

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΠΑΤΟΥΛΙΩΤΗ ΜΑΡΙΝΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2024

[1]

**Γενετική μηχανική σταθερά μετασχηματισμένων καρκινικών
κυτταρικών κλώνων μέσω Tet-επαγόμενης RNAi καταστολής
στον καρκίνο**

**Genetic engineering of stable transformed cell lines using
Tet-induced RNAi supression 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, με επιβλέποντα καθηγητή τον κύριο Γιακουντή Αντώνιο .

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Γιακουντής Αντώνιος:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2. Ψαρρά Άννα-Μαρία:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3. Κολοβός Πέτρος:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Βιολογίας Συστημάτων, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία είναι το αποτέλεσμα μια συλλογικής προσπάθειας στην οποία συνεισέφεραν πολλοί άνθρωποι. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, και πιο συγκεκριμένα το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, μαζί με όλους τους υπεύθυνους του μεταπτυχιακού προγράμματος « Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική – Διαγνωστικοί Βιοδείκτες» για την πολύτιμη μαθησιακή και ερευνητική εμπειρία που μου προσέφεραν. Ακόμη μεγαλύτερη ευγνωμοσύνη νιώθω για όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, που αποτέλεσε τον χώρο εκπόνησης της παρούσας εργασίας, και κυρίως για τον υπεύθυνο της διπλωματικής μου, τον κύριο Γιακουντή Αντώνιο. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κάνοντάς με μέλος του εργαστηρίου, για τις γνώσεις και τις συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος καθώς και για την κατανόηση που έδειξε σε δύσκολες στιγμές. Φυσικά, πολύ σημαντική ήταν και η συμβολή της κυρίας Άννας – Μαρίας Ψαρρά του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του κύριου Πέτρου Κολοβού του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, που συμμετείχαν στην Τριμελή Επιτροπή εξέτασης της Διπλωματικής μου, κάνοντας καίριες παρατηρήσεις. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μπεγγόλι Ελένη, διδακτορική φοιτήτρια του εργαστηρίου, που ήταν δίπλα μας και μας βοήθησε με την σημαντική εμπειρία της. Φυσικά, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στις συμφοιτήτριές μου, την Γούργου Μαρία και Χρυσάφη Νεφέλη, που συνέβαλαν στο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε στο εργαστήριο και ήταν τα άτομα με τα οποία μοιραζόμουν τα άγχη και τις ελπίδες, τις ευχάριστες και τις δυσάρεστες στιγμές, κάνοντας τις μέρες στο εργαστήριο να κυλάνε ακόμη πιο ευχάριστα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα άτομα του εργαστηρίου, την Λευκή, την Αντωνία, την Μαρία, την Βίκυ και τον Δημήτρη, που ήταν πάντα πρόθυμοι να προσφέρουν την βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του στομάχου είναι από τους πιο συχνούς και θνησιγόνους τύπους καρκίνου παγκοσμίως, με αποτέλεσμα να αποτελεί μείζον πρόβλημα για την δημόσια υγεία. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, όσον αφορά τους αιτιολογικούς παράγοντες και την συμπτωματολογία του. Λόγω της πολυπλοκότητάς του, μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στην ταξινόμηση των μορφών του, με αποτέλεσμα να διακρίνεται σε υποτύπους με βάση ιστολογικά, τοπολογικά και μοριακά κριτήρια. Η ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου με βάση μοριακά κριτήρια είναι πολύ σημαντική για την κλινική πράξη, καθώς συμβάλλει σε έγκαιρη διάγνωση, οδηγεί σε προληπτικά μέτρα και βοηθά στην ανάπτυξη πιο εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ο γαστρικός καρκίνος συνήθως συνοδεύεται από κακή πρόγνωση λόγω του εντοπισμού του σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, επομένως σημαντική είναι η ανάπτυξη μη επεμβατικών τεχνικών διάγνωσής του. Προς αυτήν την κατεύθυνση θα βοηθούσε η ανακάλυψη εξειδικευμένων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών που να μπορούν να συσχετιστούν με τον τύπο και το στάδιο της νόσου. Τον τελευταίο καιρό, η προσοχή έχει στραφεί στα Long Non-coding RNAs (LncRNAs), μια ετερογενή ομάδα μη κωδικοποιητικών μεταγράφων, που φαίνεται να επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την καρκινογένεση. Βέβαια, καίριο βήμα για την διαγνωστική αξιοποίησή τους είναι η προσεκτική μελέτη τους και η κατανόηση της δομής τους, του τρόπου ρύθμισης της έκφρασής τους και φυσικά της λειτουργίας τους. Στόχος της συγκεκριμένης Διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη ενός τέτοιου LncRNA, του RECUR1, το οποίο με βάση στοιχεία του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στον γαστρικό καρκίνο. Αρχικά, έγινε αποσιώπηση της έκφρασης του RECUR1 σε φυσιολογικές και καρκινικές γαστρικές κυτταρικές σειρές μέσω της τεχνολογίας της παρεμβολής RNA (RNAi), χρησιμοποιώντας λεντιικούς φορείς. Ακολούθησαν μοριακή μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης του στην έκφραση πιθανών γονιδίων- στόχων που συμμετέχουν σε κυτταρικές διαδικασίες καθώς και φαινοτυπικές μελέτες για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον ρόλο του RECUR1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετάσταση. Επιπλέον, σε μία προσπάθεια περεταίρω κατανόησης του τρόπου λειτουργίας του, μελετήθηκε με RNAi και παρόμοια φαινοτυπικά πειράματα και ο ρόλος του κωδικοποιητικού μεταγράφου CPR, που φαίνεται να ρυθμίζεται από το RECUR1, ενώ εξιχνιάστηκε και η πιθανότητα να έχει και αυτό κάποιον ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης του ίδιου του LncRNA. Με RNAi πειράματα ελέγχθηκε και ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα KLF5, που επίσης σχετίζεται με τον γαστρικό καρκίνο, στην έκφραση του RECUR1. Τέλος, έγινε προσπάθεια κατασκευής σταθερά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών που να μην παράγουν το γονίδιο CPR, μέσω της χρήσης επαγόμενου συστήματος σίγησης TetR, προκειμένου να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα μελλοντικά.

Λέξεις – κλειδιά: καρκίνος του στομάχου, LncRNAs, RECUR, παρεμβολή RNA (RNAi), φαινοτυπικά αποτελέσματα, σύστημα επαγόμενης σίγησης TetR

ABSTRACT

Gastric cancer is one of the most frequent and deadly types of cancer globally. Even though its frequency rates are constantly decreasing, gastric cancer is still an important threat for public health. It is thought to be highly heterogeneous when it comes to its causes, which can be divided into intrinsic and extrinsic, and its symptoms. Due to the complexity of the disease, it is of high importance to be classified into distinct subtypes, according to histological, topological and molecular criteria. In particular, molecular classification of gastric cancer is very important for medicine, as it can provide early diagnosis, lead to the adoption of precatative techniques and help towards the development of individualized therapeutic plans. As gastric cancer usually comes with a bad diagnosis due to its late diagnosis, new, non-invasive diagnostic techniques are more than needed. Aiming towards that, researchers try to discover new biomarkers to be used for the characterization of the subtype and importance of gastric cancer. Long Non-coding RNAs (LncRNAs) are an heterogeneous class of RNAs that even though not transcribed in proteins, they are associated with cancer development and could be used as diagnostic biomarkers. Of course, before they are used in medical applications, their structure, mechanism of transcription and functions should be carefully studied. The aim of this thesis is to study the role of RECUR1, an LncRNA that seems to participate in many steps of gastric carcinogenesis. Initially, using RNA-interference techniques and lentiviruses, RECUR1 was suppressed in both normal and carcinogenic cells. After the suppression, molecular techniques like qPCR and phenotypic assays were conducted in order the effect of RECUR1 loss in the expression of potential target-genes that take part in important cell functions like cell proliferation and metastasis to be discovered. Moreover, the same techniques were used for the suppression of CPR, an mRNA that seems to be a target of RECUR1 and maybe even regulates LncRNA's expression, and KLF5, a transcription factor with a variety of target genes, possibly including RECUR1 too, and important oncogenic properties. Finally, the Tetracycline induced suppression system (TetR) was used in an attempt to produce a stable transformed cell line with a suppressed CPR, as it would be a valuable tool for future experiments.

Key words: gastric cancer, LncRNAs, RECUR1, RNA interference (RNAi), phenotypic assays, Tetracycline induced suppression system (TetR)

Περιεχόμενα

Πίνακας Περιεχομένων Εικόνων	9
Πίνακας Περιεχομένων Πινάκων	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1.Καρκίνος του στομάχου.....	12
1.1.1. Επιδημιολογία του καρκίνου του στομάχου.....	12
1.1.2. Αιτιολογικοί παράγοντες	13
1.1.3. Ταξινόμηση περιστατικών καρκίνου του στομάχου.....	17
1.1.4.Διάγνωση και θεραπεία	21
1.2. Μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs)	26
1.2.1. Ιδιότητες των lncRNAs.....	26
1.2.2. Ταξινόμηση των lncRNAs	27
1.2.3.lncRNAs και καρκίνος	30
2. ΣΚΟΠΟΣ	32
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1. Υλικά	33
3.1.1. Αλληλουχίες	33
3.1.2. Πλασμιδιακοί φορείς.....	33
3.1.3. Βακτηριακά στελέχη	35
3.1.4. Κυτταρικές σειρές	35
3.2. Μέθοδοι	36
3.2.1. Διερεύνηση της έκφρασης διαφόρων lncRNA και γονιδίων στόχων τους σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου	36
3.2.1.1. Σύνθεση cDNA.....	36
3.2.1.2. Ποσοτική PCR (qPCR)	36
3.2.2. Μέθοδοι για την δημιουργία παροδικά γενετικά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών με διαμόλυνση με λεντιπούς	37
3.2.2.1. Απομόνωση RNA	37
3.2.2.2. Κατεργασία με DNAase	37
3.2.2.3. Σύνθεση cDNA.....	38
3.2.2.4. Ποσοτική PCR (qPCR)	38
3.2.2.5. Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (CFA).....	38
3.2.2.6. Δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound healing)	38
3.2.3. Μέθοδοι για την δημιουργία σταθερά γενετικά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών με διαμόλυνση με το pTER.....	39
3.2.3.1. Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων	39
3.2.3.2. Αντίδραση λιγάσης	39
3.2.3.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών.....	39
3.2.3.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	40

