



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΣΕΙΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΟΓΚΟΕΠΑΓΩΓΙΚΩΝ LNCRNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΛΕΝΤΙΩΝ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

Μοσχοπούλου Μαρία Ελένη

BSc Χημικός

Λάρισα, 2023

GENETIC ENGINEERING OF CANCER CELL LINES BY
INDUCIBLE SUPPRESSION OF EXPRESSION OF
ONCOGENIC LNCRNAs USING LENTIVIRUSES FOR THE
STUDY OF CANCER

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αντώνιος Γιακουντής, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Δημήτριο Κουρέτα μαζί με την επιτροπή καθηγητών του προγράμματος «Τοξικολογία» που με έκριναν ως κατάλληλη υποψήφια και μου έδωσαν την ευκαιρία να φοιτήσω στο ΠΜΣ καθιστώντας με τον τρόπο αυτό εφικτό να συνεχίσω τις σπουδές μου πέραν του βασικού κύκλου σπουδών, στο πεδίο ενδιαφέροντος μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κύριο Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο και τον κύριο Αντώνη Γιακουντή οι οποίοι με δέχτηκαν με θέρμη στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής προκειμένου να εκπονήσω εκεί τη διπλωματική μου εργασία. Στον κύριο Σωτήριο Βασιλειάδη και την κυρία Δανιέλα Τσίκου οφείλω ένα ευχαριστώ για την αποδοχή τους να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα διπλωματική εργασία. Δε θα μπορούσα να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη που νιώθω για τον κύριο Αντώνη Γιακουντη που ήταν ο επιβλέπων καθηγητής της διπλωματικής μου εργασίας και τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, για την υπομονή του και την άμεση διαθεσιμότητα του οποτεδήποτε ήταν αναγκαία η παρέμβαση και βοήθεια του. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής που συνέβαλαν το καθένα με τον τρόπο του ώστε να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία σε ένα χαρούμενο και εξαιρετικά υποστηρικτικό περιβάλλον. Πιο ειδικά, την υποψήφια διδάκτωρ Ελένη Ροντιόλα Μπεγκόλλι - την εργαστηριακή μαμά μας - για τις συμβουλές της τόσο σε εργαστηριακό / ακαδημαϊκό επίπεδο όσο και για τη ζωή έξω από το Πανεπιστήμιο, την υποψήφια διδάκτορα Μυρτώ Χατζηαγγέλου για το χαμόγελο, τη μεταδοτική θετική της ενέργεια και την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε απλόχερα όποτε η συνθήκη το απαιτούσε, τους τελειόφοιτους φοιτητές Ελένη Σταμπούλογλου, Απόστολο Καραγιάννη και Αστερία Τσαπαδίκου για την καθοδήγηση που μου παρείχαν σχετικά με τη λειτουργία του εργαστηρίου, όλα τα tips & tricks για τα πειραματικά πρωτόκολλα που μου έμαθαν και την άψογη συνεργασία και συνύπαρξη μας στο ίδιο εργαστήριο. Ένα ευχαριστώ είναι πολύ λίγο για τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Πολυξένη Γοργία και Χρήστο Γιαννακά με τους οποίους εκπονήσαμε ταυτόχρονα τις διπλωματικές μας εργασίες στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής. Η συνύπαρξη μου με τους δύο αυτούς ανθρώπους στο εργαστήριο αποτέλεσε κινητήριοις δύναμη να συνεχίζω να θέλω να επιστρέφω στον τόπο εργασίας μας ακόμα και μετά από μεγάλες πειραματικές και μη ματαιώσεις. Τους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την ψυχολογική υποστήριξη που μου έχουν παρέχει και για το γεγονός ότι αποτέλεσαν για μένα έμπνευση με το παράδειγμά τους λόγω εργασιακής ηθικής που επέδειξαν όλο το διάστημα της συνεργασίας μας η οποία έχει εξελιχθεί σε μια υπέροχη φιλία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους & το σύντροφό μου, τους γονείς & τον αδελφό μου που με στήριξαν κατά τη διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας, όπως σε κάθε βήμα μου μέχρι τώρα, με όσα μέσα, όσους τρόπους και όσες αντοχές είχε το καθένα από αυτά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μια πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική νόσος, πέμπτη κατά σειρά σε συχνότητα εμφάνισης και μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας οφείλονται κατά μεγάλο ποσοστό στην έλλειψη επαρκών και αξιόπιστων διαγνωστικών & προγνωστικών βιοδεικτών. Ο ασυμπτωματικός χαρακτήρας του συγκεκριμένου καρκινικού τύπου σε συνδυασμό με την απουσία ειδικών βιοδεικτών διάγνωσης έχουν ως αποτέλεσμα τη διάγνωση της νόσου σε προχωρημένα στάδια γαστρικού καρκίνου η οποία συνοδεύεται από κακή πρόγνωση και κακή ανταπόκριση στις θεραπευτικές προσεγγίσεις. Συνεπώς κρίνεται αναγκαία και επείγουσα η εύρεση νέων μοριακών βιοδεικτών για την ασφαλή, έγκαιρη και εξειδικευμένη διάγνωση της νόσου. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς συμμετέχουν σε μια πληθώρα θεμελιωδών κυτταρικών διεργασιών, είναι μόρια με κυτταροειδική έκφραση, χαρακτηρίζονται από απορυθμισμένη έκφραση που ακολουθεί ακανόνιστα μοτίβα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένου του γαστρικού καρκίνου και έτσι αποτελούν τους κατάλληλους υποψηφίους για διαγνωστικούς βιοδείκτες για τον καρκίνο του στομάχου. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη ενός lncRNA, του HEAL, για το οποίο υπάρχουν ενδείξεις από βιοπληροφορικά δεδομένα ότι αποτελεί στόχο για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a. Για τη διερεύνηση του προφίλ του μεταγράφου ενδιαφέροντος αρχικά πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τον προσδιορισμό της έκφρασης του σε διάφορες κυτταρικές σειρές, αναλύσεις σχετικά με τον υποκυτταρικό εντοπισμό καθώς και την μεταγραφική σταθερότητά του. Έπειτα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του HEAL σε γαστρικές κυτταρικές σειρές για τις οποίες είχε προηγηθεί σίγηση ή υπερέκφραση των HNF4a & CDX2 προκειμένου να εξεταστεί η απόκριση του HEAL όσον αφορά την έκφραση, στις εν λόγω σιγήσεις / υπερεκφράσεις. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση qPCR σε δείγματα ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης για τους CDX2 και HNF4a, με σκοπό την μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων με τη χρωματίνη του HEAL. Στο τέλος, κατασκευάστηκε ένα εργαλείο παροδικής σίγησης του HEAL, το οποίο στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την καταστολή του σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα.

ABSTRACT

Gastric cancer is a multistage and multifactorial disease, fifth in terms of incidence and one of the most frequent causes of death worldwide. The high mortality rates are mainly consequences of the lack of adequate and reliable diagnostic and prognostic biomarkers. The asymptomatic character of the disease along with the dearth of specific diagnostic biomarkers results in late diagnosis in advanced gastric cancer stages which is accompanied by poor prognosis and weak response to therapeutic treatment approaches. Consequently, it is deemed necessary and urgent the discovery of new molecular biomarkers for the safe, right and specialized diagnosis of the disease. Long non coding RNAs have immense interest as they take part in a large number of fundamental cellular functions, they have cell specific expression, they are characterized by deregulated expression that follows abnormal patterns in many pathological conditions gastric cancer included, thus they are candidate diagnostic biomarkers for gastric cancer. The purpose of this thesis is to study one specific lncRNA, which there are indications from bioinformatic data for, that is target for CDX2 and HNF4a transcription factors. Initially, for the purpose of the transcript's of interest profile investigation, some tests were performed about the expression of HEAL in several cell lines, tests about its subcellular localization as for its transcriptional stability. HEAL expression levels were then determined in HNF4a & CDX2 previously silenced or overexpressed gastric cell lines to examine the expression response of HEAL to said silencing/overexpressions. Subsequently, qPCR analysis was performed on immunoprecipitated chromatin samples for CDX2 and HNF4 α , in order to study the interaction of transcription factors with HEAL chromatin. In the end, a transient silencing tool of HEAL was constructed, which was then used to suppress it in gastric cancer cells.

Περιεχόμενα

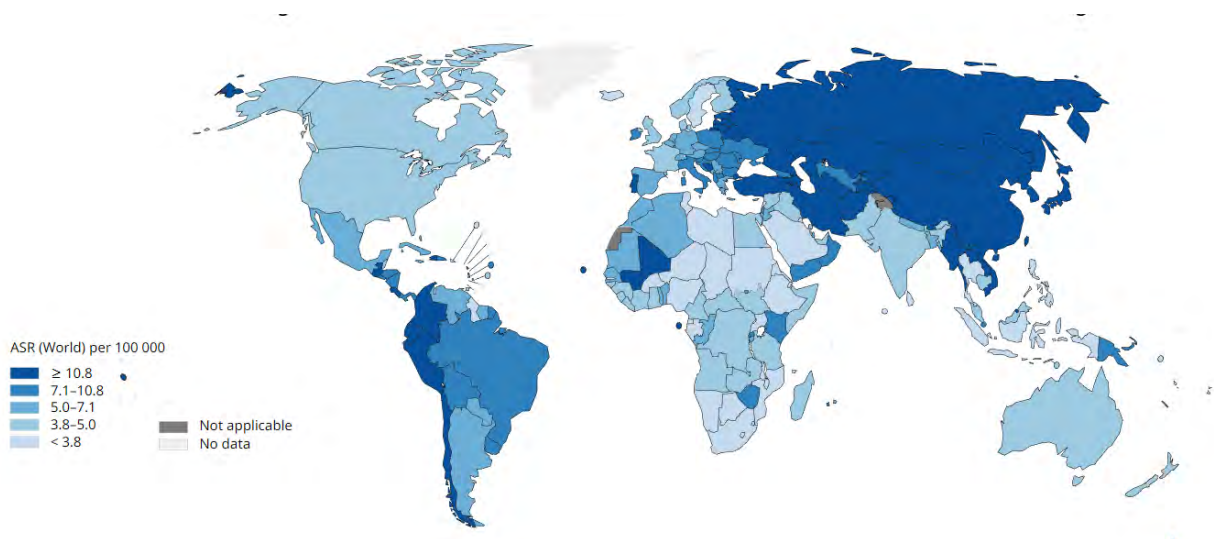
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ο γαστρικός καρκίνος	1
1.1.2 Ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου	2
1.2 Οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 & HNF4a	6
1.2.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2	6
1.2.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a	7
1.3 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs)	10
1.3.1 Χαρακτηριστικά, κατηγοριοποίηση και κυριότερες λειτουργίες των lncRNAs	10
1.3.2 Ο ρόλος των lncRNAs στον καρκίνο και η αξία τους ως βιοδείκτες στο γαστρικό καρκίνο	13
1.3.3 Τα lncRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο	16
2. ΣΚΟΠΟΣ	19
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	20
3.1 Κυτταρικές σειρές	20
3.2 Πλασμιδιακοί φορείς	20
3.3 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	21
3.3 Αντίδραση λιγάσης για shRNA – Υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων shRNA	22
3.4 Αντίδραση λιγάσης για την ενσωμάτωση του ενθέματος shHEAL στον πλασμιδιακό φορέα	22
3.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	23
3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	23
3.7 Διαγνωστική PCR	24
3.8 Απομόνωση RNA (RNA extraction)	25
3.9 Κατεργασία με DNase (DNase treatment)	25
3.10 Σύνθεση cDNA (cDNA synthesis)	26
4. Αποτελέσματα	27
4.1 Χαρακτηρισμός του HEAL	27
4.1.1 Αποτελέσματα qPCR για τη διερεύνηση της έκφρασης του HEAL σε διάφορες κυτταρικές σειρές (cell line expression)	27
4.1.2 Αποτελέσματα qPCR για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HEAL	28
4.1.3 Αποτελέσματα qPCR για τη μετα-μεταγραφική σταθερότητα του HEAL	29
4.2 Επίπεδα έκφρασης του HEAL σε HFE και AGS κύτταρα ύστερα από σίγηση (KD) / υπερέκφραση (OX) των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a	29
4.2.1 Επίπεδα έκφρασης του HEAL ύστερα από υπερέκφραση των CDX2 & HNF4a σε κύτταρα HFE	30

4.2.2 Επίπεδα έκφρασης του HEAL ύστερα από υπερέκφραση των CDX2 & HNF4a σε AGS κύτταρα.....	32
4.2.3 Επίπεδα έκφρασης του HEAL ύστερα από σίγηση των CDX2& HNF4a σε γαστρικές καρκινικές σειρές	33
4.3 Αποτελέσματα ChIP-qPCR για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2.....	35
και HNF4a.....	35
4.4 RNAi σίγηση του HEAL.....	37
4.4.1 Αποτελέσματα διαγνωστικής PCR για την ανίχνευση πλασμιδιακών φορέων με ένθεμα το shRNA ενδιαφέροντος	37
4.4.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης του HEAL μεταγράφου	38
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο γαστρικός καρκίνος

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ο πέμπτος σε συχνότητα εμφάνισης τύπος καρκίνου, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως ισχυρά επιθετικός και ετερογενής. Αναφορικά με την θνησιμότητα, ο γαστρικός καρκίνος είναι ο τρίτος, σε σειρά, πιο θανατηφόρος τύπος καρκίνου. Η διάγνωση της νόσου γίνεται συνήθως σε ηλικίες κατά μέσο όρο 70 ετών και αρκετά σπάνια κάτω από την ηλικία των 45 ετών [1, 2]. Οι άνδρες φαίνεται να είναι περισσότερο πιθανό να εμφανίσουν γαστρικό καρκίνο σε σχέση με τις γυναίκες και μάλιστα συναντάται σε διπλάσιο ποσοστό στα αρσενικά άτομα απ' ότι στα θηλυκά. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά περιβάλλοντα στα οποία εκτίθενται τα δύο φύλα, σε διαφορές στον τρόπο ζωής καθώς στην ύπαρξη ειδικών φύλοεξαρτώμενων ορμονών, οι οποίες εμφανίζονται στα θηλυκά άτομα και έχουν προστατευτικό ρόλο [3] (**Εικόνα 1**). Πέρα από το φύλο, ο γαστρικός καρκίνος φαίνεται να παρουσιάζει και μια γεωγραφική επιδημιολογία καθώς τα περισσότερα περιστατικά γαστρικού καρκίνου καταγράφονται στην ανατολική Ασία, την ανατολική Ευρώπη, την κεντρική αλλά και νότια Αμερική. Από την άλλη μεριά τα μικρότερα ποσοστά της νόσου παρατηρούνται σε χώρες της Αφρικής [2, 4].



Εικόνα 1: Απεικόνιση των ποσοστών εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου και στα δύο φύλλα σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2020 [Ανάκτηση απο World Health Organisation Cancer Today]

Η αιτιολογία του γαστρικού καρκίνου είναι πολυπαραγοντική και η ανάπτυξη της νόσου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τον τρόπο ζωής καθώς και με ορισμένες παθογενείς λοιμώξεις. Ειδικότερα, οι περισσότεροι όγκοι στο στομάχι οφείλονται σε χρόνια φλεγμονή, με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Το ελικοβακτηρίδιο μπορεί να ξεκινήσει την πρόκληση μίας γαστρίτιδας, η οποία μπορεί να καταλήξει σε δυσπλασία [5]. Όμως δεν καταλήγουν όλοι οι πάσχοντες από φλεγμονή στομάχου σε καρκίνο. Αυτό σημαίνει ότι συνυπάρχουν και άλλοι, πιθανώς γενετικοί παράγοντες. Για παράδειγμα, γενετικές ανωμαλίες όπως το hereditary diffuse cancer, το σύνδρομο Peutz – Jeghers ή μεταλλάξεις σε γονίδια όπως *p53*, *BRCA2*, *MSH2*, and *MLH1* ευνοούν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου καρκινικού τύπου. Επιπλέον, σε ελάχιστες

περιπτώσεις ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να έχει κληρονομική αιτιολογία. Επίσης ο ιός Epstein barr σχετίζεται με την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου χωρίς όμως να υπάρχει απόδειξη για τον τρόπο συσχετισμού των δύο [5]. Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου και αφορούν τον τρόπο ζωής είναι οι διατροφικές συνήθειες, η κατανάλωση αλκοόλ καθώς και η παχυσαρκία [6, 7].

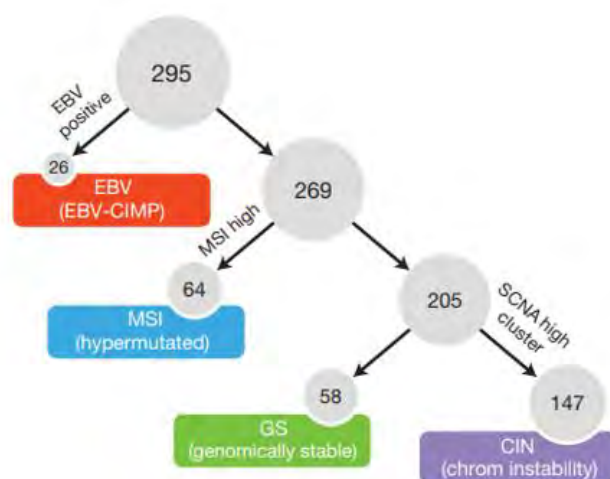
Τα προγνωστικά επιβίωσης μετά τη διάγνωση για όγκο στο στομάχι δεν είναι ιδιαίτερα αισιόδοξα. Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών ύστερα από τη διάγνωση φτάνει έως και τα 5 χρόνια. Το συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο μπορεί να επεκταθεί, ιδίως στην περίπτωση των αναπτυγμένων χωρών όπως για παράδειγμα η Ιαπωνία γεγονός που σχετίζεται με την έγκαιρη διάγνωση στα αρχικά στάδια της νόσου [8]. Φυσικά ο χρόνος της διάγνωσης δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθορίζει την πορεία και την επιβίωση των ασθενών. Άλλα δύο χαρακτηριστικά που λαμβάνονται υπόψη στην περίπτωση αυτή είναι το είδος του καρκινικού όγκου, δηλαδή σε ποια υποκατηγορία καρκίνου του στομάχου ανήκει, η σύσταση του, καθώς και το φύλο, η ηλικία, και η γενικότερη κατάσταση της υγείας του ασθενούς όπως και ο τρόπος ζωής [9].

1.1.2 Ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Υπάρχουν πάρα πολλές κατηγοριοποιήσεις για το γαστρικό καρκίνο. Η πιο κοινή ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του στομάχου είναι αυτή κατά Lauren. Η ταξινόμηση Lauren είναι κατά βάση ιστολογική κατηγοριοποίηση και σύμφωνα με αυτή υπάρχουν δύο υπότυποι γαστρικού καρκίνου: α) Ο εντερικός και β) ο διάχυτος [2][10]. Οι δύο αυτοί υπότυποι διαφέρουν στη μορφολογία, στη βιολογία τους, στην συχνότητα εμφάνισης στα δύο φύλα, στον τρόπο δημιουργίας και ανάπτυξης του όγκου, στις θεραπευτικές προσεγγίσεις, στην πρόγνωση καθώς και στην αιτιολόγησή τους [2, 11]. Τις τελευταίες δεκαετίες η ανάπτυξη των μοριακών τεχνολογιών έχει καταστήσει εφικτή και τη μοριακή υποκατηγοριοποίηση του γαστρικού καρκίνου [12]. Ενώ η ταξινόμηση κατά Lauren δίνει αρκετές απαντήσεις όπως και κατευθυντήριες γραμμές για τη θεραπευτική προσέγγιση και την πρόγνωση των ασθενών, η μοριακή ταξινόμηση των διαφόρων τύπων γαστρικού καρκίνου φωτίζει τα γεγονότα που συμβαίνουν στη βάση των ιστολογικών τροποποιήσεων και βοηθούν στην επιλογή καλύτερης και πιο στοχευμένης εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης [13].

1.1.2.1 Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Στο πλαίσιο της ερευνητικής κοινοπραξίας «Άτλας του καρκινικού γονιδιώματος» (The Cancer Genome Atlas ή TCGA), το 2014, βάσει των αποτελεσμάτων αναλύσεων ομαδοποίησης δεδομένων από δείγματα γαστρικών όγκων 295 ασθενών που προέρχονταν από διαφορετικές περιοχές του κόσμου, ταυτοποιήθηκαν 4 μοριακοί υπότυποι γαστρικού καρκίνου, οι οποίοι περιλαμβάνουν τους εξής (**Εικόνα 2**) [14]:



Εικόνα 2: Η μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου στους τέσσερις υποτύπους του όπως φαίνεται με το παραπάνω διάγραμμα ροής να έχουν ταξινομηθεί οι 295 περιπτώσεις που εξετάστηκαν [14]

Όγκοι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (Epstein-Barr virus, EBV)

Το ποσοστό των καρκίνων που σχετίζονται με ιούς ανέρχεται στο 15 – 20%. Ο Epstein – Barr ιός είναι από τους πρώτους που έχουν περιγραφεί και συσχετιστεί με διάφορους καρκινικούς τύπους συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού καρκίνου [15]. Ασθενείς που διαγιγνώσκονται με αυτού του είδους τον γαστρικό καρκίνο έχουν πρωτύτερα προσβληθεί από τον ιό Epstein Barr και όσον αφορά τις ανατομικές περιοχές του στομάχου στις οποίες εμφανίζεται κυρίως, αυτές είναι το σώμα και ο θόλος. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren, ο θετικός στον Epstein Barr γαστρικός καρκίνος ανήκει στο διάχυτο τύπο [16]. Αυτού του είδους οι όγκοι χαρακτηρίζονται από έντονη μεθυλίωση του DNA σε νησίδες CpG (CpG island methylation phenotype, CIMP) [14]. Επίσης ο EBV-θετικός γαστρικός καρκίνος προκαλεί αλλαγές όχι μόνο σε μεταγραφικό αλλά και σε μεταφραστικό επίπεδο [17]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *CDKN2A* γονιδίου που οδηγεί σε σίγηση του εν λόγω ογκοκατασταλτικού γονιδίου καθώς και η υπερκφραση του γονιδίου κινάση 3 της 4,5 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (*PIK3CA*) [18, 19]. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική διαφοροποίηση, τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του μεταβολισμού, της σύνθεσης των πρωτεϊνών, στην αγγειογένεση και το μηχανισμό της απόπτωσης [20, 21]. Έχει βρεθεί ο, τι οι μεταλλάξεις στο *PIK3CA* σχετίζονται σημαντικά με τα PD-L1 και PD-L2 (Programmed Death Ligands) [22]. Αυτά οι προσδέτες λειτουργούν ως μέσα επικοινωνίας και αλληλεπίδρασης του PD-1 (Programmed death-1), ενός υποδοχέα που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των Τ και Β λεμφοκυττάρων [23]. Στον καρκίνο, η υπερέκφραση των programmed death προσδετών επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν της επιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος [22, 24].

Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI)

Ο γαστρικός καρκίνος με αστάθεια μικροδορυφόρων εντοπίζεται κυρίως στο άντρο και τον πυλωρό του στομάχου και θεωρείται εντερικού τύπου καρκίνος κατά Lauren. Φαίνεται να εμφανίζεται κυρίως σε θηλυκά άτομα σε μεγάλες ηλικίες, δηλαδή κατά μέσο όρο τα 72 έτη, έχει καλύτερα προγνωστικά επιβιώσής από τους υπόλοιπους τύπους και διαγιγνώσκεται σε πρωτότερα στάδια της νόσου συγκριτικά με τους υπόλοιπους υπότυπους [25, 26]. Ο συγκεκριμένος υπότυπος γαστρικού καρκίνου χαρακτηρίζεται από έντονες και πολυάριθμες μεταλλάξεις όπως και έντονη υπέρμεθυσή [14]. Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται ως σειρά 1-6 νουκλεοτιδίων που βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα σε θέσεις που είναι εξαιρετικά επιρρεπείς σε μεταλλάξεις και έχουν προκύψει από τη μη σωστή λειτουργία του μηχανισμού επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων του DNA [27]. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων του DNA λειτουργεί με τη βοήθεια των ενζύμων MutL homolog 1 (MLH1), MutL homolog 3 (MLH3), MutS homolog 2 (MSH2), MutS homolog 3 (MSH3), MutS homolog 6 (MSH6), post meiotic segregation increased 1 (PMS1) και post meiotic segregation increased 2 (PMS2). Ακόμα και ένα από τα παραπάνω ένζυμα να μη μπορέσει να επιτελέσει για οποιονδήποτε λόγο το σκοπό του τότε ο μηχανισμός επιδιόρθωσης αποτυγχάνει να κάνει τις απαραίτητες διορθώσεις [28]. Συνήθως ο μηχανισμός λειτουργεί ανεπαρκώς λόγω μεταλλάξεων ή λόγω της σίγησης γονιδίων που κωδικοποιούν κάποιο από τα ένζυμα που αναφέρθηκαν παραπάνω και στα οποία ο μηχανισμός στηρίζεται για την ορθή λειτουργία του. Για παράδειγμα, η σίγηση του γονιδίου που κωδικοποιεί το MutL homolog 1 (MLH1) λόγω υπέρμεθυσής του υποκινητή του είναι ένα από τα μοριακά αίτια εκδήλωσης αυτού του υπότυπου [29, 30].

Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability, CIN)

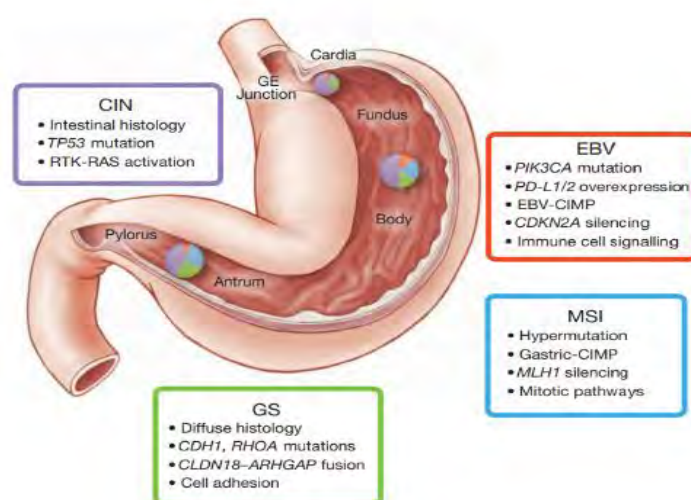
Ο χρωμοσωμικά ασταθής γαστρικός καρκίνος αφορά υπότυπο γαστρικού εντερικού καρκινώματος και μάλιστα ο πιο συνηθισμένος απ' τους τέσσερις μοριακούς υποτύπους που συναντάται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου [31]. Αυτός ο υπότυπος εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή της γαστροοισοφαγικής συμβολής της καρδιάς και του στομάχου και χαρακτηρίζεται από ανευπλοϊδία [32]. Στο CIN τύπο συναντάται η μετάλλαξη στο *TP53* γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η μετάλλαξη αυτή ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι RTK/RAS/MAPK, ευνοεί τις μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς κινασών τυροσίνης όπως είναι οι RTKs ενώ ενισχύει και πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου όπως για παράδειγμα η κυκλίνη E1(Cyclin E1), η κυκλίνη D1(Cyclin D1) και η εξαρτώμενη από την κινάση 6 κυκλίνη (Cyclin dependent kinase) [33, 34]. Επιπλέον παρατηρείται αύξηση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι RTK/RAS/MAPK όπως για παράδειγμα τον υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR), ή τον ενδοθηλιακό αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – VEGFR). Οι τροποποιήσεις στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τη διαφοροποίηση, την κυτταρική απόπτωση & προσκόλληση αλλά και στη μετανάστευση των κυττάρων [35].

Όγκοι με γονιδιωματική σταθερότητα (genetically stable, GS)

Ο γαστρικός καρκίνος με γονιδιωματική σταθερότητα παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον διάχυτο τύπο καρκίνου κατά Lauren και μάλιστα καταλαμβάνει τα μεγαλύτερα ποσοστά διάχυτου τύπου καρκίνου. Ο GS γαστρικός καρκίνος διαθέτει συγκεκριμένη μοριακή

υπογραφή αλλά επειδή οι χαρακτηριστικές του μεταλλάξεις συναντώνται σε αρκετά μικρά ποσοστά και εντοπίζονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα, συνοδεύεται από αρκετά φτωχή πρόγνωση [36]. Ο συγκεκριμένος τύπος συσχετίζεται πρωτίστως με μεταλλάξεις στο *CDH1*, ένα όγκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E – καδερίνη που εμπλέκεται σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως για παράδειγμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική προσκόλληση, η επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση και η πολικότητα του κυττάρου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1* προάγουν την ογκογένεση [37]. Επιπλέον, ένα ακόμη βιομόριο που σχετίζεται με τον GS τύπο είναι το ένζυμο RHOA που ανήκει στην οικογένεια των RHO GTPase ενζύμων και η έκφραση του στο γαστρικό καρκίνο έχει και προγνωστική αξία. Το ένζυμο RHOA εμπλέκεται σε σημαντικές διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου όπως για παράδειγμα στη διατήρηση του κυτταροσκελετού, στη μετανάστευση των κυττάρων καθώς και στην κυτταρική προσκόλληση [38]. Τέλος, η σύντηξη των γονιδίων *CLDN18-ARHGAP* αφορά μια μετάλλαξη που συναντάται στο διάχυτο τύπο καρκίνου. Η σύντηξη των δύο γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του επιθηλιακού χαρακτήρα των κυττάρων, τη μετατροπή της ταυτότητας των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά όπως και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε γειτονικούς ιστούς [39-41].

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των τεσσάρων μοριακών τύπων γαστρικού καρκίνου συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 3**):

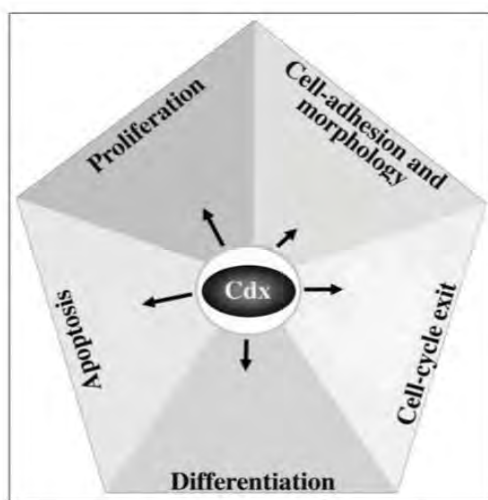


Εικόνα 3: Τα κυριότερα χαρακτηριστικά και οι συνηθέστερες θέσεις εμφάνισης των μοριακών τύπων γαστρικού καρκίνου, καρκίνος θετικός στον ιό Epstein Barr (EBV), καρκίνος με αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI), καρκίνος χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN), γονιδιωματικά σταθερός καρκίνος (GS) [14]

1.2 Οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 & HNF4a

1.2.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2

Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 είναι μια πρωτεΐνη της οικογένειας των ομοιοτικών πρωτεϊνών που στα τρωκτικά κωδικοποιείται από το ομοιοτικό γονίδιο *Cdx2* και διαθέτει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οργανισμών. Ο CDX2 εκφράζεται κυρίως στο ενδόδερμα του εντερικού επιθηλίου. Στο γονιδίωμα των θηλαστικών περιέχονται τρία γονίδια, τα *Cdx1*, *Cdx2* και *Cdx4* τα οποία σχηματίζουν την οικογένεια ουραίου τύπου με ομοιοτικό πλαίσιο (homeobox genes of the caudal family). Τα γονίδια homeobox κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής και συμμετέχουν στις διαδικασίες της κυτταρικής ανάπτυξης & μορφολογίας, της κυτταρικής διαφοροποίησης, της εμβρυϊκής ανάπτυξης, της κυτταρικής απόπτωσης, της κυτταρικής προσκόλλησης καθώς και της εξόδου από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (cell cycle exit) (**Εικόνα 4**) [42, 43].



Εικόνα 4: Οι κυτταρικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται τα *cdx* γονίδια [43]

Η έκφραση των γονιδίων αυτών ξεκινά κατά την εμβρυϊκή περίοδο σε εμβρυϊκούς ιστούς και συγκεκριμένα στο στάδιο της γαστρίδωσης ενώ η μείωση της έκφρασής τους ακολουθεί λίγο αργότερα κατά την εξέλιξη της κυοφορίας [44]. Παρόλα αυτά στο επιθήλιο του εντέρου φαίνεται πως η έκφραση των *Cdx1* και *Cdx2* γονιδίων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της εντερικής οδού καθώς και για την ομαλή λειτουργία του εντερικού επιθηλίου των ενηλίκων [45, 46]. Ο CDX2 μεταγραφικός παράγοντας είναι ο κύριος ρυθμιστής της ταυτότητας του εντερικού επιθηλίου και εγκαθιδρύει τον εντερικό φαινότυπο τον οποίο και διατηρεί. Απόδειξη για την σημασία που έχει ο CDX2 για το εντερικό επιθήλιο μπορεί να αποτελέσει το γεγονός της μετα-διαφοροποίησης από εντερικό σε γαστρικό ενδόδερμα στην περίπτωση απώλειας ενός αλληλόμορφου του *Cdx2* στα έμβρυα [47, 48]. Η ακανόνιστη έκφραση γονιδίων όπως το *Cdx2* είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [49].

1.2.1.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 στο γαστρικό καρκίνο

Ο μηχανισμός παθογένεσης του γαστρικού καρκίνου φέρει πολλά ερωτηματικά και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά είναι γνωστό πως είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία που ξεκινά με εντερική μεταπλασία και δυσπλασία η οποία οδηγεί σε γαστρίτιδα, ατροφία και τελικά γαστρικό καρκίνο [50]. Η μόλυνση με το *Helicobacter pylori* μπορεί να αποτελέσει παθολογικό έναυσμα για τη γαστρίτιδα, ενώ έχει αποδειχθεί ότι το μοριακό έναυσμα για την εντερική διαφοροποίηση στο γαστρικό περιβάλλον είναι η έκτοπη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 [50-52]. Ο CDX2 εκφράζεται φυσιολογικά στο έντερο και όχι στο στομάχι ή σε άλλους ιστούς. Η παρεκκλίνουσα έκφρασή του σε άλλους ιστούς είναι δείγμα διαφοροποίησης των κυττάρων σε εντερικού τύπου φαινότυπο, γεγονός που αποδεικνύει τον ογκοεπαγωγικό της ρόλο στο γαστρικό καρκίνο. Από την άλλη μεριά υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της έκτοπης έκφρασης του CDX2 στο γαστρικό καρκίνο, αφού φάνηκε πως η έκφρασή εντοπίζεται στα αρχικά στάδια γαστρικού καρκίνου εντερικού υπότυπου και περιορίζεται σημαντικά καθώς ο όγκος εξελίσσεται σε γαστρικό καρκίνο πιο προχωρημένου σταδίου. Άξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός της ακριβέστερης πρόγνωσης ασθενών στην περίπτωση του ογκοκατασταλτικού ρόλου της έκτοπης έκφρασης του CDX2 εξαιτίας του εντοπισμού της έκτοπης έκφρασης στα αρχικά στάδια του γαστρικού καρκίνου [43, 47, 50, 53-60].

1.2.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a

Ο πυρηνικός παράγοντας ηπατοκυττάρων 4a (Hepatocyte Nuclear factor a, HNF4a), είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptor, NR) και εκφράζεται σε επιθηλιακούς ιστούς που προέρχονται από το ενδόδερμα, όπως είναι στο έντερο, το ήπαρ, το πάγκρεας και το στομάχι [61]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον HNF4a διαθέτει δύο υποκινητές, τους P1 & P2, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλαπλές διαφορετικές ισομορφές του HNF4a λόγω της ύπαρξης των δύο υποκινητών σε συνδυασμό με το εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου που παράγεται [62, 63].

Η έκφραση του *HNF4a* είναι ιστοειδική και καθορίζεται από το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού. Πιο ειδικά, ο HNF4a που προκύπτει από την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου με υποκινητή τον P1 εντοπίζεται στο ήπαρ και τους νεφρούς εμβρύων και ενήλικων ατόμων ενώ αυτός που προκύπτει από την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου με υποκινητή τον P2 εντοπίζεται στο πάγκρεας και το ήπαρ των εμβρύων καθώς και στο στομάχι των ενηλίκων. Εξαιρέση σε αυτό με τους υποκινητές αποτελεί η έκφραση του στο παχύ και το λεπτό έντερο, δηλαδή σε αυτούς τους ιστούς ο HNF4a εκφράζεται ανεξάρτητα από τον υποκινητή του γονιδίου [64]. Οι διαφορετικές ισομορφές του HNF4a διαφέρουν στις λειτουργίες που επιτελούν καθώς και στον τρόπο που μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με το DNA και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [65-67].

Ο HNF4 είναι υπεύθυνος για τη διαφοροποίηση και εξειδίκευση των κυττάρων σε εντερικό επιθήλιο καθώς και της διατήρησης της ομοιόστασης αυτού. Επιπλέον παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του εντέρου όπως και στην αρχιτεκτονική του εντερικού επιθηλίου [68]. Επιτελεί πολλές από τις λειτουργίες του σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες με τους οποίους συνεργάζεται. Σημαντικός είναι ο ρόλος του και στην έκφραση γονιδίων που είναι άσχετα με τους συνεργαζόμενους μεταγραφικούς αλλά ιδιαίτερα σημαντικά για την ομοιόσταση και τη λειτουργία των ιστών. Τέλος, ο HNF4 καθορίζει την κυτταρική ταυτότητα και σε άλλα ενδοδερμικά όργανα εκτός από το παχύ

έντερο όπως για παράδειγμα το πάγκρεας και το λεπτό έντερο και συμβάλλει στη διατήρηση του κιρκάδιου ρυθμού (circadian rhythmicity) [62].

1.2.2.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a στο γαστρικό καρκίνο

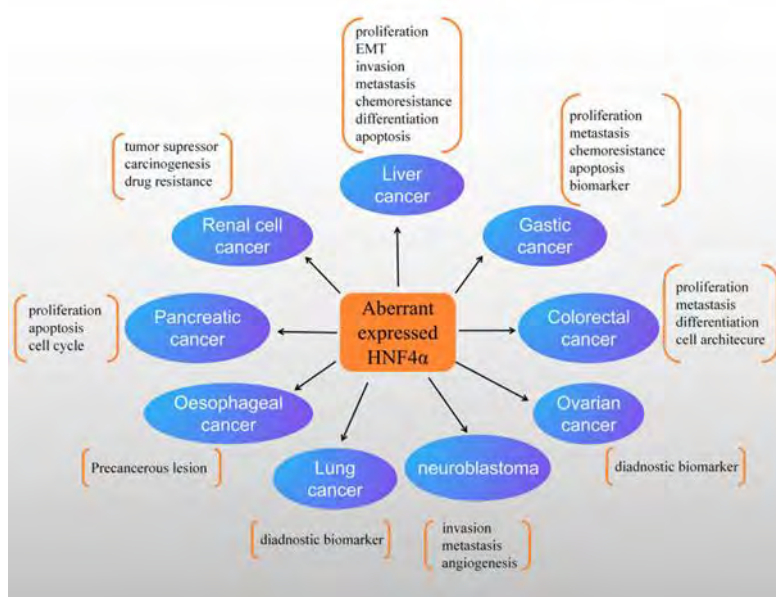
Η έντονη έκφραση του HNF4a στα αρχικά στάδια του καρκίνου του στομάχου συνάδει με τις ογκοεπαγωγικές ιδιότητες του HNF4a [69]. Το *HNF4a* έχει χαρακτηριστεί ως “πρωτο-ογκογονίδιο” (“proto-oncogene”) και αντίστοιχα ο HNF4a ως ογκοπρωτεΐνη, όσον αφορά την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου. Φαίνεται πως εκφράζεται εξαιρετικά έντονα σε γαστρικούς καρκινικούς ιστούς και έχει συσχετιστεί με το σχηματισμό κακοήθων όγκων, τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και με τη διήθηση σε γειτονικούς ιστούς. Πρόκειται για γεγονότα που αποδεικνύονται με πειράματα σίγησης του HNF4a που είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, τον περιορισμό της μετάστασης και της διήθησης, την επιβράδυνση της ανάπτυξης του καρκινικού όγκου *in vivo* καθώς και την αναστολή της αγγειογένεσης στον όγκο [70, 71]. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του HNF4a είναι ότι δρα ως ρυθμιστής στη μετάβαση από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά κύτταρα (EMT transition). Κατά τη διαδικασία αυτή συμβαίνει η μεταδιαφοροποίηση (transdifferentiation) των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά και αυτό διευκολύνει τη μετανάστευση του καρκίνου μέσω των αγγείων του αίματος αλλά και μέσω των λεμφικών αγγείων συνεισφέροντας στη μετανάστευση των διάφορων τύπων καρκίνου. Έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να έχει είτε ογκοεπαγωγικές, είτε ογκοκατασταλτικές ιδιότητες. Η έκτοπη έκφραση του HNF4a είναι ενδεικτική καρκίνου με τον HNF4a να επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες στις περιπτώσεις ογκοεπαγωγής ή ογκοκαταστολής. Για παράδειγμα ενώ σε πολλούς τύπους καρκίνου η υπερέκφραση του HNF4a φέρνει κατασταλτικά αποτελέσματα για τους όγκους, αυτό δεν συμβαίνει στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου. Στον GC (gastric cancer, GC) η αυξημένη έκφραση του HNF4a έχει ογκοεπαγωγικό ρόλο. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι η υπερβολική έκφραση του HNF4a λειτουργεί ως καρκινοειδική υπογραφή (cancer specific signature) και συσχετίζεται με κλινικά χαρακτηριστικά καρκινικών ιστών [72].

Φαίνεται πως αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες συμμετέχουν σε ομάδες μεταγραφικών παραγόντων που συνεργάζονται και ρυθμίζουν διάφορα γονίδια αλλά και ολόκληρες κυτταρικές λειτουργίες σε διάφορους ιστούς. Ανάλογα τον τύπου του ιστού υπάρχει η ανάλογη ομάδα ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων που ενεργεί κατάλληλα [73]. Οι HNF4a και CDX2 φαίνεται να συσχετίζονται θετικά. Αυτό είναι μια διαπίστωση που προκύπτει από πειράματα συνδυασμού της έκφρασης των δύο αυτών μεταγραφικών και οδηγεί στο συμπέρασμα της μεταξύ τους συσχέτισης [74]. Πιο συγκεκριμένα, ιδιαίτερα στην περίπτωση του εντερικού επιθηλίου φαίνεται πως ο HNF4a ρυθμίζει την έκφραση του CDX2 αλλά αναλαμβάνει και την δική του αυτορύθμιση, κάτι που ισχύει αντίστοιχα και για τον CDX2, δηλαδή οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες αυτορυθμίζονται και ρυθμίζουν ο ένας τον άλλον ενώ ταυτόχρονα ανήκουν σε ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα τους GATA 4/5/6, TCF7L2, που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του εντερικού επιθηλίου [75]. Ο HNF4a ενδέχεται επίσης να εμπλέκεται στη ρύθμιση της φλεγμονής και στη ρύθμιση του γονιδίου *CCL15*. Το *CCL15* έχει αναγνωριστεί ως γονίδιο στόχος για τον HNF4a. Πρόκειται για ένα γονίδιο που βοηθά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων καθώς εντοπίζεται έντονα σε καρκινικούς ιστούς και συγκεκριμένα στον καρκίνο του στομάχου. Έχει αποδειχθεί ότι η *CCL15* σχετίζεται θετικά με τον HNF4a στις περιπτώσεις πολλών ασθενών [69]. Σε μοριακό επίπεδο ο HNF4a είναι στόχος για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στον γαστρικό καρκίνο όπως για παράδειγμα GATA4 και KLF5. Έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει πολλά γονίδια που εμπλέκονται σε μεταβολικές διεργασίες και μονοπάτια με αποτέλεσμα να

συνεισφέρει στη διαμόρφωση μεταβολικού εδάφους που είναι έφορο για την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου όπως για παράδειγμα το γονίδιο *IDH1*, που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του καρκίνου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η έκφραση του *IDH1* είναι αρκετά υψηλή σε όγκους πλούσιους σε HNF4a σε σχέση με υγιείς ιστούς και δείγματα, γεγονός που δείχνει πως αυτή η σχέση HNF4a & *IDH1* ενδεχομένως έχει κάποιο ρόλο στο γαστρικό καρκίνο. Επιπρόσθετα ο HNF4a έχει συσχετιστεί και με το *ITLN1* που είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο και φαίνεται να σχετίζεται με καλή πρόγνωση [76].

Η ιστοειδικότητα που φαίνεται να χαρακτηρίζει τον HNF4a φανερώνει ότι ανήκει στα ογκογονίδια κυτταρικής γενεαλογίας (lineage survival oncogenes) για τα οποία παρατηρείται ότι ορισμένες ιδιότητες που έχουν σε φυσιολογικούς ιστούς τροποποιούνται στην περίπτωση γαστρικού καρκίνου κατά τρόπο ώστε να υποβοηθούν την ανάπτυξη του όγκου. Λόγω της ιστοειδικότητας που χαρακτηρίζει την έκφραση του HNF4a, η αντίστοιχη πρωτεΐνη έχει προταθεί ως βιοδείκτης για διαχωρισμό του γαστρικού καρκίνου από άλλους τύπους [76].

Ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών αποτελεσμάτων της διεθνούς βιβλιογραφίας συνηγορεί στην καταλληλότητα του HNF4a ως προγνωστικού και διαγνωστικού δείκτη στον γαστρικό καρκίνο, εφόσον συσχετίζεται άμεσα με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και μετάσταση καρκινικών κυττάρων (**Εικόνα 5**) [77].



Εικόνα 5: Βιολογικές λειτουργίες και πιθανές κλινικές εφαρμογές του NF4a στον καρκίνο. [72]

Από την άλλη μεριά κάτι τέτοιο παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες κυρίως επειδή ακόμη δεν είναι απόλυτα κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο ο HNF4a επιτελεί ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά το ρυθμιστικό του ρόλο στα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια της παθοφυσιολογίας των καρκινικών όγκων [72]. Αντί αυτών, έχουν προταθεί ως προγνωστικοί, διαγνωστικοί αλλά και θεραπευτικοί βιοδείκτες για τον γαστρικό καρκίνο τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non coding RNAs ή lncRNAs) τα οποία ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω αλλά εμφανίζουν έντονη ιστοειδική αλλά και καρκινοειδική έκφραση και λειτουργία [78].

