στην πρώτη βιολογική επανάληψη φαίνεται ότι τα επίπεδα των μεταγράφων του GREAT4\_2 αρχίζουν να μειώνονται μετά την πάροδο της μίας ώρας ενώ στις τέσσερις ώρες η ποσότητα των μεταγράφων έχει μειωθεί σχεδόν κατά 50%. Στην δεύτερη βιολογική επανάληψη, τα επίπεδα των μεταγράφων στην μία ώρα έχουν μειωθεί ήδη αρκετά ενώ στις τέσσερις ώρες παρατηρείται μία αύξηση στα επίπεδα των μεταγράφων και ύστερα μία εκ νέου μείωση τους, που μπορεί να αντιστοιχεί και σε πειραματικό «θόρυβο», όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 27**. Συμπερασματικά, παρόλο που τα αποτελέσματα των δύο βιολογικών επαναλήψεων δεν συμπίπτουν, προσφέρουν μία αρχική εκτίμηση σχετικά με την μετα-μεταγραφική σταθερότητα του GREAT4\_2. Συγκεκριμένα, από την πρώτη βιολογική επανάληψη προκύπτει ότι ο χρόνος ημιζωής του GREAT4\_2 είναι περίπου τέσσερις ώρες ενώ η δεύτερη βιολογική επανάληψη παραπέμπει στην μία ώρα.



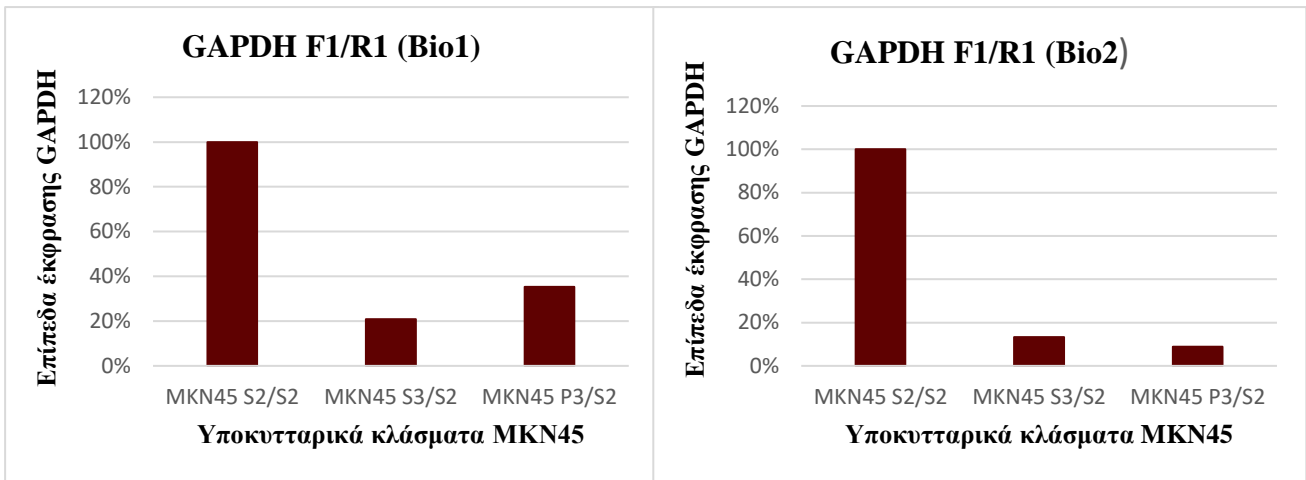
**Εικόνα 26:** Διάγραμμα απεικόνισης της σταθερότητας των μεταγράφων του GREAT4\_2 στην κυτταρική σειρά MKN45.



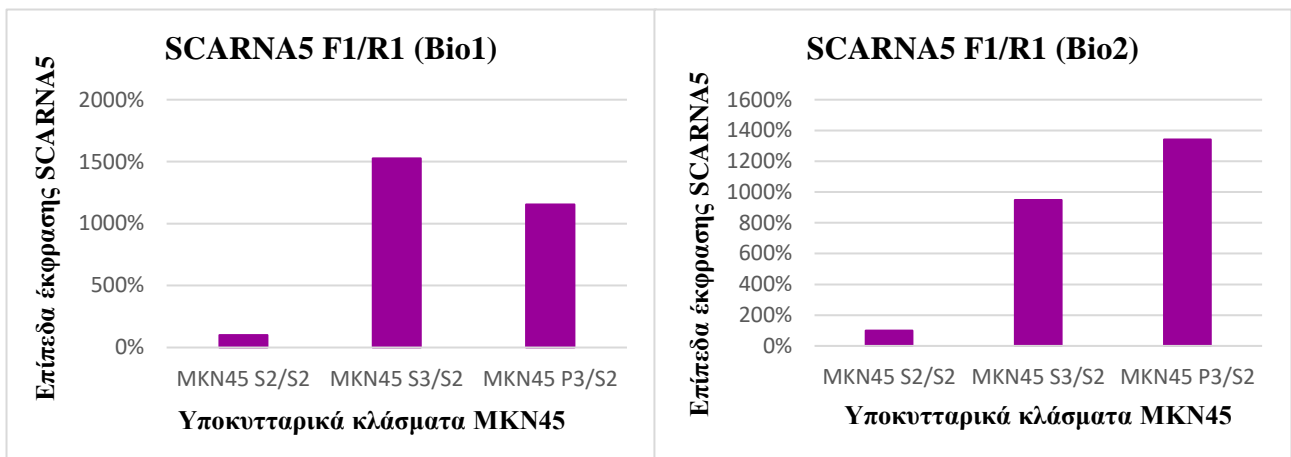
**Εικόνα 27:** Διάγραμμα απεικόνισης της μεταγραφικής σταθερότητας του GREAT4\_2 στην κυτταρική σειρά MKN45.

#### 6.4 Ανάλυση της υποκυτταρικής διαμερισματοποίησης των μεταγράφων του GREAT4\_2

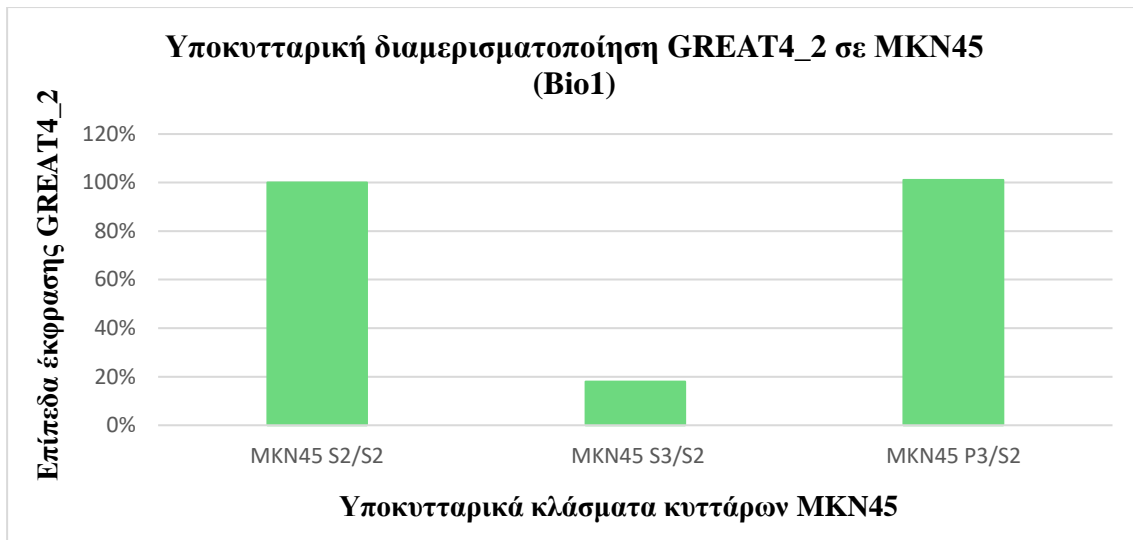
Επόμενος πειραματικός στόχος ήταν ο προσδιορισμός του υποκυτταρικού εντοπισμού του GREAT4\_2 στην κυτταρική σειρά MKN45, στην οποία δείχθηκε προηγουμένως ότι το GREAT4\_2 εμφανίζει μέγιστη έκφραση. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν ότι το υπό μελέτη lncRNA εντοπίζεται και στις δύο επαναλήψεις στο κυτταροπλασματικό κλάσμα ενώ στην πρώτη βιολογική επανάληψη εντοπίζεται και στην χρωματίνη (**Εικόνα 30**). Η υποκυτταρική κλασμάτωση πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα NUGC4 (τα δεύτερα σε σειρά κύτταρα με υψηλή έκφραση του GREAT4\_2) για επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Παρόλα αυτά, δεν επιτεύχθηκε επιτυχής διαχωρισμός των υποκυτταρικών κλασμάτων ώστε να προσδιοριστεί η θέση του lncRNA. Η διαπίστωση αυτή έγινε με την βοήθεια των θετικών μαρτύρων. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν το GAPDH και το SCARNA5. Το GAPDH βρίσκεται ως επί το πλείστον στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 28**) ενώ το SCARNA5 αποτελεί ένα χρωματινικό lncRNA (**Εικόνα 29**). Επομένως, μία επιτυχημένη υποκυτταρική κλασμάτωση θα έπρεπε να συνάδει με τον αντίστοιχο εντοπισμό αυτών των δύο μορίων κάτι το οποίο δεν ήταν εφικτό για τα NUGC4 λόγω επιμόλυνσης κατά την απομόνωση RNA. Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα των MKN45 προκύπτει ότι το GREAT4\_2 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ παράλληλα υπάρχει το ενδεχόμενο εντοπισμού του και στην χρωματίνη.



