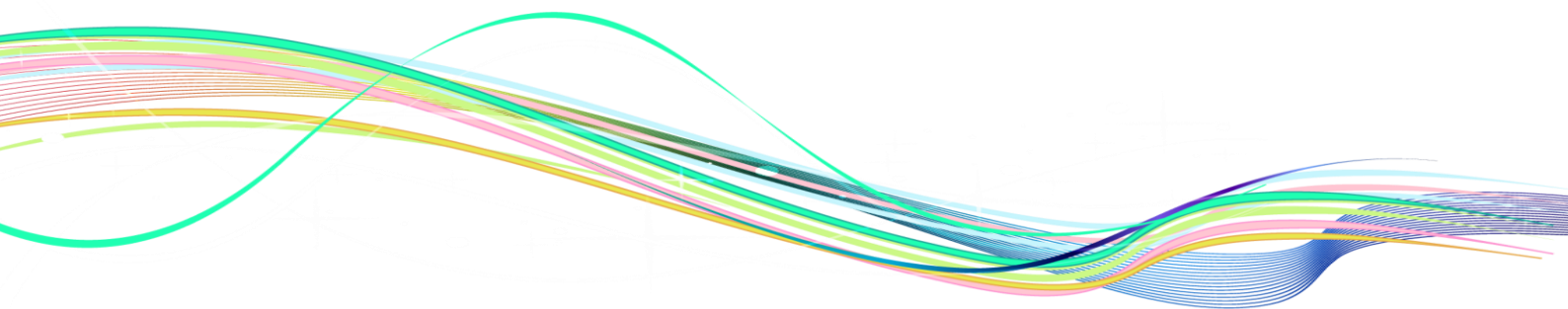


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Γενετική μηχανική σταθερά μετασχηματισμένων καρκινικών
κλώνων με Tet-επαγόμενη RNAi καταστολή στον καρκίνο**



ΕΛΕΝΗ ΜΑΡΙΑ ΑΓΑΘΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ, 2024

“Γενετική μηχανική σταθερά μετασχηματισμένων καρκινικών κλώνων με Tet-επαγόμενη RNAi καταστολή στον καρκίνο”

“Genetic engineering of stably transformed cancer lines with Tet-inducible RNA inhibition in cancer”

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων Καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Τριμελής επιτροπή

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

Δήμας Κωνσταντίνος: Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών και Εφαρμοσμένων Βιοϊατρικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος: Αν. Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
1. Εισαγωγή	7
1.1 Γαστρικός καρκίνος.....	7
1.1.1 Επιδημιολογία	7
1.1.2 Μέθοδοι διάγνωσης.....	10
1.1.3 Ιστολογική ταξινόμηση	10
1.1.4 Μοριακή ταξινόμηση	13
1.2 GATA μεταγραφικοί παράγοντες	16
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά	16
1.2.2 Μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και GATA6	17
1.2.3 GATA4 και GATA6 μεταγραφικοί παράγοντες και γαστρικός καρκίνος	18
1.3 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (Long non-coding RNA / lncRNA)	19
1.3.1 Χαρακτηριστικά lncRNA	19
1.3.2 Βιογένεση και δράση lncRNA	20
1.2.3 LncRNA και καρκίνος	23
Σκοπός.....	24
2. Υλικά και μέθοδοι.....	25
2.1 Υλικά.....	25
2.2 Μέθοδοι.....	25
2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	26
2.2.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) και ανάλυση μετρήσεων	27
3. Αποτελέσματα	29
3.1 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 έπειτα από επαγόμενη μεταγραφική του σύγηση σε κύτταρα AGS.....	29
3.2 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης lncRNA σε AGTR GATA6 και AGTR GATA4 κύτταρα	31
3.3 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων σε AGTR GATA6 και AGTR GATA4 κύτταρα	34
4. Συμπεράσματα και συζήτηση	38
Αναφορές	44

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μία από τις συχνότερες μορφές καρκίνου και κατατάσσεται στις πρώτες θέσεις θνησιμότητας που οφείλονται σε καρκίνο. Αποτελεί μία εξαιρετικά ετερογενή και πολυπαραγοντική νόσο με πολλούς περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Το γεγονός αυτό, καθιστά δύσκολη την ταξινόμησή του σε υποτύπους με βάση ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Οι GATA4 και GATA6 μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να έχουν ογκοεπαγωγικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο. Τα δύο αυτά γονίδια έχουν αυξημένο αριθμό αντιγράφων στο καρκινικό γονιδίωμα και οι παραγόμενες πρωτεΐνες τους συνεκφράζονται με αποτέλεσμα να προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εντός του όγκου. Επίσης ρυθμίζουν καθοδικά την έκφραση καίριων γονιδίων-στόχων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (long non-coding RNA – lncRNA) είναι μία μεγάλη και ανεξερεύνητη ομάδα μορίων που εμφανίζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ιδανικούς βιοδείκτες και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη θεραπειών νέας γενιάς για τον καρκίνο του στομάχου. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης lncRNAs και γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε καρκινοειδικές διεργασίες, έπειτα από την επαγόμενη μεταγραφική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA6 και GATA4 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές πρωτεύοντος γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS). Αρχικά, ελέγχθηκαν με qPCR τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 έπειτα από επαγόμενη μεταγραφική του σίγηση σε κύτταρα AGS με τη χρήση της τεχνολογίας RNAi. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν με τον ίδιο τρόπο, τα επίπεδα έκφρασης πιθανών lncRNA στόχων, με σκοπό να ελεγχθεί το εάν η τεχνολογία RNAi είχε βιολογικό αντίκτυπο στην έκφρασή τους. Τέλος, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση qPCR, έλεγχος των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε καρκινοειδικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση, ώστε να ελεγχθεί το εάν οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και GATA6 ρυθμίζουν την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων και άρα το εάν αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νέοι βιοδείκτες για την πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου με μη επεμβατικό τρόπο.

Λέξεις κλειδιά: γαστρικός καρκίνος, RNAi, GATA6, GATA4, lncRNA

Abstract

Gastric cancer is one of the most common types of cancer and ranks among the top cancer-related mortality rates. It is a highly heterogeneous and multifactorial disease with many environmental and genetic factors. This makes it difficult to classify it into subtypes based on histological and molecular characteristics. GATA4 and GATA6 transcription factors appear to have a tumorigenic role in gastric cancer. These two genes have an increased copy number in the tumor genome and their produced proteins are coexpressed and thus promote cell proliferation within the tumor. They also down-regulate the expression of key target genes that could be used as molecular markers. Long non-coding RNA (LncRNA) molecules are a large and unexplored group of molecules that exhibit specific characteristics that make them ideal biomarkers and could be used to develop next generation therapies for gastric cancer. The aim of the present study is to investigate the expression levels of lncRNAs, and target genes involved in carcinogenic processes following induced transcriptional silencing of the transcription factors GATA6 and GATA4 in human primary gastric adenocarcinoma (AGS) cell lines. Initially, the expression levels of the transcription factor GATA6 were monitored by qPCR following its induced transcriptional silencing in AGS cells using RNAi technology. Subsequently, the expression levels of potential lncRNA targets were tested in the same way, in order to test whether RNAi technology had a biological impact on their expression. Finally, using qPCR, the expression levels of genes involved in carcinogenic processes such as the cell cycle and apoptosis were tested to check whether the transcription factors GATA4 and GATA6 regulate the expression of these genes and thus whether they can be used as new biomarkers to predict disease progression in a non-invasive way.

Key words: gastric cancer, RNAi, GATA6, GATA4, lncRNA

1. Εισαγωγή

1.1 Γαστρικός καρκίνος

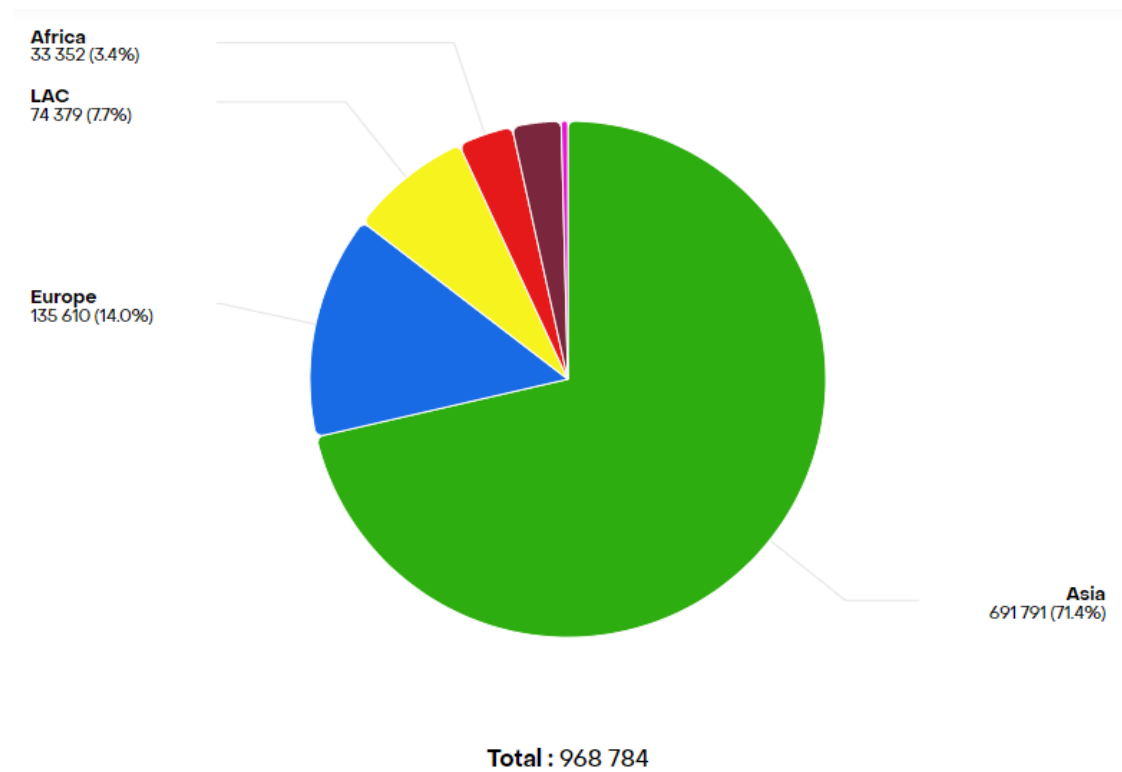
Ο γαστρικός καρκίνος, γνωστός και ως καρκίνος του στομάχου, παρά τη μειούμενη συχνότητα εμφάνισής του είναι ένας από τους κυριότερους τύπους καρκίνου στις μέρες μας. Λόγω των υψηλών ποσοστών θνησιμότητας και επιπολασμού που εμφανίζει, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγειονομικής περίθαλψης παγκοσμίως ¹. Πρόκειται για μια εξαιρετικά ετερογενή νόσο, τόσο σε φαινοτυπικό όσο και σε μοριακό επίπεδο, με αποτέλεσμα η πρόληψη και η αντιμετώπισή του να αποτελούν πρόκληση για τη δημόσια υγεία ². Είναι λοιπόν επιβεβλημένη η ανάγκη της έγκαιρης διάγνωσης, ώστε οι ασθενείς να έχουν καλύτερη πρόγνωση και βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης.

1.1.1 Επιδημιολογία

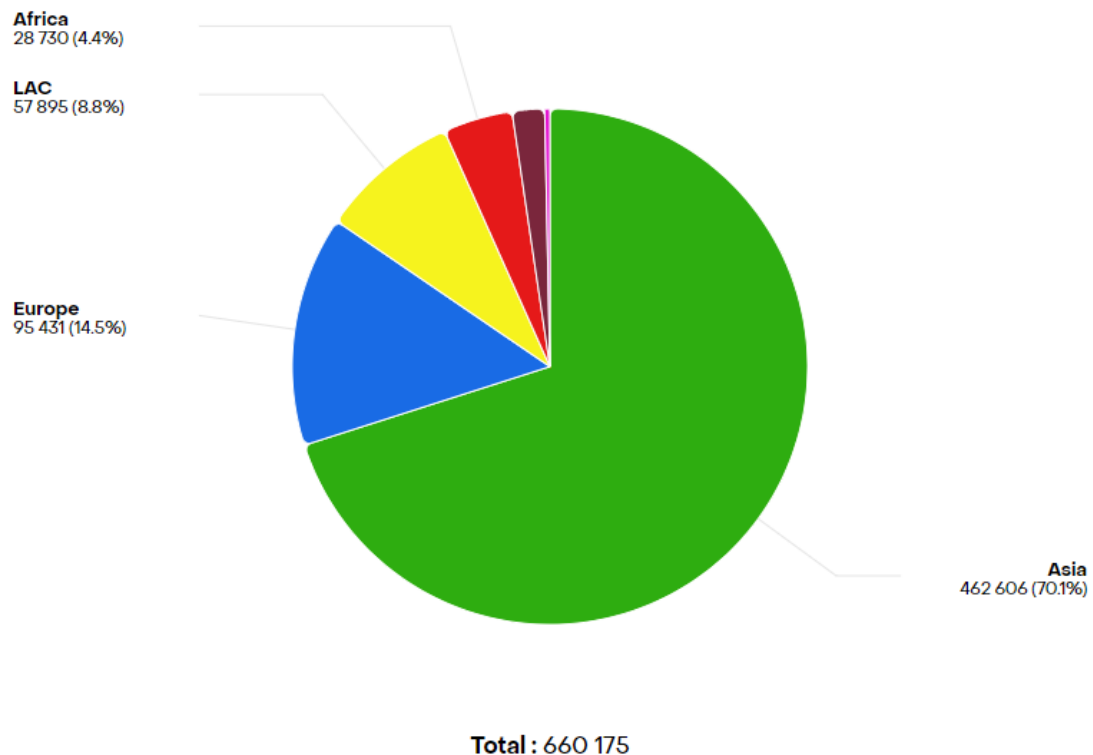
Παρά τη μειούμενη συχνότητα εμφάνισής του τα τελευταία χρόνια, ο γαστρικός καρκίνος, κατατάσσεται ανάμεσα στις πιο σοβαρές ασθένειες παγκοσμίως ¹. Αποτελεί την πέμπτη συχνότερα εμφανιζόμενη μορφή καρκίνου και λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης, την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου που σχετίζεται με αυτόν ². Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer / IARC), το 2022 εμφανίστηκαν περίπου 1.000.000 νέες περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου ανά τον κόσμο ³. Η συχνότητα εμφάνισης διαφέρει ανάμεσα στα δύο φύλα, με δύο φορές συχνότερη εμφάνιση στους άντρες από ότι στις γυναίκες. Συγχρόνως, το ποσοστό εμφάνισης της νόσου αυξάνεται με την ηλικία, καθώς είναι σχετικά σπάνιος καρκίνος σε άνδρες και γυναίκες κάτω των 45 ετών, ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν άτομα μεταξύ 60 και 80 ετών. Αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άντρες και την έκτη στις γυναίκες ^{2, 1, 4}.

Παρατηρείται ακόμη, διαφορετική συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας ανά γεωγραφική περιοχή ³. Τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης απαντώνται στη Δυτική Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική, ενώ τα υψηλότερα στη Νότια Αμερική, στην Ανατολική Ευρώπη και στην Ανατολική Ασία ⁴. Συγκεκριμένα, το 71,4% των κρουσμάτων εμφανίζεται στην Ασία και ακολουθεί η Ευρώπη με ποσοστό 14%, η Λατινική Αμερική με 7,7% και τέλος η Αφρική με 3,4% (**Εικόνα 1**). Από τις περίπου 1 εκατομμύριο περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου το 2022, οι 660.000 κατέληξαν. Τα

ποσοστά θνησιμότητας ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με τα ποσοστά εμφάνισης, με την Ασία να κατέχει την πρώτη θέση με 70,1% και να ακολουθεί η Ευρώπη με 14,5%, η Λατινική Αμερική με 8,8% και η Αφρική με 4,4% (**Εικόνα 2**)³.