1.3 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs)

1.3.1 Χαρακτηριστικά, κατηγοριοποίηση και κυριότερες λειτουργίες των lncRNAs

Τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα είναι προϊόντα μεταγραφής αλληλουχιών DNA για τις οποίες δεν ακολουθεί η μετάφρασή τους, δηλαδή η παραγωγή πρωτεϊνών. Αντιστοιχούν στο μεγαλύτερο ποσοστό του μεταγραφώματος, σε φυσιολογική κατάσταση και συνοδεύονται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενώ χαρακτηρίζονται από χαμηλή εξελικτική συντήρηση [79, 80]. Ανάλογα με το μήκος τους διακρίνονται σε μικρά (<200 νουκλεοτίδια) και μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (>200 νουκλεοτίδια) [81]. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs περιγράφηκαν για πρώτη φορά κατά την διάρκεια αλληλούχησης μεγάλης κλίμακας ολόκληρων cDNA βιβλιοθηκών ποντικών και αρχικά θεωρήθηκαν ως άχρηστος μεταγραφικός θόρυβος που αποδόθηκε στη χαμηλή πιστότητα της RNA πολυμεράσης [82]. Τα μόρια αυτά, που είναι γνωστά και ως long non coding RNAs ή lncRNAs, ομοιάζουν αρκετά στα mRNAs καθώς υπόκεινται και αυτά σε εναλλακτικό μάτισμα, έχουν 3' πολύ-αδενυλιωμένα άκρα (poly(A) tail), διαθέτουν 5' κάλυπτρα και μεταγράφονται κυρίως από την RNA πολυμεράση II [83-85].

Οι ποικίλες λειτουργίες των lncRNA είναι ευθεία συνάρτηση της ενδοκυτταρικής θέσης εντοπισμού τους [86]. Με άλλα λόγια, το υποκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο δραστηριοποιούνται είναι ενδεικτικό και του λειτουργικού τους ρόλου μέσα στο κύτταρο. Ανάλογα το υποκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο μπορεί να δραστηριοποιείται ένα lncRNA, αυτό μπορεί να ρυθμίζει είτε άμεσα είτε έμμεσα την έκφραση γονιδίων. Όσον αφορά την άμεση ρύθμιση αυτό γίνεται με επίδραση στις τροποποιήσεις της χρωματίνης ύστερα από σύνδεση με πρωτεΐνες που έχουν ρόλο ρυθμιστή χρωματίνης ή ρυθμίζοντας το μάτισμα και την σταθερότητα των mRNA [87, 88].

Όσον αφορά την έμμεση ρύθμιση αυτή μπορεί να αφορά την εμπλοκή των lncRNA σε μεταγραφικούς ή μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς έκφρασης γονιδίων ύστερα από συνεργασία με άλλα RNAs και πρωτεΐνες [89]. Τα lncRNA εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, ενώ κάποια μετάγραφα μπορεί να βρίσκονται και στα εξωσώματα [86, 90]. Στην πλειοψηφία τους τα lncRNAs είναι πυρηνικά και έχουν μελετηθεί περισσότερο σε σχέση με τα κυτταροπλασματικά [87, 88, 91]. Σχετικά με τα πυρηνικά μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, αυτά συμμετέχουν σε διεργασίες που σχετίζονται με τον πυρήνα όπως για παράδειγμα η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με τη συμμετοχή τους σε διάφορους μηχανισμούς μεταγραφικών, επιγενετικών ή μετά-μεταφραστικών ρυθμίσεων, η επεξεργασία των πρώιμων mRNA μορίων, το εναλλακτικό μάτισμα καθώς και η διαδικασία της μεταγραφής [86, 92-94]. Επιπρόσθετα, τα πυρηνικά lncRNAs μπορούν να προκαλέσουν τη σίγηση σε μεταγραφικό επίπεδο γονιδίων στόχων αλλά και την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων [87, 88, 95].

Αναφορικά με τα lncRNAs του κυτταροπλάσματος έχει αποδειχτεί ότι όσα εντοπίζονται εκεί είναι επειδή συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα. Ειδικότερα, παράδειγμα μπορούν να αποτελέσουν ο έλεγχος της σταθερότητας και της μετάφρασης των mRNA. Όσον αφορά τη σταθερότητα, αυτή επιτυγχάνεται ύστερα από τη δημιουργία lncRNA συμπλόκων με μόρια mRNA προκειμένου να προστατεύσουν τα δεύτερα από microRNAs που τα στοχεύουν και μπορεί να προκαλέσουν αρνητική ρύθμιση της έκφρασής τους μέσω αποδόμησης, ενώ ο έλεγχος

της μετάφρασης είναι αποτέλεσμα σύνδεσης των lncRNA στα mRNAs προκαλώντας έτσι την επιστράτευση ριβοδεσμευόμενων πρωτεϊνών (RNA-binding proteins ή RBPs) που καταστέλλουν την μετάφραση ή αποτελούν έναυσμα για να ξεκινήσει η μετάφραση. Αναφορικά με τη δράση των lncRNA στις πρωτεΐνες αξίζει να σημειωθεί ότι επηρεάζουν σημαντικά τη σταθερότητά τους καθώς επιδρούν στην έκφρασή τους ελέγχοντας μονοπάτια πρωτεϊνικής αποικοδόμησης με διευκόλυνση ή παρεμπόδιση της μηχανής ουβικιτίνης – πρωτεάσωματος (ubiquitin/proteasome machinery) [86, 96]. Επιπλέον, υπάρχουν πολλά στοιχεία που συνηγορούν στο γεγονός ότι τα κυτταροπλασματικά lncRNAs επιτελούν τους παραπάνω ρόλους χάρη στην ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με ποικίλες δομικές και λειτουργικές ιδιότητες [91]. Από την άλλη μεριά μπορεί να έχουν και ιδιότητες που βλάπτουν τα κύτταρα όπως για παράδειγμα η διευκόλυνση της εξέλιξης αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα ή η αρνητική ρύθμιση των στόχων του p53 [97-99].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως ο εντοπισμός των βιομορίων αυτών είναι μια δυναμική διαδικασία πράγμα που σημαίνει ότι ένα μη κωδικοποιητικό μετάγραφο που εντοπίζεται για παράδειγμα στον πυρήνα σε ιδιαίτερες συνθήκες (παραδείγματος χάριν βλάβης του γενετικού υλικού) μπορεί να βρεθεί στο κυτταρόπλασμα [100]. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των μορίων είναι ύψιστης σημασίας για την κατανόηση του λειτουργικού ρόλου ενός μορίου και κατ' επέκταση των βιολογικών διεργασιών στις οποίες εμπλέκεται.

Λειτουργικά, τα lncRNAs παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία γεγονόσ που εξηγεί και τους πολλαπλούς ρόλους που αναλαμβάνουν σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως για παράδειγμα είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο, η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA καθώς και η διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας [79]. Τα lncRNAs έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση καθοδικών γονιδίων στόχων τα οποία ελέγχουν με ποικίλους τρόπους (**Εικόνα 6**)

LncRNAs	Localization	Potential Targets	Functions
PANDAR	Nuclear	NF-YA	Inhibition of apoptotic genes expression
PANDAR	Nuclear	PTBP1	Splicing regulation
LEENE	Nuclear	Recruitment of RNAPII to the promoter	Enhancement of eNOS transcription
Kcnq1ot1	Nuclear	G9a of histone methyltransferase	Silence of genes related to mouse placenta development
TUG1	Nuclear	CBX4 and E2F1 sumoylation	Activation of growth control genes
MALAT1/NEAT2	Nuclear	CBX4 and E2F1 sumoylation	Activation of growth control genes
NORAD	Cytoplasm	PUMILIO	Maintenance of genome stability
DANCR	Cytoplasm	miR-496	Modulation of mTOR expression
PINT1/TUG1	Cytoplasm	P53	Negatively regulation of p53 targets
MALAT1	Nuclear	Unknown	Alternative splicing regulation

Εικόνα 6: Οι διάφοροι ρόλοι των lncRNA κατά τη ρύθμιση της μεταγραφής [79]

Πιο συγκεκριμένα, τα lncRNAs μπορούν να συγκεντρώνουν τις κατάλληλες πρωτεΐνες (μεταγραφικούς παράγοντες) της μεταγραφικής μηχανής προσελκύοντας και την RNA πολυμεράση II, στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων όπως επίσης μπορούν αλληλοεπιδρώνοντας με ειδικούς παράγοντες να οδηγούν στην επιλογή συγκεκριμένων υποκινητών από τις RNA πολυμεράσες [82]. Άξια αναφοράς αποτελεί η ικανότητα των lncRNAs να συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής *in cis* είτε *in trans* [101]. Η συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση λαμβάνει υπόψιν τη θέση του γενετικού τόπου του

lncRNA ως προς το γονίδιο στόχο σύμφωνα με την οποία τα *cis* δραστικά lncRNA εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γειτονικών τους γονιδίων ενώ τα *trans* δραστικά ρυθμίζουν την έκφραση πολλαπλών καθοδικών στόχων σε ολόκληρο το γονιδίωμα [102, 103].

Τα lncRNAs συμμετέχουν και στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση που ακολουθεί τη διαδικασία της μεταγραφής. Ειδικότερα, η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν συμπληρωματικές αλληλουχίες τους επιτρέπει να συμμετέχουν σε αρκετά στάδια των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων στις οποίες υπόκεινται τα mRNAs, από το μάτισμα και τη μεταφορά τους από το ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα σε ένα άλλο μέχρι τη μετάφραση και την τελική αποικοδόμησή τους [93, 94, 104]. Κατά την διαδικασία της μετάφρασης έχουν το ρόλο ρυθμιστή αυτή τη φορά όμως για την έκφραση και τη λειτουργία των μεταφραστικών παραγόντων, μια συνθήκη η οποία έχει άμεσα αντίκτυπο στην μετάφραση των mRNA μορίων [86].

Αξίζει επίσης να επισημανθεί και η ικανότητα τους να εμπλέκονται στις επιγενετικές αλλαγές. Αυτό το καταφέρνουν επιστρατεύοντας σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης σε διάφορες περιοχές του γενετικού υλικού με αποτέλεσμα να κάνουν κάθε φορά τις ίδιες περιοχές λιγότερο ή περισσότερο προσβάσιμες στην RNA πολυμεράση αλλά και να διευκολύνουν ή δυσχεραίνουν τη διαδικασία μεθυλίωσης των ιστονών. Μπορούν επίσης να προκαλούν την παύση της μεταγραφής ύστερα από επιστράτευση κατάλληλων μορίων, για παράδειγμα του PRC2 (Polycomb chromatin remodelling complex) στην περίπτωση του HOTAIR, και την μετατροπή της κατάστασης της χρωματίνης από προσβάσιμη και πιο ανοιχτή σε μη προσβάσιμη, μη ενεργή. Άλλα lncRNA, όπως για παράδειγμα το Xist, χρησιμοποιούν μηχανισμούς όπως ο siRNA ώστε να επιτευχθεί αυτή η μη ενεργή χρωματινική μορφή [82].

Τελευταία αλλά εξίσου σημαντική με τις προαναφερθείσες και η ιδιότητα τους να ανταποκρίνονται στις βλάβες του γενετικού υλικού καθώς έχουν ενεργό ρόλο στις διαδικασίες διόρθωσης και αποκατάστασης τους. Ειδικότερα, έχει αναγνωριστεί μεγάλος αριθμός lncRNAs τα οποία λαμβάνουν δράση στην επιδιόρθωση βλαβών όπως για παράδειγμα μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις, αλκυλιώσεις βάσεων, λανθασμένα ζευγαρωμένες βάσεις (base mismatch) και άλλες βλάβες οι οποίες σε περίπτωση μη έγκαιρης διόρθωσής τους οδηγούν τα κύτταρα σε καρκίνο ή ακόμα ακόμα και σε θάνατο. Έχουν αναφερθεί παραδείγματα lncRNAs (**Εικόνα 7**) που συνεργάζονται με πρωτεϊνικά σύμπλοκα για την αντιμετώπιση των βλαβών, παρόλα αυτά οι μηχανισμοί που υπαγορεύουν αυτές τις διαδικασίες παραμένουν ακόμα υπό μελέτη και εξερεύνηση [105, 106].

lncRNA	Localization	Potential Targets	Roles
NORAD	Cytoplasm	TOP1, RBMX, UMIJ10	Contribution of maintaining genomic stability
LINC00261	Nucleus	ATM kinase, TOP2A	Activation of the DNA damage response
Meg3	Nucleus	Mdm2, PTBP3	Regulation of DNA damage response
DNM3OS	Exosome	PDGFRβ / PDGFRβ / FOXO1	Regulation of DNA Damage Response
LINP1	Cytoplasm	Ku80, DNA-PKcs	Facilitation of DNA damage repair by NHEJ pathway
TODRA	Nucleus	RAD51	Enhancement of RAD51-dependent DSB repair
DDSR1	Nucleus	BRCA1 and hRNPUL1	Modulation of DNA repair by HR
JADE	Cytoplasm	Histone H4	Induction of histone H4 acetylation in the DDR
DINO	Nucleus	RRM2b, DDB2	Regulation of p53-dependent DNA damage response
CUPID1	Nucleus	Phosphorylated RPA	Modulation of the Response to DNA Damage
LIRRI	Nucleus	KU70, KU80, and RAD50	Mediation of DDR and DNA damage repair
TP53TG1	Cytoplasm	PI3K/AKT signal pathways	Contribution of the p53 response to DNA damage
ERIC	Cytoplasm	E2F1, E2F3	Modulation of the cellular response to DNA damage
TERRA	Nucleus	TRF2, Suv39h1, ORC1	Telomere maintenance and genome stability

Εικόνα 7: Παραδείγματα lncRNAs που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA [79]

Τα lncRNA παρουσιάζουν ιστοειδότητα, κυτταροειδικότητα και η έκφρασή τους απορρυθμίζεται ακολουθώντας ασυνήθιστα μοτίβα, σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως για παράδειγμα ο καρκίνος. Έχουν αναγνωριστεί lncRNAs τα οποία συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ανοσολογικού μικρο-περιβάλλοντος του όγκου (tumor immune microenvironment) όπως για παράδειγμα το lncRNA EGFR αλλά και άλλα lncRNAs τα οποία έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνουν σε καρκινικούς ιστούς τα μακροφάγα (π.χ. το LNMAT1 στην περίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης). Όλα τα παραπάνω αποτελούν τους βασικότερους λόγους που καθιστούν τα lncRNAs όχι μόνο καλούς υποψήφιους προγνωστικούς και διαγνωστικούς βιοδείκτες για καρκίνο αλλά και θεραπευτικούς στόχους [89, 107, 108]

1.3.2 Ο ρόλος των lncRNAs στον καρκίνο και η αξία τους ως βιοδείκτες στο γαστρικό καρκίνο

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα έχουν κερδίσει την προσοχή της ερευνητικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια με αφορμή την συμμετοχή τους εκτός από τις διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες και σε μια μεγάλη ποικιλία ασθενειών [109]. Έχουν περιγραφεί έξι κύρια χαρακτηριστικά στα οποία συνοψίζονται οι βασικές αρχές της κακοήθους μεταμόρφωσης [110-112]. Ακολούθως γίνεται μια σύνοψη των 6 κύριων ορόσημων του καρκίνου καθώς και μια προσπάθεια σύνδεσης καθενός από αυτά με τα ανάλογα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα που φαίνεται να σχετίζονται:

- 1) Η ιδιότητά των καρκινικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται συνεχώς απουσία εξωτερικών ερεθισμάτων είναι σημαντικό χαρακτηριστικό τους και μη κωδικοποιητικά μετάγραφα όπως για παράδειγμα το SRA εμπλέκονται στην έκφραση σημαντικών για τη διαδικασία της ογκογένεσης γονιδίων επηρεάζοντας και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [113].
- 2) Διαφυγή από καταστολείς της ανάπτυξης με τη βοήθεια μη κωδικοποιητικών μεταγράφων ύστερα από απενεργοποίηση/σίγηση γονιδίων που έχουν ογκοκατασταλτικό ρόλο. Έχει φανεί ότι η αυξημένη έκφραση των εν λόγω μη κωδικοποιητικών μεταγράφων οδηγεί σε ισχυρά ογκοεπαγωγικό φαινότυπο [110].
- 3) Απεριόριστοι κύκλοι κυτταρικού πολλαπλασιασμού με αποφυγή της απώλειας των τελομερών με τη βοήθεια της τελομεράσης η οποία προσθέτει τελομερικά τμήματα στις κατάλληλες περιοχές των χρωμοσωμάτων. Έχει αποδειχτεί ότι το μονοπάτι που

αφορά την τελομεράση εξαρτάται σημαντικά από μακρά μη κωδικοποιητικά RNA [114].

4) Μετάσταση σε γειτονικούς και μη ιστούς, η οποία εξασφαλίζεται από την αποφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης από τον οργανισμό και υποβοηθάται από lncRNAs [115]. Σε αυτό το σημείο είναι άξια αναφοράς τα MALAT1 και το HOTAIR, δυο από τα πιο μελετημένα lncRNAs τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο για την μετάσταση του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα το MALAT1 προτείνεται ως πιθανός προγνωστικός βιοδείκτης για τον καρκίνο του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC) και είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία πρόδρομων μορίων mRNA [116]. Αλλαγές στα ποσοστά και τα επίπεδα έκφρασης του MALAT1 παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία του καρκίνου. Όσον αφορά το HOTAIR, η έκφρασή του φαίνεται να είναι απορυθμισμένη σε πολλά είδη της νόσου γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δρα ως ογκογονίδιο. Για το λόγο αυτό έχει σημαντικό ρόλο στην αυξημένη καρκινική διήθηση (cancer invasiveness) και σε μεταστάσεις. Από την άλλη μεριά η μείωση στα επίπεδα του HOTAIR έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της καρκινικής επεμβατικότητας [117]. Είτε τα lncRNAs προάγουν την μετάσταση είτε όχι γίνεται αντιληπτό ότι μέσω ποικίλων τρόπων έχουν καθοριστική θέση σε αυτό το καρκινικό ορόσημο.

5) Η προαγωγή της αγγειογένεσης των καρκινικών όγκων είναι το πέμπτο ορόσημο του καρκίνου στο οποίο τα lncRNAs εμπλέκονται. Η αγγειογένεση στην ουσία αφορά το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του όγκου καθώς μέσω αυτών οι όγκοι λαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο που τους είναι απαραίτητα [118]. Τα H19, HULC, MVIH, TUG1 αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα μη κωδικοποιητικών μεταγράφων που συμμετέχουν στο σχηματισμό νέων αγγείων και είναι σημαντικοί ρυθμιστές της αγγειογένεσης [119].

6) Αποφυγή του κυτταρικού θανάτου είναι το έκτο ορόσημο του καρκίνου για το οποίο υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι ενισχύεται από αρκετά lncRNAs όπως για παράδειγμα TUG1 ή από σηματοδοτικά μονοπάτια που συσχετίζονται με lncRNAs όπως το PDPK2p/PDK1/AKT/caspase-3 και ο άξονας HOXD-AS1 [120-123]. Τα προστατο-ειδικό μετάγραφο 1 (prostate-specific transcript 1, PCGEM1), cancer upregulated drug resistant (CUDR) και PANDA (p21 associated ncRNA DNA damage activated) είναι επιπρόσθετα παραδείγματα ncRNA που εμπλέκονται στην καταστολή του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης [124, 125].

Στις ακόλουθες εικόνες γίνεται μια σύνοψη των 6 βασικών ορόσημων του καρκίνου (**Εικόνα 8**) και παρατίθεται και μια λίστα με τα κυριότερα lncRNAs που συνδέονται με καθένα από τα έξι ορόσημα μαζί με τη λειτουργία που επιτελούν σε κάθε συνθήκη (**Εικόνα 9**):



Εικόνα 8: Τα έξι ορόσημα του καρκίνου [112]

Cancer Hallmark	LncRNA	Mode of action
I. sustaining proliferative signaling	SRA	Transcriptional co-activator
	PCAT-1	Regulating gene expression
	RN7SK	Regulating transcription
	ncRNAs derived from cell cycle gene promoters	Unknown
	KRAS P1	miRNA sponge
II. Evading growth suppressors	PR antisense	Regulating gene expression
	PSF-interacting RNA	Modulating protein activity
	ANRIL	Chromatin remodeling
	GAS5	Competitor
	lincRNA-p21	Transcriptional co-repressor
III. Enabling replicative immortality	E2F4 antisense	Regulating gene expression
	TERC	RNA primer
	TERRA	Enzymatic inhibitor
	MALAT1	Modulating protein activity; sensor; scaffold
	HOTAIR	Chromatin remodeling
IV. Activating invasion and metastasis	HULC	miRNA sponge
	BC200	Translational modulator
	αHIF	RNA decay
	sONE/NOS3AS	RNA decay
	tie-1AS	RNA decay
V. Inducing angiogenesis	ncR-uPAR	Regulating gene expression
	PCGEM1	Regulating gene expression
	CUDR	Regulating gene expression
	uc.73A(P)	Unknown
	SPRY4-IT1	Unknown
VI. Resisting cell death	PANDA	Modulating protein activity
	LUST	RNA-Splicing
	PINC	unknown

Εικόνα 9: Τα έξι ορόσημα του καρκίνου κατ' αντιστοιχία με τα ανάλογα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα και τις λειτουργίες τους [110]

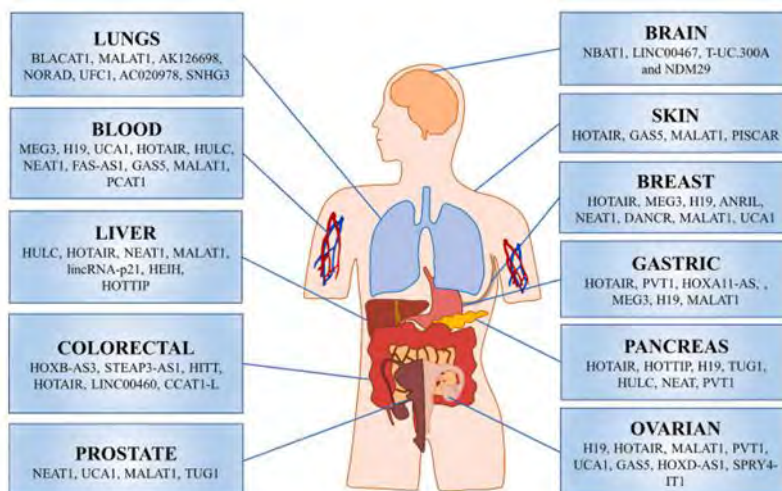
Φαίνεται πως τα lncRNAs συνεισφέρουν στην καρκινογένεση είτε με την εμπλοκή τους σε ογκοκατασταλτικά σηματοδοτικά μονοπάτια είτε δρώντας τα ίδια ως ογκογόνα ερεθίσματα.

Για παράδειγμα τα GAS5, CCND1, LET, PTENP1 και lincRNA-p21 έχουν χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικά, ενώ τα MALAT-1, PANDAR, HOTAIR, H19, PVT1, GILCG και το ANRIL ως ογκοεπαγωγικά. Σε μοριακό επίπεδο τα lncRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως επαγωγείς της ογκογένεσης μέσω της δράσης τους ως ρυθμιστές της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης μέσα από την οποία επηρεάζουν καθοριστικά τη γονιδιακή έκφραση, δρώντας ως ικριώματα για πρωτεΐνες που επάγουν την ογκογένεση ή ως ρυθμιστές ογκοκατασταλτικών microRNAs. Η συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των όγκων και των ασυνήθιστων ποσοστών lncRNAs στο αίμα καρκινοπαθών είναι αυτή που πυροδότησε παγκόσμιο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα η οποία εξετάζει τη δυναμική τους ως αξιόπιστους καρκινικούς βιοδείκτες [126]. Επιπρόσθετα, η απορρύθμιση των lncRNAs είναι καθοριστική για τους όγκους καθώς φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση, την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και την διήθηση [111].