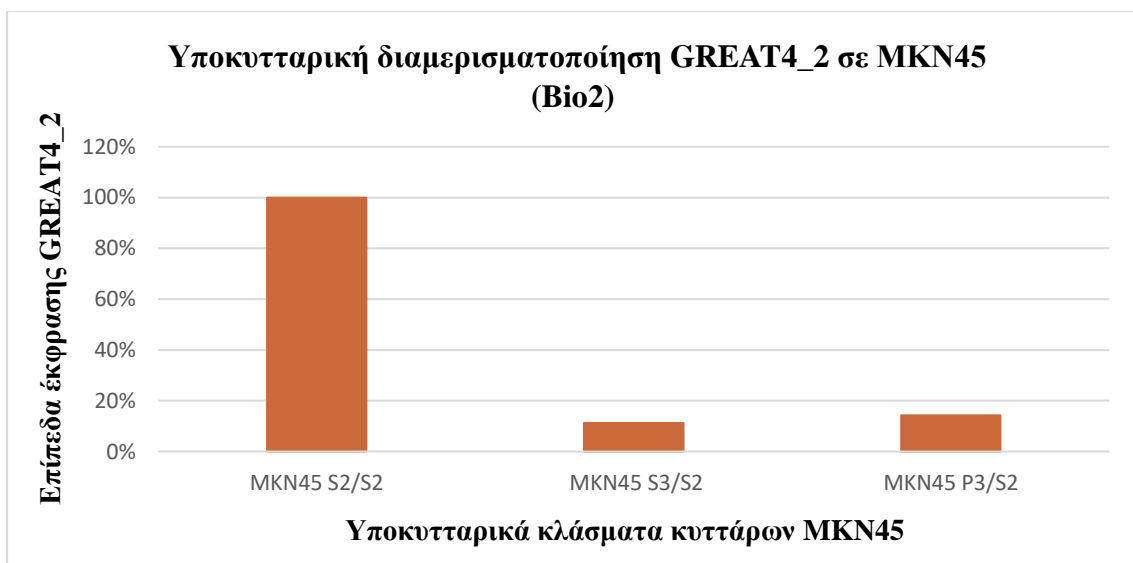
**Εικόνα 28:** Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του GAPDH στις δύο βιολογικές επαναλήψεις της MKN45 κυτταρικής σειράς.



**Εικόνα 29:** Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του SCARNA5 στις δύο βιολογικές επαναλήψεις της MKN45 κυτταρικής σειράς.



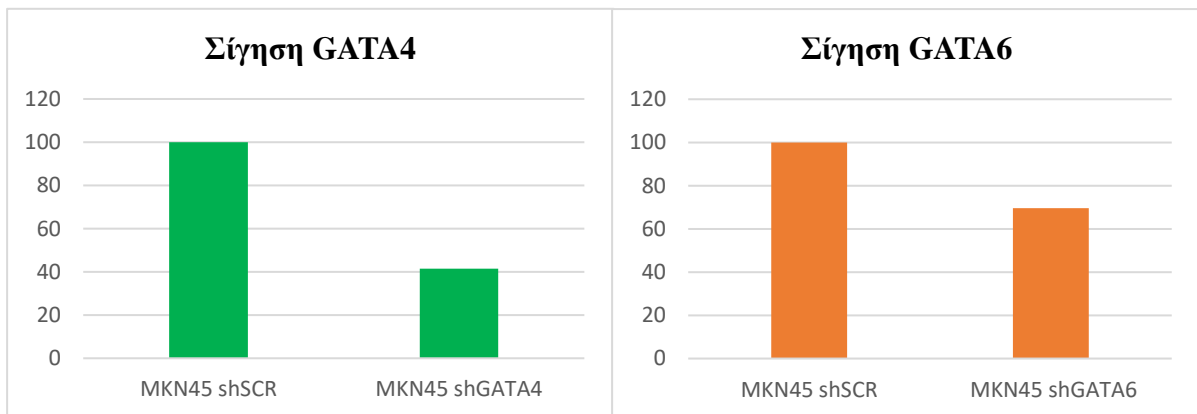
**Εικόνα 30:** Διάγραμμα υποκυτταρικού εντοπισμού του GREAT4\_2 στην πρώτη βιολογική επανάληψη MKN45.



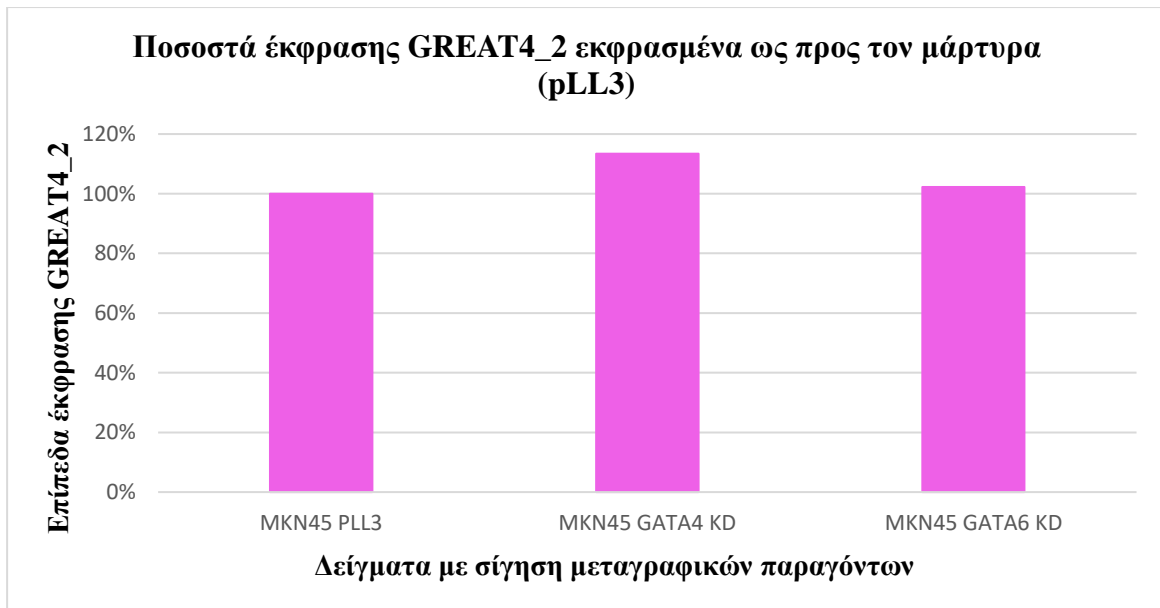
**Εικόνα 31:** Διάγραμμα υποκυτταρικού εντοπισμού του GREAT4\_2 στην δεύτερη βιολογική επανάληψη MKN45.

## 6.5 Ανάλυση της ρύθμισης της έκφρασης του lncRNA από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και GATA6

Μετά τον χαρακτηρισμό της έκφρασης, της σταθερότητας και του εντοπισμού του GREAT4\_2, επόμενος πειραματικός στόχος ήταν να προσδιοριστεί η ενδεχόμενη ρύθμιση του lncRNA από μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο GATA4 και ο GATA6. Για τον σκοπό αυτό, μελετήθηκε η έκφραση του GREAT4\_2 σε κυτταρικές σειρές όπου είχε προηγηθεί είτε σίγηση είτε υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων που πιθανώς επηρεάζουν την ρύθμιση του lncRNA. Συγκεκριμένα, στο εργαστήριο είχε προηγηθεί η σίγηση των GATA4 και GATA6 στην κυτταρική σειρά MKN45, όπου και εκφράζεται περισσότερο το GREAT4\_2. Στα κύτταρα MKN45 επιτεύχθηκε περίπου 60% σίγηση του GATA4 ενώ για το GATA6 υπήρξε σίγηση της τάξης περίπου του 40%. Στα κύτταρα αυτά ελέγχθηκε η έκφραση του GREAT4\_2, μέσω qPCR, η οποία δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την σίγηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων (**Εικόνα 32**).

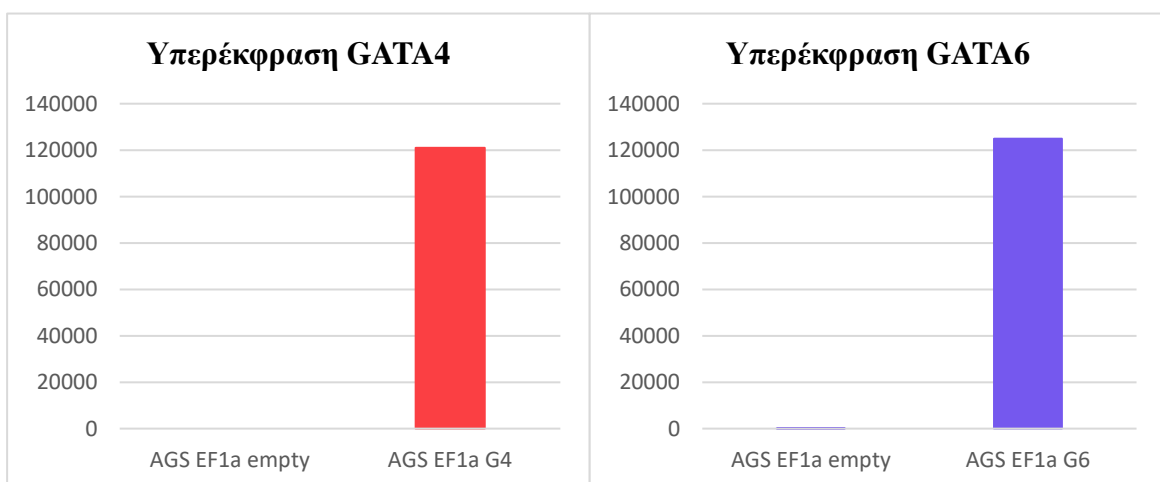


**Εικόνα 31:** Σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 στην κυτταρική σειρά MKN45. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με RFLP1.



**Εικόνα 32:** Διάγραμμα έκφρασης του GREAT4\_2 σε κύτταρα MKN45 με σίγηση των GATA4 και GATA6. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.