Εικόνα 1. Συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου ανά γεωγραφική περιοχή, για το έτος 2022³.



Εικόνα 2. Ποσοστά θνησιμότητας λόγω γαστρικού καρκίνου ανά γεωγραφική περιοχή, για το έτος 2022 ³.

Χαρακτηριστικό του γαστρικού καρκίνου αποτελεί το γεγονός ότι στην εμφάνισή του συμβάλλουν πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η διατροφή, αποτελεί έναν τέτοιο παράγοντα, αν και τα τελευταία χρόνια οι συνθήκες συντήρησης των τροφίμων είναι πιο βελτιωμένες. Η κακή διατροφή, δηλαδή η μεγαλύτερη κατανάλωση αμυλούχων τροφών, η κατανάλωση καπνιστών και πλούσιων σε αλάτι τροφίμων και η μειωμένη πρόσληψη φρέσκων φρούτων και λαχανικών, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου. Επιπλέον, η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα αποτελούν και αυτοί παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνισή του ⁵.

Ένας εξαιρετικά σημαντικός εξωγενής παράγοντας είναι και το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) ⁵. Περίπου τα δύο τρίτα του παγκόσμιου πληθυσμού είναι φορείς αυτού του βακτηρίου. Αν και η λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο δεν προκαλεί καρκίνο, η μακροχρόνια λοίμωξη οδηγεί στην εμφάνιση μακροχρόνιας φλεγμονής στο στομάχι, η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ άλλων και ορισμένων τύπων γαστρικού καρκίνου, όπως το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Λόγω του ρόλου του στην πρόκληση του καρκίνου του στομάχου, το 1994, η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο

του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το ταξινομήσε ως καρκινογόνο παράγοντα για τον άνθρωπο. Επίσης η 15^η Έκθεση του Εθνικού Προγράμματος Τοξικολογίας για τις Καρκινογόνες ουσίες του Αμερικανικού Υπουργείου Υγείας και Ανθρώπινων Υπηρεσιών, πρόσθεσε το 2021 τη χρόνια λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού στον κατάλογο των ουσιών που είναι γνωστό ότι προκαλούν καρκίνο στον άνθρωπο ⁶. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ποσοστά του γαστρικού καρκίνου είναι υψηλότερα σε κοινωνικά και οικονομικά υποβαθμισμένες χώρες, καθώς η κακή διατροφή και η υγιεινή έχουν καθοριστικό ρόλο ⁵.

1.1.2 Μέθοδοι διάγνωσης

Έχουν προταθεί πολλοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί έγκαιρη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου. Σε περιοχές με υψηλή πιθανότητα εμφάνισης της νόσου, όπως για παράδειγμα η Ιαπωνία, εφαρμόζεται προσυμπτωματικός έλεγχος σε μεγάλες ομάδες πληθυσμού (μαζικός έλεγχος) και σε άτομα υψηλού κινδύνου (ευκαιριακός προσυμπτωματικός έλεγχος). Αντιθέτως, σε περιοχές στις οποίες ο γαστρικός καρκίνος εμφανίζεται με χαμηλότερη συχνότητα, τέτοιες μέθοδοι ελέγχου θεωρούνται δαπανηρές και αδικαιολόγητες και για τον λόγο αυτό εφαρμόζονται επιλεκτικά μόνο σε συγκεκριμένες ομάδες του πληθυσμού (ηλικιωμένοι με χρόνια γαστρική ατροφία ή κακοήγη αναιμία, άτομα με μερική γαστρεκτομή, γαστρικούς πολύποδες ή κληρονομικό μη πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου). Εργαστηριακά ο προσυμπτωματικός έλεγχος μπορεί να γίνει είτε με τη χρήση δεικτών ατροφίας στο στομάχι, είτε με εξέταση του βλεννογόνου του στομάχου. Μερικοί δείκτες ατροφίας στο στομάχι είναι τα πεψινογόνα ορού, η γκρελίνη ορού και τα αντισώματα ορού για το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Η εξέταση του βλεννογόνου του στομάχου περιλαμβάνει τη φωτοφθορογραφία με βάριο και την ενδοσκόπηση ⁵.

1.1.3 Ιστολογική ταξινόμηση

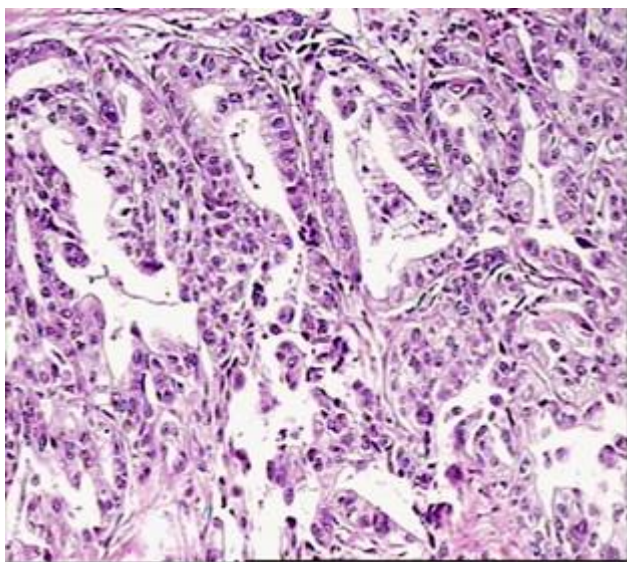
Το 90 με 95% των καρκίνων του στομάχου, είναι αδενοκαρκινώματα, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των ασθενών. Ο εντοπισμός των υποτύπων του γαστρικού καρκίνου με βάση τα γενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά, μπορεί να κάνει πιο πολύπλοκη την ταξινόμηση. Ωστόσο, αυτός ο διαχωρισμός είναι σημαντικός,

καθώς παρέχεται η δυνατότητα για πιο στοχευμένη θεραπεία ⁷. Σήμερα υπάρχουν πολλά συστήματα ταξινόμησης.

Με βάση την ιστολογία, η ταξινόμηση κατά Lauren, διαχωρίζει τον γαστρικό καρκίνο σε τρεις υποτύπους:

- 1) Τον εντερικό (intestinal type) που απαντάται σε ηλικιωμένους ασθενείς και σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες και με τη λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού,
- 2) Το διάχυτο (diffuse type) που εμφανίζεται κυρίως σε νεότερους ασθενείς και προκαλείται από γενετικούς παράγοντες και ενεργή φλεγμονή
- 3) Το μεικτό-ενδιάμεσο (mixed-intermediate type) ⁸. Με βάση την ανατομική του θέση μπορεί να χαρακτηριστεί ως εγγύς όταν εντοπίζεται κοντά στην καρδιά (cardia) και ως απομακρυσμένος, όταν βρίσκεται σε άλλα σημεία του στομάχου (non cardia) ⁵.

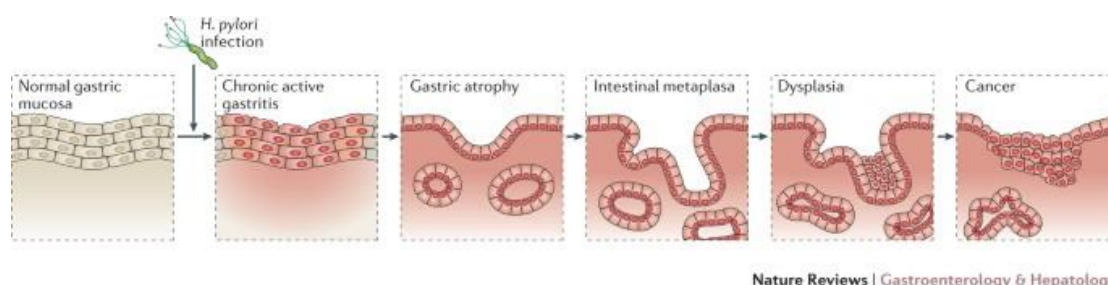
Ο εντερικός υποτύπος (**Εικόνα 3**), είναι ο συχνότερα εμφανιζόμενος, καθώς παρατηρείται στο 54 με 60% των περιπτώσεων, με διπλάσια συχνότητα στους άντρες απ' ότι στις γυναίκες και σε ηλικίες άνω των 55 ετών ⁹.



Εικόνα 3. Εντερικός υποτύπος γαστρικού καρκίνου ¹⁰

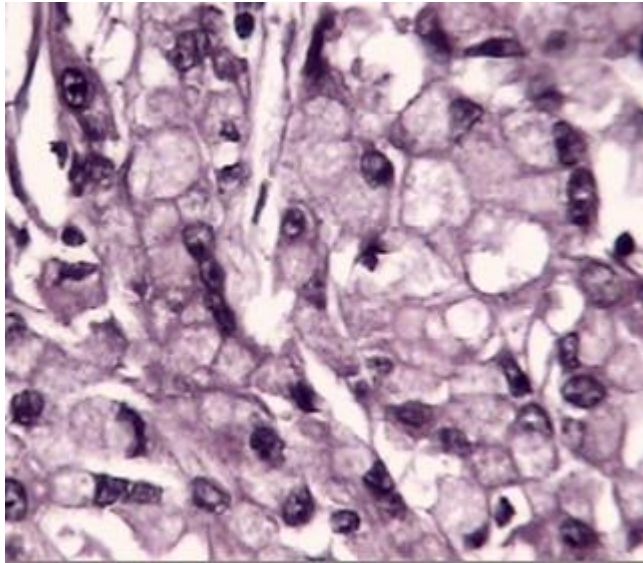
Για την εμφάνιση του συγκεκριμένου υποτύπου, καθοριστικό ρόλο έχουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού ⁹. Το ελικοβακτηρίδιο δημιουργεί αρχικά χρόνια γαστρίτιδα, η οποία προκαλεί αύξηση των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων καθώς και φλεγμονή του γαστρικού

βλεννογόνου. Έπειτα εμφανίζεται ατροφική γαστρίτιδα και αντικατάσταση της αδενικής μοίρας από ινώδη ιστό. Στη συνέχεια, κατά την εντερική μεταπλασία το γαστρικό επιθήλιο αντικαθίσταται από εντερικό επιθήλιο το οποίο σταδιακά υπόκειται σε δυσπλασία που συνεπάγεται αλλοίωση της επιθηλιακής μορφολογίας. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς και είναι λιγότερο διαφοροποιημένα. Το τελευταίο στάδιο είναι η ανάπτυξη καρκίνου λόγω αυξημένου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων και συσσώρευσης μεταλλάξεων ¹¹. Η διαδικασία που περιγράφηκε, παρουσιάζεται συνοπτικά στην **Εικόνα 4** και συνολικά ονομάζεται μονοπάτι Correa.



Εικόνα 4. Ανάπτυξη εντερικού υποτύπου γαστρικού καρκίνου. Σταδιακή εξέλιξη από το φυσιολογικό βλεννογόνο στο γαστρικό καρκίνο, έπειτα από μόλυνση με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) ¹².

Ο διάχυτος υπότυπος (**Εικόνα 5**) του γαστρικού καρκίνου έχει μικρότερο ποσοστό εμφάνισης (32%), αλλά η συχνότητα είναι ίδια για τους άντρες και τις γυναίκες. Ο μέσος όρος της ηλικίας των ασθενών είναι τα 48 έτη ⁹. Πρόκειται για μια επιθετική νεοπλασία που χαρακτηρίζεται από πρόωμη εξάπλωση μέσω λεμφικής διάχυσης. Η εμφάνισή του έχει συσχετιστεί με γενετικούς και κληρονομικούς παράγοντες, ενώ σε αντίθεση με τον εντερικό υποτύπο, δεν έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη διαδικασία που να τον προδιαθέτει. Η δομή του είναι λιγότερο συνεκτική, με τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων να είναι χαλαρές, ενώ παρατηρείται και απουσία διαφοροποιημένων κυττάρων. Η μορφολογία αυτή προκαλείται από την απώλεια της έκφρασης του γονιδίου CDH1 το οποίο κωδικοποιεί για την E-καδερίνη η οποία φυσιολογικά, διατηρεί τη δομή του επιθηλίου ¹³.



Εικόνα 5. Διάχυτος υποτύπος γαστρικού καρκίνου ¹⁰.

1.1.4 Μοριακή ταξινόμηση

Οι παραπάνω κατηγοριοποιήσεις δεν μπορούν να περιγράψουν την ετερογένεια του γαστρικού καρκίνου σε μοριακό επίπεδο και κατά συνέπεια, δεν μπορούν να κατευθύνουν την κλινική πρακτική με εξατομικευμένο τρόπο για τον ασθενή. Λόγω της εκτεταμένης γονιδιωματικής ανάλυσης μέσω αλληλούχησης, έχει προκύψει μία νέα μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου. Η ερευνητική κοινοπραξία “Άτλαντας του Καρκινικού Γονιδιώματος” (The Cancer Genome Atlas / TCGA), έχει μέχρι στιγμής, την πιο ολοκληρωμένη μοριακή ταξινόμηση για το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Σύμφωνα με αυτήν, διακρίνονται τέσσερις μοριακοί υποτύποι (**Εικόνα 6**):

- 1) Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal Instability / CIN)
- 2) Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (Genomically Stable / GS)
- 3) Όγκοι με αστάθεια μικροδορυφόρων (Microsatellite Instable / MSI)
- 4) Όγκοι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (EBV +)

Οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) περιλαμβάνουν αλλαγές στο γονιδίωμα που συμβαίνουν σε επίπεδο χρωμοσώματος και αποτελούν τον συχνότερο τύπο γαστρικού καρκίνου, με ποσοστό εμφάνισης 50%. Η χρωμοσωμική αστάθεια εκδηλώνεται με δομικές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και με αύξηση της συχνότητας της ανευπλοειδίας. Παρατηρείται αυξημένος αριθμός αντιγράφων στα χρωμοσώματα 1q, 5p, 7, 8, 13 και 20 και μειωμένος στα χρωμοσώματα 1p, 3p, 4, 5q, 9p, 17p, 18q,

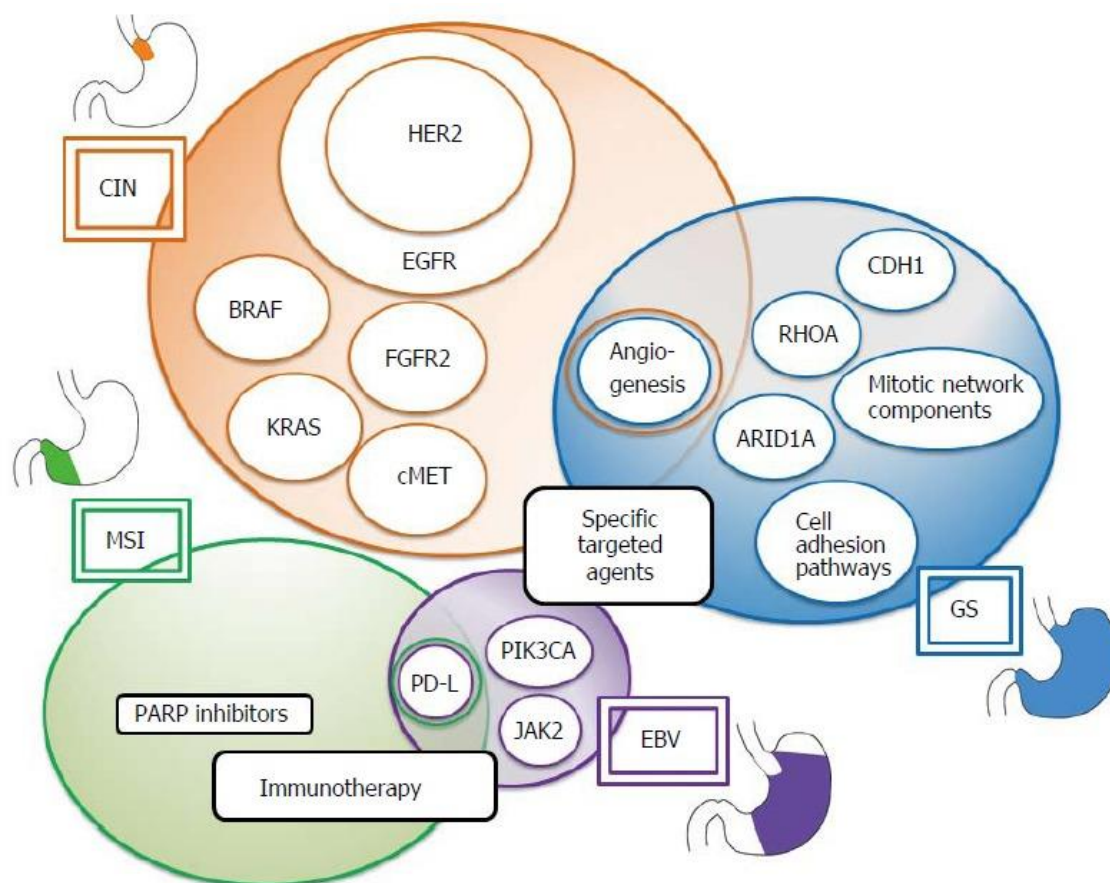
19p, 21 και 22. Οι ανακατατάξεις αυτές, μπορούν να καθορίσουν την ανάπτυξη, την πορεία και την ανταπόκριση του όγκου στη θεραπεία. Προκαλούνται μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, το οποίο έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόκριση στη βλάβη του DNA. Μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο υποδηλώνουν κακή πρόγνωση και αντίσταση στη χημειοθεραπεία και στη στοχευμένη μοριακή θεραπεία που αφορά το p53. Τέλος, οι CIN όγκοι, ενισχύουν γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες επάγουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και κυκλίνες και προκαλούν υπέρμετρη ενεργοποίηση του μονοπατιού υποδοχέων κινάσης – τυροσίνης (RTK / RAS) ¹⁴.

Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (GS), έχουν συχνότητα εμφάνισης 20% και παρατηρούνται σε άτομα μικρότερης ηλικίας (μέση ηλικία 59 έτη). Οι συγκεκριμένοι όγκοι εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης μορίων που αφορούν την προσκόλληση των κυττάρων και την αγγειογένεση, όπως η E-καδερίνη που φέρει επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις και κωδικοποιείται από το γονίδιο CDH1. Ακόμη, έχουν παρατηρηθεί αναδιατάξεις γονιδιωματικών αλληλουχιών, όπως για παράδειγμα αυτές των γονιδίων ARHGAP-CLDN18 με αποτέλεσμα την αύξηση της επιθετικότητας του όγκου, τη διατάραξη της κυτταρικής συνοχής και την ενίσχυση της διεισδυτικότητας του όγκου ⁷.

Οι όγκοι με αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI), έχουν συχνότητα εμφάνισης περίπου 20% και παρατηρούνται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (μέση ηλικία 72 έτη) και με ελαφρώς υψηλότερο επιπολασμό στις γυναίκες. Ο υποτύπος αυτός, εμφανίζεται λόγω της μεθυλίωσης του υποκινητή, που προκαλεί σίγηση της μεταγραφής του γονιδίου επιδιόρθωσης αναντιστοιχιών (MLH1) και την εμφάνιση αστάθειας μικροδορυφόρων. Με αυτόν τον τρόπο προκαλούνται μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν για ογκογόνες σηματοδοτικές πρωτεΐνες (π.χ. υποδοχέας επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα, EGFR) και αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ⁷.

Οι όγκοι που είναι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (EBV+), έχουν συχνότητα εμφάνισης περίπου 9% και αφορούν κυρίως τους άνδρες. Ο EBV υποτύπος χαρακτηρίζεται από υπερμεθυλίωση του DNA, και μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια, όπως η κινάση 3 της φωσφατίδυλο – ινοσιτόλης (PIK3CA) και η πρωτεΐνη ARID1A.

Τέλος, έχουν παρατηρηθεί γονίδια με αυξημένο αριθμό αντιγράφων, όπως τα PD-L1, PD-L2 και JAK2 ⁷.



Εικόνα 6. Μοριακοί υποτύποι γαστρικού καρκίνου. Ανατομική προοπτική και θεραπευτικές επιλογές. CIN: χρωμοσωμική αστάθεια, MSI: αστάθεια μικροδορυφόρων, GS: γονιδιωματική σταθερότητα, EBV: ιός Epstein-Barr ¹⁵.

Για τον γαστρικό καρκίνο, εκτός από την ταξινόμησή του, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε και την παθοφυσιολογία της ασθένειας. Η εμφάνιση ενός όγκου προκύπτει από την απορρύθμιση της αναπτυξιακής πορείας ενός ιστού ή μιας κυτταρικής γενεαλογίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χαθεί η ικανότητα της κυτταρικής διαφοροποίησης και να δημιουργηθεί ένας βλαστικός φαινότυπος συνεχούς πολλαπλασιασμού. Η διαφοροποίηση οδηγεί στη δημιουργία κυτταρικών υποτύπων, που είναι πιο εξειδικευμένοι από την αρχική τους μορφή. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων, δύο εκ των οποίων αφορούν τους GATA4 και GATA6 μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια GATA και έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση ιστών του

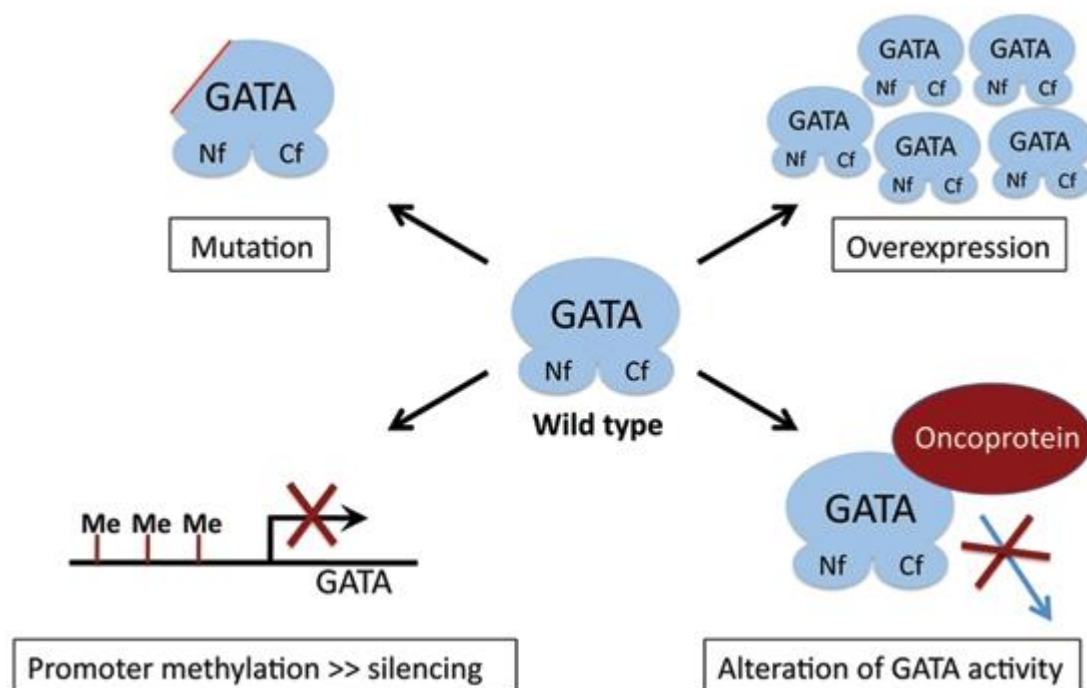
γαστρεντερικού συστήματος, ενώ ταυτόχρονα συμβάλουν και στην εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου.

1.2 GATA μεταγραφικοί παράγοντες

1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA (GATA1 – GATA6), ανήκουν σε μία συντηρημένη μεταξύ των ειδών, οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που αναγνωρίζουν και προσδένονται στην αλληλουχία-μοτίβο DNA 5'-(A/T) GATA (A/G)-3' χάρη στην οποία πήραν και το όνομά τους. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι σε όλα τα μέλη της οικογένειας, υπάρχει μία συντηρημένη επικράτεια που αποτελείται από δύο δακτυλίους ψευδαργύρου, που είναι απαραίτητοι για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και για την πρόσδεση στο DNA. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες ανάλογα με τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης που εμφανίζουν στους διαφορετικούς ιστούς: τα αιμοποιητικά GATAs (GATA1, GATA2, GATA3) που εκφράζονται στα αιμοποιητικά κύτταρα και τα ενδοδερμικά GATAs (GATA4, GATA5, GATA6) που εκφράζονται σε όργανα ενδοδερμικής και μεσοδερμικής προέλευσης και είναι λιγότερο μελετημένα από τα πρώτα. Η λειτουργία όλης της οικογένειας των GATA μεταγραφικών παραγόντων, μπορεί να μεταβληθεί, αν υποστούν υποέκφραση, υπερέκφραση ή μετάλλαξη. Η δράση τους μπορεί να εμποδιστεί επίσης και λόγω κάποιας πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης (Εικόνα 7) ¹⁶.

Τα ενδοδερμικά εκφραζόμενα μέλη GATA ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την έκφραση των γονιδίων και την απόπτωση σε διάφορους ιστούς που προέρχονται από το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, όπως αυτούς του εντέρου, του φλοιού των επινεφριδίων, της καρδιάς, του ήπατος, των πνευμόνων και των γονάδων. Αλληλεπιδρούν με ένζυμα και πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να προσφέρουν υψηλή εξειδίκευση και να ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων ^{17, 18}. Επίσης εμπλέκονται σε διάφορα αναπτυξιακά μονοπάτια και συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4-5-6, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον ιστό, μπορούν να λειτουργήσουν ως ογκοεπαγωγείς ή ογκοκαταστολείς. Συγκεκριμένα στον γαστρικό καρκίνο φαίνεται ότι έχουν επαγωγικό ρόλο στην ογκογένεση ^{19, 16}.



Εικόνα 7. Μηχανισμοί μεταβολής της δραστηριότητας των GATA μεταγραφικών παραγόντων κατά την καρκινογένεση ¹⁶.

1.2.2 Μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και GATA6

Όπως προαναφέρθηκε, οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες που θα αναλυθούν παρακάτω, φαίνεται να έχουν ογκοεπαγωγικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο. Ο GATA4 έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση ιστών από το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ, το πάγκρεας, το έντερο και το στομάχι ²⁰. Η έκφρασή του είναι ανάλογη του σταδίου ανάπτυξης και του ιστού στον οποίο βρίσκεται, ενώ μπορεί να έχει είτε θετική είτε αρνητική επίπτωση στην έκφραση των γονιδίων-στόχων ²¹.

Εστιάζοντας στον GATA6, το γονίδιο βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 18 (18q11.2), έχει πλήρες μήκος 34812 bp, αποτελείται από 6 ιντρόνια και 7 εξόνια και κωδικοποιεί 595 αμινοξέα ²². Μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας και να δεσμευτεί τόσο σε ενδογονιδιακές όσο και σε απομακρυσμένες διαγονιδιακές περιοχές, αλλά και σε υποκινητές. Όπως και ο GATA4, έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη διάφορων οργάνων και συστημάτων, όπως είναι το στομάχι, το παχύ και το λεπτό έντερο, το ήπαρ, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια, οι πνεύμονες, η καρδιά

και το αγγειακό σύστημα ²¹. Δεν επιδρά από μόνος του στη ρύθμιση της ανάπτυξης, αλλά το αποτέλεσμα επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και μόρια σηματοδότησης. Τέτοιοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4, Tbx5, FOG, πρωτεΐνες της οικογένειας Wnt και μέλη της οικογένειας Nkx2. Είναι επίσης ικανός να διατηρήσει μετα-εμβρυακά την διαφοροποιημένη κυτταρική γενεαλογία σε διάφορους ιστούς, όπως του εντερικού βλεννογόνου, του επιθηλίου των αεραγωγών και των λείων μυών της ουροδόχου κύστης. Τέλος, έχει την ικανότητα για άμεση ρύθμιση της έκφρασης άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο GATA4 ²³.

1.2.3 GATA4 και GATA6 μεταγραφικοί παράγοντες και γαστρικός καρκίνος

Διάφοροι τύποι καρκίνου έχουν συσχετιστεί με υπερέκφραση, απώλεια έκφρασης και μεταλλάξεις των GATA μεταγραφικών παραγόντων. Αναλυτικότερα, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες έρευνες συσχετίζουν τον μεταγραφικό παράγοντα GATA6 με την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο GATA6, εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα λαχμών και κρυπτών του λεπτού εντέρου. Το γονίδιο αυτό μπορεί να ενισχυθεί και να υπερεκφραστεί στο 30% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου ²².

Σε καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος, και πιο συγκεκριμένα στον γαστρικό καρκίνο, έχει βρεθεί ότι οι γενετικοί τόποι των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 βρίσκονται σε γονιδιωματική ενίσχυση. Εκτός από τον αυξημένο αριθμό αντιγράφων τους, τα δύο αυτά γονίδια συνεκφράζονται με αποτέλεσμα να προωθούν και να βοηθούν στον πολλαπλασιασμό του όγκου ²⁴.

Οι Chia et al το 2015, απέδειξαν ότι οι γενετικοί τόποι των μεταγραφικών παραγόντων GATA6, GATA4 και KLF5 ενισχύονται γενετικά στο 30% των όγκων, από τα 447 γονιδιώματα γαστρικού καρκίνου που μελετήθηκαν. Βρέθηκε επίσης ότι η καταστολή τους, είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά, προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ ακόμη υπάρχουν και κοινά σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων με τους υποκινητές. Επιπλέον το γονίδιο HNF4a (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha), ένας μεταγραφικός παράγοντας που έχει ίδιο ρόλο με τους GATA4 και GATA6 στην κυτταρική διαφοροποίηση, βρέθηκε ότι ρυθμίζεται άμεσα από τους 3 μεταγραφικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν προηγουμένως ²⁵. Σε

μία άλλη μελέτη βρέθηκε πως ο GATA6 μπορεί να υπερεκφραστεί σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου, μόνο όταν απουσιάζει εντελώς ο GATA2, γεγονός που υποδηλώνει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων²². Ακόμη, μέσω της μετενεργοποίησης του miR-520b, το GATA6 θα μπορούσε να ρυθμίσει τη μετάσταση του γαστρικού καρκίνου και να καταστείλει την εισβολή, την μετανάστευση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*²⁶.

Εκτός από την προαναφερθείσα δράση τους στον γαστρικό καρκίνο, οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζουν τη φυσιολογική λειτουργία πολλών ιστών στο γαστρεντερικό σύστημα και επομένως δεν μπορούν να αποτελέσουν άμεσους θεραπευτικούς στόχους²⁷. Επιπρόσθετως, θεωρούνται ως «μη αξιοποιήσιμοι» λόγω της παρουσίας τους στον πυρήνα που δυσχεραίνει την θεραπευτική τους στόχευση, ωστόσο είναι πιθανό να ρυθμίζουν καθοδικά την έκφραση καίριων γονιδίων-στόχων που είναι φαρμακολογικά στοχεύσιμα²⁴. Τέτοιοι στόχοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες με μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση εφόσον προσφέρουν μία πιο εξειδικευμένη και στοχευμένη θεραπεία με λιγότερες παρενέργειες. Συγκεκριμένες κατηγορίες μη κωδικοποιητικών μεταγράφων, όπως τα long non-coding RNA, συγκεντρώνουν ιδιότητες που τα αναδεικνύουν ως κατάλληλους μοριακούς βιοδείκτες.