1.3.3 Τα lncRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο

Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στον καρκίνο οφείλονται τόσο στην έλλειψη μεθόδων έγκαιρης ανίχνευσης της νόσου σε αρχικά στάδια όσο και σε ανακριβή διαγνωστικά εργαλεία. Σήμερα χρησιμοποιούνται κατά κόρον η ενδοσκόπηση σε συνδυασμό με τη βιοψία για διαγνωστικούς σκοπούς στο γαστρικό καρκίνο. Οι μέθοδοι αυτές χαρακτηρίζονται από ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα αλλά ως διαδικασίες είναι αρκετά κοστοβόρες, επεμβατικές, χρονοβόρες και επίπονες σε τέτοιο βαθμό που από μόνες τους, αποθαρρύνουν τους ίδιους τους ασθενείς από το να προχωρήσουν στην διάγνωση. Μέχρι σήμερα οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση γαστρικών όγκων είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (carcinoembryonic antigen, CEA) και υδατανθρακικά αντιγόνα (Carbohydrate antigens) όπως CA19-9 και CA72-4, όμως παρουσιάζουν περιορισμούς λόγω ευαισθησίας και ειδικότητας καθώς δεν είναι μοναδικοί για τη διάγνωση αυτού του τύπου καρκίνου και επίσης δεν είναι ικανοί να εντοπίσουν προκαρκινικές γαστρικές βλάβες όπως για παράδειγμα ατροφική γαστρίτιδα ή δυσπλασία [127]. Παρόμοια ζητήματα συναντώνται και στην περίπτωση άλλων πρωτεϊνικών βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά εργαλεία και δίνουν πολλά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης που τους χαρακτηρίζουν αλλά και στην περίπτωση των συμβατικών ορολογικών βιοδεικτών. Συνεπώς η εύρεση νέων βιοδεικτών μη εμβιακού τύπου που να είναι ικανοί να διαγιγνώσκουν την ασθένεια στα αρχικά της στάδια κρίνεται απαραίτητη και αναγκαία [126]. Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού βιοδείκτη είναι να μπορεί να ανιχνευτεί μη επεμβατικά, να είναι ευαίσθητος και ειδικός για την νόσο και το στάδιο της, καθώς και οικονομικός ώστε να μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί στην κλινική πρακτική ρουτίνας [127]. Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με την έκτοπη έκφρασή στον καρκίνο, τη σταθερότητα λόγω σχηματισμού δευτεροταγών δομών, τη σχετική αφθονία και διαθεσιμότητα στα σωματικά υγρά (όπως παραδείγματος χάριν το αίμα, τα ούρα και το γαστρικό υγρό) καθιστούν τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα κατάλληλους υποψήφιους βιοδείκτες στο γαστρικό καρκίνο [109, 126-128]. Ειδικότερα υπάρχουν πολλά παραδείγματα μακρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων τα οποία έχουν προταθεί ως βιοδείκτες γαστρικών νεοπλασιών είτε ανεξάρτητα, είτε σε συνδυασμό με άλλα lncRNA ή βιομόρια όπως πρωτεΐνες [109]. Στο γαστρικό καρκίνο το H19 έχει διαγνωστική ικανότητα η οποία χαρακτηρίζεται όσον αφορά το εμβαδό περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area under the curve, AUC) με 0,838. Όσον αφορά το AUC πρόκειται για ένα μέγεθος ενδεικτικό της ακρίβειας των διαγνωστικών τεστ το οποίο για τιμές άνω του 0,8 σημαίνει όχι μόνο αποδεκτό αποτέλεσμα αλλά και διάγνωση υψηλής αξίας [109, 129]. Από τα γνωστότερα και εις βάθος μελετημένα lncRNAs είναι τα MALAT1 και HOTAIR που επίσης έχουν προταθεί για

διαγνωστικοί δείκτες στο γαστρικό καρκίνο [109]. Πλέον σε πολλά είδη της ασθένειας εντοπίζονται υπογραφές lncRNA που αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά των διάφορων καρκινικών τύπων (**Εικόνα 10**) [122].



Εικόνα 8: Οι υπογραφές των lncRNAs στους διάφορους ιστούς [123]

Τα PTENP1, LSINCT-5, CUDR (ή UCA 1) είναι τρία lncRNAs τα οποία έχουν μελετηθεί συνδυαστικά ως τριπλή lncRNA υπογραφή σε διαγνωστικές μελέτες καρκίνου του στομάχου, όπως ακριβώς και τα CUDR, LSINCT-5 και PTENP1 τα οποία απομονώνονται από το αίμα και μπορούν να διαχωρίζουν υγιή από μη υγιή δείγματα αλλά και μεταξύ των μη υγιών όσα βρίσκονται σε αρχικό στάδιο από όσα είναι σε προχωρημένα στάδια με ικανοποιητικά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας. Όσον αφορά το αίμα ως πηγή βιοδεικτών, άλλα παραδείγματα μακρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων που έχουν μελετηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς είναι η πεντάδα TINCR, CCAT2, AOC4P, BANCER, και LINC00857. Αυτός ο συνδυασμός μπορεί να κάνει το διαχωρισμό μεταξύ ασθενών και προκαρκινικών ασθενών με ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας 68% & 89%, αντίστοιχα. Τέλος, τα LINC00152, lncUEGC1 και το HOTTIP είναι lncRNAs που περιέχονται στα εξωσώματα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το lncUEGC1 επειδή εκτός από το διαχωρισμό των ασθενών I & II σταδίου μπορεί να διαχωρίσει και ασθενείς σταδίου I με αυτούς που πάσχουν από χρόνια ατροφική γαστρίτιδα [126, 127].

Εφόσον γίνει διάγνωση της νόσου, τότε ακολουθεί η πρόγνωση που αφορά στην ουσία την εκτίμηση ή εναλλακτικά την πρόβλεψη της πιθανής εξέλιξης και της πιθανότητας ανάρρωσης ή επιβίωσης. Η πρόβλεψη της εξέλιξης παρουσιάζει αρκετές προκλήσεις οι οποίες για να ξεπεραστούν απαιτείται βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη γαστρική νεοπλασία. Ένα πρόβλημα ύψιστης σημασίας που αποτελεί αιτία για την κακή πρόγνωση στο γαστρικό καρκίνο είναι η έλλειψη αποτελεσματικών προγνωστικών βιοδεικτών. Πολυάριθμα στοιχεία που συγκεντρώνονται τα τελευταία χρόνια φανερώνουν πως τα μακρά μη κωδικοποιητικά μεταγράφα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως προγνωστικά εργαλεία για το γαστρικό καρκίνο [130]. Φαίνεται πως η έκτοπη έκφραση των lncRNA σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών, το στάδιο & το μέγεθος του όγκου, τη μετάσταση στους λεμφαδένες, τη μετάσταση σε πιο απομακρυσμένους ιστούς καθώς και το βάθος στο οποίο μπορεί ο καρκίνος να εισβάλλει στον εκάστοτε ιστό. Καθώς τα lncRNA συνδέονται ποικιλοτρόπως με παράγοντες που σχετίζονται με την πρόγνωση εξάγεται το συμπέρασμα ότι μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικά εργαλεία όχι μόνο για

την πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου αλλά και για την πρόβλεψη του τελικού κλινικού αποτελέσματος [109, 126, 131, 132]. Πιο συγκεκριμένα, η μετάσταση στους λεμφαδένες που είναι αρκετά σύνηθες μεταστατικό μονοπάτι για το γαστρικό καρκίνο, έχει μεγάλη σημασία όχι μόνο για τη διάγνωση αλλά και για την πρόγνωση και είναι ενδεικτική του TNM σταδίου καθώς και καθοριστική για τη θεραπεία των ασθενών[131].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος του στομάχου χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη διάγνωση, γεγονός που οφείλεται αφενός στην πολυπλοκότητα της νόσου αφετέρου στην έλλειψη ασφαλών, γρήγορων, οικονομικών και αξιόπιστων μέσων για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου σε αρχικά στάδια. Συνεπώς, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων, μη επεμβατικών, προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών για την έγκαιρη ανίχνευση της νόσου. Η χρήση μεταγραφικών παραγόντων όπως για παράδειγμα του HNF4a ή του CDX2 για διαγνωστικούς σκοπούς στον γαστρικό καρκίνο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας της σημαντικής συμβολής που έχουν οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες στο σχηματισμό του όγκου. Παρόλα αυτά εφόσον οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες δρουν και ανιχνεύονται τόσο σε υγιείς ιστούς όσο και σε άλλους τύπους καρκίνου, το ενδιαφέρον έχει μετατοπιστεί στα lncRNA που διακρίνονται για την εξειδικευμένη έκφρασή τους σε επίπεδο κυττάρων και ιστών και για την διαφορική τους έκφραση σε διάφορα είδη καρκίνου, όπως στον γαστρικό. Με βάση τα παραπάνω, βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ρύθμισης του lncRNA HEAL, ως υποψήφιο μετάγραφο στόχος των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a & CDX2. Αρχικά έγινε η μελέτη και ο χαρακτηρισμός των επιπέδων έκφρασης του HEAL σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς και υποκυτταρικός εντοπισμός του αλλά και προσδιορισμός της μετά-μεταγραφικής του σταθερότητάς. Στη συνέχεια για τη διερεύνηση της συσχέτισης της έκφρασης του HEAL με αυτές των HNF4a και CDX2 προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του υπό μελέτη μεταγράφου σε γαστρικές κυτταρικές σειρές για τις οποίες είχε προηγηθεί σίγηση ή υπερέκφραση των HNF4a & CDX2. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση qPCR σε δείγματα ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης για τους CDX2 και HNF4a, με σκοπό την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων με τη χρωματίνη του HEAL. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κατασκευή ενός εργαλείου παροδικής σίγησης του HEAL, το οποίο στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την καταστολή του υπό μελέτη μεταγράφου σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

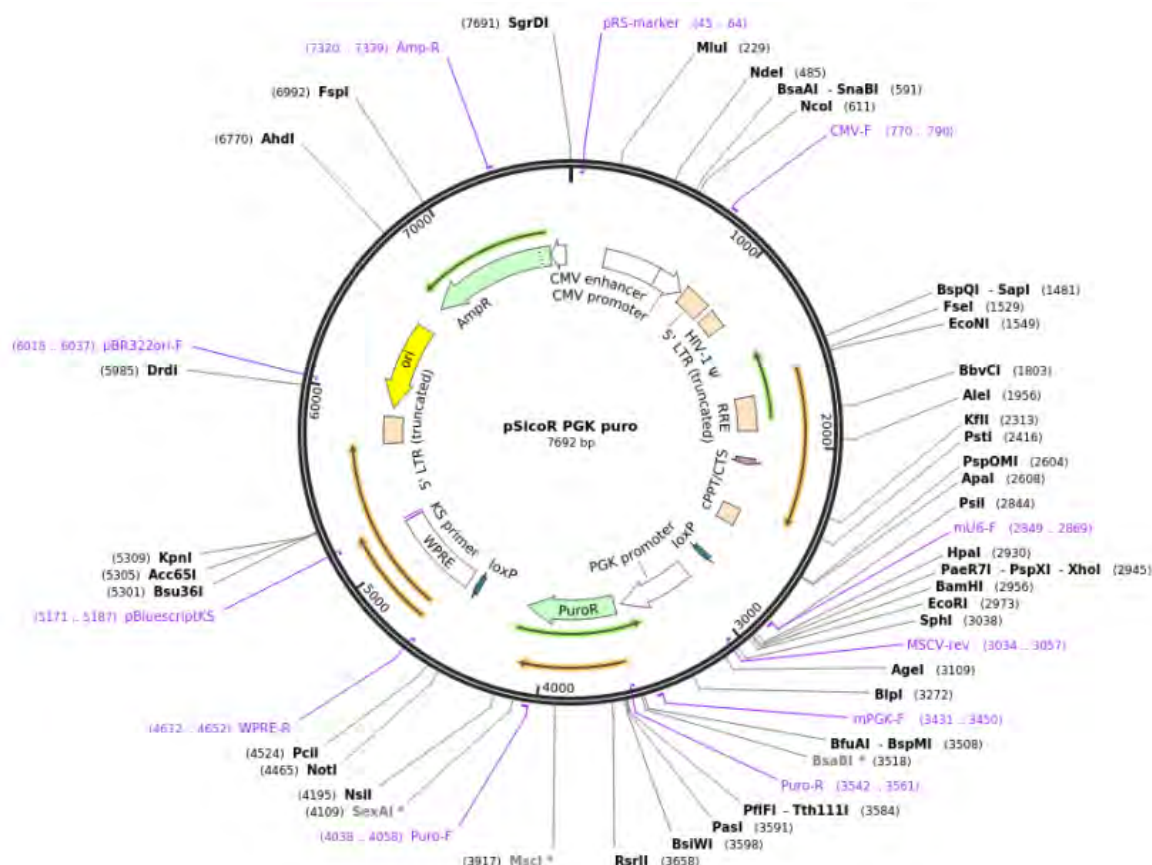
3.1 Κυτταρικές σειρές

Στις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές:

- **HFE**: ανθρώπινη κυτταρική σειρά φυσιολογικών κυττάρων του γαστρικού επιθηλίου
- **AGS**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά από γαστρικό επιθήλιο ασθενούς με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα
- **NUGC4**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά γαστρικού αδενοκαρκινώματος προερχόμενη από μετάσταση σε παραγαστρικούς λεμφαδένες.
- **KATOIII**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά γαστρικού αδενοκαρκινώματος προερχόμενη από μετάσταση στην πλευρική συλλογή
- **MKN45**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική φτωχά διαφοροποιημένου γαστρικού αδενοκαρκίνωμα ασθενούς προερχόμενη από μετάσταση στο ήπαρ
- **LS174**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά απομονωμένη από ασθενή με εντερικό αδενοκαρκίνωμα β τύπου.
- **HepG2**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά ηπατικού καρκινώματος
- **HeLa**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά από ασθενή με καρκίνο τραχήλου της μήτρας
- **HEK7**: ανθρώπινη κυτταρική σειρά που έχει προέλθει από εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα
- **NCIH520**: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά από πνεύμονα ασθενούς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα.

3.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Για τη γενετική τροποποίηση των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pSicoR PGK puro (Addgene) που έχει μήκος 7692 bp (**Εικόνα 11**). Στο συγκεκριμένο φορέα ενσωματώθηκαν αλληλουχίες οι οποίες σχεδιάστηκαν με βάση το lncRNA μόριο ενδιαφέροντος που δεν είναι άλλο από το HEAL. Οι αλληλουχίες αυτές, siRNA όπως ονομάζονται, μετατρέπονται σε short hairpin RNA (shRNA) μόρια που με τη σειρά τους στοχεύουν το συγκεκριμένο lncRNA σε πείραμα καταστολής του. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για την παραγωγή λεντιών με τους οποίους διαμολύνονται οι καρκινικές κυτταρικές σειρές ενδιαφέροντος όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενες μεταπτυχιακές διατριβές του εργαστηρίου.



Εικόνα 11: Ο πλασμιδιακός χάρτης για το pSicoR PGK puro (Addgene). Αριθμός καταλόγου Addgene #12084

3.3 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Στις qPCR που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του πειράματος της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP-qPCR), χρησιμοποιήθηκαν 4 πρότυπα δείγματα DNA γνωστής συγκέντρωσης με διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις, τα οποία αξιοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς και την ποσοτικοποίηση της αρχικής ποσότητας DNA των δειγμάτων. Ακολούθησε μια διαδικασία κανονικοποίησης η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης ως προς το αρχικό δείγμα (Input DNA), στο οποίο δεν έγινε ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης, με σκοπό να εξομαλυνθούν πιθανές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων λόγω της αποτελεσματικότητας των εκκινητών για τις εξεταζόμενες γονιδιωματικές περιοχές. Στο δεύτερο στάδιο, η διαδικασία κανονικοποίησης έγινε με τη χρήση γονιδιωματικών περιοχών, στις οποίες είναι γνωστό ότι δεν προσδένονται οι υπό μελέτη μεταγραφικοί παράγοντες. Με αυτήν την κανονικοποίηση ουσιαστικά υπολογίστηκε το εύρος αλλαγής (fold enrichment), δηλαδή πόσες φορές περισσότερος εμπλουτισμός υπήρχε της εκάστοτε γονιδιωματικής αλληλουχίας ενδιαφέροντος σε σχέση με τις υπόλοιπες γονιδιωματικές περιοχές στα δείγματα ανοσοκατακρήμνισης. Όσον αφορά τις qPCR στα πειράματα έκφρασης σε κυτταρικές σειρές, και της σίγησης του HEAL, η διαδικασία της κανονικοποίησης έγινε με διαφορετικό τρόπο. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH. Το GAPDH εμφανίζει σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και πειραματικές συνθήκες. Χρησιμοποιείται για την εξομάλυνση πιθανών διαφορών των δειγμάτων που σχετίζονται με την αρχική συγκέντρωση,

την ποσότητα του RNA ή την ποσότητα του cDNA, οι οποίες σε αντίθετη περίπτωση θα μπορούσαν να δώσουν ψευδή αποτελέσματα.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το όργανο qPCR CFX96 της BIORAD, ενώ τόσο για το σχεδιασμό της αντίδρασης που περιλαμβάνει την προετοιμασία του plate και το σχεδιασμό του πρωτοκόλλου όσο και για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CFX Manager της ίδιας εταιρίας. Στον ακόλουθο πίνακα φαίνεται η σύσταση της αντίδρασης (**Πίνακας 1**)

Πίνακας 1: Η σύσταση της αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήρια	Όγκοι (μL)
Δείγμα (DNA)	4
SYBR MIX, KAPA	10
Primer F/R (10μM)	2
WFI	4
V _{τελ} =20	

3.3 Αντίδραση λιγάσης για shRNA – Υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων shRNA

Το πρώτο βήμα για την κλωνοποίηση των shRNA για το HEAL στους πλασμιδιακούς φορείς είναι ο σχηματισμός δίκλωνων μορίων με τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδίων shRNA. Για το σκοπό αυτό αναμειγνύονται 2μL νοηματικής αλυσίδας (sense oligo, 100Mm) με 2μL αντινοηματικής (antisense oligo, 100Mm) και 96μL ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης (annealing buffer: KAc 100 mM, HepesKOH 30 mM/pH 7.4, MgAc 2 mM), τα οποία στη συνέχεια επωάζονται στους 96°C για πέντε λεπτά και έπειτα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να φτάσουν τους 30°C. Με τον τρόπο αυτό, δηλαδή μέσω της σταδιακής ψύξης οι δύο αλυσίδες θα υβριδίσουν η μια πάνω στην άλλη και θα προκύψει δίκλωνο μόριο.

3.4 Αντίδραση λιγάσης για την ενσωμάτωση του ενθέματος shHEAL στον πλασμιδιακό φορέα.

Για τη διασύνδεση του πλασμιδιακού φορέα pSicoR με τα δίκλινα shHEAL μόρια, χρησιμοποιήθηκε γραμμικός φορέας pSicoR, ο οποίος είχε προετοιμαστεί κατάλληλα με τα XhoI και BamHI ένζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά αφήνουν συγκεκριμένα κολλώδη άκρα καθώς λειτουργούν με μοναδικό τρόπο διαθέτοντας ειδικές θέσεις αναγνώρισης και κοπής. Τα δίκλινα shRNA μόρια έχουν και αυτά κολλώδη άκρα και έχουν σχεδιαστεί ώστε να είναι συμπληρωματικά με τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα που δημιουργούνται από τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Η αντίδραση διασύνδεσης πραγματοποιείται στους 16°C για δεκαέξι ώρες και η σύστασή της φαίνεται στον **Πίνακα 2**. Επίσης, πραγματοποιείται και αντίδραση ελέγχου χωρίς την παρουσία ενθέματος, αντί του οποίου προστίθεται WFI, η οποία χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

Πίνακας 2: Σύσταση αντίδρασης λιγάσης του δίκλωνου ενθέματος shRNA με τον πλασμιδιακό φορέα pSicoR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Ένθεμα	4

Πλασμιδιακός φορέας (50ng/μL)	1
T4 DNA ligase buffer 10x (NEB)	1
T4 DNA ligase buffer (Minotech)	0,5
WFI	3,5
V _{τελ} =10	

3.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν χημειοδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *e. coli* το στέλεχος XL1Blue. Αρχικά αναμείχθηκαν 50μL διαλύματος βακτηρίων μαζί με 5μL από το προϊόν διασύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα με το shHEAL και το self-ligation και ακολούθησε η επώαση του για 20 λεπτά στον πάγο. Έπειτα, ακολούθησε θερμικό σοκ των βακτηρίων για 50 δευτερόλεπτα στους 42°C ώστε οι μεμβράνες να γίνουν διαπερατές και να δεχτούν τα πλασμίδια. Κατόπιν επώαστηκαν άμεσα για 2 λεπτά στον πάγο προκειμένου να διακοπεί το θερμικό σοκ καθώς και να μειωθεί το στρες των βακτηρίων. Έπειτα έγινε προσθήκη από θρεπτικό LB broth (CONDA-pronadisa) χωρίς αμπικιλίνη (AMP) μέχρι τελικού όγκου τα 1000μL. Κατόπιν, τα βακτήρια επώαστηκαν για 50 λεπτά στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 160 στροφές έτσι ώστε να ολοκληρώσουν δύο πλήρεις κύκλους αντιγραφής και να προλάβουν να εκφράσουν το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Μετά το τέλος της επώασης, 350μL από την υγρή καλλιέργεια βακτηρίων επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB agar (condalab) με αμπικιλίνη (100μg/mL) και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C ολονυκτίως. Έπειτα, επιλέχθηκαν μοναδιαίες αποικίες βακτηρίων, οι οποίες μεταφέρθηκαν μεμονωμένα σε δοκιμαστικούς σωλήνες μαζί με 3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με AMP 100μg/ml και επώαστηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στα 160 rpm ολονύκτια.

3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με δύο τρόπους. Η πρώτη διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αυτή της αλκαλικής λύσης (homemade), με την οποία έγινε ο πρώτος έλεγχος προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει πλασμιδιακός φορέας που έχει δεχτεί και ενσωματώσει επιτυχώς το shHEAL ένθεμα. Η δεύτερη διαδικασία που ακολουθήθηκε ύστερα από τη διαπίστωση της ύπαρξης θετικού κλώνου με το homemade πρωτόκολλο ήταν η απομόνωση με το kit «NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA» (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Όσον αφορά το πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης αυτό ξεκινά με φυγοκέντρηση στα 11.000rpm για 2 λεπτά στους 4°C ποσότητας περίπου 2ml από την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση υπερκείμενου με θρεπτικό και διαδοχική προσθήκη 100μL παγωμένου μείγματος του Διαλύματος Λύσης I (50mM Tris pH=8, 10mM EDTA pH=8, ddH₂O, 100μg/mL RNase A) και 200μL φρέσκου Διαλύματος Λύσης II (1% SDS, 0,2M NaOH, ddH₂O) με σκοπό τη λύση των κυττάρων. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 150μL παγωμένου Διαλύματος Λύσης III (3M potassium acetate (KOAc) pH=6, glacial acetate/acetic acid, ddH₂O) με επώαση για 5 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης γίνεται ανάκτηση περίπου 450μL από το υπερκείμενο και προσθήκη 1mL αιθανόλης 100% και επώαση στους -80°C για 20 λεπτά. Κατόπιν, το δείγμα φυγοκεντρείται στα 13.000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C και προστίθενται 600μL αιθανόλης 70% αφού προηγηθεί απόρριψη υπερκείμενου. Το βήμα της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται στα 13.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C, όπως και η αφαίρεση υπερκείμενου. Μετά σειρά έχει η

ξήρανση πελέτας στον αέρα για περίπου 30 λεπτά, που ακολουθείται από επαναδιάλυση της πελέτας σε 100μL H₂O.