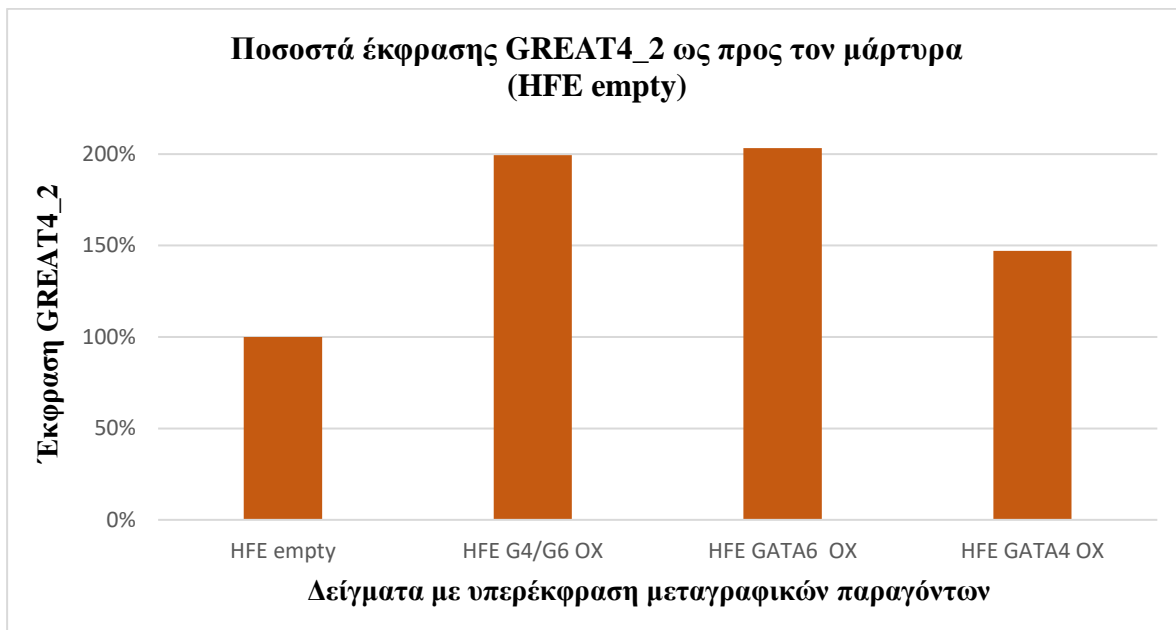
Η ίδια διαδικασία, για τον έλεγχο της ρύθμισης της έκφρασης του GREAT4\_2 από τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα AGS με υπερέκφραση των GATA4, GATA6. Μέσω qPCR φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα αυτά δεν αυξήθηκαν σημαντικά (**Εικόνα 34**). Ωστόσο, σε κύτταρα HFE με υπερέκφραση του GATA6 και του συνδυασμού των GATA4/GATA6 παρατηρήθηκε διπλάσια έκφραση του GREAT4\_2 (**Εικόνα 35**).



**Εικόνα 33:** Υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 σε κύτταρα AGS. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.



**Εικόνα 34:** Διάγραμμα έκφρασης του GREAT4\_2 σε κύτταρα AGS με υπερέκφραση των GATA4 και GATA6. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.

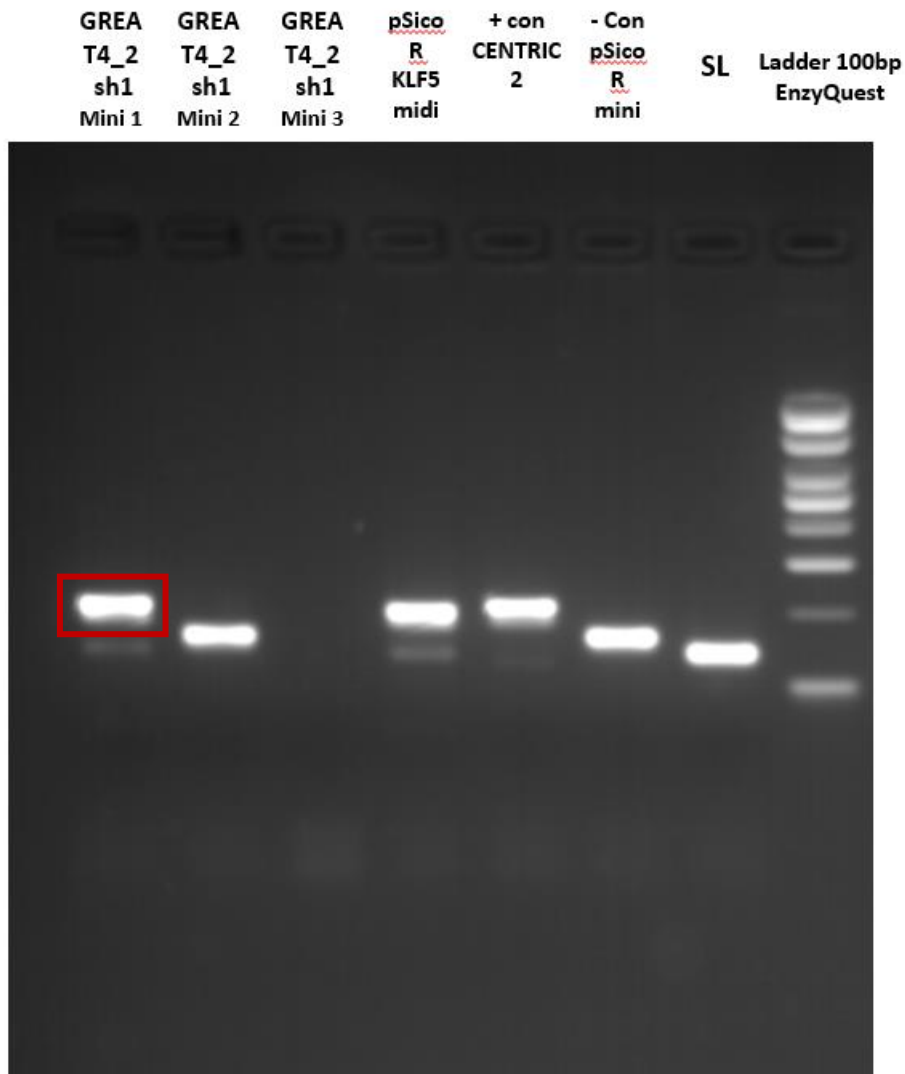


**Εικόνα 35:** Διάγραμμα έκφρασης του GREAT4\_2 σε κύτταρα HFE με υπερέκφραση των GATA4, GATA6 και συνδυασμό αυτών. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με RFLP1.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τόσο η σίγηση των GATA4 και GATA6 στην κυτταρική σειρά MKN45 όσο και η υπερέκφραση τους στην κυτταρική σειρά AGS, δεν επηρέασε την έκφραση του GREAT4\_2. Παρόλα αυτά, η υπερέκφραση των GATA4/GATA6 και μεμονωμένα του GATA6 στην κυτταρική σειρά HFE οδήγησε σε διπλάσια έκφραση του lncRNA, υποδεικνύοντας έτσι μία ρύθμιση του GREAT4\_2 από τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

## 6.6 Κλωνοποίηση shRNA για την στόχευση και παροδική σίγηση του lncRNA

Μετά την προσπάθεια χαρακτηρισμού της έκφρασης του lncRNA αλλά και της πιθανής ρύθμισης του από υποψήφιους μεταγραφικούς παράγοντες, επόμενος πειραματικός στόχος ήταν να μελετηθεί η σχέση των τριών γονιδίων, να εξεταστεί δηλαδή, η πιθανότητα τα TG1 και TG2 γονίδια να αποτελούν στόχους του GREAT4\_2. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση shRNA που στόχευε το GREAT4\_2 σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Μετά την κλωνοποίηση, ακολούθησε διαγνωστική PCR για την εύρεση του θετικού κλώνου (οι διαδικασίες αυτές περιγράφονται στις *Μεθόδους*). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε τζελ αγαρόζης όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 36*, όπου σε κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που απομονώθηκε. Τα δείγματα pSicoR KLF5 midi και + con CENTRIC2 αποτελούν τους θετικούς μάρτυρες του πειράματος ενώ τα δείγματα – con pSicoR mini και SL είναι οι αρνητικοί μάρτυρες (*Υλικά και Μέθοδοι*). Συμπερασματικά, από την *Εικόνα 36* προκύπτει επιτυχής ένθεση του shRNA ενθέματος έναντι του lncRNA στόχου, αφού παρατηρείται, στην πρώτη στήλη του τζελ αγαρόζης, μία ζώνη με ίδιο μοριακό μέγεθος με τον θετικό μάρτυρα pSicoR KLF5 midi, ο οποίος είναι πλασμιδιακός φορέας που περιέχει διαφορετικό ένθεμα ίδιου όμως μεγέθους με το shRNA ενδιαφέροντος. Παράλληλα η ζώνη αυτή βρίσκεται πιο πάνω στο τζελ αγαρόζης από τους αρνητικούς μάρτυρες που είναι ουσιαστικά πλασμιδιακοί φορείς χωρίς ένθεμα (*Υλικά και Μέθοδοι*) υποδεικνύοντας ότι το δείγμα που ηλεκτροφορήθηκε στην πρώτη στήλη του τζελ αγαρόζης έχει μεγαλύτερο μοριακό μέγεθος εξαιτίας της ένθεσης του shRNA.



**Εικόνα 36:** Απεικόνιση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR που ηλεκτροφορήθηκαν σε τζελ αγαρόζης. Σε κόκκινο πλαίσιο φαίνεται ο ανασυνδυασμένος φορέας που φέρει το ένθεμα του shRNA που στοχεύει το GREAT4\_2.

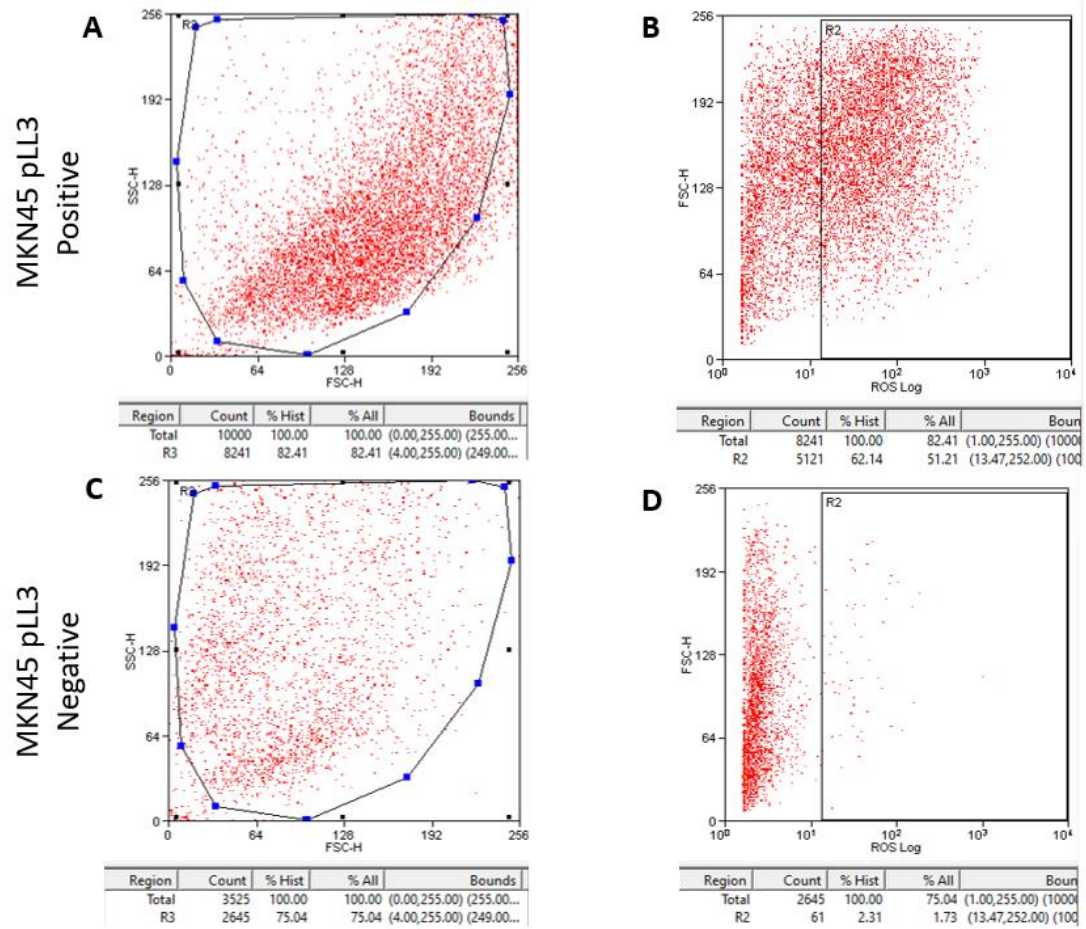
### 6.7 Ανάλυση της απόδοσης μετασχηματισμού των κυττάρων MKN45 και NUGC4 μέσω κυτταρομετρίας ροής