3.2.3.5. Αντίδραση πέψης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	40
3.2.3.6. Απομόνωση καθαρού πλασμιδιακού DNA από ανακαλλιέργεια (midi prep).	41
3.2.3.7. Γραμμοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων	41
3.2.3.8. Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με φαινόλη/χλωροφόρμιο	42
3.2.3.9. Γενετική τροποποίηση κυτταρικών σειρών.....	43
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1. Διερεύνηση της έκφρασης του RECUR1 και γονιδίων στόχων του σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου	45
4.2. Αποτελέσματα παροδικής γενετικής τροποποίησης των κυτταρικών σειρών με τα pSicoR/shRECUR1, pSicoR/shKLF5 και pSicoR/sh2CPR μέσω λεντιών	46
4.2.1. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης των στοχευμένων γονιδίων στις τροποποιημένες με λεντιούς κυτταρικές σειρές	46
4.2.2. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες ...	47
4.2.3. Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (CFA)	49
4.2.4. Δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών (WH)	51
.....	52
4.3. Αποτελέσματα σταθερά τροποποιημένης κυτταρικής σειράς AGS με pTER/sh2CPR και pTER/sh1CPR.....	54
4.3.1. Έλεγχος ανασυνδυασμού του απομονωμένου pTER/sh2CPR	54
4.3.2. Έλεγχος γραμμοποίησης του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA	54
4.3.3. Γενετική τροποποίηση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	55
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

Πίνακας Περιεχομένων Εικόνων

Εικόνα 1, «Στατιστικά στοιχεία εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου κανονικοποιημένα με βάση την ηλικία, ανά περιοχή, το 2022. Με μπλε απεικονίζονται τα ποσοστά που αφορούν το ανδρικό φύλο, ενώ με ροζ αυτά που αφορούν το γυναικείο φύλο».....	13
Εικόνα 2, «Συνοπτική παρουσίαση των βασικών αιτιολογικών παραγόντων του γαστρικού καρκίνου».....	16
Εικόνα 3, «Απεικόνιση του κεντρικού και απομακρυσμένου γαστρικού καρκίνου και ποσοστά της γεωγραφικής του κατανομής».....	18
Εικόνα 4, «Οι μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του στομάχου και τα βασικά χαρακτηριστικά τους».....	18
Εικόνα 5, «Κατηγορίες χρωμοσωμικής αστάθειας στον γαστρικό καρκίνο».....	20
Εικόνα 6, «Υγειονομικό κόστος περίθαλψης του καρκίνου του στομάχου ανάλογα με το στάδιο διάγνωσης. Το συνολικό κόστος περίθαλψης (μπλε σκούρα μπάρα) αυξάνεται σταδιακά από το στάδιο I μέχρι το στάδιο IV, ενώ το κόστος αρχικής θεραπείας και το κόστος περίθαλψης μετά την αρχική θεραπεία (γαλάζια και μωβ μπάρα αντίστοιχα) είναι τα μικρότερα στο στάδιο I».....	22
Εικόνα 7, «Κλινική εφαρμογή της υγρής βιοψίας και αξιοποίηση των βιοδεικτών που αυτή παρέχει για την διάγνωση του γαστρικού καρκίνου».....	24
Εικόνα 8, «Η θέση των γονιδίων που κωδικοποιούν lncRNAs στο γονιδίωμα. Το E αντιπροσωπεύει τα εξώνια ενώ το I τα ιντρόνια».....	28
Εικόνα 9, «Τα lncRNAs μπορούν να δράσουν <i>in cis</i> (A), <i>in trans</i> μέσα στον πυρήνα (B), αλλά και <i>in trans</i> αφού εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα (C)».....	29
Εικόνα 10, «Οι 4 μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNAs».....	30
Εικόνα 11, «LncRNAs που συμμετέχουν στις κυτταρικές διαδικασίες – ορόσημα του γαστρικού καρκίνου. Με πράσινο αναγράφονται τα lncRNAs που δρουν ως ογκογονίδια, ενώ με κόκκινο αυτά που δρουν ογκοκατασταλτικά».....	31
Εικόνα 12, «Η κλασική δομή ενός shRNA».....	33
Εικόνα 13, «Χάρτης του φορέα pTER που απεικονίζει τα σημαντικά λειτουργικά στοιχεία του και τις θέσεις κοπής των ενζύμων BglII, HindIII, EcoRI, Scal και BsaI».....	34
Εικόνα 14, «Χάρτης του φορέα pSicoR PGK puro που απεικονίζει τα βασικά λειτουργικά στοιχεία του και ενδεικτικές θέσεις κοπής σημαντικών περιοριστικών ενζύμων».....	34
Εικόνα 15α, «Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίου RECUR1(αριστερά) και CPR (δεξιά), κανονικοποιημένα με τον μέσο όρο έκφρασης των ιδιοσυστατών γονιδίων GAPDH, RPLP1 και Actin».....	45
Εικόνα 15β, «Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Tspan8, κανονικοποιημένα με τον μέσο όρο έκφρασης των ιδιοσυστατών γονιδίων GAPDH, RPLP1 και Actin».....	45
Εικόνα 16, «Αριστερά απεικονίζεται το διάγραμμα έκφρασης του RECUR1 κανονικοποιημένο ενδεικτικά με το GAPDH, ενώ δεξιά απεικονίζονται οι μέσες τιμές της έκφρασης του RECUR1 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με τις τιμές έκφρασης του shSCR και μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους».....	46
Εικόνα 17, «Αριστερά απεικονίζεται το διάγραμμα έκφρασης του KLF5 κανονικοποιημένο ενδεικτικά με το GAPDH, ενώ δεξιά απεικονίζονται οι μέσες τιμές της έκφρασης του KLF5 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με τις τιμές έκφρασης του shSCR και μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους».....	47
Εικόνα 18, «Αριστερά απεικονίζεται το διάγραμμα έκφρασης του CPR κανονικοποιημένο ενδεικτικά με το GAPDH, ενώ δεξιά απεικονίζονται οι μέσες τιμές της έκφρασης του CPR με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με τις τιμές έκφρασης του shSCR και μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους».....	47

Εικόνα 19, «Οι μέσες τιμές έκφρασης των γονιδίων – στόχων του RECUR1 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με την έκφρασή του shSCR, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους, στα AGS κύτταρα (αριστερά) και στα MKN45 κύτταρα (δεξιά)».....	48
Εικόνα 20, «Οι μέσες τιμές έκφρασης των γονιδίων – στόχων του CPR με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με την έκφρασή του shSCR, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους, στα GES1 κύτταρα (αριστερά) και στα AGS κύτταρα(δεξιά)».....	48
Εικόνα 21, «Οι μέσες τιμές έκφρασης των KLF5 και RECUR1 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με την έκφρασή του shSCR, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους, στα AGS κύτταρα»...	49
Εικόνα 22, «Φωτογραφίες κατόπιν δοκιμασίας CFA σε GES1, AGS και MKN45 κύτταρα πριν (shSCR) και μετά την σίγηση του RECUR1 (shRECUR1)».....	50
Εικόνα 23, «Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας CFA για εύρεση του μεγέθους (αριστερά) καθώς και του αριθμού των αποικιών πριν (shSCR) και μετά (shRECUR1) την σίγηση του RECUR1 με την χρήση του προγράμματος ImageJ».....	50
Εικόνα 24, «Φωτογραφίες κατόπιν δοκιμασίας CFA σε GES1, AGS και MKN45 κύτταρα πριν (shSCR) και μετά την σίγηση του CPR (sh2CPR)».....	51
Εικόνα 25, «Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας CFA για εύρεση του μεγέθους (αριστερά) καθώς και του αριθμού των αποικιών πριν (shSCR) και μετά (sh2CPR) την σίγηση του CPR με την χρήση του προγράμματος ImageJ».....	51
Εικόνα 26, «Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο κατόπιν δοκιμασίας Wound healing σε AGS και MKN45 κύτταρα πριν (shSCR) και μετά (shRECUR1) την αποσιώπηση του γονιδίου RECUR1».....	52
Εικόνα 27, «Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του Wound healing για την ποσοτικοποίηση του μεταστατικού δυναμικού των AGS (αριστερά) και MKN45 κυττάρων πριν (shSCR) και μετά (shRECUR1) την αποσιώπηση του RECUR1».....	52
Εικόνα 28, «Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο κατόπιν δοκιμασίας Wound healing σε GES1 και AGS κύτταρα πριν (shSCR) και μετά (sh2CPR) την αποσιώπηση του γονιδίου CPR».....	53
Εικόνα 29, «Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του Wound healing για την ποσοτικοποίηση του μεταστατικού δυναμικού των GES1 (αριστερά) και AGS κυττάρων πριν (shSCR) και μετά (sh2CPR) την αποσιώπηση του CPR».....	53
Εικόνα 30, «Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από τις 3 αντιδράσεις πέψης του pTER/sh2CPR. Η σειρά φόρτωσης από αριστερά προς τα δεξιά είναι: ladder, αρνητικός μάρτυρας (self-ligated pTER, θετικός μάρτυρας (pTER με άλλο διαγονίδιο), 3 βιολογικές επαναλήψεις της αντίδρασης πέψης με EcoRI».....	54
Εικόνα 31, «Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πρώτη (αριστερά) και την δεύτερη (δεξιά) προσπάθεια γραμμοποίησης του pTER/sh2CPR. Οι ζώνες δεν αντιστοιχούν σε ευθυγραμμισμένο τμήμα DNA. Στην αριστερή εικόνα στο πρώτο πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκε ο ladder, ενώ τα υπόλοιπα 3 πηγαδάκια αντιστοιχούν στις 3 αντιδράσεις πέψης με τις οποίες έγινε η γραμμοποίηση. Στην δεξιά εικόνα πάλι στο πρώτο πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκε ο ladder, ενώ το πηγαδάκι που αντιστοιχεί στον pTER/sh2CPR είναι αυτό με την κόκκινη ένδειξη».....	55
Εικόνα 32, «Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την προσπάθεια γραμμοποίησης του pTER/sh1CPR. Οι ζώνες αντιστοιχούν σε ευθυγραμμισμένο τμήμα DNA. Στο πρώτο πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκε ο ladder, ενώ τα πηγαδάκια που αντιστοιχούν στις 3 πέψεις με τις οποίες έγινε η γραμμοποίηση του pTER/sh1CPR είναι αυτά με την κόκκινη ένδειξη».....	55
Εικόνα 33, «Οι ρυθμιστικές σχέσεις του συστήματος έκφρασης των γονιδίων RECUR1, CPR και KLF5»...57	