3.7 Διαγνωστική PCR

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση του shHEAL στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR με κατάλληλους εκκινητές οι οποίοι ήταν σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδίζουν επάνω στον πλασμιδιακό φορέα πριν και μετά τη θέση σύνδεσης του ενθέματος. Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται τόσο η σύσταση της αντίδρασης, όσο και οι συνθήκες της (**Πίνακας 3 & Πίνακας 4**)

Πίνακας 3: Η σύσταση της αντίδρασης διαγνωστικής PCR προς επιβεβαίωση της επιτυχούς ενσωμάτωσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
Πλασμιδιακό DNA	1
dNTPs Thermo Scientific(10mM)	0.5
KAPA Taq Πολυμεράση DNA	0.15
KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5
PIb_unmod_screen_F1 10μM (Πρόσθιος)	1
MSCV_R (Ανάστροφος)	1
WFI	41.35
V _{τελ} =50	

Πίνακας 4: Οι συνθήκες της αντίδρασης της διαγνωστικής PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95	2'
Αποδιάταξη	95	20''
Υβριδοποίηση εκκινητών	58	10''
Επέκταση	72	15''
Τελική επέκταση	72	2'
Αναμονή	4	∞

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται αφού προηγουμένως προστεθούν σε αυτά 10 μL Loading Dye 6X. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τον καλό διαχωρισμό των ζωνών καθώς στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης το προϊόν που προκύπτει αντιστοιχεί σε ζώνη που διαφέρει περίπου 60 ζεύγη βάσεων σε σχέση με το μη ανασυνδισμένο πλασμιδιακό φορέα. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και πλασμίδιο το οποίο κατά το στάδιο της αντίδρασης λιγάσης δεν υποστεί κατεργασία με ένθεμα (self ligation) και έτσι επανακυκλοποιήθηκε (αρνητικός μάρτυρας), καθώς και δύο δείγματα θετικού ελέγχου από προηγούμενες επιτυχείς προσπάθειες κλωνοποίησης με τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα.

Οι θετικοί κλώνοι, δηλαδή τα πλασμίδια που έχουν επιτυχώς πάρει το ένθεμα shHEAL, αφού απομονωθούν με το kit «NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA» (Macherey-Nagel) θα χρησιμοποιηθούν σε σύστημα διαμόλυνσης γαστρικών καρκινικών κυττάρων με λεντιούς με σκοπό την έκφραση των shRNAs και την RNAi σίγηση των μεταγράφων-στόχων. Ειδικότερα, οι φορείς pSicoR που έφεραν το shRNA έναντι του HEAL ενσωματώθηκαν σε λεντιούς και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων AGS με τους λεντιούς που παράχθηκαν, με αποτέλεσμα την σίγηση του μεταγράφου-στόχου. Η αποτελεσματικότητα του πειράματος σίγησης ελέγχθηκε με απομόνωση RNA και ποσοτική PCR.

3.8 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Η απομόνωση του RNA (RNA extraction) από κύτταρα πραγματοποιείται με την προσθήκη 1 mL τριζόλης σε τριβλύα ανάπτυξης των κυττάρων, αναμονή για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, συλλογή των δειγμάτων σε σωληνάρια τύπου errendorf και μεταφορά σε πάγο. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μ L χλωροφόρμιο και γίνεται έντονη ανάδευση για την δημιουργία δύο φάσεων, οργανικής και υδατικής, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C και στα 14.000 rpm. Έπειτα γίνεται συλλογή της υδατικής φάσης, η οποία περιέχει το RNA, και ακολουθεί καθαρισμός με ισοπροπανόλη. Κατά το βήμα του καθαρισμού προστίθενται 500 μ L ισοπροπανόλη και 1 μ L γλυκογόνο, αναμονή για 10 λεπτά σε πάγο και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4 °C στα 14.000 rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500 μ L 70 % παγωμένη αιθανόλη στο ίζημα που δημιουργήθηκε και τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά, στους 4 °C στα 14.000 rpm. Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος με H₂O, αφού έχει προηγηθεί η απόρριψη του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος. Τέλος τα δείγματα ολικού RNA μετρήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 UV, προκειμένου να εκτιμηθεί η συγκέντρωσή τους σε νουκλεϊκά οξέα και η καθαρότητά τους, και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.9 Κατεργασία με DNase (DNase treatment)

Την απομόνωση του RNA ακολουθεί η κατεργασία των δειγμάτων με DNase. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα βήμα καθαρισμού που γίνεται κατά βάση για την απαλλαγή από τα πιθανά υπολείμματα γονιδιωματικού DNA. Οι ενζυμικές αντιδράσεις επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα με σύσταση η οποία παρουσιάζεται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας Σφάλμα! Χρησιμοποιήστε την καρτέλα "Κεντρική σελίδα", για να εφαρμόσετε το 0 στο κείμενο που θέλετε να εμφανίζεται εδώ.5: Η σύσταση της ενζυμικής αντίδρασης που πραγματοποιείται κατά το στάδιο της κατεργασίας με DNase

Αντιδραστήριο	Όγκος(μ L)
Δείγμα RNA	25
DNase I Buffer 10x (Thermoscientific for DNase I)	3
DNase I, RNase-free (ThermoFisher scientific)	1
RNase out	0,5
WFI	0,5
$V_{\text{τελ}}=30$	

Το RNase out προστίθεται ώστε να παρεμποδιστεί η δράση των πιθανών ενζύμων που υδρολύουν το RNA, δρα δηλαδή προστατευτικά προς το μόριο ενδιαφέροντος. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 40 μl οξικού νατρίου 3M pH=5,6, 360 μl WFI και 400 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της ενζυμικής αντίδρασης και τον πλήρη καθαρισμό του RNA. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 14.000 rpm στους 4°C για 5 λεπτά, μετά από έντονη ανάδευση. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια τύπου errendorf, όπου τους προστέθηκαν 1 ml παγωμένης EtOH 100% και 1 μl γλυκογόνο. Ακολούθως τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα στους -80°C, με σκοπό την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων με κατακρήμνιση της αιθανόλης. Με την ολοκλήρωση της επώασης έγινε φυγοκέντρωση στα 14.000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl παγωμένης EtOH 70% στο ίζημα που δημιουργήθηκε. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στους 4°C στα 14.000 rpm. Έπεται επαναδιάλυση του ιζήματος με H₂O, αφού έχει προηγηθεί η απόρριψη του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος. Τέλος τα δείγματα ολικού RNA μετρήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 UV, προκειμένου να εκτιμηθεί η συγκέντρωσή τους σε νουκλεϊκά οξέα και η καθαρότητά τους, και αποθηκεύονται στους -80°C.

3.10 Σύνθεση cDNA (cDNA synthesis)

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) γίνεται με σκοπό να ελεγχθούν τα επίπεδα των υπό μελέτη μεταγράφων με την τεχνική της qPCR και προκειμένου να γίνει αυτός ο έλεγχος χρειάστηκε να προηγηθεί σύνθεση cDNA από το ολικό καθαρό RNA των δειγμάτων που απομονώθηκε με τα προηγούμενα βήματα. Για την σύνθεση του cDNA από δείγματα RNA απαιτούνται 1000 ng δείγματος σε τελικό όγκο 10 μL. Τα δείγματα προετοιμάζονται κατάλληλα σύμφωνα με τις μετρημένες από πριν συγκεντρώσεις τους ώστε να εκπληρώνουν την παραπάνω συνθήκη. Στα αραιωμένα δείγματα προστίθενται 1 μL Random hexamers (100 mM) Takara, 1 μL dNTPs (10 mM) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στους 65°C (**Πίνακας 6**). Έπειτα προστίθενται τα υπόλοιπα αντιδραστήρια όπως φαίνεται στον **Πίνακα 7** και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 ώρες. Μετά το τέλος την αντίδρασης, τους προστίθενται 380 μL H₂O και ακολουθεί αποθήκευση στους -20°C.

Πίνακας 6: Σύσταση του μείγματος που αποτελείται από δείγμα, εκκινητές και dNTPs

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Random hexamers (100 mM) Takara	1
dNTPs (10 mM)	1
$V_{\text{τελ}} = 2$	

Πίνακας Σφάλμα! Χρησιμοποιήστε την καρτέλα "Κεντρική σελίδα", για να εφαρμόσετε το 0 στο κείμενο που θέλετε να εμφανίζεται εδώ.**7:** Σύσταση της ενζυμικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
5x Buffer (Invitrogen)	4
DTT 100 Mm (Invitrogen)	2
M-MLV (Invitrogen)	1

RNAse out	0,5
WFI	0,5
$V_{\text{τελ}}=8$	

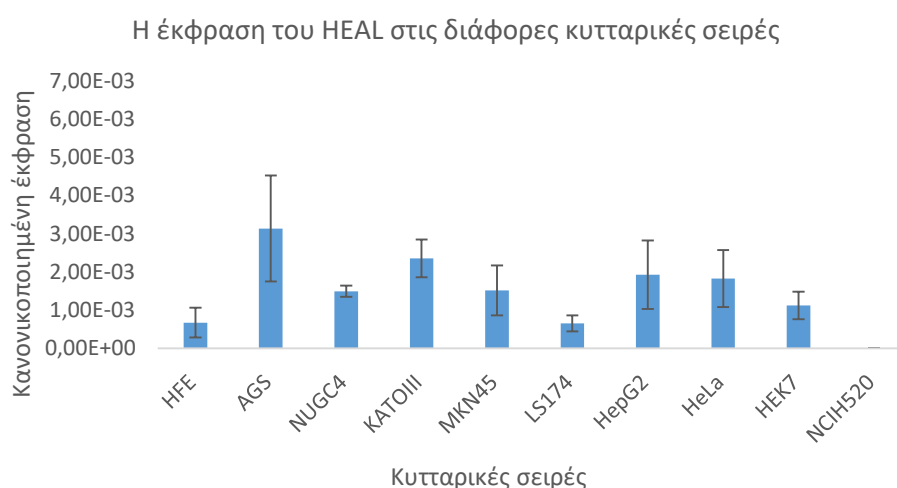
4. Αποτελέσματα

4.1 Χαρακτηρισμός του HEAL

Στο πλαίσιο του συνολικού ερευνητικού έργου του εργαστηρίου για την εύρεση και την μελέτη lncRNA των οποίων η αλλαγή του προφίλ έκφρασης συσχετίζεται με τον γαστρικό καρκίνο και με βάση προηγούμενες πειραματικές και βιοπληροφορικές μελέτες δεδομένων RNA και ChIP sequencing επιλέχθηκε το lncRNA HEAL για περαιτέρω διερεύνηση, καθώς βρέθηκε πως αλλάζει το προφίλ έκφρασής του σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ αυτών και στον γαστρικό. Αρχικό βήμα στην πειραματική διαδικασία αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός του HEAL. Ειδικότερα, ο χαρακτηρισμός αφορά σε αναλύσεις για τη μελέτη της έκφρασης του σε διάφορες κυτταρικές σειρές, για τον υποκυτταρικό του εντοπισμό καθώς και για την μεταγραφική του σταθερότητα. Τα αποτελέσματα των εν λόγω αναλύσεων παρατίθενται στις αμέσως επόμενες υποπαραγράφους.

4.1.1 Αποτελέσματα qPCR για τη διερεύνηση της έκφρασης του HEAL σε διάφορες κυτταρικές σειρές (cell line expression)

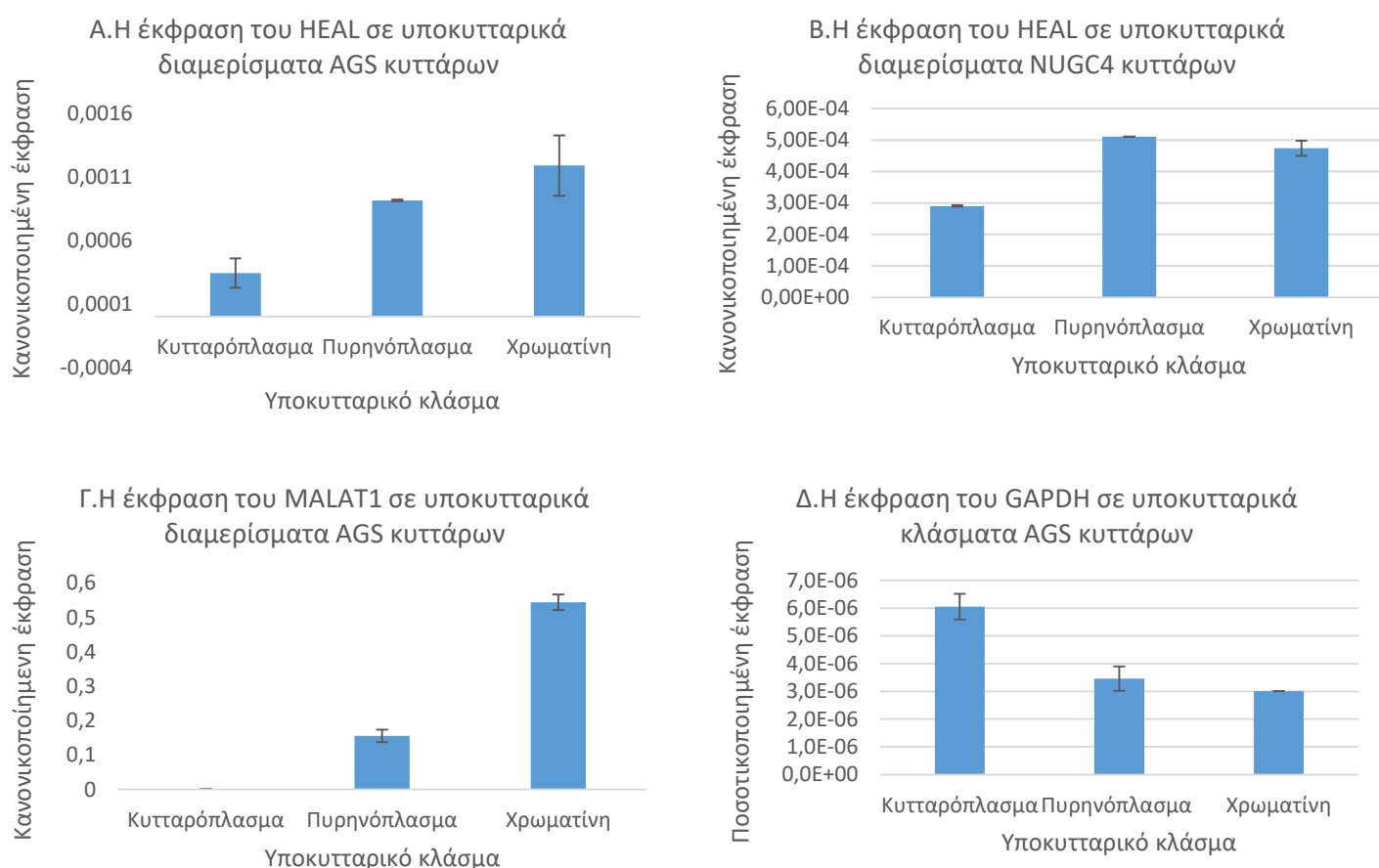
Τα επίπεδα έκφρασης του HEAL μελετήθηκαν με qPCR σε 10 κυτταρικές σειρές, οι οποίες ήταν διαθέσιμες στο εργαστήριο, τα αποτελέσματα της οποίας απεικονίζονται στην **Εικόνα 12** και αφορούν δύο βιολογικές επαναλήψεις. Όπως φαίνεται η μέγιστη έκφραση για το HEAL συναντάται στα AGS κύτταρα και στη συνέχεια ακολουθούν τα KATOIII. Κατόπιν, τα HepG2 και HeLa στα οποία η έκφραση κυμαίνεται στα ίδια περίπου επίπεδα και έχει μικρή διαφορά από τα NUGC4, στα οποία παρατηρείται ελαφρώς μικρότερη έκφραση. Ακόμα πιο χαμηλή έκφραση παρατηρείται για τα HEK7, HFE και LS174. Τέλος, όσον αφορά την κυτταρική σειρά NCIH520, η έκφραση είναι αμελητέα – σχεδόν μηδενική.



Εικόνα 12: Τα επίπεδα έκφρασης του HEAL στο σύνολο των κυτταρικών σειρών για τις οποίες εξετάστηκε

4.1.2 Αποτελέσματα qPCR για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HEAL

Όπως προαναφέρθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός ενός lncRNA έχει μεγάλη σημασία κυρίως για το λειτουργικό ρόλο του ίδιου μέσα στο κύτταρο. Συνεπώς, ο εντοπισμός εκείνου του υποκυτταρικού διαμερίσματος στο οποίο δρα το HEAL δεν είναι μόνο χρήσιμος αλλά και απαραίτητος προκειμένου να γίνει περισσότερο κατανοητή η φύση του συγκεκριμένου μεταγράφου. Για να προσδιοριστεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HEAL, πραγματοποιήθηκε qPCR σε cDNA από υποκυτταρικά κλάσματα κυττάρων AGS και NUGC4, στα οποία τον συγκεκριμένο lncRNA εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα. Η πειραματική διαδικασία για την απομόνωση των κλάσμάτων έχει περιγραφεί διεξοδικά σε προηγούμενες μεταπτυχιακές διατριβές. Στην ανάλυση έχουν χρησιμοποιηθεί και δύο δείγματα ελέγχου, το θετικό για εντοπισμό στο κυτταρόπλασμα mRNA GAPDH και το θετικό για πυρηνικό εντοπισμό lncRNA MALAT1. Στην **Εικόνα 13** φαίνονται τα αποτελέσματα της εν λόγω ανάλυσης.

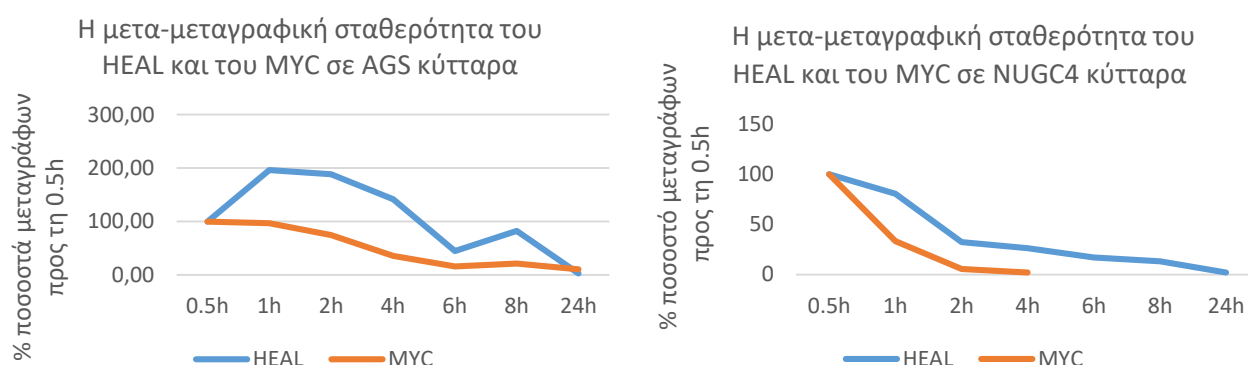


Εικόνα 13: (Α) Η έκφραση του HEAL στο κυτταροπλασματικό, πυρηνοπλασματικό και χρωματινικό κλάσμα κυττάρων AGS, (Β) η έκφραση του HEAL στο κυτταροπλασματικό, πυρηνοπλασματικό και χρωματινικό κλάσμα NUGC4 κυττάρων, (Γ) η έκφραση του MALAT1 στα υποκυτταρικά διαμερίσματα AGS κυττάρων, (Δ) η έκφραση του GAPDH σε υποκυτταρικά κλάσματα AGS κυττάρων

Όπως προκύπτει από τα ραβδογράμματα της παραπάνω εικόνας και όσον αφορά το HEAL για τα AGS και NUGC4 κύτταρα η έκφραση είναι υψηλότερη στο κλάσμα της χρωματίνης και στο πυρηνόπλασμα, αντίστοιχα. Ανάλογη τάση ακολουθείται και στην περίπτωση του θετικού μάρτυρα, δηλαδή του MALAT1 μεταγράψου, καθώς φαίνεται να έχει μέγιστο σήμα στο κλάσμα της χρωματίνης. Στον αντίποδα, η μέγιστη έκφραση του GAPDH εντοπίζεται για το κλάσμα του κυτταροπλάσματος.

4.1.3 Αποτελέσματα qPCR για τη μετα-μεταγραφική σταθερότητα του HEAL

Προκειμένου να μελετηθεί η μετα-μεταγραφική σταθερότητα του HEAL πραγματοποιήθηκε κατεργασία των κυττάρων AGS με ακτινομυκίνη D, η οποία αναστέλλει τη διαδικασία της μεταγραφής και έτσι χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του ρυθμού αποδόμησης των μεταγράφων. Ως μηδενικός χρόνος θεωρείται η στιγμή κατεργασίας με ακτινομυκίνη κατά την οποία λαμβάνεται δείγμα κυττάρων. Στη συνέχεια και αφού γίνει η κατεργασία, ανά τακτά ορισμένα χρονικά διαστήματα (0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h) λαμβάνεται δείγμα από τα κύτταρα την οποία ακολουθεί εξαγωγή RNA, κατεργασία με DNase, σύνθεση cDNA και τελικά ανάλυση με qPCR. Ως δείγμα ελέγχου με γνωστό χρόνο ζωής χρησιμοποιήθηκε το κωδικοποιητικό μετάγραφο του γονιδίου c-myc και η ανάλυση έγινε τόσο για την AGS κυτταρική σειρά όσο και για την NUGC4, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 14**. Όλα τα μεγέθη έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη 0,5h, λόγω αποικοδόμησης του RNA στην συνθήκη 0h.



Εικόνα 14: Επίπεδο έκφρασης μεταγράφων HEAL και MYC σε κύτταρα AGS (αριστερά) και NUGC4 (δεξιά) σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά από έκθεση σε ακτινομυκίνη-D

Μια πρώτη παρατήρηση που μπορεί κανείς εύκολα να κάνει με βάση τα ραβδογράμματα της Εικόνας 14 είναι ότι το HEAL και στην περίπτωση των AGS και στην περίπτωση των NUGC4 φαίνεται πιο σταθερό από το MYC μετάγραφο. Πιο ειδικά και όσον αφορά το διάγραμμα που αφορά στα AGS (αριστερά), ο χρόνος ημίσειας ζωής του HEAL φαίνεται πως είναι οι 6 ώρες ενώ του MYC οι 3 ώρες. Όσον αφορά τα NUGC4 ο χρόνος ημίσειας ζωής του HEAL φαίνεται πως είναι οι 2 ώρες ενώ του MYC η 1 ώρα. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι η σταθερότητα των μεταγράφων ακολουθεί την ίδια τάση και στις δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών γαστρικού καρκίνου.