Προτού πραγματοποιηθεί η γενετική τροποποίηση των κυττάρων με το πλασμίδιο που έφερε το shRNA, μέσω λεντιϊών, ήταν αναγκαία η γνώση του ποσοστού των κυττάρων που μπορούν να τροποποιηθούν από τις κυτταρικές σειρές στις οποίες εκφράζεται περισσότερο το GREAT4\_2, δηλαδή τις κυτταρικές σειρές MKN45 και NUGC4. Η γνώση αυτή βοηθάει στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της σίγησης συνδυαστικά και με άλλες παραμέτρους.

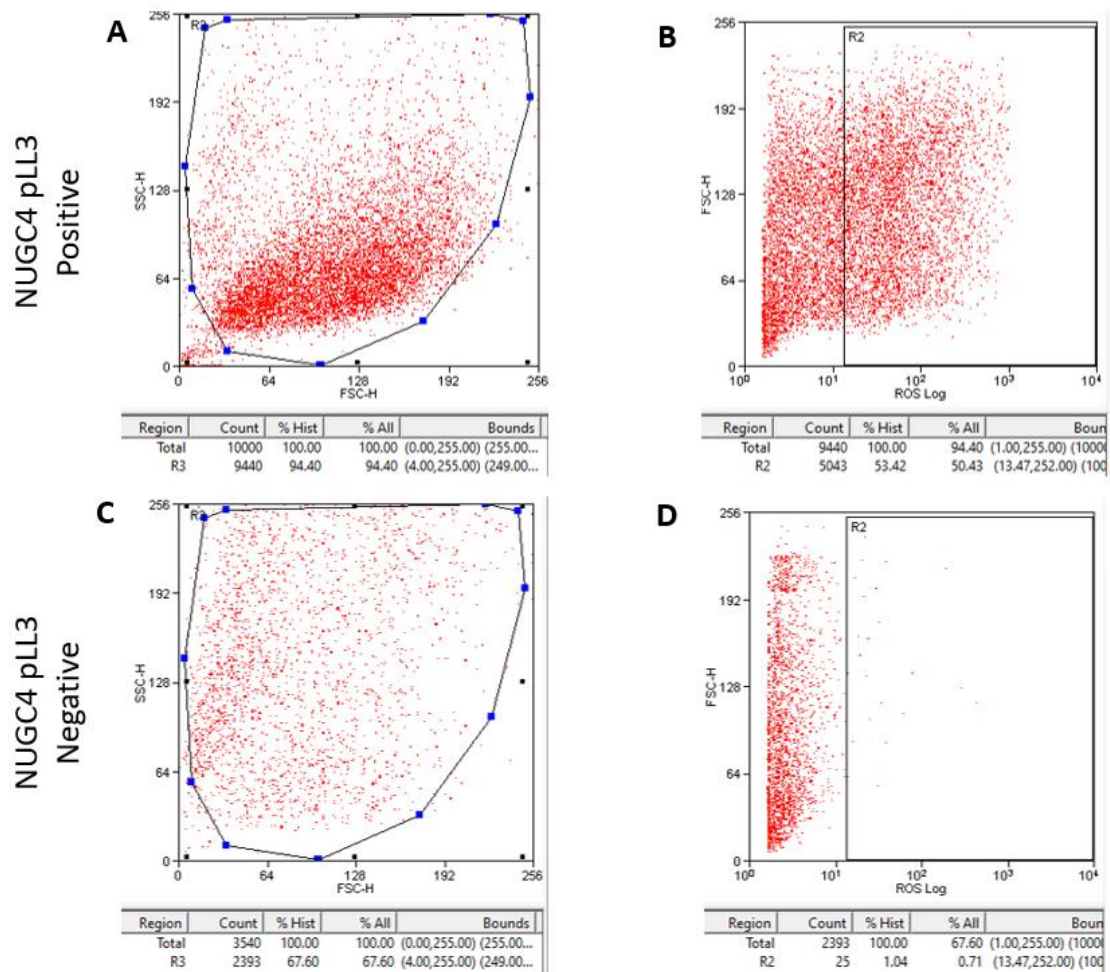
Συγκεκριμένα, στην *Εικόνα 37* και *38* φαίνονται τα αποτελέσματα από πείραμα **FACS**. Στην *Εικόνα 37*, φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος για την κυτταρική σειρά MKN45. Στα Διαγράμματα A και C της *Εικόνας 37*, στο πλαίσιο εντός του τετραγώνου συλλέγονται τα κύτταρα με σφαιρικό σχήμα και ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Το SSC είναι ανάλογο της σφαιρικότητας των κυττάρων ενώ το FSC είναι ανάλογο του μεγέθους των κυττάρων. Στο πλαίσιο R2 του Διαγράμματος D, φαίνεται ο αυτοφθορισμός των επιλεγμένων, από το Διάγραμμα A, κυττάρων, εφόσον αυτά είναι τροποποιημένα με άδειο φορέα χωρίς GFP. Το 1,73% των MKN45 κυττάρων φαίνεται να αυτοφθορίζει. Αντιθέτως, στο R2 πλαίσιο του Διαγράμματος B φαίνεται ο συνολικός φθορισμός που παρουσιάζουν τα MKN45 κύτταρα μετά την γενετική τροποποίηση με GFP. Συγκεκριμένα, το 51,21% των κυττάρων αυτών τροποποιήθηκε με τον ανασυνδυασμένο φορέα που έφερε GFP με αποτέλεσμα να φθορίζουν.

Αντίστοιχα είναι και τα Διαγράμματα της *Εικόνας 38*. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι το 0,71% των NUGC4 κυττάρων αυτοφθορίζει, ενώ το 50,43% αυτών κατάφερε να τροποποιηθεί με τον ανασυνδυασμένο φορέα που έφερε GFP με αποτέλεσμα να φθορίζουν.

Συμπερασματικά, από το πείραμα της κυτταρομετρίας ροής προκύπτει ότι ένα σημαντικό ποσοστό (>50%) γαστρικών καρκινικών κυττάρων MKN45 και NUGC4 καταφέρνει να τροποποιηθεί λαμβάνοντας τον ανασυνδυασμένο φορέα μέσω του συστήματος των λεντιϊών.



**Εικόνα 37:** Αποτέλεσμα κυτταρομετρίας ροής για τα κύτταρα ΜΚΝ45. Α, C) Απεικόνιση εντός του πλαισίου των σφαιρικών κυττάρων με φυσιολογικό μέγεθος, Β) Φθορισμός τροποποιημένων κυττάρων, D) Αυτοφθορισμός μη τροποποιημένων κυττάρων.



**Εικόνα 38:** Αποτέλεσμα κυτταρομετρίας ροής για τα κύτταρα NUGC4. A,C) Απεικόνιση εντός του πλαισίου των σφαιρικών κυττάρων με φυσιολογικό σχήμα, B) Φθορισμός των τροποποιημένων κυττάρων, D) Αυτοφθορισμός των κυττάρων.

## 6.8 Ανάλυση της σχέσης μεταξύ του lncRNA και των υποψήφιων γονιδίων-στόχων μέσω παροδικής σίγησης του

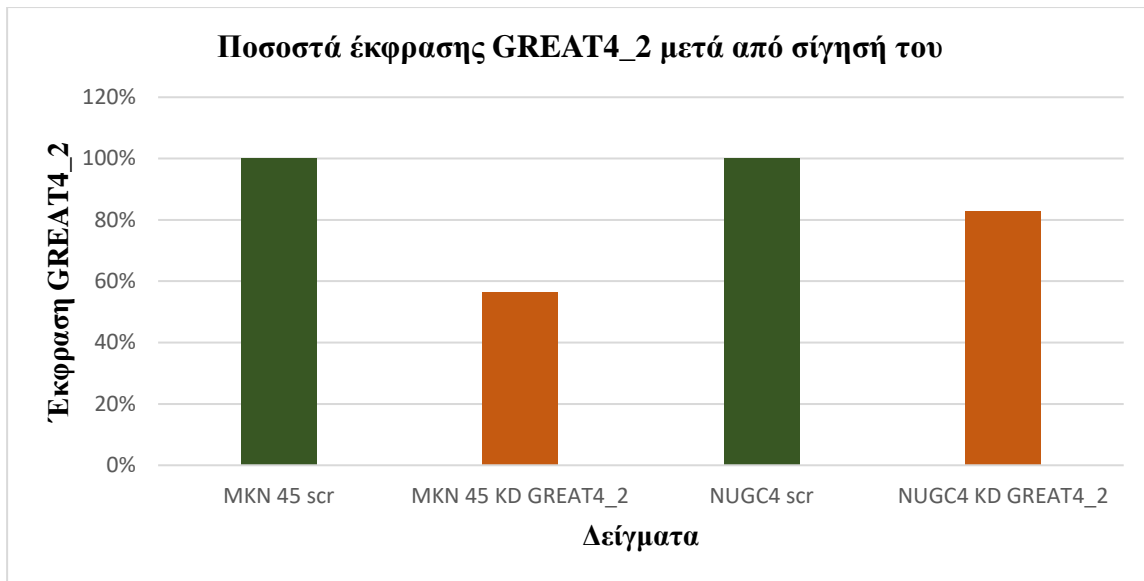
### 6.8.1 Πρώτη προσπάθεια παροδικής σίγησης του GREAT4 2