Πίνακας Περιεχομένων Πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1, «ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥΣ ΣΤΟΙΧΕΙΑ. ΠΗΓΗ: CELLOSAURUS - CELL LINE ENCYCLOPEDIA».....	35
ΠΙΝΑΚΑΣ 2, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA».....	36
ΠΙΝΑΚΑΣ 3, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΔΕΥΤΕΡΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA».....	36
ΠΙΝΑΚΑΣ 4, «ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΩΝ 45 ΚΥΚΛΩΝ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ PCR ΚΑΙ ΟΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΟΥΣ».....	38
ΠΙΝΑΚΑΣ 5, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΜΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR».....	38
ΠΙΝΑΚΑΣ 6, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΕ DNAASE».....	39
ΠΙΝΑΚΑΣ 7, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ».....	40
ΠΙΝΑΚΑΣ 8, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ».....	40
ΠΙΝΑΚΑΣ 9, «Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ HOMEMADE ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA».....	41
ΠΙΝΑΚΑΣ 10, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΕΨΗΣ».....	42
ΠΙΝΑΚΑΣ 11, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1,5%».....	42
ΠΙΝΑΚΑΣ 12, « Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ. ΜΕ ΜΠΛΕ ΧΡΩΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ pTER/SH2CPR (Α ΚΑΙ Β), ΕΝΩ ΜΕ ΡΟΖ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ pTER/SH1CPR».....	43
ΠΙΝΑΚΑΣ 13, «Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ. ΜΕ ΜΠΛΕ ΧΡΩΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΤΟΥ pTER/SH2CPR(Α ΚΑΙ Β), ΕΝΩ ΜΕ ΡΟΖ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΤΟΥ pTER/SH1CPR».....	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Καρκίνος του στομάχου

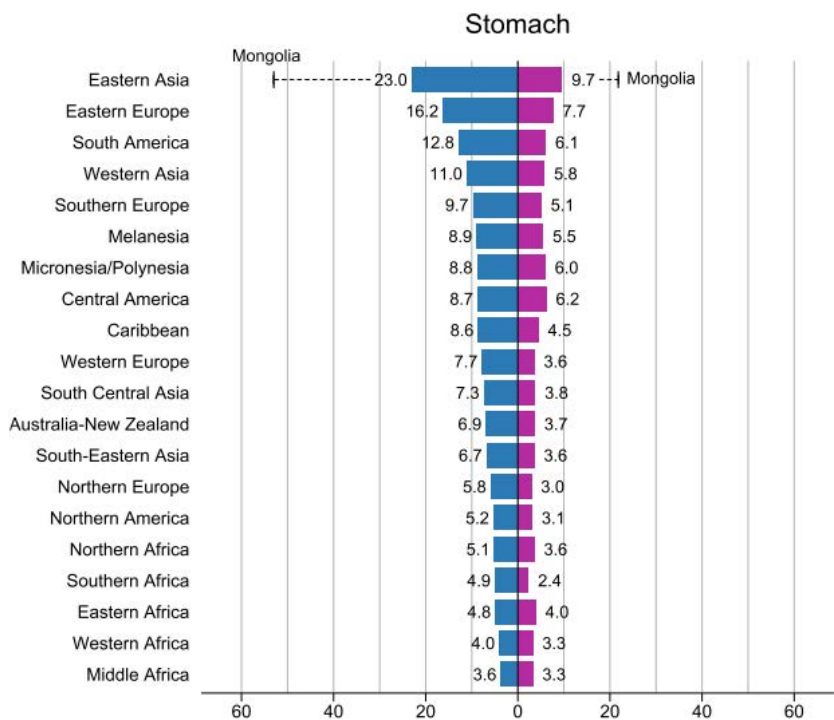
Ο γαστρικός καρκίνος αφορά μια πολυδιάστατη, επιθετική και εξαιρετικά ετερογενή μορφή καρκίνου(L. Yang et al., 2020), αφού παρουσιάζει ποικίλα μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά τόσο ανάμεσα σε διαφορετικά κύτταρα του ίδιου όγκου, όσο και μεταξύ διαφορετικών ασθενών(López et al., 2023). Βέβαια, είναι από τους καρκίνους που επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από συμπεριφορικές συνήθειες, επομένως η μελέτη του είναι σημαντική καθώς η εμφάνισή του μπορεί εύκολα να αποφευχθεί(Rawla & Barsouk, 2019).

1.1.1. Επιδημιολογία του καρκίνου του στομάχου

Ο γαστρικός καρκίνος θεωρείται ο 5^{ος} πιο συχνός τύπος της νόσου στον κόσμο, ενώ ανέρχεται στην 4η θέση όσον αφορά στην θνησιμότητα(Muzaheed, 2020). Παρουσιάζει διακυμάνσεις στην συχνότητα εμφάνισης ανά γεωγραφική περιοχή, με τα περισσότερα κρούσματα να καταγράφονται στην Κεντρική και Βόρεια Αμερική, στην Ανατολική Ευρώπη και στην Ανατολική Ασία(Muzaheed, 2020), ενώ ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά να χαρακτηρίζουν την Αφρική(Morgan et al., 2022). Μάλιστα, το 60% των νέων περιστατικών εμφανίζονται μόνο στην Ανατολική Ασία(Sekiguchi et al., 2022)! Επίσης, εμφανίζεται σχεδόν με διπλάσια συχνότητα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες(Muzaheed, 2020) (**Εικόνα 1**), ενώ το 80% των περιπτώσεων αφορά ανθρώπους άνω των 50 ετών (Akbari et al., 2022). Το 8-30% των ασθενών έχουν κάποιον συγγενή πρώτου βαθμού που επίσης έπασχε από γαστρικό καρκίνο(Bernini et al., 2006). Όσον αφορά στην θνησιμότητα, ένας στους 12 θανάτους από καρκίνο αποδίδεται στον καρκίνο του στομάχου(Rawla & Barsouk, 2019). Και εδώ παρατηρούνται γεωγραφικές διακυμάνσεις, με τα υψηλότερα ποσοστά θανάτου να καταγράφονται στην ανατολική Ασία, ως επακόλουθο και της υψηλής συχνότητας εμφάνισης, και τα χαμηλότερα στην Αφρική. Παρόμοιες διαφορές στους θανάτους από γαστρικό καρκίνο, αν και μικρότερες, παρατηρούνται γενικότερα ανάμεσα στις αναπτυσσόμενες και τις αναπτυγμένες χώρες, λόγω και των διαφορών στην ιατροφαρμακευτική περίθαλψη(Ilic & Ilic, 2022).

Παρά το γεγονός ότι ο καρκίνος του στομάχου ακολουθεί πτωτική πορεία, αφού λιγότερο από έναν αιώνα πριν ήταν ο 1^{ος} πιο συχνός και ο 2^{ος} πιο θνησιγόνος και ενώ η συχνότητά του έχει μειωθεί κατά 4,3% την τελευταία εικοσαετία(J. Wen & Shen, 2023), αποτελεί μείζον πρόβλημα για την δημόσια υγεία(Rawla & Barsouk, 2019). Αρχικά, ο απόλυτος αριθμός κρουσμάτων πληθαίνει λόγω της αύξησης του ανθρώπινου πληθυσμού(Etemadi et al., 2020), καθώς και της διάρκειας ζωής(Arnold, Park, et al., 2020). Ενώ το 2020 ασθενούσαν από γαστρικό καρκίνο 1,09 εκατομμύρια άνθρωποι, ο αριθμός αναμένεται να αυξηθεί σε 1,77 εκατομμύρια το 2040(Morgan et al., 2022). Επιπλέον, η διάγνωσή του δεν συνδέεται με αισιόδοξη πρόγνωση, αφού μόνο το 20-40% των ασθενών καταφέρνουν να επιβιώσουν για πάνω από 5 χρόνια, με μια μικρή αύξηση στην Ανατολική Ασία, όπου λόγω μεγάλης συχνότητας γίνεται ενδελεχής προληπτική διάγνωση που επιτρέπει την ανίχνευση της νόσου σε πρώιμα στάδια(Allemani et al., 2018). Ακόμη, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα τελευταία χρόνια ο καρκίνος το στομάχου παρά την μείωση στις μεγάλες ηλικίες, εμφανίζει αυξητικές τάσεις σε μικρές ηλικίες (κάτω των 55 ετών), γεγονός πιο έντονο στις αναπτυγμένες χώρες(dí Martino et al., 2022). Το 2019 ήταν ο 5^{ος} πιο συχνός καρκίνος στους εφήβους και σε νεαρούς ενήλικες παγκοσμίως(Y. F. Wen et al., 2021). Πιο αναλυτικά, αυτές οι αυξητικές τάσεις αφορούν κυρίως το απομακρυσμένο αδενοκαρκίνωμα, γεγονός που οφείλεται ίσως και στον σύγχρονο τρόπο ζωής(Z. Wang et al., 2021), ενώ η πρόγνωση είναι χειρότερη για τους νεαρούς ασθενείς, λόγω καθυστερημένης διάγνωσης(Cormedi et al., 2018) και αυξημένης επιθετικότητας(Z. Wang et al., 2016). Αδιάσειστα είναι και τα στοιχεία για αύξηση του γαστρικού καρκίνου σε Καυκάσιες γυναίκες κάτω των 50 ετών(Z. Wang et al., 2021). Βέβαια, αυτή η αύξηση στην συχνότητα, δεν συνδυάζεται με την συνήθως παρατηρούμενη ανάλογη αύξηση στην θνησιμότητα, τουλάχιστον στις αναπτυγμένες χώρες, λόγω των εκσυγχρονισμένων θεραπευτικών

προσεγγίσεων(Morgan et al., 2022). Να σημειωθεί επίσης ότι ο γαστρικός καρκίνος που ξεκινάει από νεαρή ηλικία συχνά σχετίζεται με δυσβίωση του στομαχικού μικροβιώματος και αυτοάνοσες γαστρίτιδες, ενώ αντιμετωπίζεται γενετικά και κλινικά ως ξεχωριστός τύπος, αφού έχει τα δικά του χαρακτηριστικά γνωρίσματα(Mauri et al., 2019). Είναι διάχυτος, με μεγάλο μεταστατικό δυναμικό, πολύ επιθετικός και με κακή πρόγνωση(Strong et al., 2017).



Εικόνα 1: Στατιστικά στοιχεία εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου κανονικοποιημένα με βάση την ηλικία, ανά περιοχή, το 2022. Με μπλε απεικονίζονται τα ποσοστά που αφορούν το ανδρικό φύλο, ενώ με ροζ αυτά που αφορούν το γυναικείο(Bray et al., 2024).