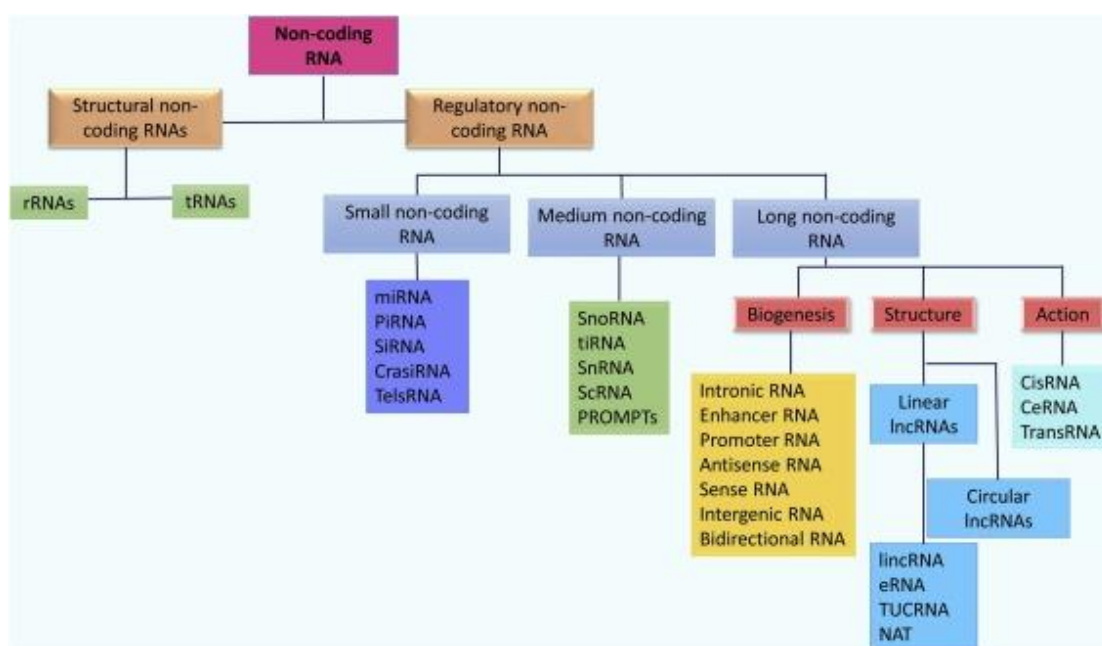
1.3 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (Long non-coding RNA / lncRNA)

1.3.1 Χαρακτηριστικά lncRNA

Το ανθρώπινο γονιδίωμα μεταγράφεται σε διάφορες κατηγορίες μη κωδικοποιητικού RNA, που περιλαμβάνουν ρυθμιστικά RNA (lncRNA, snoRNA, miRNA, scRNA) και δομικά RNA (tRNA, rRNA), ενώ μόνο το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος αντιστοιχεί σε μεταφραζόμενες mRNA αλληλουχίες²⁸.

Τα μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNA), αφορούν μετάγραφα τα οποία δεν εμπλέκονται στη μετάφραση και διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα ιδιοσυστάτα-δομικά (π.χ. tRNA, rRNA) και τα ρυθμιστικά (**Εικόνα 8**). Τα ρυθμιστικά ncRNA, ανάλογα με το μέγεθός τους χωρίζονται σε βραχεία και μακρά²⁹. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) είναι μόρια RNA που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από

200 νουκλεοτίδια. Η πλειοψηφία αυτών μπορεί να μεταγραφεί από την RNA pol II και υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες πολυαδενυλίωσης του 3' άκρου και ματίμασματος με το mRNA. Ωστόσο, η δυνατότητα της μετάφρασής τους είναι ελάχιστη έως μηδενική. Τα lncRNA εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, ενώ παράλληλα διαθέτουν και ευελιξία, χάρη στην ικανότητά τους να προσαρμόζονται στις διαφορετικές μοριακές αλληλεπιδράσεις και δομές. Αξίζει να σημειωθεί πως η απορρύθμισή τους σχετίζεται με διάφορες καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καθώς και με τον καρκίνο ^{30, 31}.



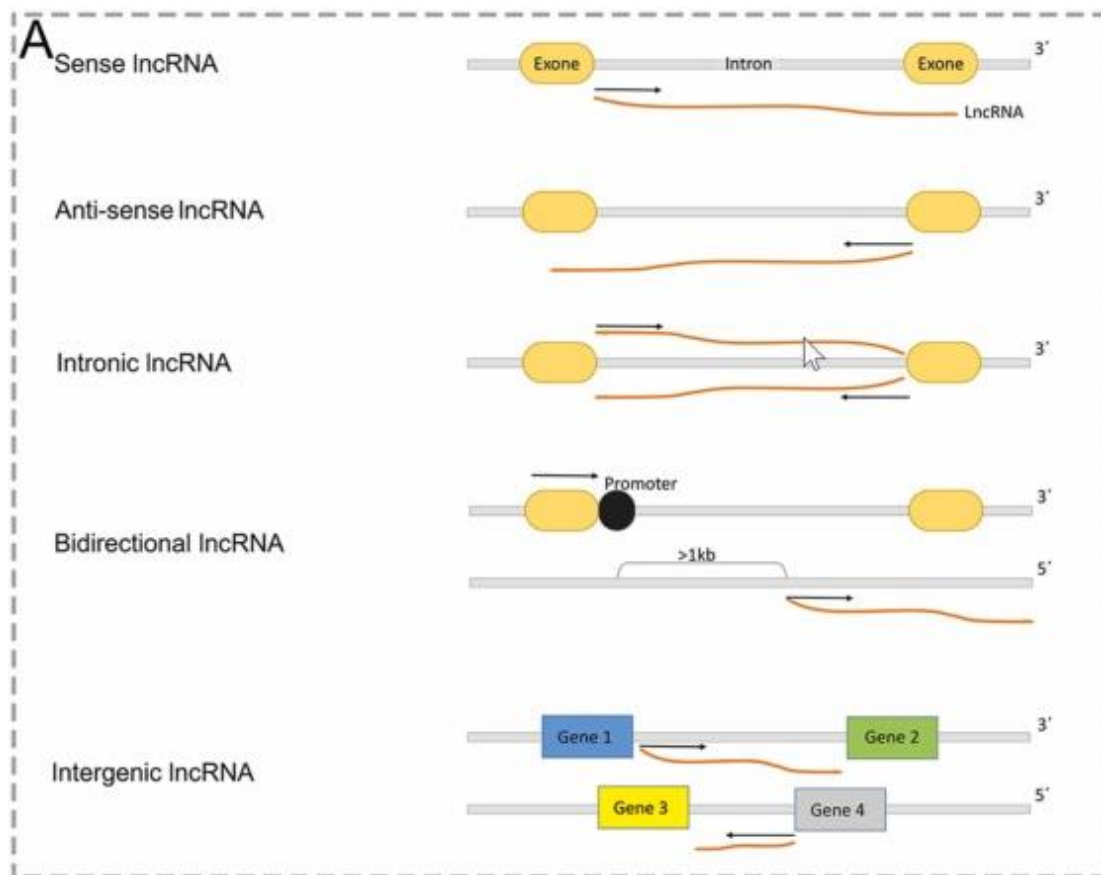
Εικόνα 8. Ταξινόμηση lncRNA, ανάλογα με τη δομή, τη δράση και τη βιογένεσή τους ²⁸.

1.3.2 Βιογένεση και δράση lncRNA

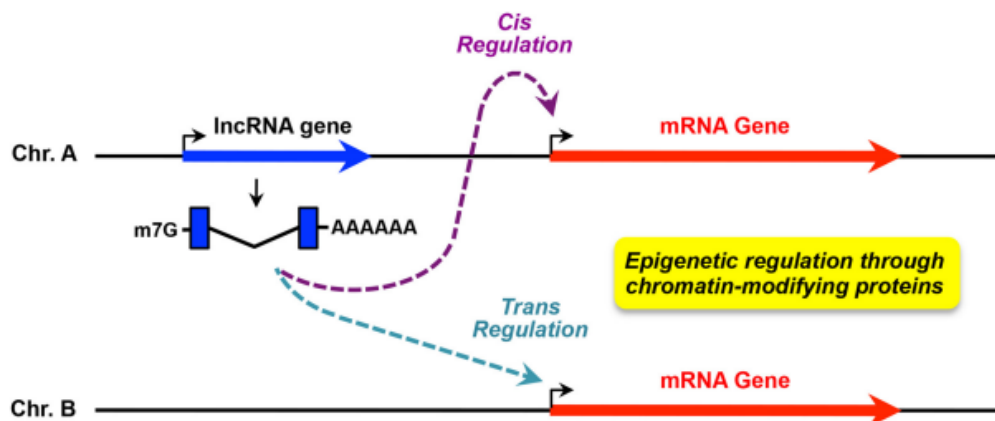
Όπως προαναφέρθηκε, τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο τόσο στην ανάπτυξη του ανθρώπου όσο και στην εξέλιξη μιας ασθένειας. Η κατανόηση της βιογένεσής τους είναι σημαντική ώστε να διαφοροποιηθούν από τα υπόλοιπα RNA, αλλά και να κατανοήσουμε τη λειτουργία τους. Τα lncRNA μεταγράφονται από διάσπαρτες θέσεις στο γονιδίωμα. Η βιογένεση και μεταγραφή τους είναι ιστοειδική και τελεί υπό τον έλεγχο ερεθισμάτων, ειδικών για τον κυτταρικό τύπο και το στάδιο που βρίσκονται, ενώ προϋποθέτει ρύθμιση από διαφορετικά στοιχεία του DNA, όπως υποκινητές, διαγονιδιακές περιοχές και

ενισχυτές. Επίσης στη βιογένεσή τους εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί, όπως για παράδειγμα ο σχηματισμός μικρών πυρηνικών RNA (snoRNA) και πρωτεϊνικών συμπλόκων (snoRNP) στα άκρα τους, ο σχηματισμός κυκλικών δομών και η διάσπαση από τη ριβονουκλεάση (RNaseP) για τη δημιουργία ώριμων άκρων²⁸.

Ανάλογα με τη γονιδιωματική περιοχή στην οποία μεταγράφονται, τα lncRNA διακρίνονται σε νοηματικά ή αντινοηματικά όταν μεταγράφονται από τη νοηματική ή αντινοηματική αλυσίδα των γονιδίων, αντίστοιχα, ιντρονικά όταν μεταγράφονται από ιντρόνια άλλων κωδικοποιητικών και μη γονιδίων, μεσογονιδιακά όταν μεταγράφονται από περιοχές μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και αμφίδρομα (**Εικόνα 9**). Με βάση την υποκυτταρική τους θέση διακρίνονται σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά^{32, 33}. Τα lncRNA με βάση τις επιδράσεις που ασκούν στις αλληλουχίες του DNA διακρίνονται επίσης σε *cis*-δραστικά (*cis*-lncRNA) όταν ρυθμίζουν την έκφραση γειτονικών τους γονιδίων πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα και σε *trans*-δραστικά (*trans*-lncRNA) όταν δρουν σε απομακρυσμένα ως προς τον γενετικό τους τόπο γονίδια στόχους, ενδεχομένως και σε διαφορετικό χρωμόσωμα (**Εικόνα 10**)^{34, 35}.



Εικόνα 9. Ταξινόμηση των lncRNA με βάση τη γονιδιωματική τους θέση ³².



Εικόνα 10. Cis και trans μηχανισμός δράσης των lncRNA ³⁶.

Τα lncRNA μπορούν να δράσουν ως ικρίωματα (scaffolds), σήματα (signals), ενισχυτές (enhancers), οδηγοί (guides) και δολώματα (decoys), ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική ομοιόσταση και την έκφραση των γονιδίων ³⁴. Έχουν καθοριστικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και ο κυτταρικός κύκλος. Συγκεκριμένα, όσα lncRNA μετάγραφα μετακινούνται στο

κυτταρόπλασμα στοχεύουν στα μετάγραφα του mRNA και ρυθμίζουν τη μετάφραση και τη σταθερότητα του mRNA, ενώ όσα παραμένουν στον πυρήνα μετά την μεταγραφή, συχνά δρουν ως σημαντικοί επιγενετικοί και μεταγραφικοί ρυθμιστές ελέγχοντας την γονιδιακή έκφραση και την οργάνωση του γονιδιώματος^{37,38}. Ανάλογα με τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις πρωτεΐνες, το DNA ή το RNA και έτσι να ρυθμίσουν τη λειτουργία πυρηνικών σωμάτων χωρίς μεμβράνη, να παρέμβουν στα μονοπάτια σηματοδότησης, να τροποποιήσουν τη λειτουργία της χρωματίνης ή να μεταβάλλουν τη σταθερότητα και τη μετάφραση των κυτταροπλασματικών mRNAs. Με αυτούς του τρόπους επηρεάζεται η έκφραση των γονιδίων και είναι πιθανό να προκληθούν ανοσολογικές αποκρίσεις, νευρωνικές διαταραχές και καρκίνος. Όσον αφορά τον καρκίνο, τα lncRNA συχνά είναι υπεύθυνα για τη διαδικασία της αγγειογένεσης, της μετάστασης και της απόπτωσης και αυτό τα καθιστά μόρια-στόχους για τη διάγνωση και τη θεραπεία νεοπλασιών^{39, 34}.

1.2.3 LncRNA και καρκίνος

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA αποτελούν μία ομάδα βιοδεικτών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη θεραπειών νέας γενιάς για τον καρκίνο του στομάχου. Τα lncRNAs έχουν υψηλή εξειδίκευση σε κυτταρικό και ιστολογικό επίπεδο, ενώ παράλληλα εμφανίζουν καρκινοειδική έκφραση. Γι' αυτό λοιπόν αποτελούν πολύ καλούς βιοδείκτες για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου σε αρχικά στάδια, αλλά και για την ανάπτυξη νέων, πιο στοχευμένων θεραπειών με σκοπό την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών που πάσχουν από γαστρικό καρκίνο.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης lncRNAs και γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε καρκινοειδικές διεργασίες, έπειτα από την επαγόμενη μεταγραφική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA6 και GATA4 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές πρωτεύοντος γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS). Απώτερος στόχος της μελέτης αυτής, είναι ο εντοπισμός νέων βιοδεικτών που πιθανώς θα μπορούν να διαγνώσουν το γαστρικό καρκίνο σε αρχικά στάδια, καθώς και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη νέων πιο στοχευμένων θεραπειών για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδραστήρια τα εξής:

1. Δείγματα cDNA
2. Water For Injection (WFI)
3. SYBR Green, KAPA
4. Primer (F/R), 10 μ M, Eurofins

Ως cDNA χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη κυτταρική σειρά πρωτεύοντος γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI εμπλουτισμένο με 10% FBS σε θερμοκρασία 37° C και CO₂ 5%. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν επιθηλιακή μορφολογία και είναι εμπορικά διαθέσιμα έπειτα από απομόνωση από ασθενή με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Στον **Πίνακα 1** αναγράφονται οι αλληλουχίες όλων των primers που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις ποσοτικής PCR.