Μετά το πείραμα της κυτταρομετρίας ροής και γνωρίζοντας πλέον την αποτελεσματικότητα της γενετικής τροποποίησης των κυττάρων, ακολούθησε η γενετική τροποποίηση των MKN45 και NUGC4 κυττάρων με τον ανασυνδυασμένο φορέα, psicoR. Το πείραμα της γενετικής τροποποίησης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Τα αποτελέσματα της πρώτης γενετικής τροποποίησης έδωσαν τα αποτελέσματα της **Εικόνας 39**. Στην **Εικόνα 39** φαίνεται ότι επιτεύχθηκε μία σίγηση της τάξης του 43,57% στην MKN45 κυτταρική σειρά. Στην NUGC4 κυτταρική σειρά παρατηρήθηκε μικρότερη

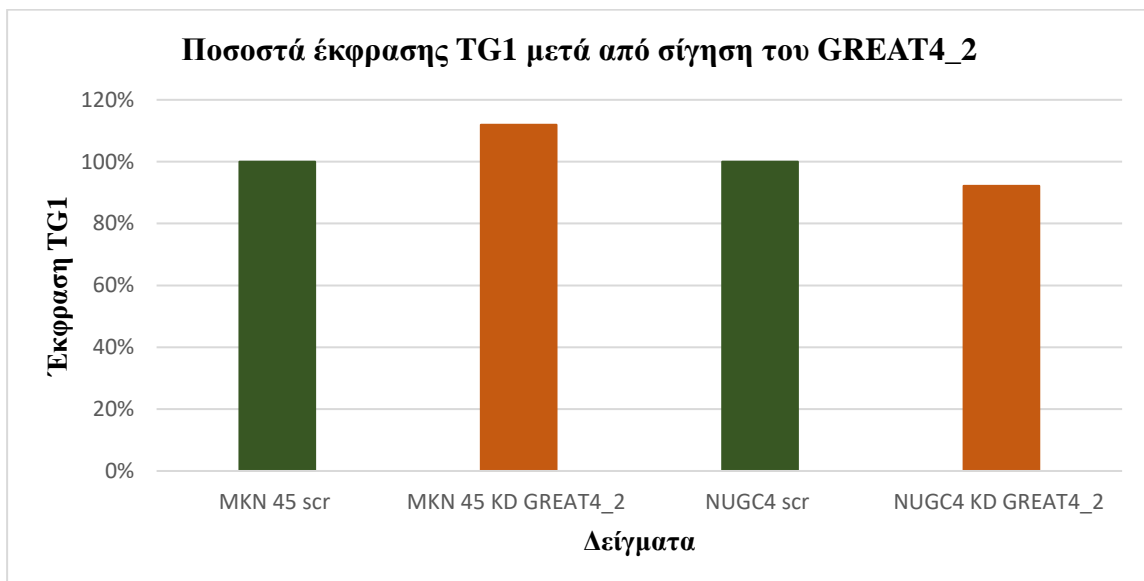
σίγηση, ίση με 17,32%. Στα κύτταρα MKN45 που επιτεύχθηκε υψηλότερη σίγηση φαίνεται να επηρεάστηκε η έκφραση του TG2 ενώ η έκφραση του TG1 παρέμεινε ανεπηρέαστη. Αντίστοιχα, στα NUGC4 κύτταρα η έκφραση του TG1 μειώθηκε κατά 8% ενώ του TG2 κατά 12%.

Το ποσοστό σίγησης που επιτεύχθηκε στην κυτταρική σειρά MKN45 είναι ικανοποιητικό για να δώσει μία αρχική εκτίμηση σχετικά με την ενδεχόμενη ρύθμιση των TG1 και TG2 από το GREAT4\_2. Συμπερασματικά, στην κυτταρική σειρά MKN45 παρατηρείται ότι κατά την σίγηση του GREAT4\_2 (κατά 43,57%), υπάρχει μία μείωση της έκφρασης του γονιδίου TG2 (*Εικόνα 41*) ενώ η έκφραση του γονιδίου TG1 δεν επηρεάζεται (*Εικόνα 40*). Η μείωση στην έκφραση του γονιδίου TG2 υποδηλώνει μία ενδεχόμενη ρύθμιση του από το GREAT4\_2, εφόσον η σίγηση του οδήγησε στην μείωση της έκφρασης του. Ωστόσο, το ποσοστό σίγησης που επιτεύχθηκε δεν είναι αρκετό για να επιβεβαιώσει με ασφάλεια την ρύθμιση του TG2 από το GREAT4\_2. Επομένως, το γενικότερο πλαίσιο που προκύπτει από αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι το TG2 μπορεί να αποτελεί στόχο του υπό μελέτη lncRNA ενώ το TG1 δεν φαίνεται να ρυθμίζεται από αυτό.

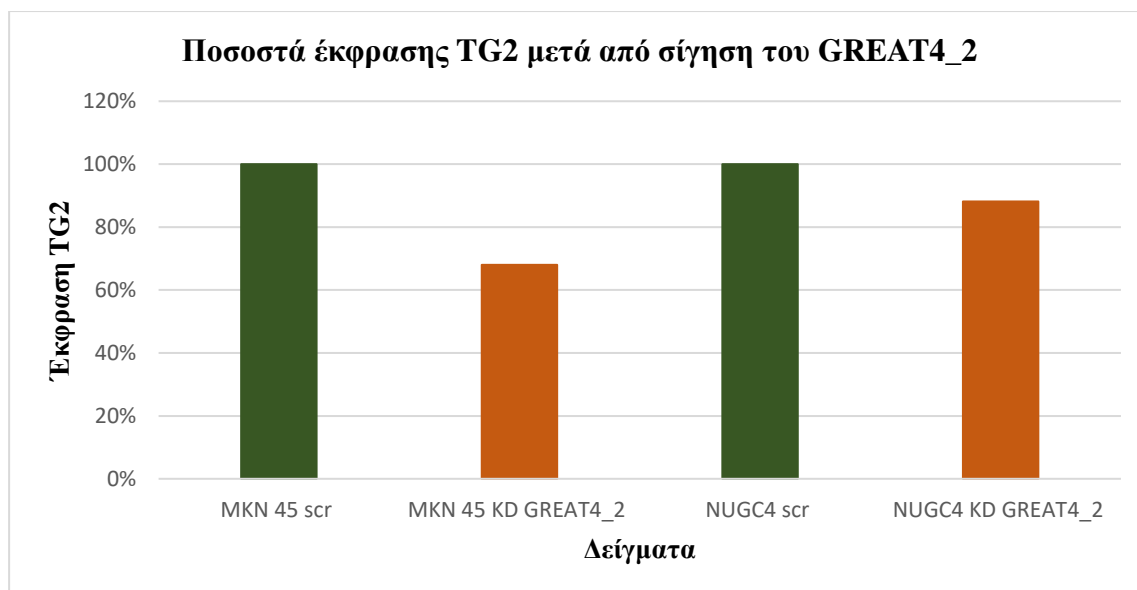
Στην κυτταρική σειρά NUGC4 παρατηρείται ότι η σίγηση της τάξης του 17,34% στο GREAT4\_2 οδήγησε σε μία μικρή μείωση της έκφρασης των γονιδίων TG1 (8%) και TG2 (12%). Φαίνεται ξανά ότι αυτή η μικρή σίγηση που επιτεύχθηκε οδήγησε ξανά σε μείωση της έκφρασης του TG2, σχεδόν σε παραπλήσιο ποσοστό με αυτό της σίγησης, ενώ παρουσιάστηκε και μία μείωση της έκφρασης του TG1. Παρόλα αυτά, η σίγηση που επιτεύχθηκε είναι αρκετά μικρή για να μπορέσει να υποδείξει με ασφάλεια την ρύθμιση των γονιδίων TG1 και TG2 από το lncRNA. Επομένως, για τα κύτταρα NUGC4 ενώ φαίνεται να ακολουθείται ένα κοινό πρότυπο με τα MKN45 κύτταρα, δεν είναι εφικτή η διεξαγωγή ενός γενικότερου συμπεράσματος καθώς η μείωση στην έκφραση των γονιδίων TG1 και TG2 είναι μικρή, με αποτέλεσμα να εγείρει αμφιβολίες για πειραματικό «θόρυβο».



**Εικόνα 39:** Διάγραμμα της έκφρασης του GREAT4\_2, μέσω qPCR, μετά από σίγησή του. MKN45 scr και NUGC4 scr είναι τα controls του πειράματος. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.



**Εικόνα 40:** Διάγραμμα της έκφρασης του TG1, μέσω qPCR, μετά από την σίγηση του GREAT4\_2. MKN45 scr και NUGC4 scr είναι τα controls του πειράματος. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.

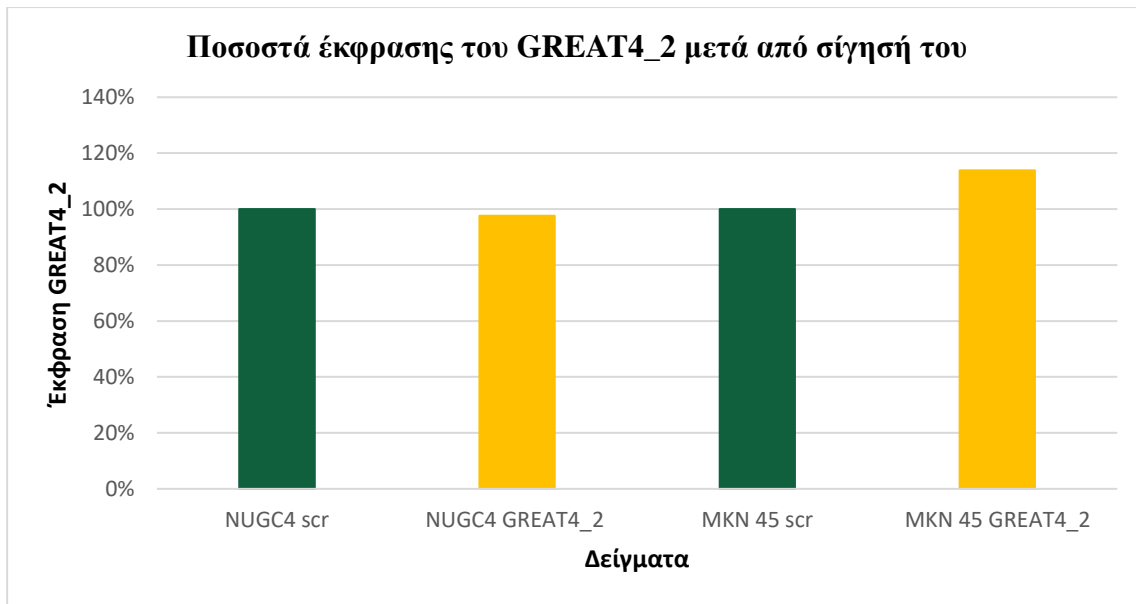


**Εικόνα 41:** Διάγραμμα της έκφρασης του TG2, μέσω qPCR, μετά από την σίγηση του GREAT4\_2. MKN45 scr και NUGC4 scr είναι τα controls του πειράματος. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.