1.1.2. Αιτιολογικοί παράγοντες

Η παθογένεση του καρκίνου του στομάχου είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και χρονοβόρα και μπορεί να αποδοθεί σε πληθώρα αιτιολογικών παραγόντων(Grad et al., 2023) **(Εικόνα 2):**

Α) Ενδογενείς παράγοντες:

Γενετικοί παράγοντες: Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου, αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισής του έως και 10%(Muzaheed, 2020). Έχουν εντοπιστεί γενετικοί πολυμορφισμοί, όπως οι IL-10T-819C, IL-8-251, IL-18RAP917997 που αφορούν γονίδια που κωδικοποιούν ιντερλευκίνες, αλλά και μεταλλάξεις στα γονίδια TP53, KRAS, SMAD4 οι οποίες κληρονομούνται από γενιά σε γενιά αυξάνοντας την προδιάθεση των φορέων τους για καρκίνο του στομάχου(Negovan et al., 2019). Πέρα από πολυμορφισμούς, υπάρχουν και κάποια κληρονομικά σύνδρομα που σχετίζονται με τον γαστρικό καρκίνο(Alagesan et al., 2023). Ενδεικτικά, τέτοια είναι ο κληρονομικός διάχυτος γαστρικός καρκίνος (HDGC), ο οποίος οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο CDH1 ή στο CTNNA1, που αμφότερα κωδικοποιούν την E- καδερίνη (Fitzgerald et al., 2010),το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα με πολύποδες στο εγγύς στομάχι (GAPPS), το οποίο είναι ένα αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο και χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου APC (Garcia-Pelaez et al., 2022), το σύνδρομο Lynch, το οποίο είναι ιδιαίτερα συχνό και σχετίζεται με μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2, MSH6 και EPCAM, που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση λαθών κατά την αντιγραφή του DNA, το σύνδρομο Peutz-Jeughers (PJS), με μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο LKB1 και το σύνδρομο Li-Fraumeni, με αυτοσωμικές επικρατείς αλλά και *de novo* μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53(Alagesan et al., 2023). Τέλος, ακόμη και η ύπαρξη γαστρικού καρκίνου στις προηγούμενες γενιές απουσία συγκεκριμένου

πολυμορφισμού ή συνδρόμου, θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου (Alagesan et al., 2023). Για τον καρκίνο του στομάχου ευθύνονται επίσης χρωμοσωμικές αριθμητικές μεταλλάξεις, που ενεργοποιούν ογκογονίδια και απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικούς παράγοντες, όπως γονίδια που συμμετέχουν στο RTK/RAS/MAPK μονοπάτι (πχ HER2) (C. Chen et al., 2019), καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση γονιδίων, για παράδειγμα των CDH1, p16, hMLH1 (Nakamura et al., 2014). Τέλος, η κακοήθης αναιμία, αποτέλεσμα της γαστρικής ατροφίας, αυξάνει τις πιθανότητες του γαστρικού καρκίνου μέχρι και 6% σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, ενώ μια συσχέτιση υπάρχει και με την ομάδα αίματος A (Rawla & Barsouk, 2019).

Προϋπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις: Η χρόνια γαστρική ατροφία, η ατροφία του γαστρικού βλεννογόνου, η εντερική μεταπλασία, οι χρόνιες λοιμώξεις (Goldenring & Nomura, 2006), η υπερτροφία του γαστρικού βλεννογόνου (Menetrier disease) (Musumba et al., 2012), η διατάραξη της ισορροπίας του γαστρικού μικροβιώματος μετά από εγχείρηση αφαίρεσης τμήματος του στομάχου, οι πολύποδες (Sharaf et al., 2013) και η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (GERD) (Solaymani-Dodaran et al., 2004) καθιστούν τους ασθενείς άτομα υψηλού κινδύνου για εμφάνιση γαστρικού καρκίνου (Grad et al., 2023).

B) Εξωγενείς παράγοντες:

Περιβαλλοντικοί παράγοντες: Η ακτινοβολία, οι τοξίνες, το κάπνισμα, οι διατροφικές συνήθειες, τα επίπεδα σωματικής άσκησης, η κατανάλωση αλκοόλ, τα μέτρα προσωπικής υγιεινής, η οικονομική κατάσταση και το μορφωτικό επίπεδο είναι επιγραμμικά κάποιοι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση καρκίνου του στομάχου, κυρίως του κεντρικού τύπου (Assaad et al., 2018a).

Όσον αφορά στο κάπνισμα, αυτό αυξάνει την συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου κυρίως στα πιο απομακρυσμένα τμήματα του στομάχου (Butt et al., 2019), με τους άνδρες να είναι πιο επιρρεπείς από τις γυναίκες (Sasazuki et al., 2002). Οι ογκογόνες δράσεις του οφείλονται στα συστατικά του τσιγάρου, όπως το νιτρώδες άζωτο και η νικοτίνη, που ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια ERK και VEGF διευκολύνοντας την μετάσταση (Shin et al., 2023). Μάλιστα, το κάπνισμα έχει μια ποσοτική αιτιολογική σχέση με τον γαστρικό καρκίνο, καθώς μεγαλύτερος αριθμός τσιγάρων και διάρκεια καπνίσματος συνδέεται με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισής του (Sasazuki et al., 2002). Βέβαια, το κάπνισμα πολλές φορές έχει ογκογόνο ρόλο δρώντας συνεργιστικά και με άλλους παράγοντες, όπως την μόλυνση από το βακτήριο *H. pylori* (Alagesan et al., 2023).

Σχετικά με την διατροφή, το υπερβολικό αλάτι, οι πίκλες (Ren et al., 2012), το κόκκινο κρέας και τα αλλαντικά (S. R. Kim et al., 2019) φαίνεται να προωθούν την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου, οδηγώντας σε ατροφική γαστρίτιδα, ενώ τα φρούτα (Bertuccio et al., 2019), τα λαχανικά (Ferro et al., 2020), το λευκό κρέας, το ασβέστιο (Shah et al., 2020), οι βιταμίνες C και D και γενικότερα η Μεσογειακή διατροφή (Assaad et al., 2018b) έχουν προστατευτικό ρόλο (Kwak & Paik, 2020).

Πιο ειδικά, η υπερβολική κατανάλωση αλατιού συμβάλλει στην αντικατάσταση των αδενικών γαστρικών βλεννογόνων κυττάρων από επιφανειακά γαστρικά βλεννογόνα κύτταρα, με αποτέλεσμα τα πρώτα να μην μπορούν πλέον μέσω των γλυκανών τους να εμποδίσουν την βιοσύνθεση των γλυκολιπιδίων του κυτταρικού τοιχώματος του *H. pylori*, που όπως αναφέρεται και παρακάτω, είναι ογκογόνος παράγοντας (Kato et al., 2006). Επιπλέον, υψηλές δόσεις αλατιού καταστρέφουν το προστατευτικό βλεννογόνο του στομάχου, οδηγώντας σε ωσμωτική πίεση, που με την σειρά της καταστρέφει το γαστρικό επιθήλιο (Ilic & Ilic, 2022). Έτσι, δίαιτα πλούσια σε κατανάλωση άλατος αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης γαστρικού καρκίνου (Kato et al., 2006).

Η παχυσαρκία (BMI > 30), οδηγεί μέσω της συσσώρευσης πάχους σε γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (Akbari et al., 2022), επομένως αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα κινδύνου για γαστρικό

καρκίνο, του κεντρικού τύπου(Avgerinos et al., 2019). Βέβαια, παρόμοια δράση έχει και το BMI<18,5(Jang et al., 2022).

Μάλιστα, οι καθημερινές συνήθειες ευθύνονται και για τις διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης και πιθανότητα επιβίωσης από τον γαστρικό καρκίνο ανάμεσα σε διαφορετικές εθνικότητες και κοινωνικά στρώματα, καθώς και ανάμεσα στα δύο φύλα(Alagesan et al., 2023). Βέβαια, η διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα, ειδικά σε νεαρές ηλικίες, μπορεί να ερμηνευτεί και με βάση τις ενδογενείς ορμόνες(S. Wang et al., 2022). Μία υπόθεση είναι ότι το οιστρογόνο δρα προστατευτικά, γι' αυτό κιόλας γυναίκες που καθυστερούν να μπουν στην εμμηνόπαυση εμφανίζουν μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου(Lagergren et al., 2014), ενώ μια άλλη υπόθεση είναι ότι τα ανδρογόνα προωθούν την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου(Davis et al., 2014).

Γ) Βιολογικοί παράγοντες: Ιοί, βακτήρια αλλά και διάφορα παράσιτα, όπως τα σχιστοσώματα, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την καρκινογένεση (H. van Tong et al., 2017).

Πιο συγκεκριμένα, ο γαστρικός καρκίνος επηρεάζεται και από το στομαχικό μικροβίωμα, με την πιθανότητα εμφάνισής του να αυξάνει η μόλυνση με *H. pylori*, *Propionibacterium acnes*, και *Prevotella copri*, ενώ το *Lactococcus lactis* φαίνεται να έχει έναν πιο προστατευτικό ρόλο(Gunathilake et al., 2019).

Πιο αναλυτικά, το *H.pylori*, ή ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού στα ελληνικά, είναι ένα Gram (-) βακτήριο σπειροειδούς σχήματος που μολύνει το γαστρικό επιθήλιο σε πάνω από το 50% του παγκόσμιου πληθυσμού(Alagesan et al., 2023). Το 1994 χαρακτηρίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως καρκινογόνο τάξης Ι(Hooi et al., 2017) , αφού ευθύνεται για μέχρι και το 75% του συνολικού αριθμού των γαστρικών καρκίνων, και συγκεκριμένα αυτών του απομακρυσμένου τύπου(Mentis et al., 2019). Γι' αυτό άλλωστε πολλοί έχουν χαρακτηρίσει τον καρκίνο του στομάχου ως καρκίνο επαγόμενο από λοίμωξη(Muzaheed, 2020).