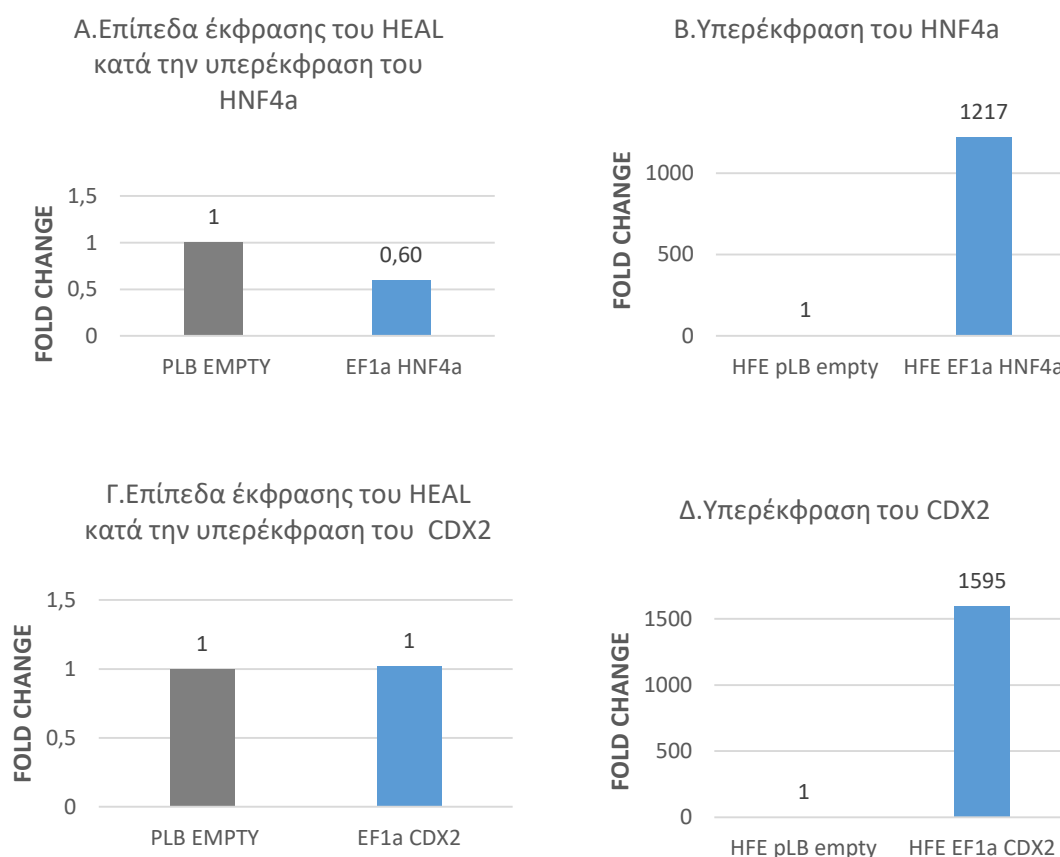
4.2 Επίπεδα έκφρασης του HEAL σε HFE και AGS κύτταρα ύστερα από σίγηση (KD) / υπερέκφραση (OX) των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a

Από προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου έχει βρεθεί, ότι το HEAL πιθανώς ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα HNF4a. Ένας από τους βασικούς στόχους της διπλωματικής εργασίας ήταν να εξεταστεί εάν το εν λόγω lncRNA ρυθμίζεται άμεσα ή έμμεσα από τον μεταγραφικό παράγοντα. Προκειμένου να απαντηθεί αυτό το ερώτημα χρειάζεται

να μελετηθεί η έκφραση του HEAL σε γαστρικές κυτταρικές σειρές στις οποίες έχει προηγηθεί σίγηση ή υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4a, ώστε να ακολουθήσουν πειράματα ανοσοκατακρίμησης σε συγκεκριμένα κύτταρα.

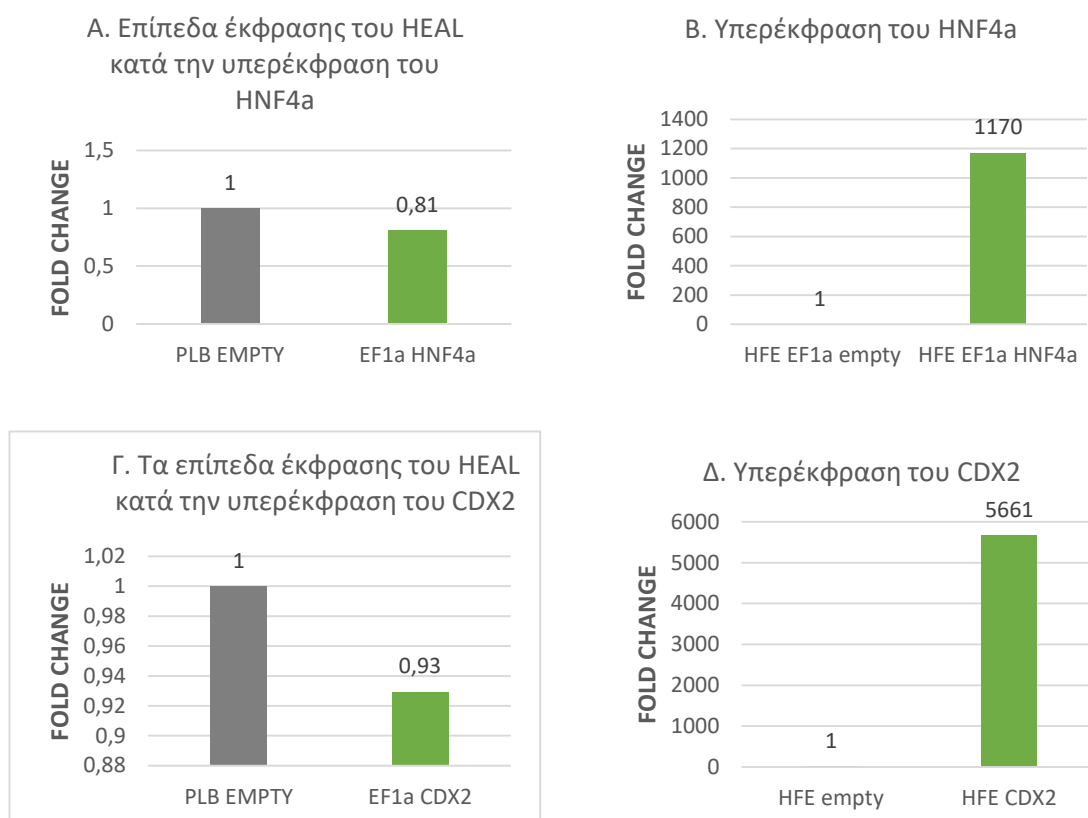
4.2.1 Επίπεδα έκφρασης του HEAL ύστερα από υπερέκφραση των CDX2 & HNF4a σε κύτταρα HFE

Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται στα δεξιά οι υπερεκφράσεις των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2 και αριστερά κατ' αντιστοιχία το αντίκτυπο που έχουν οι υπερεκφράσεις αυτές στα επίπεδα έκφρασης του HEAL. Τόσο οι υπερεκφράσεις των μεταγραφικών, όσο και τα αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση του HEAL εκφράζονται ως προς ποσοστό επί των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου (μη μετασχηματισμένος φορέας pLB). Οι κανονικοποιήσεις έχουν γίνει με τη χρήση του ιδιοσυστατου γονιδίου GAPDH.



Εικόνα 15: Το αποτέλεσμα που έχει η υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a (B) και CDX2(Δ) στα επίπεδα έκφρασης του HEAL(A, Γ)

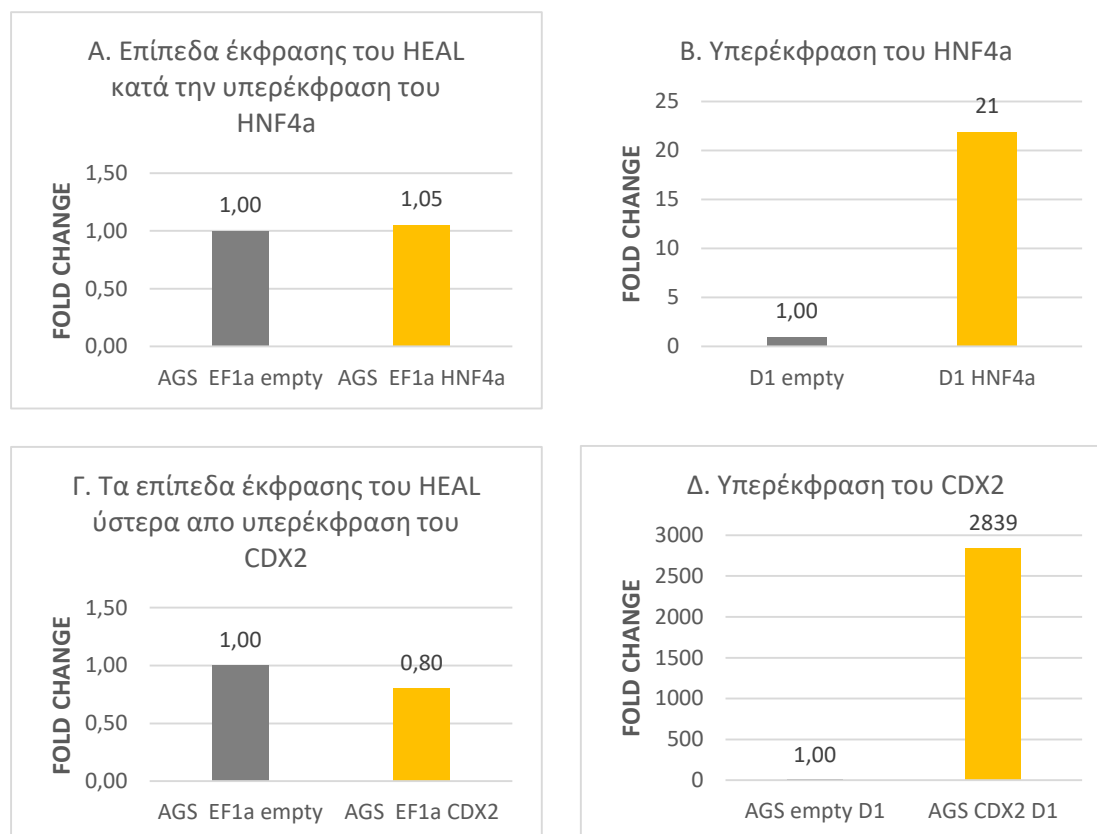
Όπως φαίνεται από την **Εικόνα 15** με την υπερέκφραση του HNF4a προκύπτει μείωση στην έκφραση του HEAL της τάξης του 40%. Από την άλλη μεριά, η υπερέκφραση του CDX2 φαίνεται να μην έχει αντίκτυπο στην έκφραση του HEAL. Την ίδια τάση φαίνεται να ακολουθούν και αποτελέσματα από δεύτερη βιολογική επανάληψη υπερέκφρασης των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων σε HFE κύτταρα (**Εικόνα 16**) τα οποία εκφράζονται σε σχέση με τα αρνητικά δείγματα ελέγχου (pLB empty και EF1a empty).



Εικόνα 16: Το αντίκτυπο της υπερέκφρασης των HNF4a(B) & CDX2 (Δ) στα επίπεδα έκφρασης του HEAL(A, Γ) σε HFE κύτταρα

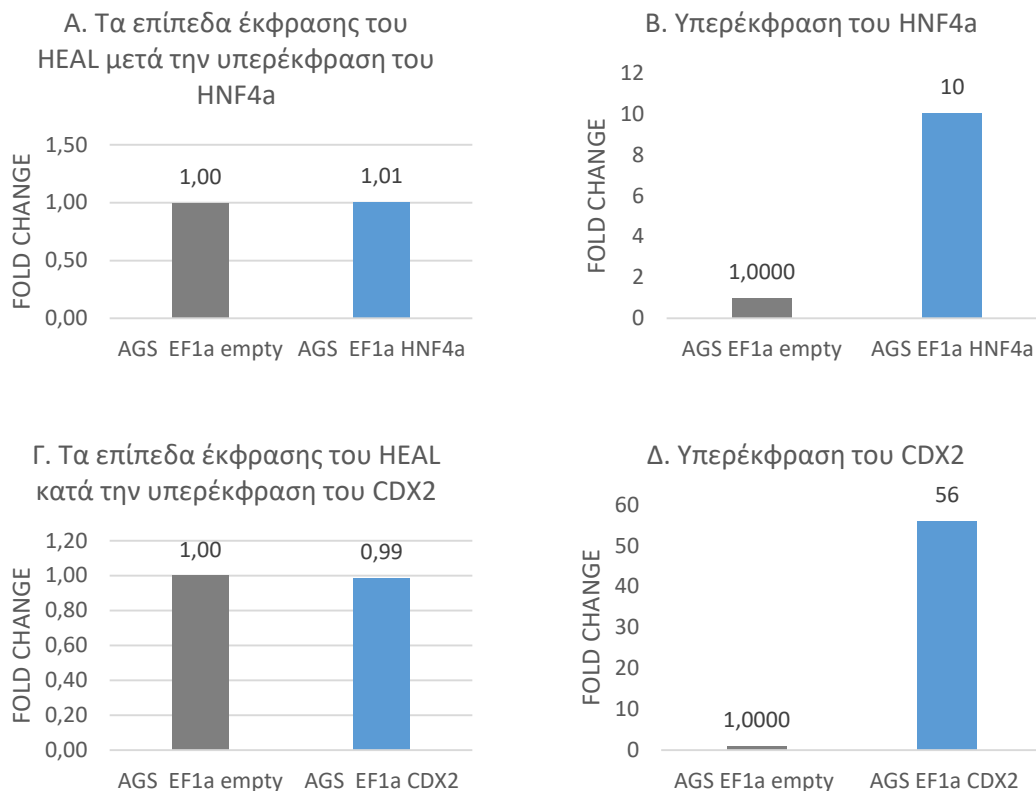
4.2.2 Επίπεδα έκφρασης του HEAL ύστερα από υπερέκφραση των CDX2 & HNF4a σε AGS κύτταρα

Στα παρακάτω διαγράμματα (**Εικόνα 17**) φαίνονται στα δεξιά οι υπερεκφράσεις των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2 σε κύτταρα AGS και αριστερά κατ' αντιστοιχία το αντίκτυπο που έχουν οι υπερεκφράσεις αυτές στα επίπεδα έκφρασης του HEAL στα ίδια κύτταρα εκφρασμένα ως προς τα αρνητικά δείγματα ελέγχου (EF1a empty).



Εικόνα 17: (Α) Το αντίκτυπο της υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a στην έκφραση του HEAL, (Β) Η αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του HNF4a, (Γ) Το αντίκτυπο στην έκφραση του HEAL ύστερα από υπερέκφραση του CDX2, (Δ) η αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του CDX2

Όσον αφορά τις υπερεκφράσεις των μεταγραφικών παραγόντων στην περίπτωση των AGS κυττάρων και λαμβάνοντας υπόψη τα ραβδογράμματα της εικόνας 17, οι υπερεκφράσεις των HNF4a & CDX2 φαίνεται να έχουν αμελητέα επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του HEAL σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS. Ανάλογα ευρήματα προκύπτουν και από διαφορετικό πείραμα υπερέκφρασης των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων σε AGS κύτταρα (**Εικόνα 18**).

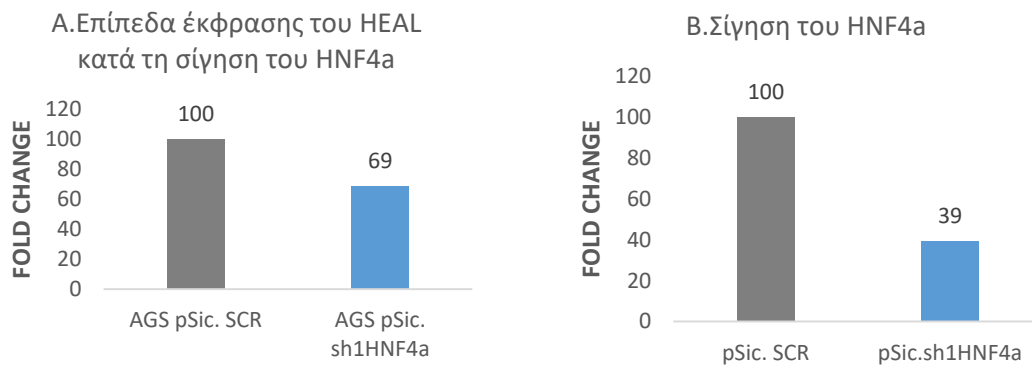


Εικόνα 18: Τα επίπεδα έκφρασης του HEAL (Α,Γ) ύστερα από την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a(Β) και CDX2(Δ) σε κύτταρα AGS. Όλα τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως προς το αρνητικό δείγμα ελέγχου EF1a

4.2.3 Επίπεδα έκφρασης του HEAL ύστερα από σίγηση των CDX2 & HNF4a σε γαστρικές καρκινικές σειρές

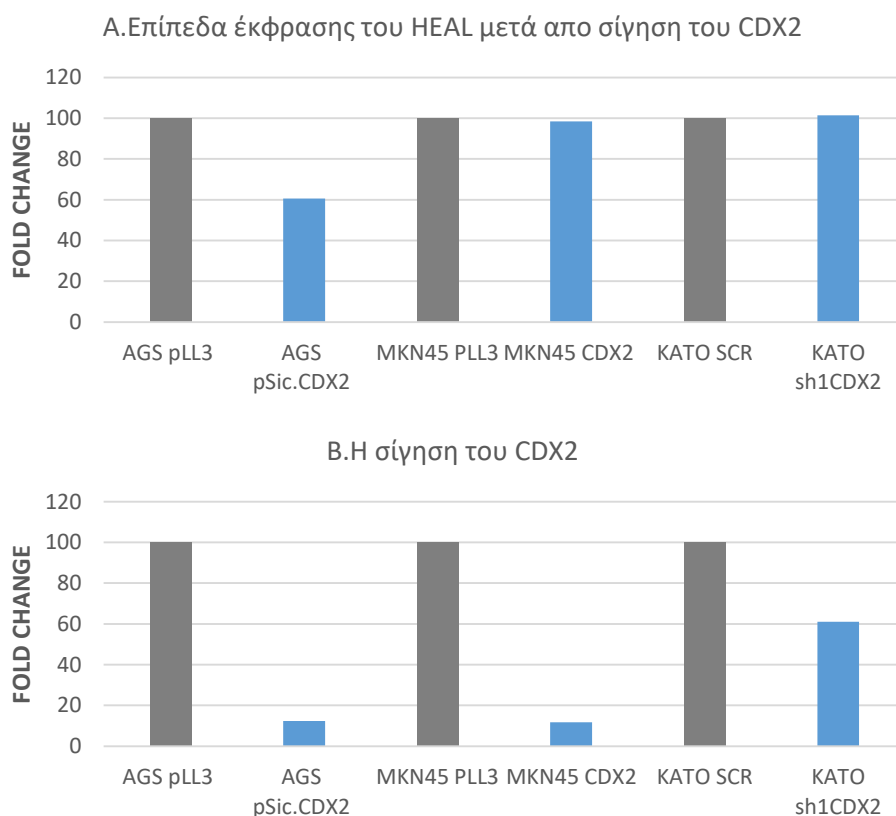
Η σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε μόνο σε γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, επειδή μόνο σε αυτές εκφράζονται οι υπό μελέτη μεταγραφικοί παράγοντες. Πιο ειδικά, συνδυάζοντας ότι τα HFE κύτταρα είναι υγιή κύτταρα γαστρικού επιθηλίου, τα AGS, MKN45 και KATOIII είναι κύτταρα γαστρικού καρκίνου καθώς και ότι στο γαστρικό καρκίνο συναντάται η έκτοπη έκφραση των CDX2 και HNF4a, γίνεται αντιληπτό ότι η εξέταση της συνθήκης σίγησης των μεταγραφικών αυτών παραγόντων στα HFE κύτταρα δεν έχει νόημα καθώς σε αυτά τα κύτταρα οι CDX2 και HNF4a δεν εκφράζονται.

Στην εικόνα που ακολουθεί (**Εικόνα 19**) φαίνεται η σίγηση του HNF4a σε αντιπαραβολή με το αποτέλεσμα που η ίδια επιφέρει στην έκφραση του υπό εξέταση lncRNA. Σύμφωνα με τα ραδιογράμματα της εικόνας 16 με σίγηση του HNF4a της τάξης του 60%, προκύπτει μείωση στην έκφραση του HEAL σε ποσοστό περίπου 40% όπως παρατηρείται για το HEAL και στην περίπτωση της υπερέκφρασης του HNF4a.



Εικόνα 19: (Α) Τα επίπεδα έκφρασης του HEAL ύστερα από σίγηση του HNF4a σε κύτταρα AGS εκφρασμένα ως προς το αρνητικό δείγμα ελέγχου pSicoR SCR , (Β) Η σίγηση του HNF4a εκφρασμένη ως προς το αρνητικό δείγμα ελέγχου pSicoR SCR

Κατά τη σίγηση του CDX2 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS, MKN45 και KATOIII προκύπτουν ποικίλες παρατηρήσεις. Αρχικά, φαίνεται πως στα AGS και MKN45 κύτταρα έχει επιτευχθεί η σίγηση του CDX2 σε ικανοποιητικό βαθμό της τάξης του 90% περίπου, ενώ για τα KATOIII η σίγηση είναι της τάξης του 40% (**Εικόνα 20B**). Όσον αφορά το αντίκρισμα αυτών των CDX2 σιγήσεων στα επίπεδα έκφρασης του HEAL, παρατηρείται μια σημαντική μείωση της έκφρασης περίπου στο 40% μόνο στα AGS κύτταρα σε σχέση με το αρνητικό control (AGS PLL3)(**Εικόνα 20A**).



Εικόνα 20: (Α) Τα επίπεδα έκφρασης του HEAL μετά από σίγηση του CDX2 σε τρεις καρκινικές γαστρικές κυτταρικές σειρές AGS, MKN45 & KATOIII, (Β) Η αποτελεσματικότητα της σίγησης του CDX2 στις AGS, MKN45 και KATOIII

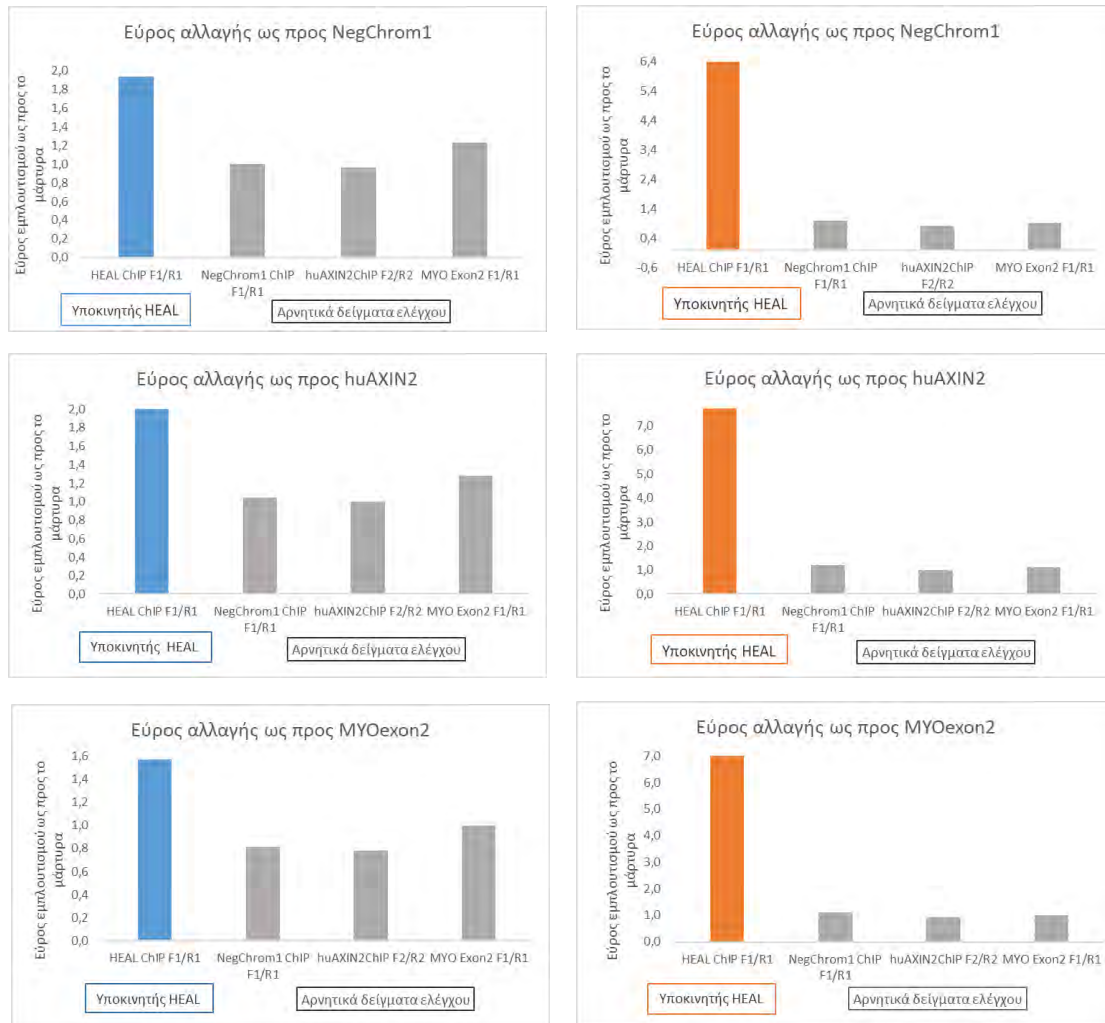
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως η έκφραση του HEAL επηρεάζεται από την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a.