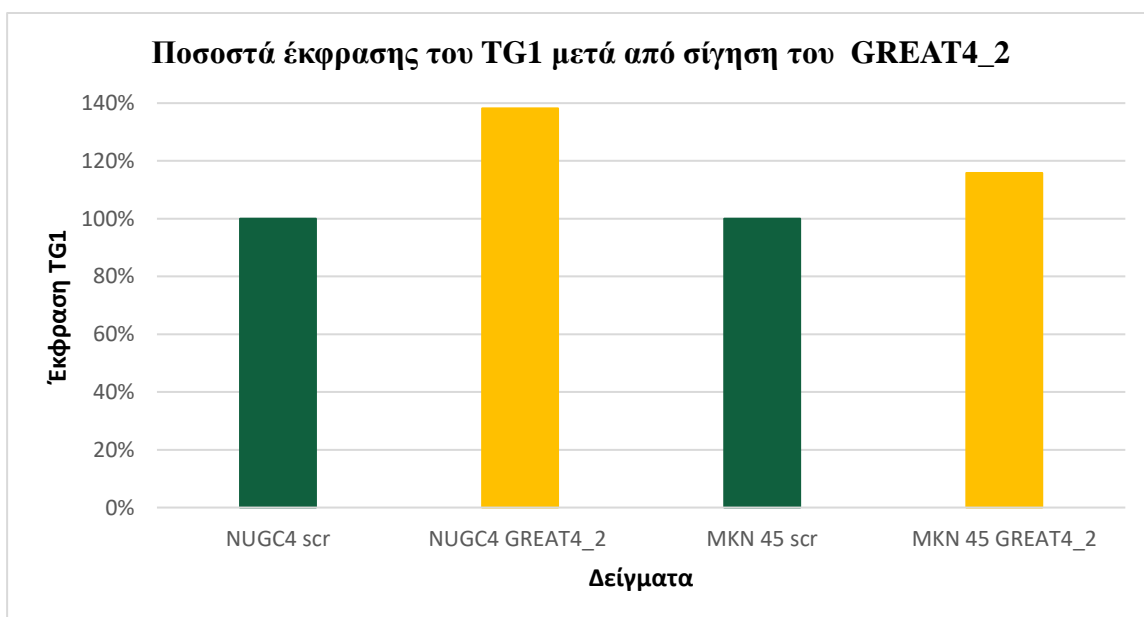
### **6.8.2 Δεύτερη προσπάθεια παροδικής σίγησης του GREAT4\_2**

Το πείραμα της γενετικής τροποποίησης των MKN45 και NUGC4 κυττάρων επαναλήφθηκε με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανότητα επίτευξης καλύτερης σίγησης. Στην δεύτερη γενετική τροποποίηση τα κύτταρα επώαστηκαν με τον ιό για τρεις ημέρες σε αντίθεση με την πρώτη τροποποίηση όπου τα κύτταρα επώαστηκαν για μία ημέρα. Τα αποτελέσματα αυτής της επανάληψης παρουσιάζονται στις **Εικόνες 42, 43 και 44**.

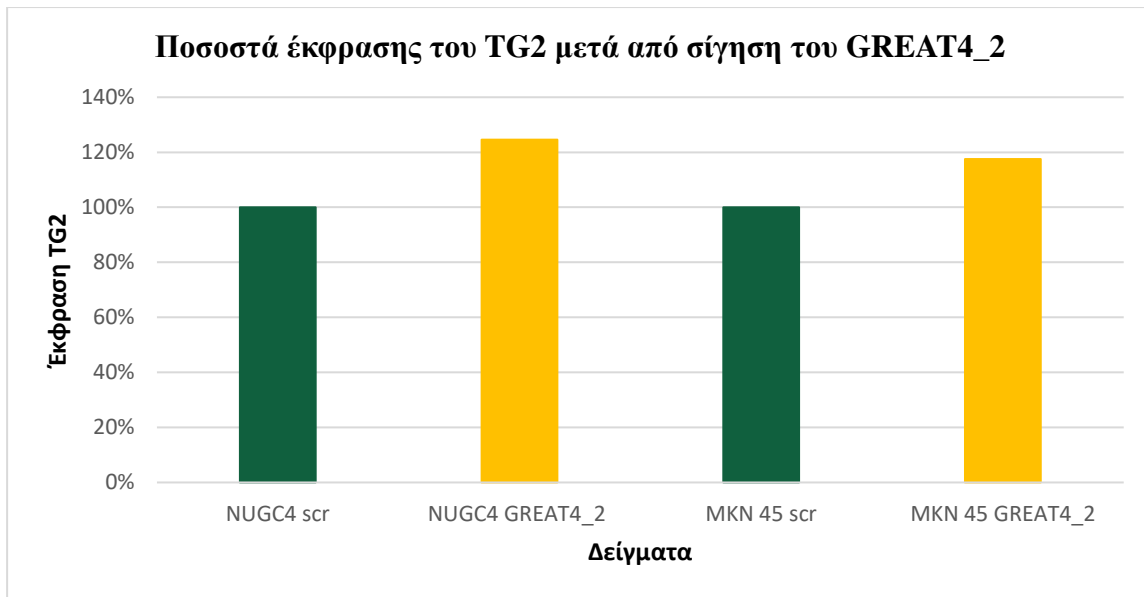
Από τα αποτελέσματα της επανάληψης της σίγησης του GREAT4\_2 προκύπτει ότι δεν επιτεύχθηκε σίγηση του lncRNA (**Εικόνα 42**) με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προκύψει κάποιο συμπέρασμα που να επιβεβαιώνει ή να απορρίπτει τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρώτη προσπάθεια σίγησης. Συνεπώς, από τις δύο επαναλήψεις του πειράματος σίγησης του GREAT4\_2 φαίνεται ότι στην κυτταρική σειρά MKN45 το TG2 πιθανώς να αποτελεί στόχο του GREAT4\_2 σε αντίθεση με το TG1. Από την άλλη πλευρά, για την κυτταρική σειρά NUGC4 δεν μπορεί να διεξαχθεί ένα γενικότερο συμπέρασμα.



**Εικόνα 42:** Διάγραμμα της έκφρασης του GREAT4\_2, μέσω qPCR, μετά από επανάληψη της σίγησής του. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.



**Εικόνα 43:** Διάγραμμα της έκφρασης του TG1, μέσω PCR, μετά από επανάληψη της σίγησής του GREAT4\_2. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.



**Εικόνα 44:** Διάγραμμα της έκφρασης του TG2, μέσω qPCR, μετά από επανάληψη της σίγησης του GREAT4\_2. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα με GAPDH.

---

## **7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

Όπως έχει καταστεί σαφές το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στα lncRNA για την αξιοποίηση τους στην διάγνωση και πρόγνωση του γαστρικού καρκίνου. Στην προσπάθεια αυτή εντάσσεται και το ερευνητικό έργο του εργαστηρίου μέρος του οποίου αποτελεί και η παρούσα πτυχιακή εργασία. Για τον σκοπό αυτό, λοιπόν, έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού της έκφρασης ενός μη μελετημένου lncRNA, του GREAT4\_2, για το οποίο ελέγχθηκε η ενδεχόμενη ρύθμιση του από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και GATA6 ενώ τέλος εξετάστηκε και η σχέση του GREAT4\_2 με άλλα δύο διαφορετικά γονίδια. Τα γονίδια στόχοι Target Gene 1 και Target Gene 2 (TG1 και TG2) είναι παρακείμενα του GREAT4\_2 πάνω στο χρωμόσωμα με αποτέλεσμα το ερευνητικό ενδιαφέρον να στρέφεται στην πιθανή δράση του GREAT4\_2 ως *cis-acting* lncRNA εφόσον στην βιβλιογραφία έχουν σημειωθεί πολλά παραδείγματα *cis-acting* lncRNA που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση.

Ένα από τα παραδείγματα της συμμετοχής των *cis-acting* lncRNA στην καρκινογένεση αποτελεί το HMGA1-lncRNA (HMGA1-lnc). Η έκφραση του HMGA1-lnc μειώνεται στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η έκφραση ενός γειτονικού γονιδίου που κωδικοποιεί την HMGA1 πρωτεΐνη η οποία ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που ελέγχουν την τρισδιάστατη διαμόρφωση της χρωματίνης. Η HMGA1 πρωτεΐνη αυξάνει την έκφραση ογκογονιδίων όπως E2F1, AP1 ενώ μειώνει την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το TP53. Το συγκεκριμένο lncRNA μειορρυθμίζει την έκφραση του HMGA1 γονιδίου ενώ στην περίπτωση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα εφόσον η έκφραση του HMGA1-lncRNA μειώνεται, η έκφραση της ογκοεπαγωγικής πρωτεΐνης αυξάνεται [52]. Επιπλέον, ένα άλλο παράδειγμα *cis-acting* lncRNA που συμβάλλει στον καρκίνο είναι το KCNQ1OT1. Το lncRNA αυτό βρίσκεται σε μία χρωμοσωμική περιοχή που είναι εντυπωμένη, συνεπώς μόνο το ένα εκ των δύο αλληλομόρφων εκφράζεται. Συγκεκριμένα, το KCNQ1OT1 lncRNA εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο καταστέλλοντας το γειτονικό γονίδιο CDKN1C, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναστολή της ανάπτυξης. Συνεπώς, το CDKN1C γονίδιο εκφράζεται μόνο από το μητρικό αλληλόμορφο εφόσον το KCNQ1OT1 lncRNA είναι εντυπωμένο. Στην περίπτωση όμως του Συνδρόμου Beckwith-Wiedemann (Beckwith-Wiedemann Syndrome → BWS), χάνεται η μεθυλίωση του κέντρου εντυπώματος (IC2), με αποτέλεσμα να εκφράζεται το KCNQ1OT1 lncRNA. Η έκτοπη έκφραση του lncRNA οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης του CDKN1C γονιδίου οδηγώντας έτσι στο BWS σύνδρομο. Το

σύνδρομο αυτό αφορά την ανάπτυξη των παιδιών και τα καθιστά πιο επιρρεπή σε παιδικού τύπου καρκίνους [53].