Πίνακας 1. Αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις ποσοτικής PCR

Primer	Forward	Reverse
VIIL	5'-TATGGTGGCGTCCTAGTACAGG-3'	5'-AAGCCTTGTGGTGGATGCTGAC-3'
TFF1	5'-CCAGTGTGCAAATAAGGGCTGC-3'	5'-AGGCAGATCCCTGCAGAAAGTGT-3'
TSPAN8	5'-CATAGGCTTGCTTCTGATCCTGC-3'	5'-CTTTCCCCTGTGGCGCTCAAAA-3'
TSPAN11	5'-GCCTACATCCTCATCTTTGCGG-3'	5'-CTCAACCAGGAAGATGACGAGC-3'
HES1	5'-GGAAATGACAGTGAAGCACCTCC-3'	5'-GAAGCGGGTCACCTCGTTCATG-3'
CASP10	5'-CCAGGCTATGTATCCTTTTCGGC-3'	5'-TCGTTGACAGCAGTGAGGATGG-3'
SPINK4	5'-TGCCAGTGGCAGCAGGAAAGC-3'	5'-CCAAGCAGAGCTGGCATTTCATTC-3'
GATA6	5'-GCCACTACCTGTGCAACGCCT-3'	5'-CAATCCAAGCCGCGGTGATGAA-3'
GAPDH	5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

2.2 Μέθοδοι

Για τα πειράματα αξιοποιήθηκε μια θυγατρική σειρά των AGS που ονομάζεται AGTR13, η οποία προγενέστερα είχε τροποποιηθεί γενετικά από το εργαστήριο ώστε να υπερεκφράζει την πρωτεΐνη καταστολέα TetR. Κατά τα πειράματα επαγωγής της καταστολής τα κύτταρα διατηρούνται σε δύο καταστάσεις, τον μάρτυρα CON και την συνθήκη επαγωγής της καταστολής DOX. Στον μάρτυρα CON, η TetR μπορεί να

συνδεθεί σε μια αλληλουχία χειριστή που βρίσκεται στον υποκινητή του shRNA, καταστέλλοντας την μεταγραφή του. Ως εκ τούτου δεν παράγονται shRNA μόρια έναντι του μεταγραφικού παράγοντα GATA6, με αποτέλεσμα ο τελευταίος να εκφράζεται κανονικά. Στη συνθήκη DOX, έχει γίνει προσθήκη δοξκυκλίνης, ένα ανάλογο της τετρακυκλίνης, στο περιβάλλον των κυττάρων εξαναγκάζοντας την TetR να αλλάξει στερεοχημικά τη διαμόρφωσή της, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συνδεθεί στον χειριστή DNA και τελικά να μειώνονται τα επίπεδα του GATA6 λόγω των παραγόμενων shRNA που αποικοδομούν τα μετάγραφα του. Το cDNA που χρησιμοποιήθηκε, είχε παραχθεί στα πλαίσια προηγούμενων πειραμάτων στο εργαστήριο. Για τον έλεγχο πραγματοποιήθηκε qPCR στο cDNA 12 κλώνων που έχουν τροποποιηθεί γενετικά με μια κασέτα shRNA έναντι του GATA6. Η qPCR περιλάμβανε την ανίχνευση δύο γονιδίων: του GATA6 και του GAPDH, το οποίο λειτουργεί ως ιδιοσύστατο ώστε να πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση και να ελεγχθεί το ποσοστό της GATA6 σίγησης. Επιπλέον εφαρμόστηκε qPCR με τον ίδιο τρόπο και στο cDNA 4 κλώνων (33, 37, 40 και 45) οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί γενετικά με κασέτα shRNA έναντι του GATA4. Σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των γονιδίων GATA4 και του ιδιοσυστάτου GAPDH.

2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την πραγματοποίηση της qPCR, ήταν απαραίτητη η δημιουργία ενός Master mix που περιλάμβανε τη χρωστική KAPA SYBR Green όπου λειτουργούσε ως Buffer. Το Master mix περιείχε επίσης αποστειρωμένο, μη πυρετογόνο, απιονισμένο νερό (Water For Injection – WFI), το γονίδιο (primer) του οποίου προσδιορίζονταν τα επίπεδα έκφρασης και τα δείγματα cDNA. Οι αναλογίες για την παρασκευή του Master mix, αναφέρονται στον **Πίνακα 2** και προσαρμόζονταν ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύονταν κάθε φορά.

Αρχικά τα δείγματα cDNA και τα γονίδια που μελετούνταν, καθώς και το WFI και η χρωστική SYBR Green, τοποθετούνταν σε πάγο, μέχρι να ξεπαγώσουν. Η χρωστική, ως φωτοευαίσθητη, καλύπτονταν ώστε να μην έρχεται σε επαφή με το φως. Μόλις τα δείγματα cDNA ξεπάγωναν, τοποθετούνταν στο vortex και στη συνέχεια στο spin ώστε να αναδευτούν. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνταν και μία επανάληψη.

Με πιπέτα των 20 μL , λαμβάνονταν 4 μL cDNA και τοποθετούνταν προσεκτικά ώστε να μην εγκλωβιστεί αέρας, σε μία θέση των tube strips που χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή της qPCR. Αμέσως μετά, η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν για την επανάληψη του δείγματος και στη συνέχεια φορτωνόταν το επόμενο δείγμα και η επανάληψή του.

Για την παρασκευή του Master mix, αρχικά η χρωστική τοποθετούταν στο vortex και στο spin, για ελάχιστο χρόνο ώστε να αναδευτεί. Σε tube 1,5 ml, προστίθεντο με σειρά η χρωστική, το WFI και το γονίδιο, σε ποσότητες ανάλογες με τον αριθμό των δειγμάτων cDNA. Για κάθε γονίδιο παρασκευάζονταν διαφορετικό Master mix. Στη συνέχεια επαναλαμβανόταν η διαδικασία με το vortex και το spin ώστε να αναδευτούν τα αντιδραστήρια και 16 μL Master mix τοποθετούνταν σε κάθε θέση των tube strips στην οποία υπήρχε δείγμα cDNA με την ίδια διαδικασία που αναλύθηκε προηγουμένως. Τέλος τα tube strips τοποθετούνταν στο spin ώστε να αναδευτούν τα συστατικά και να μην υπάρχουν σταγόνες στα τοιχώματα.

Πίνακας 2. Σύσταση Master mix (X 1).

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
SYBR Green, KAPA	10
WFI	4
Primer F/R (10 μM), Eurofins	2
Τελικός όγκος	16

2.2.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) και ανάλυση μετρήσεων

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα της εταιρείας BioRad και για το σχεδιασμό της αντίδρασης (ορισμός θέσεων δειγμάτων και πρωτοκόλλου) και την προβολή των αποτελεσμάτων, το πρόγραμμα CFX manager της BioRad. Η σύσταση της αντίδρασης αναγράφεται στον **Πίνακα 3** και οι συνθήκες στον **Πίνακα 4**. Η ανάλυση και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγιναν με το λογισμικό υπολογιστικού φύλλου Microsoft Excel.

Πίνακας 3. Σύσταση της αντίδρασης qPCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Δείγμα cDNA	4
SYBR Green, KAPA	10
WFI	4
Primer F/R (10 mM), Eurofins	2
Τελικός όγκος	20

Πίνακας 4. Συνθήκες της αντίδρασης qPCR.

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

3. Αποτελέσματα

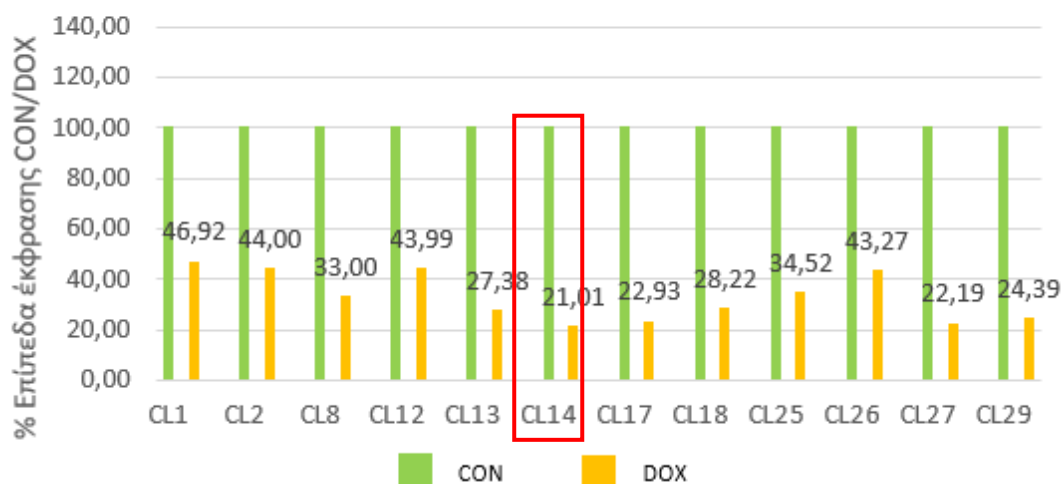
3.1 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 έπειτα από επαγόμενη μεταγραφική του σίγηση σε κύτταρα AGS

Από προηγούμενο πείραμα του εργαστηρίου είχε προηγηθεί η γενετική τροποποίηση κυττάρων AGTR13 με σκοπό την επαγόμενη μεταγραφική σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 με τη βοήθεια της τεχνολογίας Tet-RNAi σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά πρωτεύοντος γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS). Μετά τη γενετική τροποποίηση αυτών των κυττάρων, και στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής επιλέχθηκαν κλώνοι κυττάρων AGTR13 με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά βλαστισιδίνη και ζεοσίνη που υποδηλώνει έκφραση της πρωτεΐνης TetR και ενσωμάτωση της κασέτας shRNA αντίστοιχα, παρουσία (DOX) και απουσία (CON) της δοξκυκλίνης. Οι κλώνοι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του GATA6 με τη χρήση της qPCR τόσο στον μάρτυρα (CON) όσο και στην συνθήκη καταστολής (DOX). Ελέγχθηκαν συνολικά, τα CON/DOX επίπεδα έκφρασης 12 κλώνων κυττάρων (**Πίνακας 5**) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 11**.

Πίνακας 5. Κλώνοι cDNA στους οποίους ελέγχθηκαν τα CON/DOX επίπεδα έκφρασης.

AGTR GATA6
1 CON / DOX
2 CON / DOX
8 CON / DOX
12 CON / DOX
13 CON / DOX
14 CON / DOX
17 CON / DOX
18 CON / DOX
25 CON / DOX
26 CON / DOX
27 CON / DOX
29 CON / DOX

Έκφραση GATA6 σε επαγόμενη σίγησή του σε κύτταρα AGS



Εικόνα 11. Επίπεδα έκφρασης GATA6 σε κύτταρα AGS-TetR, χωρίς (CON) και μετά (DOX) την επαγόμενη σίγηση με τη χρήση της τεχνολογίας TetR-RNAi. Στο κόκκινο πλαίσιο βρίσκεται ο κλώνος με το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της έκφρασης. Τα αποτελέσματα αφορούν ποσοστό κανονικοποιημένης GATA6 έκφρασης στην συνθήκη DOX έναντι των επιπέδων στον μάρτυρα CON.

Αναλυτικά, τα ποσοστά μείωσης της έκφρασης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Από όλους τους κλώνους επιλέχθηκαν οι 3 που εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης της έκφρασης του GATA6 για τη συνέχεια του πειράματος, συγκεκριμένα ο κλώνος 14 (CL14) με ποσοστό καταστολής 78,99%, ο κλώνος 17 (CL17) με ποσοστό καταστολής 77,07% και ο κλώνος 27 (CL27) με ποσοστό καταστολής 77,81%.

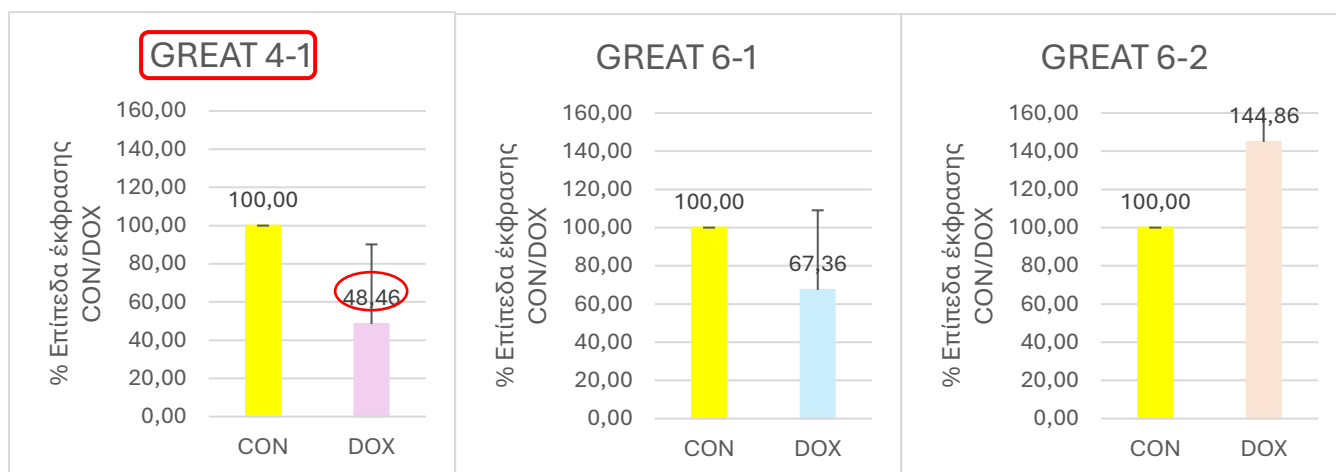
Πίνακας 6. Ποσοστά μείωσης της έκφρασης των κλώνων της συνθήκης DOX σε σχέση με τη συνθήκη CON (100%) των ίδιων κλώνων. Σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται οι κλώνοι που επιλέχθηκαν για τη συνέχεια του πειράματος.

Κλώνος στη συνθήκη DOX	Ποσοστό μείωσης της έκφρασης (%)
CL1	53,08
CL2	56,00
CL8	67,00
CL12	56,01
CL13	72,38
CL14	78,99
CL17	77,07
CL18	71,78
CL25	65,48
CL26	56,73
CL27	77,81
CL29	75,61

3.2 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης lncRNA σε AGTR GATA6 και AGTR GATA4 κύτταρα

Στους κλώνους 14, 17 και 27 που επιλέχθηκαν, έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης πιθανών lncRNA στόχων, που έχουν προκύψει στο εργαστήριο από προηγούμενα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντισώματα έναντι του GATA6 σε κύτταρα AGS, με σκοπό να ελεγχθεί το εάν η τεχνολογία RNAi είχε βιολογικό αντίκτυπο στην έκφραση τους. Ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης έγινε με qPCR και η κανονικοποίηση των τιμών με τη χρήση του ιδιόσυστατου γονιδίου GAPDH.

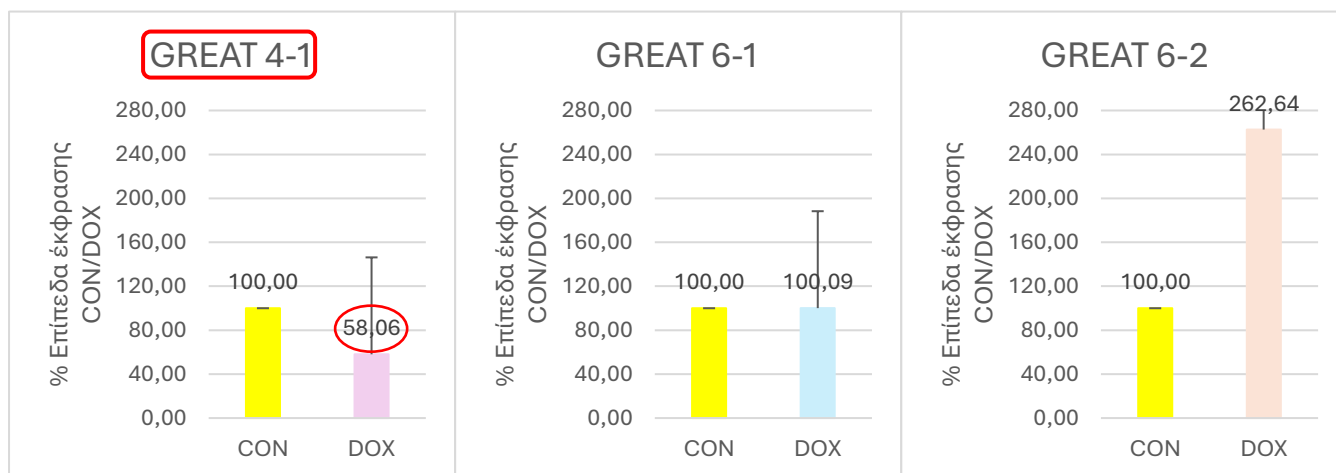
Έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης 4 lncRNAs: GREAT 4-1, GREAT 4-2, GREAT 6-1 και GREAT 6-2. Το GREAT 4-2 δεν παρουσιάζεται στα αποτελέσματα, καθώς η qPCR δεν ήταν αξιόπιστη και επομένως οι primers χρειάζονται επανασχεδιασμό. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 12**.