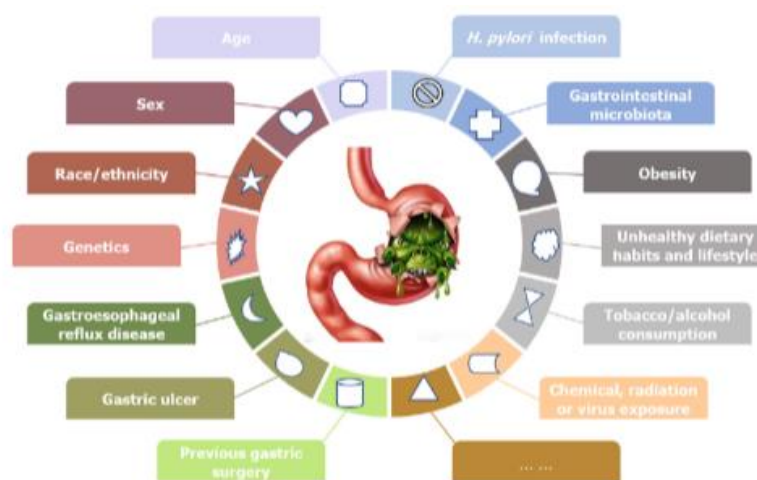
Συνήθως, η μόλυνση με το *H.pylori* γίνεται στην παιδική ηλικία και ο πιο συχνός τρόπος μετάδοσης είναι από άτομο σε άτομο, μέσω μολυσμένων σιέλων και κοπράνων, ή μέσω επαφής με μολυσμένο φαγητό και νερό(López et al., 2023). Αρχικά, προκαλεί μόνο φλεγμονή των ιστών και χρόνια γαστρίτιδα(Alagesan et al., 2023). Ωστόσο, αν το βακτήριο δεν αντιμετωπιστεί, μέσα σε μια χρονική περίοδο 15-20 ετών(Hooi et al., 2017), χάρη στην επαγωγή ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών, η μη καρκινική παθολογική κατάσταση μπορεί να εξελιχθεί σε πολυεστιακή ατροφική γαστρίτιδα, σε εντερική μεταπλασία, σε δυσπλασία (λόγω αλλαγής του pH)(Ansari & Yamaoka, 2017), και τέλος σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα(Watari et al., 2014). Αυτή η αλληλουχία των παθολογικών καταστάσεων ονομάζεται και «Καταρράκτης Correa».Η αρχική γαστρική ατροφία οφείλεται στο ότι το *Helicobacter pylori* προκαλεί μια μετανάστευση των ουδετερόφιλων κυττάρων στο γαστρικό βλεννογόνο, όπου επάγουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και οδηγούν σε βλάβες στο DNA και τελικά σε απόπτωση(Grad et al., 2023). Επιπλέον, το *H.pylori* προκαλεί και διάφορες γενετικές αλλαγές στα γαστρικά κύτταρα, προκαλώντας τους γενετική αστάθεια(Graham, 2015). Βέβαια, μόνο το 2-5% των προσβεβλημένων ατόμων εμφανίζουν γαστρικό καρκίνο (Grad et al., 2023). Η επιθετικότητα της μόλυνσης και επομένως και η τελική της έκβαση εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως από το γονιδίωμα του ξενιστή (σημαντική η δράση αποπτωτικών γονιδίων όπως τα Bac και Bcl2(Shadifar et al., 2015) , καθώς και η ύπαρξη των πολυμορφισμών IL-10 και IL-17 (Cisło et al., 2018)) και από την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού, αφού φαίνεται ότι ιστορικό μόλυνσης στην οικογένεια αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου στους απογόνους κατά 5 φορές(Khoder et al., 2019). Επίσης εξαρτάται και από το περιβάλλον, εφ' όσον διατροφή χαμηλή σε αλάτι και πλούσια σε φρέσκα λαχανικά και φρούτα, ταυτόχρονα με καλή συντήρηση των τροφών λειτουργούν προστατευτικά(Graham, 1997).Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει και το γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου(Muzaheed, 2020), το οποίο φυσικά συνεξετάσσεται στα βάθη των αιώνων με το γονιδίωμα των ανθρώπων – ξενιστών(Rawla & Barsouk, 2019). Πιο συγκεκριμένα,

στελέχη που φέρουν τις λοιμογόνες πρωτεΐνες CagA (εντείνει τις ανοσολογικές αντιδράσεις του ξενιστή με αποτέλεσμα την μείωση της συνοχής των γαστρικών ιστών, ενώ βοηθά το *H.pylori* να εισέλθει στα γαστρικά κύτταρα και να μεταβάλλει σηματοδοτικά μονοπάτια προκαλώντας φλεγμονή(Basso et al., 2008)), VacA (μεταβάλλει την ισορροπία ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση του γαστρικού επιθηλίου(Palframan et al., 2012) και OpiA (διαταράσσει την επικοινωνία των επιθηλιακών κυττάρων)(Franco et al., 2008), που έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή που φέρουν δυνατό μαστίγιο και κυκλικό σχήμα για καλύτερη μετακίνηση στο γαστρικό επιθήλιο(Sycuro et al., 2010), θεωρούνται πιο καρκινογόνα(Muzaheed, 2020). Μάλιστα, τα στελέχη αυτά μπορεί να παρουσιάζουν και διαφορετική γεωγραφική κατανομή, αφού για παράδειγμα στελέχη με το γονίδιο VacA προσβάλλουν πολύ πιο συχνά τους Αφρικανούς και τους Ισπανούς(Brown et al., 2022). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα για τον ρόλο των παραπάνω παραγόντων είναι το λεγόμενο «Αφρικανικό Αίνιγμα», που πήρε το όνομά του από το παράδοξο εύρημα ότι παρά τα υψηλά ποσοστά μόλυνσεων από *H.pylori* στην Αφρική, τα περιστατικά γαστρικού καρκίνου είναι πολύ χαμηλά(Smith et al., 2019). Αυτό έχει αποδοθεί στην μη κατανάλωση τροφών διατηρημένων σε αλάτι (Smith et al., 2019) αλλά και στο γεγονός ότι τα στελέχη του *H.pylori* που κυριαρχούν στην Αφρική έχουν χαμηλά ποσοστά του γονιδίου CagA στο γονιδίωμά τους συγκριτικά με αυτά των υπόλοιπων γεωγραφικών περιοχών του κόσμου(Park et al., 2018).

Πέρα από την αύξηση του *H.pylori*, με την βοήθεια της αλληλούχησης επόμενης γενιάς, βρέθηκε ότι το γαστρικό μικροβίωμα σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο εμφανίζει τρομερή μείωση της ποικιλότητας σε σχέση με το φυσιολογικό μικροβίωμα, ενώ υπάρχει αύξηση των στελεχών που φυσιολογικά θα συναντιούνταν στο έντερο(W. J. Yang et al., 2023). Πιο ειδικά, η αύξηση των πληθυσμών των *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Subdoligranulum*, *Enterococcus*, *Streptococcus* και *Bacteroides* αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου(W. J. Yang et al., 2023). Αυτό φυσικά συνδέεται και με τις διατροφικές συνήθειες του ατόμου(W. J. Yang et al., 2023).

Για τις παρατηρούμενες αυξητικές τάσεις σε νεαρές ηλικίες βέβαια μπορεί να ευθύνονται και ο σύγχρονος τρόπος ζωής στις πλούσιες χώρες, πχ η παχυσαρκία(Heer et al., 2020), αλλά και οι προληπτικές εξετάσεις σε υγιή άτομα, που καμιά φορά οδηγούν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα καταδεικνύοντας κακοήθειες που δεν θα καταλήξουν σε ασθένεια(di Martino et al., 2022).

Πέρα από όλα τα παραπάνω, ακόμη και η φύση των ίδιων των γαστρικών κυττάρων του στομάχου συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου, αφού διαιρούνται με εξαιρετικά υψηλό ρυθμό, διευκολύνοντας την δημιουργία μεταλλάξεων(Grad et al., 2023).



Εικόνα 2 : Συνοπτική παρουσίαση των βασικών αιτιολογικών παραγόντων του γαστρικού καρκίνου(Nemtsova et al., 2023).

1.1.3. Ταξινόμηση περιστατικών καρκίνου του στομάχου

Υπάρχουν πολλά συστήματα ταξινόμησης του γαστρικού καρκίνου. Πιο αναλυτικά, μπορεί να διακριθεί σε κατηγορίες με βάση:

A) Ιστολογικά κριτήρια. Κατηγοριοποιείται σε:

1. **Αδενοκαρκίνωμα**, που συνδέεται με μόλυνση από το *H.pylori* (Muzaheed, 2020) και αντιστοιχεί στο 90% των παγκόσμιων περιστατικών (Deng et al., 2021),

2. **Λέμφωμα του γαστρικού λεμφοειδούς ιστού που σχετίζεται με την παραγωγή βλέννας (MALT)** (Muzaheed, 2020). Πρόκειται για σπάνια μορφή - αντιπροσωπεύει μόλις το 3% των περιστατικών παγκοσμίως (Muzaheed, 2020), ενώ σχετίζεται με μόλυνση από το *H.pylori* (Akbari et al., 2022).

3. **Γαστρικό καρκίνο κυτάρων με διαμόρφωση σφραγιστήρος -δακτυλίου**

4. **Μη διαφοροποιημένο γαστρικό καρκίνο**

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης κατά Lauren το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διαχωρίζεται περαιτέρω σε (Grad et al., 2023):

1. **Γαστρικό καρκίνο εντερικού τύπου**, που αφορά το 54% των συνολικών περιπτώσεων, εμφανίζεται συνήθως σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, κυρίως σε άνδρες και ανθρώπους μεγάλης ηλικίας (Grad et al., 2023), και έχει καλύτερη πρόγνωση από τους υπόλοιπους τύπους (Kunz et al., 2012). Οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (διατροφή, *Helicobacter pylori* κλπ.) (López et al., 2023). Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από εντερική μεταπλασία, λόγω του *H.pylori*, καθώς και από την ύπαρξη σωληνοειδών και αδενικών δομών (Onoyama et al., 2022).

2. **Διάχυτο γαστρικό καρκίνο**, που είναι αρκετά πιο σπάνιος (30% των περιπτώσεων), εμφανίζεται συνήθως σε νεαρά άτομα, είναι πιο συχνός στις γυναίκες (Q. Yao et al., 2020) και συνοδεύεται από κακή πρόγνωση (Grad et al., 2023). Οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις (πχ μετάλλαξη στο γονίδιο CDH1) (López et al., 2023). Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από ελάχιστα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα και από την απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων τους και άρα την έλλειψη αδενικών δομών (Alagesan et al., 2023), και

3. **Γαστρικό καρκίνο ενδιάμεσου τύπου**, που εμφανίζει χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των δύο προηγούμενων τύπων.

Παρά τις ιστολογικές διαφορές των υποτύπων αυτού του συστήματος ταξινόμησης, δεν μπορεί να αξιοποιηθεί κλινικά (Onoyama et al., 2022).