Βασικός άξονας αυτής της πτυχιακής είναι ο χαρακτηρισμός του GREAT4\_2. Δείχθηκε λοιπόν, από βιοπληροφορικές αναλύσεις, ότι το συγκεκριμένο lncRNA εκφράζεται περισσότερο στον φυσιολογικό ιστό του στομάχου (*Εικόνα 14, 15, 16*), με αποτέλεσμα να εγείρονται σκέψεις για ογκοκατασταλτική δράση του GREAT4\_2. Παραδείγματα ογκοκατασταλτικών lncRNA έχουν αναφερθεί προηγουμένως στην βιβλιογραφία, με ένα από αυτά αποτελεί το MEG3 lncRNA που έχει βρεθεί ότι μειορρυθμίζεται στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας με αποτέλεσμα να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση [54]. Η έκφραση των υποψήφιων γονιδίων στόχων (TG1 και TG2) φάνηκε από την βιοπληροφορική ανάλυση να είναι χαμηλή ενώ η έκφραση τους εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με την έκφραση του GREAT4\_2 στον καρκινικό ιστό. Τέλος, τα γονίδια TG1 και TG2, εμφάνισαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το GREAT4\_2 στα διαφορετικά στάδια του γαστρικού καρκίνου.

Σε πειραματικό επίπεδο φάνηκε ότι το GREAT4\_2 εκφράζεται παραπάνω στις γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με άλλες καρκινικές σειρές διαφορετικών ιστών. Το γεγονός αυτό συνάδει με την προσοχή που έχουν λάβει τα lncRNA για την αξιοποίηση τους ως μοριακοί βιοδείκτες καθώς αναδεικνύει μία μεγαλύτερη εξειδίκευση τους σε επίπεδο ιστού σε αντίθεση με άλλα βιομόρια που μπορούν εξίσου να εντοπιστούν σε βιολογικά υγρά του ανθρώπου όπως τα miRNA [55]. Τα αποτελέσματα των qPCR που έδειξαν την τάση του GREAT4\_2 να εκφράζεται περισσότερο στις γαστρικές κυτταρικές σειρές, δημιουργούν νέες προοπτικές για την περαιτέρω διερεύνηση του GREAT4\_2 ως ενός νέου εξειδικευμένου για τον γαστρικό καρκίνο διαγνωστικού ή προγνωστικού βιοδείκτη. Παράλληλα, τα γονίδια TG1 και TG2 (*Εικόνα 24 και 25*) δείχθηκε να εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στις ίδιες κυτταρικές σειρές όπου ελέγχθηκε η έκφραση του GREAT4\_2, προτείνοντας ενδεχομένως μία σχέση μεταξύ των τριών γονιδίων.

Συνεχίζοντας, εξετάστηκε η σταθερότητα του μεταγράφου του lncRNA. Τα πιο ασταθή lncRNA έχουν χρόνο ημιζωής περίπου δύο ώρες ενώ τα πολύ σταθερά μετάγραφα κοντά στις δεκαέξι ώρες. Από το Διάγραμμα της *Εικόνας 26* φαίνεται ότι το GREAT4\_2 μετά το πέρας της μίας ώρας αρχίζει να μειώνεται ενώ στην πρώτη βιολογική επανάληψη των MKN45 ο χρόνος ημιζωής του lncRNA είναι κοντά στις 4 ώρες. Τα μετάγραφα των

lncRNA έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής από τα mRNA αλλά δεν θεωρούνται κατά βάση ασταθή. Έχει βρεθεί ότι ο μέσος όρος χρόνου ημιζωής των lncRNA είναι 3,5 ώρες. Υπάρχουν κάποια lncRNA, περισσότερα σε αριθμό από τα mRNA, που έχουν χρόνο ημιζωής μικρότερο από 2 ώρες και κατ' επέκταση θεωρούνται εξαιρετικά ασταθή ενώ υπάρχουν και μερικά lncRNA, λιγότερα σε αριθμό από τα mRNA, με χρόνο ημιζωής πάνω από 16 ώρες και θεωρούνται εξαιρετικά σταθερά μετάγραφα [56]. Η ξαφνική άνοδος στα επίπεδα των μεταγράφων μετά την μία ώρα στην δεύτερη βιολογική επανάληψη (**Εικόνα 27**) πιθανώς αντιστοιχεί σε πειραματικό θόρυβο. Η μετα-μεταγραφική σταθερότητα ενός lncRNA επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Ο αριθμός των εξονίων, οι δευτεροταγείς δομές καθώς και ο υποκυτταρικός εντοπισμός είναι κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την μεταγραφική σταθερότητα ενός lncRNA [57]. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό έχει δειχθεί ότι τα lncRNA που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα είναι πιο σταθερά σε σχέση με αυτά που εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα. Ο χρόνος ημιζωής που προτείνεται από την πρώτη βιολογική επανάληψη (4 ώρες) συμβαδίζει με το γεγονός ότι το GREAT4\_2 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (ενδεχομένως και στην χρωματίνη) αρά έχει πιο σταθερά μετάγραφα σε σχέση με αυτά που εμφανίζουν χρόνο ημιζωής δύο ωρών. Το γεγονός ότι εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα δεν αναιρεί το ενδεχόμενο να βρίσκεται και στον πυρήνα είτε σε υψηλά είτε σε χαμηλά επίπεδα και να δρα *in cis* ρυθμίζοντας την έκφραση των γειτονικών του γονιδίων εφόσον υπάρχει και το ενδεχόμενο ο χρόνος ημιζωής να είναι 1 ώρα, χρόνος ημιζωής που αντιστοιχεί κατά βάση σε πυρηνικά lncRNA. Αναφερόμενοι στην πιθανή *cis* δράση του GREAT4\_2, αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν βρεθεί παραδείγματα *cis*-acting lncRNA όπως τα HOXA-AS3 και HOXB-AS3 lncRNA που ελέγχουν την έκφραση των επικαλυπτόμενων HOX5-7 γονιδίων [58]. Επιπλέον, θα μπορούσε κάποιο ρυθμιστικό στοιχείο του GREAT4\_2 να παρουσιάζει την *cis* δράση και όχι το μετάγραφο του GREAT4\_2. Ένα τέτοιο παράδειγμα από την βιβλιογραφία είναι και το HASTER lncRNA του οποίου ο υποκινητής σταθεροποιεί την μεταγραφή του HNF1A μεταγραφικού παράγοντα [59].

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του GREAT4\_2 στα AGS και MKN45 κύτταρα δεν επηρεάστηκε από την καταστολή ή την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6 (**Εικόνα 32 και 34**). Παρόλα αυτά, στα HFE κύτταρα, η έκφραση του GREAT4\_2 διπλασιάστηκε μετά την υπερέκφραση του GATA6 αλλά και του συνδυασμού GATA4/GATA6 (**Εικόνα 35**). Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες συμβάλλουν στην ρύθμιση της έκφρασης του lncRNA αλλά απαιτούνται

περαιτέρω πειραματικές προσεγγίσεις για επιβεβαίωση αυτού του αποτελέσματος. Παράλληλα, η ρύθμιση του lncRNA από τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες συμβαίνει στην μη καρκινική κυτταρική σειρά (HFE) και όχι στις καρκινικές κυτταρικές σειρές AGS και MKN45. Από το συγκεκριμένο αποτέλεσμα πιθανόν να προκύπτει μια ογκοκατασταλτική δράση του GATA6 σε συνδυασμό με το GREAT4\_2. Περιπτώσεις ογκοκατασταλτικής δράσης του GATA6 έχουν καταγραφεί στην βιβλιογραφία με ένα παράδειγμα να αποτελεί η GATA6 εξαρτώμενη πρόκληση της κυτταρικής απόπτωσης καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα [60].

Μετά τον γενικότερο χαρακτηρισμό της έκφρασης, της σταθερότητας και του υποκυτταρικού εντοπισμού του GREAT4\_2, επόμενος στόχος ήταν ο προσδιορισμός της σχέσης των τριών γονιδίων (GREAT4\_2, TG1, TG2). Στην πρώτη πειραματική δοκιμή σίγησης του GREAT4\_2, επιτεύχθηκε ποσοστό σίγησης ίσο με 43,57% σε κύτταρα MKN45 και 17,32% σε κύτταρα NUGC4. Η σίγηση του GREAT4\_2 οδήγησε σε μία 8% μείωση του TG1 σε κύτταρα NUGC4 και σε μείωση 32% και 12% του TG2 σε MKN45 και NUGC4 κύτταρα αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη την σίγηση που επιτεύχθηκε, η μείωση της έκφρασης που παρατηρείται στα γονίδια TG1 και TG2 μπορεί να υποδηλώνει μία πιθανή ρύθμιση της έκφρασης τους από το GREAT4\_2 (κυρίως του TG2). Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι περίπου το 50% των κυττάρων (MKN45 και NUGC4) καταφέρνουν να τροποποιηθούν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο γεγονός που επηρεάζει το ποσοστό της σίγησης. Παρόλα αυτά οι παράγοντες που επηρεάζουν μία σίγηση γονιδίου δεν περιορίζονται μόνο σε αυτό. Συγκεκριμένα, ενδεχομένως το GREAT4\_2 να μην εκφραζόταν σε όλα τα κύτταρα με την ίδια ένταση και στην ίδια χρονική στιγμή. Αυτό δηλώνει ότι μπορεί κύτταρα τα οποία να κατάφεραν να τροποποιηθούν γενετικά να μην εξέφραζαν εκείνη την στιγμή το GREAT4\_2. Παράλληλα, για να αναδειχθεί η σχέση των γονιδίων, θα πρέπει αυτά να συνεκφράζονται την ίδια χρονική περίοδο ώστε να η σίγηση του ενός να αναδείξει τις επιπτώσεις στην έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων. Επιπρόσθετα, το lncRNA μπορεί να λαμβάνει κάποιες δευτεροταγείς δομές οι οποίες να εμποδίζουν την σίγηση μέσω RNAi ενώ και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του GREAT4\_2 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία της σίγησης καθώς έχει δειχθεί ότι πυρηνικά lncRNA καταστέλλονται με μεγαλύτερη επιτυχία με την χρήση ASO (Antisense oligonucleotide) σε σχέση με την χρήση shRNA [61].