Εικόνα 12. Επίπεδα έκφρασης lncRNAs σε AGTR GATA6 κύτταρα, χωρίς (CON) και μετά (DOX) την επαγόμενη σίγηση με τη χρήση της τεχνολογίας TetR-RNAi. Στο κόκκινο πλαίσιο βρίσκεται το lncRNA με το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της έκφρασης. Η έκφραση αφορά κανονικοποιημένο ποσοστό σίγησης έναντι του μάρτυρα CON.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα, παρατηρείται πως το lncRNA με τη μεγαλύτερη μείωση της έκφρασής του ήταν το GREAT 4-1, ενώ το GREAT 6-2 αύξησε τα ποσοστά έκφρασης στη συνθήκη DOX. Συγκεκριμένα η έκφραση του GREAT 4-1 μειώθηκε κατά 51,84%, και του GREAT 6-1 κατά 32,64%. Αντιθέτως η έκφραση του GREAT 6-2 αυξήθηκε κατά 44,86%.

Για να διερευνηθεί ακόμα πιο διεξοδικά η πιθανή ρύθμιση αυτών των lncRNA από παράγοντες GATA, ακολούθησε ανεξάρτητος έλεγχος των επιπέδων έκφρασης τους, πάλι σε AGTR13 κύτταρα, στα οποία έχει επιτευχθεί επαγόμενη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 με τη χρήση της τεχνολογίας Tet-RNAi, από προηγούμενες πτυχιακές του εργαστηρίου. Οι GATA4 shRNA κλώνοι που ελέγχθηκαν ήταν οι 33, 37, 40 και 45 καθότι εμφανίζουν ποσοστά σίγησης του GATA4 αντίστοιχα με αυτά που παρατηρήθηκαν για το GATA6. Όπως και για τις GATA6 σειρές, ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων lncRNA στους GATA4 κλώνους πραγματοποιήθηκε με την τεχνική qPCR, ενώ η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση του ιδιόσυστατου γονιδίου GAPDH. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 13**.



Εικόνα 13. Επίπεδα έκφρασης lncRNAs σε AGTR GATA4 κύτταρα, χωρίς (CON) και μετά (DOX) την επαγόμενη σίγηση με τη χρήση της τεχνολογίας TetR-RNAi. Στο κόκκινο πλαίσιο βρίσκεται το lncRNA με το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της έκφρασης. Και εδώ η έκφραση αφορά κανονικοποιημένο ποσοστό σίγησης έναντι του μάρτυρα CON.

Παρατηρείται ότι και σε αυτή την περίπτωση το GREAT 4-1 είναι αυτό με τη μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης κατά μέσο όρο σε όλους τους κλώνους. Συγκεκριμένα η έκφρασή του μειώθηκε κατά 41,94%. Σημειώνεται επίσης ότι τα επίπεδα έκφρασης του GREAT 6-1 δεν επηρεάστηκαν καθόλου, ενώ στην περίπτωση του GREAT 6-2 υπάρχει υπερέκφραση με ποσοστό 162,64%. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, δεν επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο όλα τα lncRNAs που μελετήθηκαν. Παρατηρείται θετική ρύθμιση του GREAT4-1 και αρνητική του GREAT6-2 ενώ ο GREAT6-1 δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα, καθώς τα επίπεδα της έκφρασής του παραμένουν σταθερά.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το lncRNA GREAT4-1, τα ποσοστά της μείωσης ήταν περίπου ίδια και στις δύο περιπτώσεις (**Εικόνες 12 & 13**). Λίγο μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε με την καταστολή της έκφρασης του GATA6. Άρα λοιπόν και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές για το GREAT4-1 και το ρυθμίζουν θετικά. Αυτό υποδηλώνει ότι αυξάνονται οι πιθανότητες ρύθμισής του από τους δύο ογκοεπαγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και GATA6, στον καρκίνο.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα για το lncRNA GREAT6-1 παρατηρείται ότι η σίγηση του GATA6 οδήγησε σε περίπου 33% μείωση της έκφρασης του GREAT6-1

(**Εικόνα 12**). Αυτό το γεγονός υποδηλώνει τη θετική ρύθμιση του GREAT6-1 από τον GATA6. Η μείωση των επιπέδων έκφρασής του φαίνεται ότι αυξάνει τις πιθανότητες ρύθμισής του, στον καρκίνο. Παράλληλα η σίγηση του GATA4 δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του GREAT6-1 (100,09%) (**Εικόνα 13**) και αυτό υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο lncRNA δεν φαίνεται να ρυθμίζεται από τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα.

Αντιθέτως, για το lncRNA GREAT 6-2, βλέπουμε πως με την καταστολή του GATA6 η έκφρασή του αυξάνεται κατά 45% περίπου, ενώ με την καταστολή του GATA4 παρατηρείται υπερέκφραση, αφού εκφράζεται περίπου 160% περισσότερο από ότι στη συνθήκη CON (**Εικόνες 12 & 13**). Άρα και στις δύο περιπτώσεις το GREAT6-2 ρυθμίζεται αρνητικά από τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες.

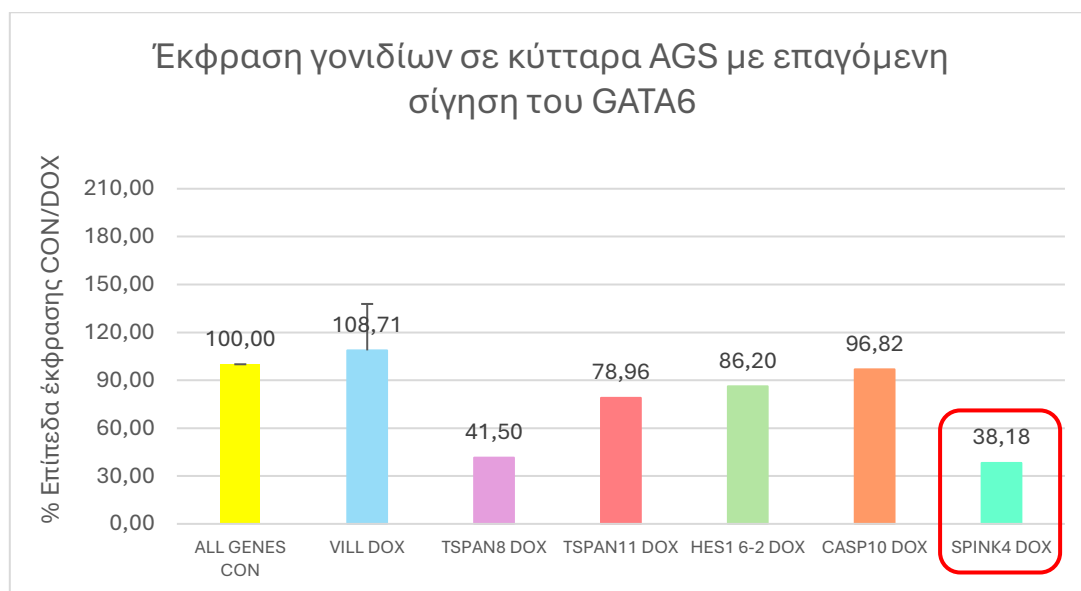
Το GREAT 4-1 θα μπορούσε πιθανώς να αποτελέσει έναν πολύ καλό βιοδείκτη, καθώς η έκφρασή του μειώνεται σε μεγάλο βαθμό κατά τη σίγηση και των δύο μεταγραφικών παραγόντων. Παρομοίως και το GREAT 6-2 θα μπορούσε να αποτελέσει καλό βιοδείκτη, καθώς και στις δύο περιπτώσεις η έκφρασή του αυξάνεται. Αντιθέτως, το GREAT 6-1 μάλλον δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης, καθώς κατά την καταστολή του GATA6, τα επίπεδα της έκφρασής του μειώνονται λίγο, αλλά η καταστολή του GATA4 δεν το επηρεάζει καθόλου.

3.3 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων σε AGTR GATA6 και AGTR GATA4 κύτταρα

Εκτός από την ρύθμιση μη κωδικοποιητικών RNA, οι παράγοντες GATA4 και 6 συχνά ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που με την σειρά τους εμπλέκονται σε καρκινοειδικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος, ήταν να ελεγχθεί το εάν οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και GATA6 ρυθμίζουν την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων και άρα το εάν αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νέοι βιοδείκτες για την πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου με μη επεμβατικό τρόπο.

Για να διερευνηθεί και αυτός ο ρόλος των GATA4 και 6 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε μια τελευταία σειρά qPCR αναλύσεων στους προαναφερθέντες AGTR13 κλώνους που εκφράζουν shRNA τόσο έναντι του GATA4 όσο έναντι του GATA6, αυτή τη φορά με σκοπό τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης

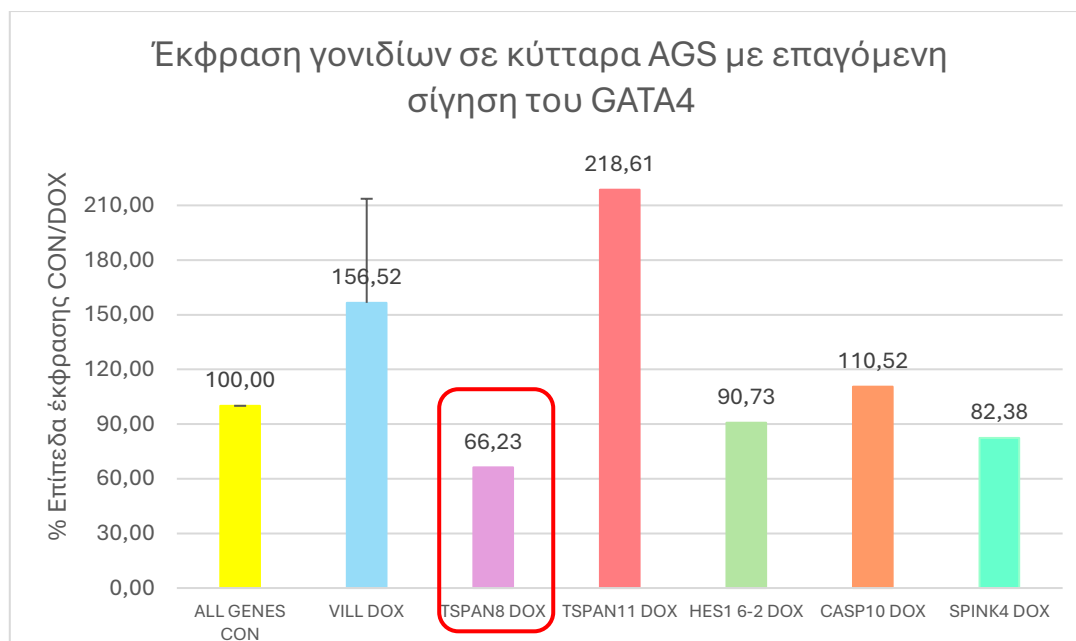
των γονιδίων-στόχων: TFF1, VILL, TSPAN8, TSPAN11, HES1 6-2, CASP10 και SPINK4 που εμπλέκονται σε καρκινοειδικές διεργασίες στον στομάχο. Αναλυτικότερα ο τρόπος δράσης τους αναγράφεται παρακάτω. Τα αποτελέσματα της qPCR παρουσιάζονται στο διάγραμμα τις **Εικόνας 14**.



Εικόνα 14. Επίπεδα έκφρασης γονιδίων σε AGTR GATA6 κύτταρα, χωρίς (CON) και μετά (DOX) την επαγόμενη σίγηση με τη χρήση της τεχνολογίας TetR-RNAi. Στο κόκκινο πλαίσιο βρίσκεται το γονίδιο με το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της έκφρασης. Τα αποτελέσματα για το γονίδιο TFF1, δεν παρατίθενται για λόγους αξιοπιστίας των εκκινήτων.

Αναλύοντας το διάγραμμα της εικόνας, παρατηρείται πως το γονίδιο με τη μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης είναι το SPINK4 (61,82%), ενώ αυτό που η έκφρασή του μειώθηκε λιγότερο είναι το CASP10 (3,18%). Το γονίδιο VILL φαίνεται να μην επηρεάστηκε καθόλου (108,71%). Το TSPAN11 και το HES1 6-2 εμφάνισαν πολύ μικρότερα ποσοστά μείωσης, 21,04% και 13,8% αντίστοιχα. Συμπεραίνεται πως ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 επηρεάζει θετικά τα περισσότερα γονίδια, των οποίων η έκφρασή τους μειώνεται σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό. Τα γονίδια που θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, είναι το TSPAN8 και το SPINK4, των οποίων η έκφραση μειώνεται πολύ με την καταστολή του GATA6.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των ίδιων γονιδίων, στους κλώνους των AGTR GATA4 κυττάρων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 15**.



Εικόνα 15. Επίπεδα έκφρασης γονιδίων σε AGTR GATA4 κύτταρα, χωρίς (CON) και μετά (DOX) την επαγόμενη σίγηση με τη χρήση της τεχνολογίας TetR-RNAi. Στο κόκκινο πλαίσιο βρίσκεται το γονίδιο με το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της έκφρασης.

Σε αυτή την περίπτωση το γονίδιο που είχε τη μικρότερη έκφραση είναι το TSPAN8 (33,77%). Η έκφραση των HES1 6-2 και SPINK4 φαίνεται ότι έχει μειωθεί ελάχιστα (9,27% και 17,62% αντίστοιχα), ενώ η έκφραση του CASP10 είναι κατά 10,52% μεγαλύτερη. Δύο γονίδια, το VILL (56,52%) και το TSPAN11 (118,61%) εμφάνισαν αυξημένη έκφραση στη συνθήκη DOX. Συμπεραίνεται ότι τα γονίδια VILL, TSPAN11 και TSPAN8, είναι αυτά που πιθανόν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, καθώς με την καταστολή του GATA4, η έκφρασή τους αυξάνεται ή μειώνεται αντίστοιχα σε ικανοποιητικά ποσοστά.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 πιθανώς ρυθμίζει την έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων, θετικά στις περιπτώσεις που παρατηρείται μείωση της έκφρασης και αρνητικά όταν η έκφρασή τους αυξάνεται. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της σίγησης του GATA6, παρατηρείται ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες ασκούν διαφορετική επίδραση στα περισσότερα γονίδια. Ο GATA6 ρυθμίζει θετικά σχεδόν όλα τα γονίδια, ενώ ο GATA4, προκαλεί θετική ρύθμιση στα μισά από τα γονίδια που μελετήθηκαν, και τα υπόλοιπα ρυθμίζονται αρνητικά. Συνοπτικά οι διαφορετικές επιδράσεις των μεταγραφικών παραγόντων στα γονίδια παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 7. Επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA6 και GATA4 στα διαφορετικά γονίδια-στόχους. Με – αναγράφεται η αρνητική και με + η θετική ρύθμιση του γονιδίου-στόχου.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	
	GATA6	GATA4
VILL	-	-
TSPAN8	+	+
TSPAN11	+	-
HES1 6-2	+	+
CASP10	+	-
SPINK4	+	+

4. Συμπεράσματα και συζήτηση

Μεταξύ των γονιδίων που βρίσκονται σε γονιδιωματική ενίσχυση στον γαστρικό καρκίνο, συμπεριλαμβάνονται και αυτά των μεταγραφικών παραγόντων GATA6 και GATA4. Οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη των φυσιολογικών ιστών, όσο και στην ανάπτυξη των όγκων και για το λόγο αυτό θεωρούνται σήμερα γονίδια προαγωγής της γαστρικής κυτταρικής γενεαλογίας. Στην παρούσα πτυχιακή πραγματοποιήθηκε αρχικά έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA6. Γενικά, σε όλους τους κλώνους η μείωση της έκφρασης ήταν πάνω από 50%, ενώ δεν ξεπέρασε το 80%. Το μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης που επιτεύχθηκε (78,99%) στον κλώνο 14 θεωρείται ικανοποιητικό, με βάση έρευνα που έχει γίνει σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές στις οποίες ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της επαγόμενης σίγησης. Τα ποσοστά σίγησης σε αυτή την περίπτωση κυμαίνονταν μεταξύ 67% και 91% ⁴⁰.