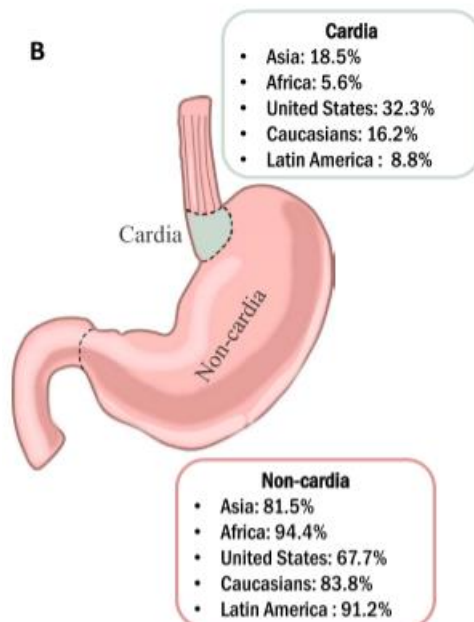
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, διακρίνεται σε **σωληνοειδή, θηλώδη, βλεννώδη** και σε **γαστρικό καρκίνο ελάχιστης συνοχής** (Cislo et al., 2018). Αν θέλουμε να συνδυάσουμε τα δύο τελευταία συστήματα ταξινόμησης, οι πρώτες δύο κατηγορίες εντάσσονται στα πλαίσια του καρκίνου εντερικού τύπου, ενώ οι τελευταίες στον διάχυτο (Cislo et al., 2018).

B) Τοπολογικά κριτήρια. Διακρίνεται σε (**Εικόνα 3**):

1. **Κεντρικό**, που εμφανίζεται σε κεντρικές περιοχές του στομάχου, όπως αυτές που περιβάλλουν την γαστροοισοφαγική ένωση (Muzaheed, 2020). Αντιστοιχεί μόλις στο 18% των συνολικών περιπτώσεων (Arnold, Ferlay, et al., 2020), με υψηλά ποσοστά στους Καυκάσιους χωρίς Ισπανικές καταβολές (J. Kim et al., 2017), ενώ συνοδεύεται από κακή πρόγνωση (Ilic & Ilic, 2022). Σχετίζεται συνήθως με την διατροφή και την παχυσαρκία (Sung et al., 2019). Από κλινική άποψη, μπορεί να υποδιαιρεθεί σε κεντρικό γαστρικό καρκίνο με συμπτώματα παρόμοια με αυτά του οισοφαγικού αδενοκαρκινώματος και αιτιολογικό παράγοντα την

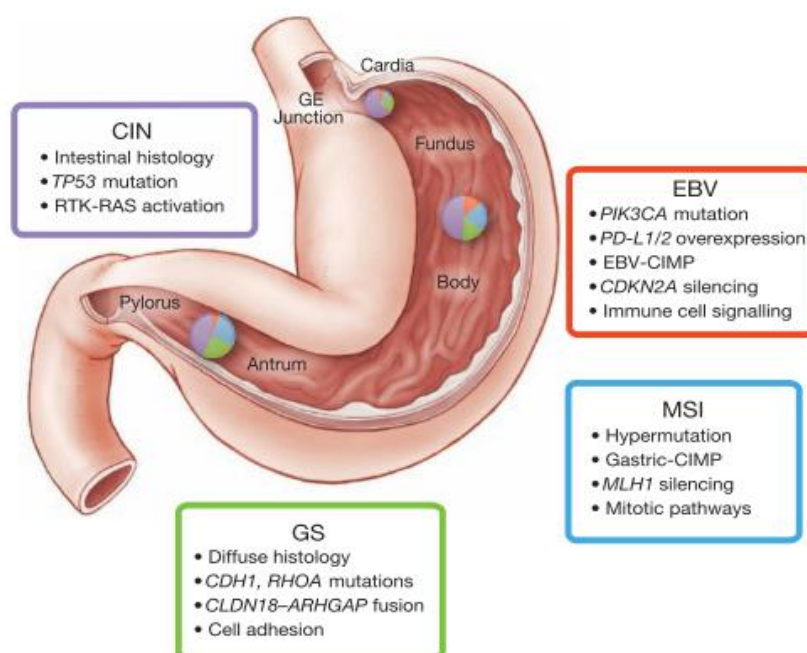
γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (GERD) (Mukaisho et al., 2015) και σε κεντρικό γαστρικό καρκίνο με συμπτώματα παρόμοια με αυτά της ατροφικής γαστρίτιδας και του απομακρυσμένου καρκίνου του στομάχου, με αιτιολογικό παράγοντα την μόλυνση από το *H.pylori* (Akbari et al., 2022).

2. **Απομακρυσμένο**, που εμφανίζεται στα πιο απομακρυσμένα τμήματα (Morgan et al., 2022) του στομάχου. Είναι ο πιο συχνός τύπος και το 90% περιπτώσεων του οφείλονται σε μόλυνση από *H.pylori* (Plummer et al., 2016), γι' αυτό και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στα κατώτερα κοινωνικά στρώματα (Alagesan et al., 2023).



Εικόνα 3 : Απεικόνιση του κεντρικού και απομακρυσμένου γαστρικού καρκίνου και ποσοστά της γεωγραφικής του κατανομής (López et al., 2023).

Γ) **Μοριακά κριτήρια:** Η μοριακή ταξινόμηση κατέστη δυνατή χάρη στην ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών αλληλούχησης του DNA και το πλεονέκτημά της είναι ότι μπορεί να αξιοποιηθεί στην κλινική πράξη (Bass et al., 2014a). Η πιο σημαντική μοριακή ταξινόμηση έγινε το 2014 από τον Άτλαντα του Καρκινικού Γονιδιώματος (The Cancer Genome Atlas – TCGA) (**Εικόνα 4**), σύμφωνα με τον οποίο ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να διακριθεί σε (Bass et al., 2014a):



1. Γαστρικό καρκίνο θετικό στην μόλυνση από τον ιό Epstein- Bar (EBV+)

Ο Epstein-Bar είναι ένας ογκογόνος ιός που μολύνει τα Β λεμφοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, και κατόπιν εξάντλησης του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλεί τον αέναο πολλαπλασιασμό τους και άρα την καρκινογένεση(Iizasa et al., 2022). Αποτελεί το 5-10% των συνολικών περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου (Boysen et al., 2009). Είναι πολύ πιθανό να αφορά γαστρικούς καρκίνους του κεντρικού τμήματος του στομάχου(Cavaleiro-Pinto et al., 2011), και εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό (81%) στους άνδρες(Bass et al., 2014b). Δεν συσχετίζεται με εντερική μεταπλασία(Q. Wang et al., 2019), ενώ χαρακτηρίζεται από καλή πρόγνωση και χαμηλά ποσοστά επανεμφάνισης(Iizasa et al., 2022). Συνδέεται με μεταλλάξεις στα γονίδια PI3KCA, που κωδικοποιεί για ένα καταλυτικό μόριο του μονοπατιού PI3K, το οποίο βοηθά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό(Cislo et al., 2018), ARID1A, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που συμμετέχει στην αναδιοργάνωση των χρωμοσωμάτων και η απώλειά του οδηγεί σε μη φυσιολογική λειτουργία του συστήματος επιδιόρθωσης λαθών κατά την διάρκεια της αντιγραφής(López et al., 2023), καθώς και στο BCOR, που ελέγχει την λειτουργία κυττάρων του ανοσοποιητικού(Cislo et al., 2018). Επίσης, σε αυτήν την μορφή συχνά παρατηρείται υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων των υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως του CDKN2A(Ang et al., 2016). Τέλος, εμφανίζει υπερέκφραση των PD-L1 και PD-L2 μορίων, καθιστώντας τον συγκεκριμένο καρκίνο κατάλληλο για ανοσοθεραπεία και επομένως δίνοντάς του καλύτερη πρόγνωση(Böger et al., 2016). Η διάγνωσή του μπορεί να γίνει με ενδοσκοπικές μεθόδους(Iizasa et al., 2022), με υβριδισμό *in situ* (ISH) καθώς και με ψηφιακή PCR σταγόνας (ddPCR), που επιτρέπει τον υπολογισμό των μορίων DNA του EBV στον ιστό – στόχο(J. Yang et al., 2020).

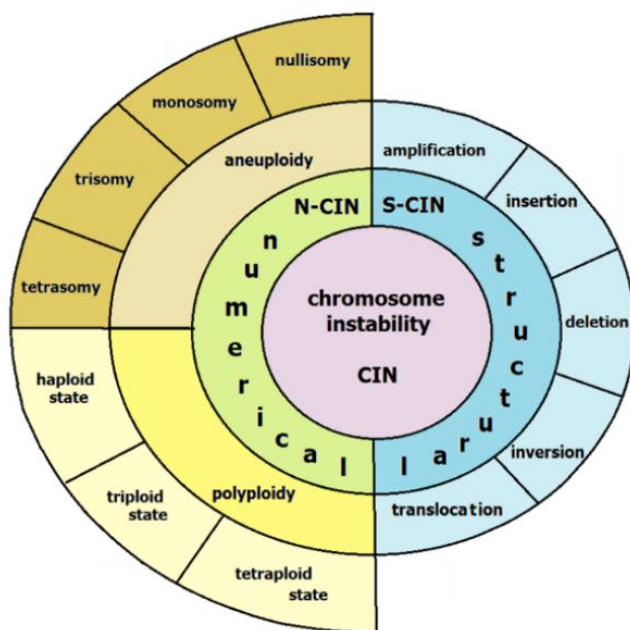
2. Γαστρικό καρκίνο που χαρακτηρίζεται από αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI)