4.3 Αποτελέσματα ChIP-qPCR για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a

Ύστερα από τα αποτελέσματα των qPCR για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του HEAL μετά από υπερέκφραση και σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2, πραγματοποιήθηκε qPCR έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation/ChIP) για την ενίσχυση των γονιδωματικών περιοχών του HEAL στις οποίες πιθανώς να προσδένονται οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες σε κύτταρα AGS. Ο σκοπός αυτού του πειράματος ήταν η διαλεύκανση της σχέσης των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a & CDX2 με το υπό μελέτη lncRNA και ειδικότερα μελετήθηκε η *in vitro* αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων με τον υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για το HEAL. Για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης, πραγματοποιήθηκε ChIP-qPCR σε δείγμα μη κατακερματισμένης χρωματίνης, που χρησιμεύει ως αρνητικός μάρτυρας, και ανοσοκατακρημνισμένης (immunoprecipitated/IP) για κάθε μεταγραφικό παράγοντα με ζεύγος εκκινητών που αναγνωρίζει την αλληλουχία του υπό μελέτη υποκινητή. Επιπλέον, ως αρνητικοί μάρτυρες για την διερεύνηση της ειδικότητας της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στις περιοχές στόχους χρησιμοποιήθηκαν οι γονιδωματικές περιοχές NegChrom1 (τμήμα μεσογονιδιακής περιοχής του γονιδιώματος), huAXIN2 (αλληλουχία εξονίου) και MYOexon2 (αλληλουχία εξονίου), στις οποίες δεν προσδένονται οι εν λόγω μεταγραφικοί παράγοντες όπως έχει διαπιστωθεί από δεδομένα αλληλούχησης ChIP (ChIP-seq) του εργαστηρίου.

CDX2 IP

HNF4a IP



Εικόνα 21: Αποτελέσματα των ChIP-qPCR για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 (αριστερά) και HNF4a (δεξιά). Στα παραπάνω γραφήματα απεικονίζεται το εύρος αλλαγής του σήματος στη γονιδιωματική περιοχή-στόχο (παρουσιάζονται με πορτοκαλί και μπλε χρώμα) σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες NegChrom1, huAXIN2 και MYOexon2 (παρουσιάζονται με γκρι χρώμα) στην ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη για τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων των ChIP-qPCR που πραγματοποιήθηκαν για τους μεταγραφικούς CDX2 και HNF4a παρουσιάζονται στην **Εικόνα 21**. Από τις κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων ως προς κάθε αρνητικό μάρτυρα μεμονωμένα, γίνεται κατανοητό ότι οι γονιδιωματικές περιοχές που επιλέχθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες είναι κατάλληλοι, καθώς δεν παρατηρείται εμπλουτισμός των συγκεκριμένων περιοχών στα δείγματα ανοσοκατακρήμνισης του CDX2 και του HNF4a, γεγονός που αποδεικνύεται από τον μεταξύ τους λόγο που είναι κοντά στην μονάδα παρουσιάζοντας μόνο μικρές αποκλίσεις. Σχετικά με την ανοσοκατακρήμνιση του CDX2, υπάρχει ασθενής ανίχνευση της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στον υποκινητή του υπό μελέτη γονιδίου αφού παρατηρείται υψηλότερος (~2 φορές) εμπλουτισμός της συγκεκριμένης γονιδιωματικής αλληλουχίας να είναι σε σχέση με τα αρνητικά δείγματα ελέγχου. Όσον αφορά την ανοσοκατακρήμνιση για

τον HNF4a, παρατηρείται έντονος εμπλουτισμός στη γονιδιωματική περιοχή στόχο κατά περίπου 7 φορές περισσότερος συγκριτικά με τα αρνητικά δείγματα ελέγχου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την αλληλεπίδραση κυρίως του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a και δευτερευόντως του CDX2 στη συγκεκριμένη γονιδιωματική περιοχή. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνεται η σημαντική αλληλεπίδραση των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων με την χρωματίνη του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για το HEAL και ιδιαίτερα όσον αφορά τον HNF4a.

4.4 RNAi σίγηση του HEAL

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση κατάλληλα σχεδιασμένων shRNAs στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR για την καταστολή του υπό μελέτη lncRNA HEAL και ακολούθησαν πειράματα RNAi σίγησης του μεταγράφου σε κύτταρα AGS και NUGC4, μέσω της εισαγωγής των κλωνοποιημένων φορέων στα κύτταρα με λεντιούς. Η επιλογή των AGS κυττάρων έγινε με βάση τα αποτελέσματα της qPCR για τη cell line expression, τα οποία υπέδειξαν τα AGS ως την κυτταρική σειρά με τη μέγιστη έκφραση. Επίσης τα AGS μετασχηματίζονται εύκολα και μεγαλώνουν γρήγορα ενώ είναι από πρωτεύον γαστρικό όγκο. Τα NUGC4 κύτταρα επιλέχθηκαν προκειμένου να γίνει μια ανεξάρτητη επανάληψη σε μια δεύτερη καρκινική κυτταρική σειρά η οποία μετασχηματίζεται με σχετική ευκολία όπως και τα AGS, ενώ παράλληλα εκφράζει τους μεταγραφικούς παράγοντες αλλά και το lncRNA σε ικανοποιητικά επίπεδα. Απώτερος σκοπός της διαδικασίας της κλωνοποίησης ήταν η κατασκευή αποτελεσματικού εργαλείου παροδικής σίγησης, το οποίο θα μπορούσε να αξιοποιηθεί μελλοντικά για την διερεύνηση και αποσαφήνιση του ρόλου του lncRNA ενδιαφέροντος.

4.4.1 Αποτελέσματα διαγνωστικής PCR για την ανίχνευση πλασμιδιακών φορέων με ένθεμα το shRNA ενδιαφέροντος

Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR που πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 2% για την ανίχνευση των φορέων pSicoR στους οποίους έχει κλωνοποιηθεί επιτυχώς το shRNA για το μετάγραφο HEAL, τα αναμενόμενα προϊόντα ενός θετικού κλώνου είναι μια ενισχυμένη ζώνη μεγέθους 210bp, ενώ στην περίπτωση ανεπιτυχούς ενσωμάτωσης αντίστοιχα ενισχύεται μια ζώνη 148bp (**Εικόνα 22**).

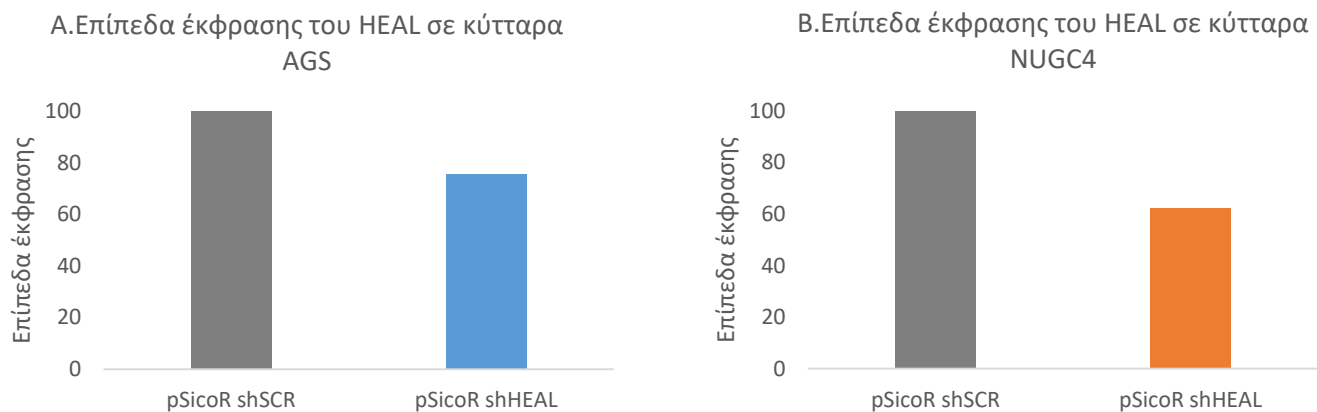


Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων διαγνωστικής PCR του φορέα *pSicoR* με σκοπό την ανίχνευση θετικών φορέων για το *shHEAL* σε πηκτή αγαρόζης 2%. *Ladder*: μάρτυρας μοριακών βαρών 100bp της *Enzyquest*. *NC*: αρνητικό δείγμα ελέγχου. *PC*: θετικό δείγμα ελέγχου. *SL*: *self ligation*

Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% συμπεραίνεται ότι ο φορέας στον οποίο κλωνοποιήθηκε το *shRNA* για το *HEAL* στην ένατη διαδρομή είναι θετικός, καθώς η ζώνη εμφανίζεται περίπου στις 200 bp, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των θετικών δειγμάτων ελέγχου (2^η διαδρομή, 4^η διαδρομή – πλασμιδιακός φορέας *pSicoR* με ένθεμα *shRNA*) και σε αντίθεση με τα αρνητικά δείγμα ελέγχου (3^η διαδρομή, 5^η διαδρομή – πλασμιδιακός φορέας *pSicoR*) που η μικρότερη ζώνη αντιστοιχεί σε τμήμα DNA μεγέθους ~150 bp. Τελικά, από την ηλεκτροφόρηση προκύπτει ότι η ένθεση του *shRNA* ήταν επιτυχής για τον τρίτο κλώνο που απομονώθηκε.

4.4.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης του *HEAL* μεταγράφου

Η αποτελεσματικότητα της σίγησης στα AGS και NUGC4 κύτταρα ελέγχθηκε με qPCR αφού είχε προηγηθεί απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA όπως περιγράφηκε προηγουμένως στην παράγραφο 3.8 & 3.10. Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου στο πείραμα σίγησης αποτέλεσαν κύτταρα AGS και NUGC4, τα οποία διαμολύνθηκαν με λεντιούς που έφεραν κλωνοποιημένο πλασμιδιακό φορέα *pSicoR* με ένθεμα κατάλληλα σχεδιασμένου *shRNA* (*shSCR*) για σίγηση της αλληλουχίας RNA scramble (*SCR*), η οποία δεν στοχεύει πουθενά στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Τα αρνητικά δείγματα ελέγχου ονομάστηκαν AGS *SCR* και NUGC4 *SCR*, αντίστοιχα. Ο υπολογισμός της έκφρασης έγινε σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Συγκριτικά με το control, για το οποίο ορίζεται η τιμή 100, το *shRNA* του *HEAL* εκφράζεται 25% λιγότερο στην περίπτωση των AGS κυττάρων και περίπου 40% λιγότερο στα NUGC4 κύτταρα (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 23: (Α) Επίπεδα έκφρασης του HEAL μετά από την σίγησή του σε κύτταρα AGS. (Β) Επίπεδα έκφρασης του HEAL μετά από την σίγησή του σε κύτταρα NUGC4.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως η καταστολή του HEAL κρίνεται επιτυχής και στις δύο κυτταρικές, αλλά ο βαθμός καταστολής είναι περιορισμένος ειδικά στα κύτταρα AGS.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα lncRNAs έχουν προταθεί ως υποψήφιοι βιοδείκτες για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου και το αποτελούν θέμα συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος εντός της επιστημονικής κοινότητας. Η μεγάλη πρόοδος των τεχνικών RNA seq σε συνδυασμό με την πληθώρα διαθέσιμων βιοπληροφορικών εργαλείων έχουν συνεισφέρει στην ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του προφίλ έκφρασης μη κωδικοποιητικών μεταγράφων που παίζουν σημαντικό ρόλο για σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με το γαστρικό καρκίνο. Υπάρχει πλέον ένας μεγάλος αριθμός lncRNAs τα οποία έχουν μελετηθεί όχι μόνο ως προς τη διαγνωστική και προγνωστική τους αξία στον καρκίνο του στομάχου αλλά και ως θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση της νόσου [132, 133]. Για παράδειγμα το lncRNA HOTAIR μπορεί να αξιοποιηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης στον γαστρικό καρκίνο για το συνολικό προγνωστικό επιβίωσης των ασθενών [131]. Η αυξημένη έκφραση του HOTAIR στο ΓΚ είναι ένδειξη περιτοναϊκής διάχυσης (peritoneal diffusion), φλεβικής διήθησης (venous infiltration), ενώ είναι συνυφασμένη και με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης [109]. Επιπροσθέτως, μια ομάδα δέκα lncRNAs έχει αξιοποιηθεί συνδυαστικά με στόχο την πρόγνωση του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, η οποία αποτελείται από τα lncRNA SOX21-AS1, HCG22, C5orf66-AS1, TINCR, MIR205HG, PGM5-AS1, NALT1, ENSG00000241224.2, ENSG00000262756, HNF4A-AS1. Αυτά φαίνεται πως μπορούν να συσχετιστούν με τη συνολική επιβίωση (Overall Survival ή OS) και κατά συνέπεια να χρησιμοποιηθούν για προγνωστικούς σκοπούς [111]. Επιπλέον, έχει μελετηθεί και μια άλλη ομάδα πέντε lncRNAs τα οποία προτείνονται για τα προγνωστικά συνολικής επιβίωσης ΓΚ ασθενών. Το προγνωστικό μοντέλο αυτό χαρακτηρίζεται από τιμή AUC 0,815, που συνεπάγεται υψηλή διαγνωστική ακρίβεια και ειδικότητα [134]. Επίσης έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης των GASL1 (growth arrest associated lncRNA 1), PTCSC3 (papillary thyroid carcinoma susceptibility candidate 3) συνδέονται σημαντικά με το μέγεθος του όγκου, το στάδιο TNM καθώς και τη μετάσταση σε μακρινούς ιστούς και όργανα. Επιπλέον έχουν αναφερθεί τα HOXA11-AS (HOXA11 antisense RNA) και TUBA4B (tubulin alpha 4b) αφού φαίνεται να σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το μέγεθος και το στάδιο του όγκου, καθώς και τη μετάσταση στους λεμφαδένες. Αξίζει να αναφερθεί ότι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του HOXA11-AS έχουν καλύτερο ποσοστό επιβίωσης, ενώ ασθενείς με χαμηλή έκφραση TUBA4B έχουν μικρότερο χρόνο επιβίωσης [132]. Προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός των ασθενών υψηλού κινδύνου από τους ασθενείς χαμηλού κινδύνου, αναπτύχθηκε και επιβεβαιώθηκε μια υπογραφή 12 lncRNAs. Το εν λόγω συνδυαστικό μοντέλο συνοδεύεται από μια τιμή 0,869 όσον αφορά το AUC, γεγονός που φανερώνει πως μπορεί να βελτιώσει την ακρίβεια της διάγνωσης για τους ασθενείς [135]. Παράλληλα, η έκφραση του lncRNA SNHG3 είναι υψηλή σε πολλούς καρκινικούς τύπους. *In vivo* και *in vitro* δοκιμές έδειξαν ότι το συγκεκριμένο μεταγράφο μπορεί να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση [130]. Όλες οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι τα απορρυθμισμένα lncRNAs διαδραματίζουν καθοριστικής σημασίας ρόλους για τους ασθενείς με γαστρικό καρκίνο και πλέον θεωρούνται πολλά υποσχόμενα μόρια όχι μόνο για την πρόγνωση αλλά και τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου [109, 130] λόγω της ισχυρά καρκινοειδικής έκφρασής και λειτουργίας τους.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος του lncRNA HEAL, το οποίο μέσα από βιοπληροφορικές αναλύσεις βρέθηκε να έχει τροποποιημένη έκφραση στο γαστρικό καρκίνο και ενδείξεις σχετικά με τη ρύθμισή του από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF4a ή / και CDX2. Από τις αναλύσεις περί έκφρασης του HEAL στις διάφορες κυτταρικές σειρές, φάνηκε πως η παρουσία του HEAL εμφανίζεται διάχυτη πέρα από το γαστρικό και σε άλλους τύπους καρκίνου. Από τα παρόντα δεδομένα προκύπτει πως το

συγκεκριμένο lncRNA έχει την τάση να εμφανίζει πιο έντονη έκφραση σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα όσον αφορά τις συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές στις οποίες και εξετάστηκε η έκφρασή του. Επίσης προκύπτουν ενδείξεις ότι σε καρκινικά κύτταρα εντοπίζεται κατά κανόνα μεγαλύτερος αριθμός μεταγράφων σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα (π.χ. HFE), γεγονός που υποδηλώνει καρκινοειδική έκφραση. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η μέγιστη έκφραση του HEAL σε AGS κύτταρα μπορεί να αποτελέσει ένδειξη περί της καταλληλότητας του ως διαγνωστικού δείκτη καθώς τα AGS είναι κύτταρα γαστρικού καρκίνου σε αρχικά στάδια της νόσου που αφορούν σε αμιγώς πρωτεύοντα γαστρικό όγκο, σε αντίθεση με τα MKN45 ή τα NUGC4 που αφορούν μεταστατικό στάδιο [136, 137]. Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR ύστερα από την κυτταρική κλασμάτωση φάνηκε πως το HEAL είναι ένα πυρηνικό lncRNA που καθώς έχει μέγιστη συγκέντρωση στο χρωματινικό κλάσμα. Το συγκεκριμένο εύρημα θα μπορούσε να δώσει μια πιθανή ερμηνεία για το λειτουργικό ρόλο του υπό μελέτη μεταγράφου όπως για παράδειγμα τη συμμετοχή του στη διαμόρφωση μεταγραφικών αποκρίσεων μέσω τροποποίησης της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης καθώς και της καθιέρωσης της χωρικής οργάνωσης του πυρήνα δρώντας ως ικρίωμα [138]. Έχει αποδειχθεί ότι τα πυρηνικά lncRNAs συνεργάζονται με πρωτεΐνες με σκοπό τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πιθανότατα μέσω τροποποίησης της δομής της χρωματίνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο σχηματισμός ενός πλέγματος χρωματίνης, μη κωδικοποιητικού μεταγράφου και μίας ριβονουκλεοπρωτεΐνης το οποίο μπορεί να δράσει τόσο στην αποσυμπίεση της χρωματίνης όσο και στην οργάνωση της δομής της [139]. Επιπρόσθετο παράδειγμα ενός εκτενώς μελετημένου μακρού μη κωδικοποιητικού μεταγράφου που εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και δρα ως ικρίωμα στον γαστρικό καρκίνο είναι το NEAT1 [140, 141].

Προκειμένου να ολοκληρωθεί ο χαρακτηρισμός της έκφρασης του lncRNA HEAL έγινε μελέτη της μετα-μεταγραφικής σταθερότητάς του απ'όπου προέκυψε ότι είναι ένα εξαιρετικά σταθερό μετάγραφο με χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 5 ώρες στα AGS κύτταρα αν συγκριθεί με το MYC μετάγραφο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι χρόνοι ημιζωής για τα lncRNA χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλία με μέσος χρόνος ημίσειας ζωής τις 3.96h σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος στον πνεύμονα [142]. Συνεπώς η μεγάλη σταθερότητα του HEAL είναι ένα χαρακτηριστικό που δε συνηθίζεται μεταξύ των lncRNAs καθώς η συντριπτική πλειοψηφία αυτών έχει χρόνους ημιζωής μικρότερους των δύο ωρών [143].

Από αναλύσεις για τον προσδιορισμό της έκφρασης του HEAL στις HFE, AGS, MKN & KATOIII κυτταρικές σειρές στις οποίες είχε προηγηθεί σίγηση ή/και υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2 προέκυψε πληθώρα παρατηρήσεων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πιο συγκεκριμένα, στα HFE κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται ούτε ο HNF4a, ούτε ο CDX2, έγινε υπερέκφραση των εν λόγω μεταγραφικών [70, 144, 145]. Εφόσον οι HNF4a και CDX2 δεν εκφράζονται φυσιολογικά στα γαστρικά κύτταρα αλλά η έκτοπη έκφραση τους λαμβάνει χώρα σε γαστρικούς όγκους, η υπερέκφραση τους στα HFE κύτταρα κατέστησε τα κύτταρα αυτά μια προσομοίωση γαστρικών καρκινικών κυττάρων σε αρχικά στάδια ή σε κατάσταση προκαρκινικής αλλοίωσης. Στη συνθήκη αυτή, η υπερέκφραση του HNF4a είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του HEAL κατά περίπου 40%. Αντίστοιχα, η υπερέκφραση του CDX2 στα ίδια κύτταρα δεν επέφερε καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του HEAL. Από τα αποτελέσματα αυτά μπορεί κανείς να εξάγει το συμπέρασμα ότι εάν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων και του υπό μελέτη lncRNA, τότε αυτή εντοπίζεται αποκλειστικά μεταξύ του HNF4a και του HEAL. Όσον αφορά τα AGS κύτταρα στα οποία οι CDX2 & HNF4a ούτως ή άλλως εκφράζονται, η υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων φάνηκε να μην επιφέρει κάποια αλλαγή στα

επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου. Παράλληλα εξετάστηκαν τα επίπεδα του HEAL σε AGS κύτταρα στα οποία προηγουμένως είχε γίνει σίγηση του HNF4a. Αντίθετα από ότι θα ανέμενε κανείς με βάση τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης του HNF4a στα HFE κύτταρα, η ίδια τάση για τα επίπεδα έκφρασης του HEAL φαίνεται να ακολουθείται και στην συνθήκη καταστολής. Αναλυτικότερα, με την σίγηση του HNF4a προκύπτει μείωση της έκφρασης του HEAL κατά 40%. Συνεπώς, θα μπορούσε να διατυπωθεί το συμπέρασμα ότι ο HNF4a δρα επαγωγικά ως προς το HEAL μετάγραφο αφού τα επίπεδα του μειώνονται κατά την σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα. Όσον αφορά τα ποσοστά έκφρασης του HEAL κατά τη σίγηση του CDX2, αυτά εξετάστηκαν σε τέσσερις γαστρικές καρκινικές σειρές με το ενδιαφέρον να εντοπίζεται στις AGS και MKN45 για τις οποίες φαίνεται πως για ίδια ποσοστά σίγησης του CDX2 στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές επιτυγχάνεται τελείως διαφορετική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του HEAL. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από σίγηση του CDX2 που φτάνει το 90% και στις δύο γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές προκύπτει μείωση της έκφρασης του HEAL κατά 40% στα AGS κύτταρα και καμία μεταβολή για τα MKN45. Αναφορικά με την KATOIII, η σίγηση του CDX2 φαίνεται να μην επηρεάζει την έκφραση του HEAL.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a διαπιστώθηκε σημαντική αλληλεπίδραση του HNF4a με τον υποκινητή του HEAL όπου παρουσίασε ενίσχυση σήματος κατά περίπου 7 φορές στην ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη για τον HNF4a. Τα παραπάνω δεδομένα για τον HNF4a επιβεβαιώνουν τις βιοπληροφορικές παρατηρήσεις, υποστηρίζοντας την υπόθεση της άμεσης ρύθμισης του υπό μελέτη lncRNA από τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται και το μακρύ μη κωδικοποιητικό μετάγραφο lnc-APUE ως στόχος του HNF4a. Πιο ειδικά, το lnc-APUE ρυθμίζεται από τον εν λόγω μεταγραφικό ύστερα από αλληλεπίδραση του HNF4a με τον υποκινητή του και μάλιστα με τέτοιο τρόπο ώστε το μετάγραφο να καταστέλλεται [146]. Επιπρόσθετα, στον υποκινητή του HEAL φαίνεται να προσδένεται δευτερευόντως ο παράγοντας CDX2 με περίπου 2 φορές ενίσχυση στην ίδια θέση.