Μελλοντικά, υπάρχουν αρκετές πειραματικές προσεγγίσεις που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την διαλεύκανση του πλήρους προφίλ της έκφρασης του GREAT4\_2.

Συγκεκριμένα, για την εύρεση του υποκυτταρικού εντοπισμού του GREAT4\_2 θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μία *in situ* υβριδοποίηση. Παράλληλα, για να αποδειχθεί εάν τελικά τα γονίδια TG1 και TG2 αποτελούν στόχους ρύθμισης του GREAT4\_2 θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί knock-out του γονιδίου του GREAT4\_2 μέσω CRISPR/Cas9 και να ελεγχθεί η επίδραση που θα είχε αυτή η ενέργεια στην έκφραση των δύο γονιδίων αλλά και στον φαινότυπο των κυττάρων. Το knock-out του γονιδίου θα έδινε την δυνατότητα στόχευσης και ενός ρυθμιστικού στοιχείου με αποτέλεσμα να διακόπτεται η ενδεχόμενη *in cis* δράση του lncRNA από όπου και εάν προέρχεται, είτε δηλαδή από το ίδιο το μετάγραφο είτε από κάποιο ρυθμιστικό στοιχείο του lncRNA. Ωστόσο, εγκυμονούν κίνδυνοι καθώς το συγκεκριμένο μη μελετημένο lncRNA θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων με αποτέλεσμα η αποσιώπηση του να μην επιτρέψει την ανάπτυξη των κυττάρων με επακόλουθη απόπτωσή τους. Η αποσιώπηση lncRNA μέσω CRISPR/Cas9 έχει επιχειρηθεί σε γαστρικά κύτταρα MKN45, τα οποία αξιοποιούνται και στην παρούσα πτυχιακή εργασία, και συγκεκριμένα έχουν γίνει προσπάθειες αποσιώπησης του GMAN lncRNA για να εξετάσουν την επίδραση αυτού του knock-out στην έκφραση της πρωτεΐνης Ephrin A1 η οποία ρυθμίζεται από το συγκεκριμένο lncRNA [62].

1. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.

2. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
3. Morgan, E., et al., *The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020-40: A population-based modelling study*. EClinicalMedicine, 2022. **47**: p. 101404.
4. Zali, H., M. Rezaei-Tavirani, and M. Azodi, *Gastric cancer: prevention, risk factors and treatment*. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2011. **4**(4): p. 175-85.
5. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
6. Zhang, W., *TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics*. Chin J Cancer, 2014. **33**(10): p. 469-70.
7. Yang, J., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype*. Cancer Lett, 2020. **495**: p. 191-199.
8. Sun, K., et al., *EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 583463.
9. Shokal, U. and P.C. Sharma, *Implication of microsatellite instability in human gastric cancers*. Indian J Med Res, 2012. **135**(5): p. 599-613.
10. Lim, B., et al., *Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1190-201.
11. Axon, A., *Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2006. **20**(4): p. 697-708.
12. Maconi, G., G. Manes, and G.B. Porro, *Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(8): p. 1149-55.
13. Thrumurthy, S.G., et al., *The diagnosis and management of gastric cancer*. BMJ, 2013. **347**: p. f6367.
14. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
15. Saka, M., et al., *Present and future status of gastric cancer surgery*. Jpn J Clin Oncol, 2011. **41**(3): p. 307-13.
16. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
17. Ransohoff, J.D., Y. Wei, and P.A. Khavari, *The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(3): p. 143-157.
18. Wu, R., et al., *Characters, functions and clinical perspectives of long non-coding RNAs*. Mol Genet Genomics, 2016. **291**(3): p. 1013-33.
19. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.
20. Zhang, X., et al., *Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
21. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 96-118.
22. Wierzbicki, A.T., *The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing*. Curr Opin Plant Biol, 2012. **15**(5): p. 517-22.
23. St Laurent, G., C. Wahlestedt, and P. Kapranov, *The Landscape of long noncoding RNA classification*. Trends Genet, 2015. **31**(5): p. 239-51.
24. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
25. Carlevaro-Fita, J. and R. Johnson, *Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization*. Mol Cell, 2019. **73**(5): p. 869-883.
26. Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.

27. Marchese, F.P. and M. Huarte, *Long non-coding RNAs and chromatin modifiers: their place in the epigenetic code*. Epigenetics, 2014. **9**(1): p. 21-6.
28. McHugh, C.A., et al., *The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3*. Nature, 2015. **521**(7551): p. 232-6.
29. Latos, P.A., et al., *Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing*. Science, 2012. **338**(6113): p. 1469-72.
30. Mowel, W.K., et al., *Control of Immune Cell Homeostasis and Function by lncRNAs*. Trends Immunol, 2018. **39**(1): p. 55-69.
31. Nunez-Martinez, H.N. and F. Recillas-Targa, *Emerging Functions of lncRNA Loci beyond the Transcript Itself*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(11).
32. Winkler, L., et al., *Functional elements of the cis-regulatory lincRNA-p21*. Cell Rep, 2022. **39**(3): p. 110687.
33. Zhang, J., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(1): p. 1-5.
34. Hajjari, M. and A. Salavaty, *HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers*. Cancer Biol Med, 2015. **12**(1): p. 1-9.
35. Clemson, C.M., et al., *An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles*. Mol Cell, 2009. **33**(6): p. 717-26.
36. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCcation: lncRNA localization and function*. J Cell Biol, 2021. **220**(2).
37. Chen, L.L., *Linking Long Noncoding RNA Localization and Function*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(9): p. 761-772.
38. Noh, J.H., et al., *Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018. **9**(3): p. e1471.
39. Huarte, M., *The emerging role of lncRNAs in cancer*. Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1253-61.
40. Do, H. and W. Kim, *Roles of Oncogenic Long Non-coding RNAs in Cancer Development*. Genomics Inform, 2018. **16**(4): p. e18.
41. Taniue, K. and N. Akimitsu, *The Functions and Unique Features of lncRNAs in Cancer Development and Tumorigenesis*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
42. Sawaki, K., M. Kanda, and Y. Kodera, *Review of recent efforts to discover biomarkers for early detection, monitoring, prognosis, and prediction of treatment responses of patients with gastric cancer*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **12**(7): p. 657-670.
43. Badowski, C., B. He, and L.X. Garmire, *Blood-derived lncRNAs as biomarkers for cancer diagnosis: the Good, the Bad and the Beauty*. NPJ Precis Oncol, 2022. **6**(1): p. 40.
44. Jelski, W. and B. Mroczko, *Molecular and Circulating Biomarkers of Gastric Cancer*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(14).
45. Beylerli, O., et al., *Long noncoding RNAs as promising biomarkers in cancer*. Noncoding RNA Res, 2022. **7**(2): p. 66-70.
46. Chen, J.S., et al., *H19 serves as a diagnostic biomarker and up-regulation of H19 expression contributes to poor prognosis in patients with gastric cancer*. Neoplasma, 2016. **63**(2): p. 223-30.
47. Li, B., Q. Huang, and G.H. Wei, *The Role of HOX Transcription Factors in Cancer Predisposition and Progression*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
48. !!! INVALID CITATION !!! {}.
49. You, L., et al., *The long non-coding RNA HOXA11-AS activates ITGB3 expression to promote the migration and invasion of gastric cancer by sponging miR-124-3p*. Cancer Cell Int, 2021. **21**(1): p. 576.
50. Yuan, Y.H., et al., *Epigenetic inactivation of HOXD10 is associated with human colon cancer via inhibiting the RHOC/AKT/MAPK signaling pathway*. Cell Commun Signal, 2019. **17**(1): p. 9.

51. Feng, Y., et al., *Homeobox Genes in Cancers: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic Intervention*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 770428.
52. Stewart, G.L., et al., *Deregulation of a Cis-Acting lncRNA in Non-small Cell Lung Cancer May Control HMGA1 Expression*. *Front Genet*, 2020. **11**: p. 615378.
53. Valente, F.M., et al., *Transcription alterations of KCNQ1 associated with imprinted methylation defects in the Beckwith-Wiedemann locus*. *Genet Med*, 2019. **21**(8): p. 1808-1820.
54. Zhang, J., et al., *Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21*. *Cancer Biol Ther*, 2016. **17**(1): p. 104-13.
55. Nukala, S.B., et al., *Long non-coding RNAs and microRNAs as crucial regulators in cardio-oncology*. *Cell Biosci*, 2022. **12**(1): p. 24.
56. Clark, M.B., et al., *Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability*. *Genome Res*, 2012. **22**(5): p. 885-98.
57. Shi, K., et al., *Genome-wide analysis of lncRNA stability in human*. *PLoS Comput Biol*, 2021. **17**(4): p. e1008918.
58. Degani, N., et al., *Highly conserved and cis-acting lncRNAs produced from paralogous regions in the center of HOXA and HOXB clusters in the endoderm lineage*. *PLoS Genet*, 2021. **17**(7): p. e1009681.
59. Beucher, A., et al., *The HASTER lncRNA promoter is a cis-acting transcriptional stabilizer of HNF1A*. *Nat Cell Biol*, 2022. **24**(10): p. 1528-1540.
60. Chen, W., et al., *GATA6 Exerts Potent Lung Cancer Suppressive Function by Inducing Cell Senescence*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 824.
61. Lennox, K.A. and M.A. Behlke, *Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(2): p. 863-77.
62. Zhuo, W., et al., *Long Noncoding RNA GMAN, Up-regulated in Gastric Cancer Tissues, Is Associated With Metastasis in Patients and Promotes Translation of Ephrin A1 by Competitively Binding GMAN-AS*. *Gastroenterology*, 2019. **156**(3): p. 676-691 e11.