Με σκοπό την ανάπτυξη νέων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας του γαστρικού καρκίνου, τα lncRNA έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Ορισμένα lncRNA προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, ενώ άλλα αναστέλλουν την ανάπτυξη. Υπάρχουν επίσης περιπτώσεις στις οποίες ο ρόλος των μακρών μη κωδικοποιητικών RNA είναι αντίθετος σε διαφορετικούς τύπους γαστρικού καρκίνου ³². Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι το H19 με μήκος 2,3 kb που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p15.5 λειτουργεί ως ογκογόνο και η ανώμαλη ρύθμισή του σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή στα κύτταρα του γαστρικού καρκίνου και με κακή πρόγνωση ⁴¹. Ακόμη όταν υπερεκφράζεται σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ όταν καταστέλλεται προκαλείται απόπτωση κυτταρικών σειρών γαστρικού καρκίνου ⁴². Επιπλέον το NEAT1 που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q13.1 και έχει μήκος 22,743 bp, είναι υπεύθυνο για την έναρξη και την εξέλιξη του όγκου και η απορρύθμισή του σχετίζεται με κλινικά χαρακτηριστικά όπως η επιβίωση των ασθενών, το ποσοστό υποτροπής και η μετάσταση. Η υπερέκφραση του NEAT1 προκαλεί χαμηλό ποσοστό επιβίωσης στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου ³⁸.

Επίσης σε κλινικές και *in vitro* μελέτες αποδείχθηκε ότι η ανώμαλη έκφραση των lncRNAs σχετίζεται με τη ρύθμιση της απόπτωσης, της μετάστασης του όγκου, της εισβολής, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόκρισης στη θεραπεία, αλλά και με κακή πρόγνωση ⁴³. Ένα παράδειγμα του ότι τα lncRNAs μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, αποτελεί το TCLInc1 το οποίο εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο πλάσμα και σε ιστούς ασθενών με γαστρικό καρκίνο, σε σύγκριση με τα επίπεδα υγιών ατόμων. Επιπλέον, η υπερέκφραση αυτού, συσχετίστηκε με απομακρυσμένη μετάσταση ⁴⁴. Τα lncRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση σχηματισμού δευτερογενούς δομής για αποτροπή αλληλεπιδράσεων με βιομόρια, την διαμόρφωση των γονιδιωματικών θέσεων των lncRNAs για την πρόκληση μεταγραφικής καταστολής, τροποποιήσεις προτύπων έκφρασης και την εισαγωγή συνθετικών lncRNAs. Ωστόσο, μέχρι στιγμής, καμία θεραπεία δεν έχει προχωρήσει στην κλινική φάση II και III ⁴⁵. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο ένα lncRNA, το PCA3, έχει μετατραπεί επιτυχώς σε μοριακό διαγνωστικό τεστ, εγκεκριμένο από τον FDA, και προτείνεται σε ασθενείς με αρνητική βιοψία για τον καρκίνο του προστάτη ⁴⁶.

Με βάση τα παραπάνω, πλαίσια της πτυχιακής πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις qPCR ώστε να μελετηθεί η πιθανή επίπτωση της σίγησης τόσο του GATA6 όσο και του GATA4 στην έκφραση υποψήφιων lncRNA στόχων που έχουν προκύψει από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, όντως διαπιστώθηκε σημαντική επίπτωση στην έκφραση των υπό μελέτη lncRNA και για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες.

Το GREAT4-1, είναι ένα lncRNA, στον υποκινητή του οποίου προσδένεται η πρωτεΐνη GATA4 σε καρκινικά κύτταρα που εντοπίζονται στο στομάχι. Η έκφρασή του είναι εξειδικευμένη όσον αφορά τον κυτταρικό τύπο και τον ιστό. Σε μία μελέτη στην οποία μελετήθηκε η έκφρασή του σε Ευρωπαίους, Αμερικάνους και Κορεάτες ασθενείς με γαστρικό καρκίνο, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου σε αντίθεση με την έκφρασή του σε φυσιολογικούς ιστούς ⁴⁷. Στην παρούσα πτυχιακή παρατηρείται πως με τη σίγηση του GATA6 και του GATA4 η έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA μειώνεται (51,4% και 41,94% αντίστοιχα) και μάλιστα παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης ανάμεσα στα τρία lncRNAs που μελετήθηκαν (**Εικόνες 12 & 13**). Άρα λοιπόν το GREAT 4-1 ρυθμίζεται θετικά και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες.

Τα GREAT6-1/2 είναι lncRNAs που στον υποκινητή τους προσδένεται η πρωτεΐνη GATA6. Το GREAT6-1 δρα κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων και στον καρκίνο του στομάχου, ρυθμίζεται από ογκοεπαγωγικούς παράγοντες. Η

βιοπληροφορική ανάλυση μίας μελέτης έδειξε ότι η έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA είναι υψηλή και εξειδικευμένη σε περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου. Επίσης η σίγηση της μεταγραφής των GATA4, GATA6 και KLF5 μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές⁴⁸. Στην παρούσα εργασία τα επίπεδα του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά τη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 (32,64%), ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης παρέμειναν σταθερά με τη σίγηση του GATA4 (100,09%). Συμπεραίνεται λοιπόν πως το GREAT6-1 ρυθμίζεται θετικά από το GATA6, αλλά δεν επηρεάζεται καθόλου από τον GATA4. Επιπλέον το GREAT6-2 αυξάνει την έκφρασή του κατά τη σίγηση του GATA6 (44,86%) και τέλος υπερεκφράζεται με τη σίγηση του GATA4 (162,64%). Αυτό υποδηλώνει πως ρυθμίζεται αρνητικά και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες.

Παράλληλα στην παρούσα πτυχιακή, έγινε έλεγχος της έκφρασης επιλεγμένων κωδικοποιητικών γονιδίων-στόχων τα οποία εμπλέκονται σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, με σκοπό να διερευνηθεί η επίπτωση της σίγησης τόσο του GATA4 όσο και του GATA6 σε καρκινοειδικούς φαινότυπους σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα VILL, TSPAN8, TSPAN11, HES1 6-2, CASP10 και SPINK4 (Εικόνες 14 & 15).

Η βιλλίνη (VILL) είναι μία ακτινοδεσμευτική πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με την ακτίνη προκειμένου να σχηματίσει τα όρια του επιθηλίου. Η καταστολή της προκαλεί τη μετάβαση του κυττάρου από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό και στη συνέχεια την εμφάνιση μετάστασης. Εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του εντέρου και το επίπεδο έκφρασής της αυξάνεται με τη διαφοροποίηση. Σε μία μελέτη βρέθηκε ότι σε καρκινικούς ιστούς βρίσκεται σε μειωμένη ποσότητα σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς, γεγονός που την καθιστά κατάλληλο βιοδείκτη για την αξιολόγηση της κατάστασης⁴⁹. Από την ανάλυση του VILL παρατηρείται πως με τη σίγηση του GATA6 η έκφρασή του αυξήθηκε περίπου 9% και από τη σίγηση του GATA4 η έκφρασή του αυξήθηκε περίπου 57%. Άρα λοιπόν το συγκεκριμένο γονίδιο ρυθμίζεται αρνητικά και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες.

Η τετρασπανίνη 8 (TSPAN8), είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Η έκφρασή της είναι σημαντικά αυξημένη σε περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου και έχει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της μετάστασης του όγκου μέσω

της ενεργοποίησης του μονοπατιού EGFR/AKT. Αυτό την κάνει έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο του γαστρικού καρκίνου ⁵⁰. Κατά τη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6, το TSPAN8 είχε μεγάλη μείωση της έκφρασής του, με ποσοστό περίπου 59% και κατά τη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 η μείωση της έκφρασης ήταν περίπου 34%. Φαίνεται λοιπόν πως και στις δύο περιπτώσεις οι GATA6 και GATA4 είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές του γονιδίου, ρυθμίζοντας θετικά την έκφρασή του.

Η τετρασπανίνη 11 (TSPAN11), αποτελεί επίσης μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία σχετίζεται με τη μετανάστευση των κυττάρων ⁵¹. Με τη σίγηση του GATA6 η έκφρασή της μειώθηκε περίπου 21% ενώ αντίθετα κατά τη σίγηση του GATA4 το συγκεκριμένο γονίδιο εμφάνισε αύξηση με ποσοστό περίπου 119%. Ο GATA6 μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει θετικά την έκφραση της τετρασπανίνης, ωστόσο ο GATA4 τη ρυθμίζει αρνητικά, προκαλώντας μάλιστα την υπερέκφρασή της στη συνθήκη DOX.

Το γονίδιο HES1 έχει βρεθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η απόπτωση, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και η ικανότητα της αυτοανανέωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι συμμετέχει στη διατήρηση των καρκινικών κυττάρων, στον ανταγωνισμό της απόπτωσης που προκαλείται από φάρμακα και στη μετάσταση ⁵². Ο GATA6 μεταγραφικός παράγοντας λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής αυτού του γονιδίου, καθώς ρυθμίζει θετικά την έκφρασή του. Συγκεκριμένα, στη συνθήκη DOX το ποσοστό της έκφρασης μειώθηκε περίπου 14%. Θετικά φαίνεται πως ρυθμίζει την έκφραση και ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4, καθώς όταν σιγείται, η έκφραση του HES1 μειώνεται περίπου 10%.

Σχετικά με την κασπάση (CASP10), αξίζει να σημειωθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων, ενώ η μετάλλαξή της σχετίζεται εκτός των άλλων και με την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου ⁵³. Αναφορικά με την σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6, παρατηρείται ότι η έκφρασή της μειώνεται λίγο, με ποσοστό περίπου 3%. Αυτό υποδηλώνει θετική ρύθμιση του γονιδίου από τον GATA6. Αντίθετα, όταν προκαλείται σίγηση του GATA4 μεταγραφικού παράγοντα, η κασπάση ρυθμίζεται αρνητικά προκαλώντας αύξηση της έκφρασής της σε ποσοστό περίπου 11%.

Τέλος αναφορικά με τον αναστολέα της πεπτιδάσης σερίνης ορού, Kazal 4 (SPINK4), φαίνεται η έκφρασή του να μειώνεται στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, όταν αναστέλλεται η SPDEF, με αποτέλεσμα την τελική διαφοροποίηση και ωρίμανση των εντερικών βοηθίων κυττάρων, υποδηλώνοντας έτσι την εμπλοκή της στην παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου ⁵⁴. Και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές για το γονίδιο SPINK4, ωστόσο η έκφρασή του είναι πολύ περισσότερο μειωμένη στην καταστολή του GATA6 (περίπου 62%) από ότι στην καταστολή του GATA4 (περίπου 18%).

Συγκρίνοντας λοιπόν τα αποτελέσματα των μετρήσεων από την σίγηση του GATA4 με αυτά της σίγησης του GATA6, παρατηρείται ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες επηρεάζουν διαφορετικά τα συγκεκριμένα γονίδια. Το γονίδιο VILL αυξάνει και στις δύο περιπτώσεις την έκφρασή του, ωστόσο στην περίπτωση του GATA6 ελάχιστα, ενώ στην περίπτωση του GATA4 περίπου 57%. Και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές του γονιδίου TSPAN8 και η διαφορά στη μείωση της έκφρασης ανάμεσα στις δύο περιπτώσεις είναι περίπου 20%, με τη μείωση να είναι μεγαλύτερη στην καταστολή του GATA6. Σχετικά με το γονίδιο TSPAN11 οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες λειτουργούν εντελώς αντίθετα, αφού ο GATA6 είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής, ενώ ο GATA4 λειτουργεί κατασταλτικά για το συγκεκριμένο γονίδιο, προκαλώντας μάλιστα υπερέκφρασή του στη συνθήκη DOX. Το γονίδιο HES1 6-2 φαίνεται να μην επηρεάζεται πολύ, αφού και στις δύο περιπτώσεις η μείωση της έκφρασής είναι μικρότερη από 15%. Μικρή επιρροή υπάρχει και στην περίπτωση του CASP10, με τον GATA6 να το ρυθμίζει θετικά προκαλώντας ελάχιστη μείωση της έκφρασης και τον GATA4 να το ρυθμίζει αρνητικά προκαλώντας αύξηση της έκφρασης, σε αμελητέα επίπεδα.

Το εάν οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA6 και GATA4 προσδένονται άμεσα ή έμμεσα στους υποκινητές των γονιδίων που μελετώνται, δεν μπορεί να αποδειχθεί με την παρούσα εργασία. Ωστόσο στην περίπτωση που αυτοί συνδέονται άμεσα και επηρεάζουν τα γονίδια με τον ίδιο τρόπο (πχ η έκφραση ενός γονιδίου μειώνεται με την καταστολή και των δύο μεταγραφικών παραγόντων), οι δύο αυτές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να ρυθμιστούν με την πρόσδεσή τους στον υποκινητή των γονιδίων. Αυτή η ρύθμιση μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους. Από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, δύο από αυτούς έχουν ελεγχθεί και αποκλεισθεί.

Ο πρώτος τρόπος που έχει αποκλειστεί είναι οι δύο πρωτεΐνες να συνδυάζονται ανεξάρτητα και να προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα σύμπλοκο με αποτέλεσμα όταν δεν εκφράζεται η μία εκ των δύο πρωτεϊνών, το σύμπλοκο να μην μπορεί να δημιουργηθεί και το γονίδιο να αλλάζει την έκφρασή του θετικά ή αρνητικά. Ο δεύτερος τρόπος είναι ο ένας μεταγραφικός παράγοντας να ρυθμίζει τον δεύτερο και αυτός με τη σειρά του να ρυθμίζει το γονίδιο. Όπως προαναφέρθηκε, έχει επιβεβαιωθεί ότι βιολογικά ο ένας μεταγραφικός παράγοντας δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του άλλου, παρά το γεγονός ότι και οι δύο είναι μέλη της ίδιας οικογένειας. Επίσης έχει επιβεβαιωθεί ότι το shRNA είναι μοναδικό για κάθε μεταγραφικό παράγοντα.

Αυτό που είναι πιθανό να ισχύει είναι ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν ανεξάρτητα να ανταγωνιστούν την πρόσδεσή τους στο GATA μοτίβο του γονιδίου. Άρα λοιπόν στην GATA6 καταστολή θα μπορούν να εκφράζουν τον GATA4 ο οποίος με τη σειρά του θα ρυθμίζει το γονίδιο και το αντίστροφο.

Εν κατακλείδι, από την παρούσα πτυχιακή προκύπτει ότι τόσο ο παράγοντας GATA4 όσο και ο παράγοντας GATA6 ρυθμίζουν ανεξάρτητα ή από κοινού την έκφραση καθοδικών γονιδίων στόχων που αφορούν lncRNA ενώ παράλληλα ελέγχουν και την μεταγραφή γνωστών mRNA στόχων που εμπλέκονται σε καρκινοειδικές διεργασίες στον στόμαχο. Παρά τα ενθαρρυντικά αυτά αποτελέσματα είναι σημαντικό να τονιστεί το γεγονός ότι χρειάζονται περεταίρω έρευνες με σκοπό να μελετηθεί και σε κλινικό επίπεδο η διαγνωστική και προγνωστική αξία των συγκεκριμένων GATA γονιδίων στόχων, ώστε να προκύψουν ενδεχομένως νέοι βιοδείκτες που θα μπορούν με μη επεμβατικό τρόπο να προβλέψουν την πορεία της εξέλιξης της ασθένειας, αλλά ταυτόχρονα να αξιοποιηθούν για τη διάγνωση και τη θεραπεία της ασθένειας σε πρώιμα στάδια όπου ακόμα τα ποσοστά της πλήρους ανάρρωσης είναι υψηλά.