Εμφανίζεται συνήθως σε γυναίκες μεγάλης ηλικίας (>65 ετών), στα κατώτερα τμήματα του στομάχου και αποτελεί το 22% των συνολικών γαστρικών καρκίνων(Cislo et al., 2018). Ιστολογικά, η μεγάλη πλειοψηφία ανήκει στους καρκίνους εντερικού γαστρικού υπότυπου(Puliga et al., 2021). Συχνά, αστάθεια μικροδορυφόρων εντοπίζεται και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις του στομάχου, όπως στην εντερική μεταπλασία, γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι ένα πρόωρο γεγονός στην γαστρική καρκινογένεση(Puliga et al., 2021). Πολλές φορές η εμφάνισή του έχει συσχετιστεί με μόλυνση από το *H.pylori*(Microsatellite Instability in Gastric Carcinomas 583, 1999). Οι γαστρικοί καρκίνοι αυτής της κατηγορίας έχουν διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων στους μικροδορυφόρους τους από το φυσιολογικό(Cislo et al., 2018). Αυτοί που διαφέρουν αρκετά ονομάζονται μεγάλης αστάθειας μικροδορυφόρων (MSI-H), ενώ αυτοί που διαφέρουν σε μικρό βαθμό ονομάζονται μικρής αστάθειας μικροδορυφόρων (MSI-L). Είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο σύστημα επιδιόρθωσης λαθών κατά την αντιγραφή του DNA (dMMR), με συχνή μετάλλαξη την υπερμεθυλίωση του γονιδίου *MLH1*(Guo et al., 2017). Επίσης, έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης EGFR(Cislo et al., 2018). Συχνά εμφανίζει μεταλλάξεις σε συστατικά του MHC συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, όπως στις πρωτεΐνες B2M και HLA-B(Bass et al., 2014a). Η κατάταξη σε μία από τις παραπάνω κατηγορίες βοηθά στην επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης, αφού για παράδειγμα, για τους MSI-H γαστρικούς καρκίνους συστήνεται μόνο η χειρουργική αφαίρεση και όχι η χημειοθεραπεία, λόγω και της παρουσίας λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου(Cislo et al., 2018). Σχετίζεται με πιο έγκαιρη διάγνωση και καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τους καρκίνους σταθερών μικροδορυφόρων (MSS), αφού σπάνια εμφανίζει μεταστάσεις στους λεμφοειδείς αδένες(Zubarayen et al., 2019). Μπορεί να διαγνωστεί είτε με ιστοχημικές αναλύσεις (IHC) είτε με μοριακό έλεγχο μέσω της PCR(Puliga et al., 2021). Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισής του είναι η απλή χειρουργική αφαίρεση, ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για θετικές επιδράσεις του συνδυασμού της με χημειοθεραπείες(Puliga et al., 2021). Λόγω της υψηλής μεταλλαξιγένεσης, και μάλιστα της υψηλής έκφρασης των PD-L1 μορίων(L. Gu et al., 2017), και σε αυτόν τον υπότυπο μπορούν

να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα, στα πλαίσια της ανοσοθεραπείας(Onoyama et al., 2022).

3. Γαστρικό καρκίνο που χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια (CIN)

Είναι ο πιο συχνός – εμφανίζεται στο 50% των περιπτώσεων και ιστολογικά ανήκει στον γαστρικό καρκίνο εντερικού τύπου, ενώ εμφανίζεται στο κεντρικό τμήμα του στομάχου(Cislo et al., 2018). Περιλαμβάνει γαστρικούς καρκίνους με αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πχ ανευπλοειδίες ή πολυπλοειδίες (n-CIN) ή και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως μετατοπίσεις και ελλείψεις (s-CIN) (**Εικόνα 5**) (Guo et al., 2017). Οι ανευπλοειδίες συνήθως σχετίζονται με καρκίνους με υψηλό μεταστατικό δυναμικό, ανθεκτικότητα σε θεραπείες και κακή πρόγνωση(Nemtsova et al., 2023). Συχνά είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε γονίδια που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόκριση στην καταστροφή του DNA και η μίτωση(Nemtsova et al., 2023). Τέτοια γονίδια μπορεί να είναι τα AURKA, AURKB, CCNB1, CDK1 και άλλα γονίδια κινασών τυροσίνης(Nemtsova et al., 2023). Επίσης, σχετίζεται με υπερέκφραση των VEGF, EGFR, HER2 και άλλων ογκογονιδίων (Corso & Giordano, 2016). Το πιο χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53(Bass et al., 2014a), που δρα ογκοκατασταλτικά κωδικοποιώντας την πρωτεΐνη p53, έναν μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την απόπτωση(Kastenhuber & Lowe, 2017). Ακόμη, χαρακτηρίζεται από έλλειψη παρουσίας κυτάρων του ανοσοποιητικού στο περιβάλλον του όγκου(Nemtsova et al., 2023). Η διάγνωση αυτού του υπότυπου γαστρικού καρκίνου είναι δύσκολη, καθώς δεν υπάρχουν τεχνικές και δείκτες που να υποδηλώνουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες(Nemtsova et al., 2023). Θεραπευτικά, προοπτικές παρουσιάζει η ανάπτυξη φαρμάκων που να στοχεύουν είτε το μονοπάτι του TP53 (APR-548) (Hassin & Oren, 2023) είτε τις κινάσες τυροσίνης (trastuzumab)(Tan et al., 2018). Επίσης, η εφαρμογή χημειοθεραπείας παρουσιάζει το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε αυτόν τον τύπο καρκίνου(Serra et al., 2019).



Εικόνα 5: Κατηγορίες χρωμοσωμικής αστάθειας στον γαστρικό καρκίνο(Nemtsova et al., 2023).

4. Γενετικά σταθερό γαστρικό καρκίνο (GS)

Αποτελεί το 20% των καρκίνων του στομάχου, ενώ δεν εμφανίζει μοριακές αλλαγές μεγάλης έκτασης(Cislo et al., 2018). Η διάγνωσή του γίνεται συχνά σε ασθενείς μικρής ηλικίας (μέσος όρος 59 ετών)(Q. Wang et al., 2019).Ιστολογικά εμπίπτει στην κατηγορία του διάχυτου καρκίνου και εμφανίζει μεταλλάξεις στα γονίδια RHOA, CDH1 και CLDN18/ARHGAP(Cislo et al., 2018). Οι μεταλλάξεις στο CDH1 αν και αποτελούν ένδειξη ότι οι φορείς τους ανήκουν σε πληθυσμό υψηλού κινδύνου, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά,

αφού πρόκειται για μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας(Onoyama et al., 2022). Αντιθέτως, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο RHOA είναι κέρδους λειτουργίας, επομένως είναι δυνατή η θεραπευτική τους στόχευση(Onoyama et al., 2022). Οι περισσότερες μεταλλάξεις αυτού του τύπου αφορούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διακυτταρική προσκόλληση(Puliga et al., 2021). Θεραπευτικά, η εφαρμογή χημειοθεραπείας δεν επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα(Serra et al., 2019).

Ο παραπάνω διαχωρισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, δεν έχει όμως προγνωστική αξία(Cislo et al., 2018). Αυτόν τον σκοπό εξυπηρετεί ο διαχωρισμός του Ασιατικού Κέντρου Διερεύνησης για τον Καρκίνο (ACGR), που διαχωρίζει τον καρκίνο του στομάχου σε(Cislo et al., 2018):

1.Γαστρικό καρκίνο που χαρακτηρίζεται από αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI)

Έχει την καλύτερη πρόγνωση, συνδέεται ιστολογικά με τον γαστρικό καρκίνο εντερικού τύπου και συνήθως δεν υποτροπιάζει μετά την αντιμετώπιση(Cislo et al., 2018).

2.Γαστρικό καρκίνο με σταθερούς μικροδορυφόρους και φαινότυπο επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάπτωσης (MSS/EMT)

Παρουσιάζει την χειρότερη πρόγνωση, η διάγνωση γίνεται συνήθως σε ασθενείς μικρής ηλικίας και σε ήδη προχωρημένο στάδιο, ενώ συνδέεται ιστολογικά με τον διάχυτο γαστρικό καρκίνο και εμφανίζει υψηλά ποσοστά υποτροπής(Cislo et al., 2018). Χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο CDH1(Cislo et al., 2018).

3. Γαστρικό καρκίνο με σταθερούς μικροδορυφόρους και έκφραση του TP53 (MSS/TP53+)

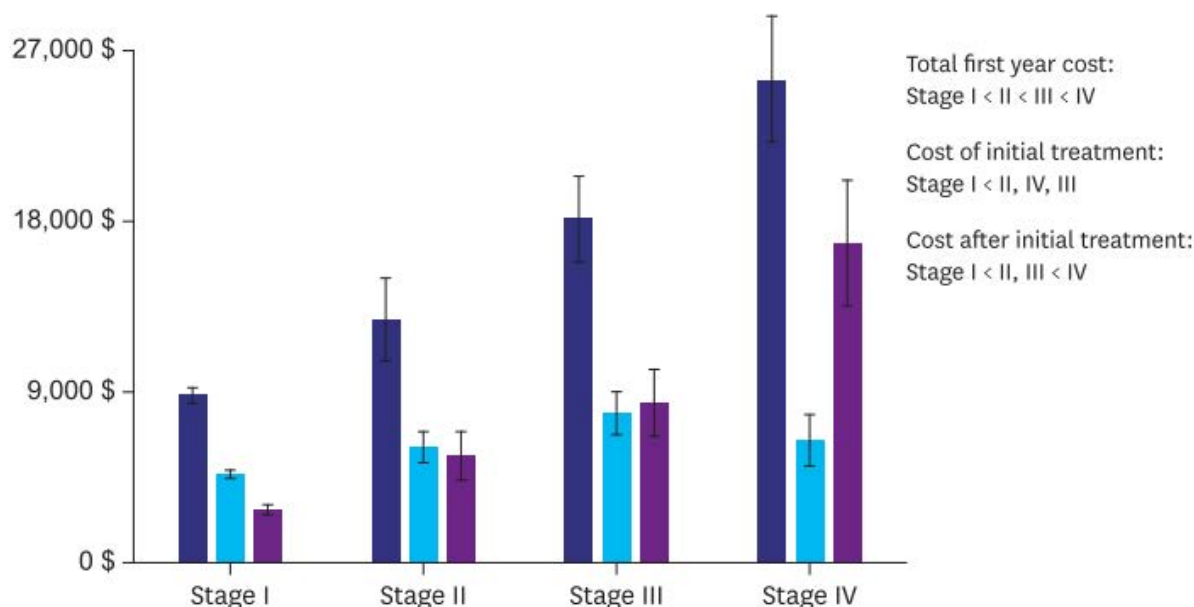
Εμφανίζεται σε ποσοστό 26% και έχει ενδιάμεση πρόγνωση από του πρώτους δύο, ενώ συνδέεται συχνά με μόλυνση από τον EBV(Cislo et al., 2018).

4. Γαστρικό καρκίνο με σταθερούς μικροδορυφόρους και έλλειψη του TP53 (MSS/TP53-)

Εμφανίζεται σε ποσοστό 36% και έχει ενδιάμεση πρόγνωση από του πρώτους δύο τύπους(Cislo et al., 2018). Παρουσιάζει μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων στο γονίδιο TP53+, αλλά μικρό αριθμό άλλων μεταλλάξεων(Q. Wang et al., 2019).