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση του shRNA, που σχεδιάστηκε με σκοπό την ειδική σίγηση του HEAL, στους πλασμιδιακούς φορείς pSicoR, ακολούθησε σίγηση του μεταγράφου σε AGS και NUGC4 κύτταρα μέσω της εισαγωγής των φορέων με το σύστημα των λεντιών. Ο προσδιορισμός των σχετικών επιπέδων έκφρασης του HEAL έδειξε ότι το εργαλείο RNAi σίγησης που κατασκευάστηκε παρήγαγε αναποτελεσματικό επίπεδο παρεμβολής καθώς τα επίπεδα του HEAL μειώθηκαν μόνο κατά 25% στα AGS κύτταρα. Όσον αφορά τα NUGC4, εκεί το επίπεδο παρεμβολής έφτανε το 40%, ποσοστό που συναντάται κατά τη βιβλιογραφία για τις σιγήσεις lncRNAs σε γαστρικά κύτταρα [146-149]. Στους πιθανούς λόγους για τα επίπεδα της RNAi σίγησης σε ζωντανά κύτταρα μέσω της εισαγωγής του εργαλείου καταστολής με το σύστημα των λεντιών εντάσσεται η πιθανότητα να μην ήταν επιτυχής η διαμόλυνση των κυττάρων λόγω χαμηλής αραίωσης του ιού και το shRNA να μην εκφράστηκε βέλτιστα ή να μην είχε βέλτιστη δράση λόγω ακατάλληλου σχεδιασμού. Σε κάθε περίπτωση χρειάζεται να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών του πειράματος για την σίγηση του συγκεκριμένου μεταγράφου και να επαναληφθεί σε βέλτιστες συνθήκες.

Στους μελλοντικούς στόχους για την έρευνα σχετικά με το HEAL μετάγραφο θα μπορούσε να ενταχθεί η φαινοτυπική διερεύνηση. Πιο ειδικά, θα μπορούσε να ελεγχθεί μετά τη σίγηση του HEAL τι συνεπάγεται αυτό για φαινοτυπικά για τα κύτταρα. Παράλληλα, θα μπορούσε να ερευνηθεί αν μπορεί να προκύψει μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης απ' όσα προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία. Ακόμα θα μπορούσε να ακολουθηθεί αντί διαφορετικός

μηχανισμός σίγησης, αντί για knockdown γονιδίου να δοκιμαστεί η χρήση ενός CRISPR συστήματος για την απαλοιφή του γονιδίου ακολουθούμενη και αυτή από φαινοτυπική παρατήρηση και ενδεχομένως μια RNAseq ανάλυση με την προϋπόθεση ότι έχει προηγουμένως προκύψει ένα ενδιαφέρον φαινοτυπικό αποτέλεσμα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.
2. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
3. Wang, S., et al., *Global and national trends in the age-specific sex ratio of esophageal cancer and gastric cancer by subtype*. Int J Cancer, 2022. **151**(9): p. 1447-1461.
4. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
5. Sexton, R.E., et al., *Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies*. Cancer Metastasis Rev, 2020. **39**(4): p. 1179-1203.
6. Katoh, H. and S. Ishikawa, *Lifestyles, genetics, and future perspectives on gastric cancer in east Asian populations*. J Hum Genet, 2021. **66**(9): p. 887-899.
7. Sekiguchi, M., et al., *Epidemiological Trends and Future Perspectives of Gastric Cancer in Eastern Asia*. Digestion, 2022. **103**(1): p. 22-28.
8. Ajani, J.A., et al., *Gastric Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2022. **20**(2): p. 167-192.
9. Leja, M. and A. Line, *Early detection of gastric cancer beyond endoscopy - new methods*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2021. **50-51**: p. 101731.
10. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
11. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
12. Waldum, H.L. and R. Fossmark, *Types of Gastric Carcinomas*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(12).
13. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
14. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
15. Gomez, K., et al., *Genomic landscape of virus-associated cancers*. medRxiv, 2023.
16. Sun, K., et al., *EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 583463.
17. Geddert, H., et al., *EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1*. Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(3): p. 209-14.
18. Koriyama, C., et al., *Loss of p16/CDKN2A protein in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma*. Oncology, 2004. **67**(1): p. 81-7.
19. Zhou, H., et al., *Expression and significance of EBV, ARID1A and PIK3CA in gastric carcinoma*. Mol Med Rep, 2019. **19**(3): p. 2125-2136.
20. Jiao, Y., Y. Feng, and X. Wang, *Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications*. Biochemistry (Mosc), 2018. **83**(11): p. 1289-1298.
21. Lai, K., M.C. Killingsworth, and C.S. Lee, *Gene of the month: PIK3CA*. J Clin Pathol, 2015. **68**(4): p. 253-7.
22. Liu, J., et al., *Profiles of PD-1, PD-L1, PD-L2 in Gastric Cancer and Their Relation with Mutation, Immune Infiltration, and Survival*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 2496582.
23. Tucker, C.G., et al., *The Role of Programmed Death-1 in Type 1 Diabetes*. Curr Diab Rep, 2021. **21**(6): p. 20.
24. Nakano, H., et al., *PD-L1 overexpression in EBV-positive gastric cancer is caused by unique genomic or epigenomic mechanisms*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 1982.

25. Rodriquez, M.G., et al., *MSI and EBV Positive Gastric Cancer's Subgroups and Their Link With Novel Immunotherapy*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
26. Sanjeevaiah, A., et al., *Gastric Cancer: Recent Molecular Classification Advances, Racial Disparity, and Management Implications*. J Oncol Pract, 2018. **14**(4): p. 217-224.
27. Baretti, M. and D.T. Le, *DNA mismatch repair in cancer*. Pharmacol Ther, 2018. **189**: p. 45-62.
28. Puliga, E., et al., *Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows*. Cancer Treat Rev, 2021. **95**: p. 102175.
29. Martinez-Ciarpaglini, C., et al., *Assessing molecular subtypes of gastric cancer: microsatellite unstable and Epstein-Barr virus subtypes. Methods for detection and clinical and pathological implications*. ESMO Open, 2019. **4**(3): p. e000470.
30. Yang, G., R.Y. Zheng, and Z.S. Jin, *Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours*. J Cancer Res Clin Oncol, 2019. **145**(12): p. 2891-2899.
31. Kushima, R., *The updated WHO classification of digestive system tumours-gastric adenocarcinoma and dysplasia*. Pathologe, 2022. **43**(1): p. 8-15.
32. Bonelli, P., et al., *Precision medicine in gastric cancer*. World J Gastrointest Oncol, 2019. **11**(10): p. 804-829.
33. Kohlruss, M., et al., *Diverse 'just-right' levels of chromosomal instability and their clinical implications in neoadjuvant treated gastric cancer*. Br J Cancer, 2021. **125**(12): p. 1621-1631.
34. Sabapathy, K. and D.P. Lane, *Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(1): p. 13-30.
35. Liu, X. and S.J. Meltzer, *Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(3): p. 348-358.
36. Ling, Y., et al., *Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer*. Comput Struct Biotechnol J, 2020. **18**: p. 3301-3308.
37. Shenoy, S., *CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 10477-10486.
38. Nam, S., J.H. Kim, and D.H. Lee, *RHOA in Gastric Cancer: Functional Roles and Therapeutic Potential*. Front Genet, 2019. **10**: p. 438.
39. Yang, H., et al., *RhoGAP domain-containing fusions and PPAPDC1A fusions are recurrent and prognostic in diffuse gastric cancer*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4439.
40. Yao, F., et al., *Recurrent Fusion Genes in Gastric Cancer: CLDN18-ARHGAP26 Induces Loss of Epithelial Integrity*. Cell Rep, 2015. **12**(2): p. 272-85.
41. Zhang, W.H., et al., *The Significance of the CLDN18-ARHGAP Fusion Gene in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1214.
42. Beck, F., *Homeobox genes in gut development*. Gut, 2002. **51**(3): p. 450-4.
43. Guo, R.J., E.R. Suh, and J.P. Lynch, *The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(7): p. 593-601.
44. Benahmed, F., et al., *Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene*. Gastroenterology, 2008. **135**(4): p. 1238-1247, 1247 e1-3.
45. Yasui, W., et al., *Molecular pathology of gastric cancer: research and practice*. Pathol Res Pract, 2011. **207**(10): p. 608-12.
46. Zhu, Y., et al., *Cdx2 Regulates Intestinal EphrinB1 through the Notch Pathway*. Genes (Basel), 2021. **12**(2).

47. Almeida, R., et al., *Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas*. J Pathol, 2003. **199**(1): p. 36-40.
48. Yu, J., et al., *CDX2 inhibits epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer by modulation of Snail expression and beta-catenin stabilisation via transactivation of PTEN expression*. Br J Cancer, 2021. **124**(1): p. 270-280.
49. Shah, N. and S. Sukumar, *The Hox genes and their roles in oncogenesis*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(5): p. 361-71.
50. Masood, M.A., A. Loya, and M.A. Yusuf, *CDX2 as a prognostic marker in gastric cancer*. Acta Gastroenterol Belg, 2016. **79**(2): p. 197-200.
51. Giroux, V. and A.K. Rustgi, *Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(10): p. 594-604.
52. Sardar, A.A., J.A. Jalal, and K.S.H. Ameen, *Immunohistochemical Expression of CDX2 in Gastric Carcinoma*. Iran J Pathol, 2022. **17**(2): p. 143-149.
53. Chai, D., et al., *CDX2 and Reg IV expression and correlation in gastric cancer*. BMC Gastroenterol, 2021. **21**(1): p. 92.
54. Eda, A., et al., *Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia*. J Gastroenterol, 2002. **37**(2): p. 94-100.
55. Kim, H.J., et al., *Methylation of the CDX2 promoter in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa increases with age and its rapid demethylation in gastric tumors is associated with upregulated gene expression*. Carcinogenesis, 2020. **41**(10): p. 1341-1352.
56. Liu, Y.Q., et al., *CDX2 inhibits invasion and migration of gastric cancer cells by phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10/Akt signaling pathway*. Chin Med J (Engl), 2015. **128**(8): p. 1065-71.
57. Shi, X.Y., B. Bhagwande, and A.S. Leong, *CDX2 and villin are useful markers of intestinal metaplasia in the diagnosis of Barrett esophagus*. Am J Clin Pathol, 2008. **129**(4): p. 571-7.
58. Tsukamoto, T., et al., *Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia*. J Cancer Res Clin Oncol, 2004. **130**(3): p. 135-45.
59. Xiao, Z.Y., et al., *Expression of CDX2 and villin in gastric cardiac intestinal metaplasia and the relation with gastric cardiac carcinogenesis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(1): p. 247-50.
60. Liu, Q., et al., *CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer*. Mod Pathol, 2007. **20**(12): p. 1286-97.
61. van der Post, R.S., et al., *HNF4A immunohistochemistry facilitates distinction between primary and metastatic breast and gastric carcinoma*. Virchows Arch, 2014. **464**(6): p. 673-9.
62. Dubois, V., et al., *Control of Cell Identity by the Nuclear Receptor HNF4 in Organ Pathophysiology*. Cells, 2020. **9**(10).
63. Yeh, M.M., D.E. Bosch, and S.S. Daoud, *Role of hepatocyte nuclear factor 4-alpha in gastrointestinal and liver diseases*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(30): p. 4074-4091.
64. Dean, S., et al., *Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents*. Gene Expr, 2010. **14**(6): p. 337-44.
65. Chellappa, K., et al., *Opposing roles of nuclear receptor HNF4alpha isoforms in colitis and colitis-associated colon cancer*. Elife, 2016. **5**.
66. Lambert, E., et al., *Human Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha Encodes Isoforms with Distinct Transcriptional Functions*. Mol Cell Proteomics, 2020. **19**(5): p. 808-827.

67. Tanaka, T., et al., *Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer*. J Pathol, 2006. **208**(5): p. 662-72.
68. Cattin, A.L., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(23): p. 6294-308.
69. Ni, Z., et al., *Analysis of the HNF4A isoform-regulated transcriptome identifies CCL15 as a downstream target in gastric carcinogenesis*. Cancer Biol Med, 2021. **18**(2): p. 530-46.
70. Chang, H.R., et al., *HNF4alpha is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer*. Gut, 2016. **65**(1): p. 19-32.
71. Hu, Q., et al., *Berberine Attenuated Proliferation, Invasion and Migration by Targeting the AMPK/HNF4alpha/WNT5A Pathway in Gastric Carcinoma*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1150.
72. Lv, D.D., L.Y. Zhou, and H. Tang, *Hepatocyte nuclear factor 4alpha and cancer-related cell signaling pathways: a promising insight into cancer treatment*. Exp Mol Med, 2021. **53**(1): p. 8-18.
73. San Roman, A.K., et al., *Transcription factors GATA4 and HNF4A control distinct aspects of intestinal homeostasis in conjunction with transcription factor CDX2*. J Biol Chem, 2015. **290**(3): p. 1850-60.
74. Uozaki, H., et al., *Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein-Barr virus status in gastric cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(3): p. 230-40.
75. Larsen, S., et al., *HNF4alpha and CDX2 Regulate Intestinal YAP1 Promoter Activity*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(12).
76. Xu, C., et al., *HNF4alpha pathway mapping identifies wild-type IDH1 as a targetable metabolic node in gastric cancer*. Gut, 2020. **69**(2): p. 231-242.
77. Garrison, W.D., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1207-20.
78. Chandra Gupta, S. and Y. Nandan Tripathi, *Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets*. Int J Cancer, 2017. **140**(9): p. 1955-1967.
79. Li, G., et al., *The Biological Roles of lncRNAs and Future Prospects in Clinical Application*. Diseases, 2021. **9**(1).
80. Wu, Z., et al., *Regulation of lncRNA expression*. Cell Mol Biol Lett, 2014. **19**(4): p. 561-75.
81. Dozmorov, M.G., et al., *Systematic classification of non-coding RNAs by epigenomic similarity*. BMC Bioinformatics, 2013. **14 Suppl 14**(Suppl 14): p. S2.
82. Mercer, T.R., M.E. Dinger, and J.S. Mattick, *Long non-coding RNAs: insights into functions*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(3): p. 155-9.
83. Fang, Y. and M.J. Fullwood, *Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(1): p. 42-54.
84. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
85. Mattick, J.S., et al., *Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023. **24**(6): p. 430-447.
86. Karakas, D. and B. Ozpolat, *The Role of lncRNAs in Translation*. Noncoding RNA, 2021. **7**(1).
87. Pandey, R.R., et al., *Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation*. Mol Cell, 2008. **32**(2): p. 232-46.

88. Zylicz, J.J., et al., *Chromatin dynamics and the role of G9a in gene regulation and enhancer silencing during early mouse development*. Elife, 2015. **4**.
89. Ratti, M., et al., *MicroRNAs (miRNAs) and Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) as New Tools for Cancer Therapy: First Steps from Bench to Bedside*. Target Oncol, 2020. **15**(3): p. 261-278.
90. Mas-Ponte, D., et al., *LncAtlas database for subcellular localization of long noncoding RNAs*. RNA, 2017. **23**(7): p. 1080-1087.
91. Elguindy, M.M., et al., *PUMILIO, but not RBMX, binding is required for regulation of genomic stability by noncoding RNA NORAD*. Elife, 2019. **8**.
92. Gonzalez, I., et al., *A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(5): p. 370-6.
93. Tripathi, V., et al., *The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation*. Mol Cell, 2010. **39**(6): p. 925-38.
94. Tripathi, V., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003368.
95. Yang, L., et al., *ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs*. Cell, 2011. **147**(4): p. 773-88.
96. Noh, J.H., et al., *Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018. **9**(3): p. e1471.
97. Huarte, M., et al., *A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response*. Cell, 2010. **142**(3): p. 409-19.
98. Khalil, A.M., et al., *Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11667-72.
99. Lu, Q.C., et al., *LncRNA-DANCR contributes to lung adenocarcinoma progression by sponging miR-496 to modulate mTOR expression*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(3): p. 1527-1537.
100. Carlevaro-Fita, J. and R. Johnson, *Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization*. Mol Cell, 2019. **73**(5): p. 869-883.
101. Hung, T., et al., *Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters*. Nat Genet, 2011. **43**(7): p. 621-9.
102. Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.
103. Liu, S.J. and D.A. Lim, *Modulating the expression of long non-coding RNAs for functional studies*. EMBO Rep, 2018. **19**(12).
104. He, Y., et al., *The antisense transcriptomes of human cells*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1855-7.
105. Betts, J.A., et al., *Long Noncoding RNAs CUPID1 and CUPID2 Mediate Breast Cancer Risk at 11q13 by Modulating the Response to DNA Damage*. Am J Hum Genet, 2017. **101**(2): p. 255-266.
106. Garcia-Rodriguez, A., et al., *DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells*. Int J Mol Sci, 2018. **20**(1).
107. Chen, C., et al., *LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3826.
108. Jiang, R., et al., *The long noncoding RNA lnc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15129.
109. Qian, Y., L. Shi, and Z. Luo, *Long Non-coding RNAs in Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy*. Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 612393.

110. Gutschner, T. and S. Diederichs, *The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view*. RNA Biol, 2012. **9**(6): p. 703-19.
111. Razavi, H. and A. Katanforosh, *Identification of novel key regulatory lncRNAs in gastric adenocarcinoma*. BMC Genomics, 2022. **23**(1): p. 352.
112. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
113. Kim, L.K., et al., *LncRNA SRA mediates cell migration, invasion, and progression of ovarian cancer via NOTCH signaling and epithelial-mesenchymal transition*. Biosci Rep, 2021. **41**(9).
114. Gala, K. and E. Khattar, *Long non-coding RNAs at work on telomeres: Functions and implications in cancer therapy*. Cancer Lett, 2021. **502**: p. 120-132.
115. Liu, S.J., et al., *Long noncoding RNAs in cancer metastasis*. Nat Rev Cancer, 2021. **21**(7): p. 446-460.
116. Goyal, B., et al., *Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021. **1875**(2): p. 188502.
117. Han, L., et al., *Downregulation of Long Noncoding RNA HOTAIR and EZH2 Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation, Invasion, and Migration of Human Breast Cancer Cells*. Cancer Biother Radiopharm, 2018. **33**(6): p. 241-251.
118. Yao, C., et al., *Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and anti-angiogenic therapies*. Cancer Biol Med, 2023. **20**(1): p. 25-43.
119. Yu, B. and S. Wang, *Angio-LncRs: LncRNAs that regulate angiogenesis and vascular disease*. Theranostics, 2018. **8**(13): p. 3654-3675.
120. Fang, Y., et al., *Pyroptosis: A new frontier in cancer*. Biomed Pharmacother, 2020. **121**: p. 109595.
121. Jiang, N., et al., *Progress in understanding the role of lncRNA in programmed cell death*. Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 30.
122. Nandwani, A., S. Rathore, and M. Datta, *LncRNAs in cancer: Regulatory and therapeutic implications*. Cancer Lett, 2021. **501**: p. 162-171.
123. Wu, Y., et al., *LncRNAs and regulated cell death in tumor cells*. Front Oncol, 2023. **13**: p. 1170336.
124. Kotake, Y., et al., *Long Non-coding RNA, PANDA, Contributes to the Stabilization of p53 Tumor Suppressor Protein*. Anticancer Res, 2016. **36**(4): p. 1605-11.
125. Liu, K., et al., *Long non-coding RNAs regulate drug resistance in cancer*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 54.
126. 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.
127. Herrera-Pariente, C., et al., *Biomarkers for Gastric Cancer Screening and Early Diagnosis*. Biomedicines, 2021. **9**(10).
128. Hauptman, N. and D. Glavac, *Long non-coding RNA in cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(3): p. 4655-69.
129. Nahm, F.S., *Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians*. Korean J Anesthesiol, 2022. **75**(1): p. 25-36.
130. Gao, Y., et al., *Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(24): p. 3401-3412.
131. Xu, X., et al., *Clinicopathological and prognostic value of lncRNAs expression in gastric cancer: A field synopsis of observational studies and databases validation*. Medicine (Baltimore), 2022. **101**(40): p. e30817.
132. Yuan, L., et al., *Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 96.

133. Chen, D., et al., *Non-Coding RNAs in Gastric Cancer: From Malignant Hallmarks to Clinical Applications*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 732036.
134. Cai, C., et al., *A five-lncRNA model predicting overall survival in gastric cancer compared with normal tissues*. Aging (Albany NY), 2021. **13**(21): p. 24349-24359.
135. Tian, X., et al., *Differentially Expressed lncRNAs in Gastric Cancer Patients: A Potential Biomarker for Gastric Cancer Prognosis*. J Cancer, 2017. **8**(13): p. 2575-2586.
136. Akiyama, S., et al., *Characteristics of three human gastric cancer cell lines, NU-GC-2, NU-GC-3 and NU-GC-4*. Jpn J Surg, 1988. **18**(4): p. 438-46.
137. Busuttil, R.A., et al., *An orthotopic mouse model of gastric cancer invasion and metastasis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 825.
138. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCcation: lncRNA localization and function*. J Cell Biol, 2021. **220**(2).
139. Guh, C.Y., Y.H. Hsieh, and H.P. Chu, *Functions and properties of nuclear lncRNAs-from systematically mapping the interactomes of lncRNAs*. J Biomed Sci, 2020. **27**(1): p. 44.
140. Loe, A.K.H., L. Zhu, and T.H. Kim, *Chromatin and noncoding RNA-mediated mechanisms of gastric tumorigenesis*. Exp Mol Med, 2023. **55**(1): p. 22-31.
141. Luo, J., et al., *lncRNAs: Architectural Scaffolds or More Potential Roles in Phase Separation*. Front Genet, 2021. **12**: p. 626234.
142. Shi, K., et al., *Genome-wide analysis of lncRNA stability in human*. PLoS Comput Biol, 2021. **17**(4): p. e1008918.
143. Clark, M.B., et al., *Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability*. Genome Res, 2012. **22**(5): p. 885-98.
144. Kim, Y.H., et al., *AMPK α modulation in cancer progression: multilayer integrative analysis of the whole transcriptome in Asian gastric cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2512-21.
145. Chen, H.Y., et al., *Caudal type homeoboxes as a driving force in Helicobacter pylori infection-induced gastric intestinal metaplasia*. Gut Microbes, 2020. **12**(1): p. 1-12.
146. Li, S.Y., et al., *lncRNA lnc-APUE is Repressed by HNF4 α and Promotes G1/S Phase Transition and Tumor Growth by Regulating MiR-20b/E2F1 Axis*. Adv Sci (Weinh), 2021. **8**(7): p. 2003094.
147. Han, H., et al., *Long noncoding RNA PART1 restrains aggressive gastric cancer through the epigenetic silencing of PDGFB via the PLZF-mediated recruitment of EZH2*. Oncogene, 2020. **39**(42): p. 6513-6528.
148. Yin, D. and X. Lu, *Silencing of long non-coding RNA HCP5 inhibits proliferation, invasion, migration, and promotes apoptosis via regulation of miR-299-3p/SMAD5 axis in gastric cancer cells*. Bioengineered, 2021. **12**(1): p. 225-239.
149. Zhen-Hua, W., et al., *Silencing of lncRNA C1RL-AS1 Suppresses the Malignant Phenotype in Gastric Cancer Cells via the AKT/beta-Catenin/c-Myc Pathway*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1508.