Αναφορές

- (1) Petryszyn, P.; Chapelle, N.; Matysiak-Budnik, T. Gastric Cancer: Where Are We Heading? *Digestive Diseases* **2020**, *38* (4), 280–285. <https://doi.org/10.1159/000506509>.
- (2) Smyth, E. C.; Nilsson, M.; Grabsch, H. I.; van Grieken, N. C.; Lordick, F. Gastric Cancer. *The Lancet* **2020**, *396* (10251), 635–648. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5).
- (3) IARC. *Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022*. <https://gco.iarc.who.int/today/> (accessed 2024-06-18).
- (4) Forman, D.; Burley, V. J. Gastric Cancer: Global Pattern of the Disease and an Overview of Environmental Risk Factors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2006**, *20* (4), 633–649. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2006.04.008>.
- (5) Karimi, P.; Islami, F.; Anandasabapathy, S.; Freedman, N. D.; Kamangar, F. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2014**, *23* (5), 700–713. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1057>.
- (6) NCI. *Helicobacter pylori (H. pylori) and Cancer - NCI*. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/h-pylori-fact-sheet> (accessed 2024-07-23).
- (7) Wang, Q.; Liu, G.; Hu, C. Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology Res* **2019**, *12* (6), 275–282. <https://doi.org/10.14740/gr1187>.
- (8) Díaz del Arco, C.; Fernández Aceñero, M. J.; Ortega Medina, L. Molecular Classifications in Gastric Cancer: A Call for Interdisciplinary Collaboration. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, *25* (5), 2649. <https://doi.org/10.3390/ijms25052649>.
- (9) Cisło, M.; Filip, A. A.; Offerhaus, G. J. A.; Ciseł, B.; Rawicz-Pruszyński, K.; Skierucha, M.; Polkowski, W. P. Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology. *Oncotarget* **2018**, *9* (27), 19427–19442. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24827>.
- (10) Mireskandari, M.; Shafaii, A.; Kayser, G.; Kayser, K. Lack of CD117 and Rare Bcl-2 Expression in Stomach Cancer by Immunohistochemistry. An Immunohistochemical Study with Review of the Literature. *Diagnostic pathology* **2006**, *1*, 7. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-1-7>.
- (11) Correa, P.; Piazuelo, M. B. The Gastric Precancerous Cascade. *Journal of Digestive Diseases* **2012**, *13* (1), 2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x>.
- (12) O'Connor, A.; O'Morain, C. A.; Ford, A. C. Population Screening and Treatment of Helicobacter Pylori Infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14* (4), 230–240. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.195>.
- (13) Kaur, G.; Vyas, M. *Stomach Carcinoma - Diffuse type*. PathologyOutlines.com. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stomachdiffuse.html>.
- (14) Nemtsova, M. V.; Kuznetsova, E. B.; Bure, I. V. Chromosomal Instability in Gastric Cancer: Role in Tumor Development, Progression, and Therapy. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (23), 16961. <https://doi.org/10.3390/ijms242316961>.
- (15) Garattini, S. K.; Basile, D.; Cattaneo, M.; Fanotto, V.; Ongaro, E.; Bonotto, M.; Negri, F. V.; Berenato, R.; Ermacora, P.; Cardellino, G. G.; Giovannoni, M.; Pella, N.; Scartozzi, M.; Antonuzzo, L.; Silvestris, N.; Fasola, G.; Aprile, G. Molecular Classifications of Gastric Cancers: Novel Insights and Possible Future

- Applications. *World J Gastrointest Oncol* **2017**, *9* (5), 194–208. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v9.i5.194>.
- (16) Zheng, R.; Blobel, G. A. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer* **2010**, *1* (12), 1178–1188. <https://doi.org/10.1177/1947601911404223>.
 - (17) Haveri, H.; Westerholm-Ormio, M.; Lindfors, K.; Mäki, M.; Savilahti, E.; Andersson, L. C.; Heikinheimo, M. Transcription Factors GATA-4 and GATA-6 in Normal and Neoplastic Human Gastrointestinal Mucosa. *BMC Gastroenterol* **2008**, *8*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-8-9>.
 - (18) Parviainen, H.; Kiiveri, S.; Bielinska, M.; Rahman, N.; Huhtaniemi, I. T.; Wilson, D. B.; Heikinheimo, M. GATA Transcription Factors in Adrenal Development and Tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2007**, *265–266*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.033>.
 - (19) Aronson, B. E.; Stapleton, K. A.; Krasinski, S. D. Role of GATA Factors in Development, Differentiation, and Homeostasis of the Small Intestinal Epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2014**, *306* (6), G474–G490. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00119.2013>.
 - (20) Gong, Y.; Zhang, L.; Zhang, A.; Chen, X.; Gao, P.; Zeng, Q. GATA4 Inhibits Cell Differentiation and Proliferation in Pancreatic Cancer. *PLOS ONE* **2018**, *13* (8), e0202449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202449>.
 - (21) Romano, O.; Miccio, A. GATA Factor Transcriptional Activity: Insights from Genome-Wide Binding Profiles. *IUBMB Life* **2020**, *72* (1), 10–26. <https://doi.org/10.1002/iub.2169>.
 - (22) Sun, Z.; Yan, B. Multiple Roles and Regulatory Mechanisms of the Transcription Factor GATA6 in Human Cancers. *Clinical Genetics* **2020**, *97* (1), 64–72. <https://doi.org/10.1111/cge.13630>.
 - (23) Adam, R. M.; Mauney, J. R. *GATA6 (GATA binding protein 6)*. ATLAS of GENETICS and CYTOGENETICS in ONCOLOGY and HAEMATOLOGY. [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40690/gata6-\(gata-binding-protein-6\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40690/gata6-(gata-binding-protein-6)) (accessed 2024-07-03).
 - (24) Deng, N.; Goh, L. K.; Wang, H.; Das, K.; Tao, J.; Tan, I. B.; Zhang, S.; Lee, M.; Wu, J.; Lim, K. H.; Lei, Z.; Goh, G.; Lim, Q.-Y.; Tan, A. L.-K.; Poh, D. Y. S.; Riahi, S.; Bell, S.; Shi, M. M.; Linnartz, R.; Zhu, F.; Yeoh, K. G.; Toh, H. C.; Yong, W. P.; Cheong, H. C.; Rha, S. Y.; Boussioutas, A.; Grabsch, H.; Rozen, S.; Tan, P. A Comprehensive Survey of Genomic Alterations in Gastric Cancer Reveals Systematic Patterns of Molecular Exclusivity and Co-Occurrence among Distinct Therapeutic Targets. *Gut* **2012**, *61* (5), 673–684. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301839>.
 - (25) Chia, N.-Y.; Deng, N.; Das, K.; Huang, D.; Hu, L.; Zhu, Y.; Lim, K. H.; Lee, M.-H.; Wu, J.; Sam, X. X.; Tan, G. S.; Wan, W. K.; Yu, W.; Gan, A.; Tan, A. L. K.; Tay, S.-T.; Soo, K. C.; Wong, W. K.; Dominguez, L. T. M.; Ng, H.-H.; Rozen, S.; Goh, L.-K.; Teh, B.-T.; Tan, P. Regulatory Crosstalk between Lineage-Survival Oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 Cooperatively Promotes Gastric Cancer Development. *Gut* **2015**, *64* (5), 707–719. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306596>.
 - (26) Liu, H.; Du, F.; Sun, L.; Wu, Q.; Wu, J.; Tong, M.; Wang, X.; Wang, Q.; Cao, T.; Gao, X.; Cao, J.; Wu, N.; Nie, Y.; Fan, D.; Lu, Y.; Zhao, X. GATA6 Suppresses Migration and Metastasis by Regulating the miR-520b/CREB1 Axis in Gastric Cancer. *Cell Death Dis* **2019**, *10* (2), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1270-x>.

- (27) Tremblay, M.; Sanchez-Ferras, O.; Bouchard, M. GATA Transcription Factors in Development and Disease. *Development* **2018**, *145* (20), dev164384. <https://doi.org/10.1242/dev.164384>.
- (28) Dahariya, S.; Paddibhatla, I.; Kumar, S.; Raghuwanshi, S.; Pallepati, A.; Gutti, R. K. Long Non-Coding RNA: Classification, Biogenesis and Functions in Blood Cells. *Molecular Immunology* **2019**, *112*, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>.
- (29) He, X.; Cai, L.; Tang, H.; Chen, W.; Hu, W. Epigenetic Modifications in Radiation-Induced Non-Targeted Effects and Their Clinical Significance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2023**, *1867* (8), 130386. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130386>.
- (30) Zhang, X.; Wang, W.; Zhu, W.; Dong, J.; Cheng, Y.; Yin, Z.; Shen, F. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (22), 5573. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>.
- (31) Marchese, F. P.; Raimondi, I.; Huarte, M. The Multidimensional Mechanisms of Long Noncoding RNA Function. *Genome Biology* **2017**, *18* (1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1348-2>.
- (32) Hosseini, S. A.; Haddadi, M. H.; Fathizadeh, H.; Nemati, F.; Aznaveh, H. M.; Taraj, F.; Aghabozorgizadeh, A.; Gandomkar, G.; Bazazzadeh, E. Long Non-Coding RNAs and Gastric Cancer: An Update of Potential Biomarkers and Therapeutic Applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2023**, *163*, 114407. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114407>.
- (33) Tamtaji, O. R.; Derakhshan, M.; Rashidi Noshabad, F. Z.; Razaviyan, J.; Hadavi, R.; Jafarpour, H.; Jafari, A.; Rajabi, A.; Hamblin, M. R.; Mahabady, M. K.; Taghizadieh, M.; Mirzaei, H. Non-Coding RNAs and Brain Tumors: Insights Into Their Roles in Apoptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.792185>.
- (34) Μόσχοβης, Δ. Η συμβολή των μεγάλων μη-κωδικών (long non-coding) RNA στους παγκρεατικούς καρκίνους. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Παθολογίας. Κλινική Γαστρεντερολογική Γ.Ν.Ν.Π. Άγιος Παντελεήμων, 2019. <http://hdl.handle.net/10442/hedi/46456> (accessed 2024-06-27).
- (35) Ma, L.; Bajic, V. B.; Zhang, Z. On the Classification of Long Non-Coding RNAs. *RNA Biology* **2013**, *10* (6), 924–933. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>.
- (36) Sun, M.; Kraus, W. L. Minireview: Long Noncoding RNAs: New “Links” between Gene Expression and Cellular Outcomes in Endocrinology. *Mol Endocrinol* **2013**, *27* (9), 1390–1402. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1113>.
- (37) Bridges, M. C.; Daulagala, A. C.; Kourtidis, A. LNCcation: lncRNA Localization and Function. *Journal of Cell Biology*. January 2021. <https://doi.org/10.1083/jcb.202009045>.
- (38) Dong, P.; Xiong, Y.; Yue, J.; Hanley, S. J. B.; Kobayashi, N.; Todo, Y.; Watari, H. Long Non-Coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy in Human Tumors. *Front. Genet.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00471>.
- (39) Statello, L.; Guo, C.-J.; Chen, L.-L.; Huarte, M. Gene Regulation by Long Non-Coding RNAs and Its Biological Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2021**, *22* (2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>.
- (40) Henriksen, J. R.; Løkke, C.; Hammerø, M.; Geerts, D.; Versteeg, R.; Flægstad, T.; Einvik, C. Comparison of RNAi Efficiency Mediated by Tetracycline-Responsive

- H1 and U6 Promoter Variants in Mammalian Cell Lines. *Nucleic Acids Research* **2007**, 35 (9), e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm193>.
- (41) Li, P.; Tong, L.; Song, Y.; Sun, J.; Shi, J.; Wu, Z.; Diao, Y.; Li, Y.; Wang, Z. Long Noncoding RNA H19 Participates in Metformin-Mediated Inhibition of Gastric Cancer Cell Invasion. *Journal of Cellular Physiology* **2019**, 234 (4), 4515–4527. <https://doi.org/10.1002/jcp.27269>.
 - (42) Yang, F.; Bi, J.; Xue, X.; Zheng, L.; Zhi, K.; Hua, J.; Fang, G. Up-Regulated Long Non-Coding RNA H19 Contributes to Proliferation of Gastric Cancer Cells. *The FEBS Journal* **2012**, 279 (17), 3159–3165. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x>.
 - (43) Silva, J. M. C.; Teixeira, E. B.; Mourão, R. M. da S.; Ferraz, R. S.; Moreira, F. C.; Assumpção, P. P. de; Calcagno, D. Q. The Landscape of lncRNAs in Gastric Cancer: From Molecular Mechanisms to Potential Clinical Applications. *Front. Pharmacol.* **2023**, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1237723>.
 - (44) Hu, K.; Zhang, Y.; Rong, J.; Deng, W.; Xiao, B. Overexpression of lncRNA TCLlnc1 in Gastric Cancer Predicts Postoperative Distant Recurrence and Poor Survival. *Anti-Cancer Drugs* **2022**, 33 (10), 999. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001396>.
 - (45) Winkle, M.; El-Daly, S. M.; Fabbri, M.; Calin, G. A. Noncoding RNA Therapeutics — Challenges and Potential Solutions. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, 20 (8), 629–651. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z>.
 - (46) Cui, Y.; Cao, W.; Li, Q.; Shen, H.; Liu, C.; Deng, J.; Xu, J.; Shao, Q. Evaluation of Prostate Cancer Antigen 3 for Detecting Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep* **2016**, 6 (1), 25776. <https://doi.org/10.1038/srep25776>.
 - (47) Μονάντερου, Ό. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ lncRNA GREIT4-1 ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ, Θεσσαλίας, Λάρισα, 2020. <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/bitstream/handle/11615/53804/21542.pdf?sequence=1>.
 - (48) Ασλάνογλου, Π.-Μ. Χαρακτηρισμός Του lncRNA GREAT6-1 Που Ρυθμίζεται Από Ογκοεπαγωγικούς Μεταγραφικούς Παράγοντες Στον Καρκίνο, Θεσσαλίας, Λάρισα, 2020. <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/bitstream/handle/11615/53802/21536.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
 - (49) Azizi, S. M.; Hashemi, M.; Falsafi, S.; Azizi, S. M.; Shirkoohi, R. Expression of Villin Associated with Epithelial to Mesenchymal Transition in Patients with Gastric Cancer Relating to Their Clinical and Morphological Specifications. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology* **2020**, 5 (1), 11–14. <https://doi.org/10.31557/apjcb.2020.5.1.11-14>.
 - (50) Zhang, L.; Xu, Y.; Cai, E.; Zheng, M.; Liu, L.; Wang, Q.; Li, S. TSPAN8 Regulates EGFR/AKT Pathway to Enhance Metastasis in Gastric Cancer. *Mol Biol Rep* **2023**, 50 (10), 7955–7965. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08662-4>.
 - (51) GeneCards. *TSPAN11 Gene - GeneCards | TSN11 Protein | TSN11 Antibody*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSPAN11> (accessed 2024-07-17).
 - (52) Liu, Z.-H.; Dai, X.-M.; Du, B. Hes1: A Key Role in Stemness, Metastasis and Multidrug Resistance. *Cancer Biol Ther* **2015**, 16 (3), 353–359. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1016662>.

- (53) GeneCards. *CASP10 Gene - GeneCards | CASPA Protein | CASPA Antibody*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CASP10> (accessed 2024-07-17).
- (54) Xie, M.; Li, K.; Li, J.; Lu, D.; Hu, B. Association and Diagnostic Value of Serum SPINK4 in Colorectal Cancer. *PeerJ* **2019**, *7*, e6679. <https://doi.org/10.7717/peerj.6679>.