1.1.4.Διάγνωση και θεραπεία

Ο γαστρικός καρκίνος έχει αρκετά μεγάλο υγειονομικό κόστος περίθαλψης, το οποίο αυξάνεται αναλογικά με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται κατά την διάρκεια της διάγνωσής του (**Εικόνα 6**)(K. Zhang et al., 2020). Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να υιοθετηθούν μέτρα που να οδηγήσουν στην αποφυγή εμφάνισής του καθώς και στην έγκαιρη διάγνωση(Alagesan et al., 2023). Για να επιτευχθεί ένας τέτοιος σκοπός, απαιτείται πολυδιάστατος προληπτικός έλεγχος(Alagesan et al., 2023).

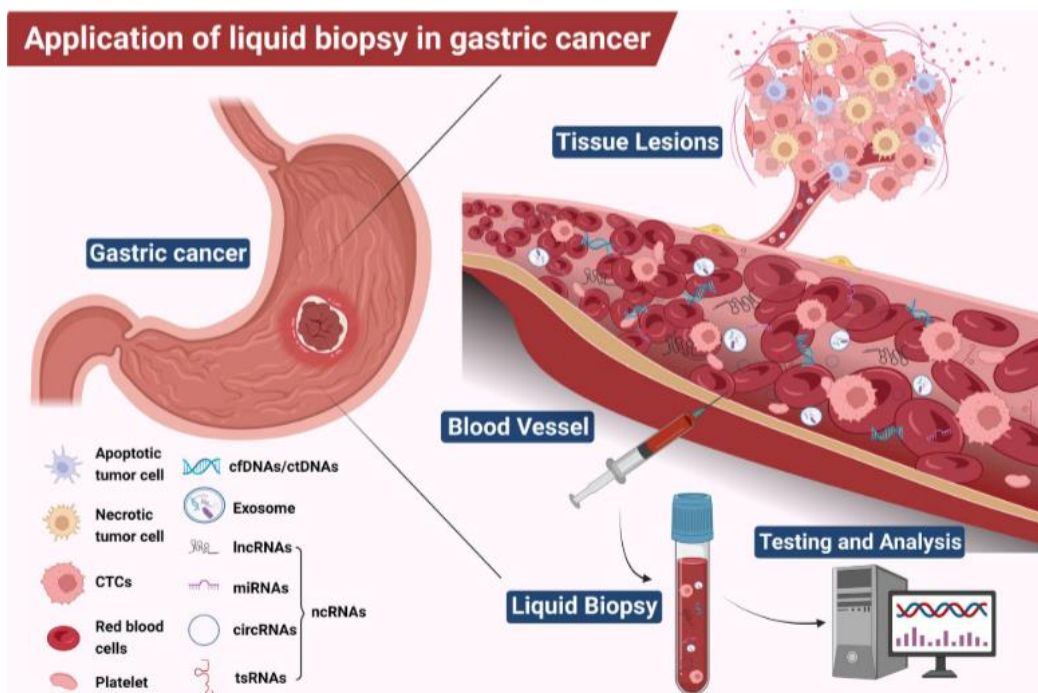


Εικόνα 6: Υγειονομικό κόστος περίθαλψης του καρκίνου του στομάχου ανάλογα με το στάδιο διάγνωσης. Το συνολικό κόστος περίθαλψης (μπλε σκούρα μπάρα) αυξάνεται σταδιακά από το στάδιο I μέχρι το στάδιο IV, ενώ το κόστος αρχικής θεραπείας και το κόστος περίθαλψης μετά την αρχική θεραπεία (γαλάζια και μωβ μπάρα αντίστοιχα) είναι τα μικρότερα στο στάδιο I (J. H. Kim et al., 2018).

Αρχικά, ένα τμήμα προληπτικών εξετάσεων πρέπει να αφορά την μόλυνση από το βακτήριο *H.pylori* (Alagesan et al., 2023). Αυτές οι εξετάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν είτε ενδοσκοπικές βιοψίες που αξιοποιούν ειδικές ιστοπαθολογικές χρώσεις, αλλά μη επεμβατικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα έλεγχο των ειδικών αντιγόνων στα κόπρανα, ορολογικά τεστ αντισωμάτων (ELISA) και τεστ ανίχνευσης της ουρίας στην αναπνοή (Best et al., 2018). Το τελευταίο είναι το πιο αποτελεσματικό, αν και όλες οι μη επεμβατικές μέθοδοι δίνουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα αν ο ασθενής χρησιμοποιεί αντιβιοτικά (Alagesan et al., 2023). Μετά την διάγνωση της μόλυνσης από το *H.pylori*, ακολουθεί η αντιμετώπισή του (Alagesan et al., 2023). Η κλαριθρομυκίνη και η μετρονιδαζόλη είναι τα πιο διαδεδομένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα, σε δόσεις ανάλογες με το επίπεδο μόλυνσης και το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή (Shirani et al., 2023). Για την τελική απόφαση της θεραπευτικής προσέγγισης, σημαντικές πληροφορίες μπορούν να δοθούν και από μελέτες που θα δείχνουν σε ποιο στάδιο της μόλυνσης το *H.pylori* γίνεται ογκογόνο (Alagesan et al., 2023). Ένας τρόπος μείωσης της πιθανότητας εμφάνισης γαστρικού καρκίνου σε ασθενείς θετικούς για *H.pylori* είναι η χορήγηση ασπιρίνης (Ye et al., 2013) και γενικότερα άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (Grad et al., 2023). Λόγω της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που έχουν αναπτύξει πολλά στελέχη *H.pylori*, αλλά και ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή, πολλές φορές η μόλυνση μπορεί να είναι εμμένουσα, επομένως χρειάζονται επαναληπτικές εξετάσεις για να επιβεβαιωθεί ότι το βακτήριο έχει εξαλειφθεί πλήρως (Alagesan et al., 2023). Οι προληπτικές εξετάσεις πρέπει να γίνονται σε όλον τον πληθυσμό, αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό στο πληθυσμό υψηλού κινδύνου (Leja et al., 2017), δηλαδή σε όσους πάσχουν από γαστρική ατροφία ή εντερική μεταπλασία, στους συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών και σε πληθυσμούς με ετήσια συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου πάνω από 20 άτομα στα 100000 (Fock et al., 2009). Βέβαια, προβληματισμός υπάρχει για τις διάφορες παρενέργειες που μπορεί να προκύψουν από την πλήρη εξάλειψη, όπως η αύξηση της ανθεκτικότητας του σε αντιβιοτικά, η διατάραξη της ομοιόστασης του μικροβιώματος, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, η αύξηση του γαστρικού καρκίνου σε νέες ηλικίες λόγω νέων μηχανισμών που παλιότερα αναστέλλονταν (Blaser & Falkow, 2009) και η εξασθένηση των ανοσολογικών αντιδράσεων του ξενιστή σε παθογόνα τέτοιου τύπου (Blaser, 2012). Μάλιστα, επειδή πολλές παρενέργειες παρουσιάζουν ομοιότητα με τους αιτιολογικούς παράγοντες του κεντρικού καρκίνου του στομάχου, ο οποίος εμφανίζει μια μικρή αύξηση τα τελευταία χρόνια, πολλοί αναρωτιούνται μήπως αυτή είναι ακόμη μια παρενέργεια του *H.pylori* (Rawla & Barsouk, 2019).

Άλλη μια τεχνική πρόληψης είναι οι ενδοσκοπικές βιοψίες (Alagesan et al., 2023). Δεν συμβάλλουν μόνο στην διάγνωση του καρκίνου προχωρημένου σταδίου, αλλά μπορούν να αναγνωρίσουν και αρχικές προκαρκινικές αλλοιώσεις, όπως την γαστρική εντερική μεταπλασία, δηλαδή την ανάπτυξη εντερικού επιθηλίου στο γαστρικό βλεννογόνο (Alagesan et al., 2023). Φυσικά, απαιτείται για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, επανάληψη των εξετάσεων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ειδικά σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (Alagesan et al., 2023). Για παράδειγμα, στις Ασιατικές χώρες, υπάρχουν εθνικά προγράμματα επαγρύπνησης, όπως για παράδειγμα υποχρεωτική ενδοσκοπική απεικόνιση από τα 50 και μετά στην Ιαπωνία (Sekiguchi et al., 2022) και προληπτική ενδοσκοπική απεικόνιση του άνω στομάχου μαζί με γαστρεντερικές ακτινογραφίες κάθε δύο χρόνια από την ηλικία των 40 και μετά στην Κορέα (Jun et al., 2017), που φαίνεται να βοηθούν στην πρόληψη του γαστρικού καρκίνου (Alagesan et al., 2023), αφού έχουν αυξήσει τα ποσοστά επιβίωσης σε 65% και 71,5% αντιστοίχως (Hong et al., 2020) και έχουν μειώσει την θνησιμότητα κατά 30 – 80% (Saumoy et al., 2018). Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις οδήγησαν στον εμπλουτισμό των υπάρχουσών διαγνωστικών τεχνικών, για παράδειγμα με την ανάπτυξη του Γαστρεντερικού Διαγνωστικού Συστήματος με την βοήθεια της Τεχνητής Νοημοσύνης (GRAIDS), που καθιστά τις ενδοσκοπικές μεθόδους πιο αποτελεσματικές, ακόμη και σε χώρες χωρίς την κατάλληλη τεχνογνωσία (Luo et al., 2019).

Ωστόσο, η επεμβατικότητα των ενδοσκοπήσεων, οι παρενέργειες που μπορούν να επιφέρουν (π.χ. αιμορραγία) και το υψηλό κόστος (Akbari et al., 2022), αποτρέπουν πολλούς από τις προληπτικές εξετάσεις (Ismaila & Misauno, 2013). Γι' αυτό, πολύ σημαντική είναι η ανακάλυψη μη επεμβατικών μεθόδων, όπως η υγρή βιοψία (**Εικόνα 7**), για την εύρεση βιοδεικτών που καταδεικνύουν προκαρκινικές αλλοιώσεις και κυκλοφορούν σε σωματικά υγρά (Alagesan et al., 2023). Τέτοιοι βιοδείκτες μπορεί να είναι τα microRNAs (Wei et al., 2019), τα lncRNAs και γενικά τα ncRNAs, διάφορες πρωτεΐνες, όπως αντισώματα του ορού έναντι του *H. pylori*, η PG, ένα πρόδρομο μόριο της πεψίνης, η G-17 ή γαστρίνη, μία ορμόνη του γαστρεντερικού, καθώς και διάφοροι μεταβολίτες του πλάσματος, όπως το μεθυλαμμωνικό οξύ, το οποίο παράγεται κατόπιν έλλειψης της βιταμίνης B12, σημαντικό επακόλουθο του γαστρικού καρκίνου (Miranti et al., 2017). Όλα τα παραπάνω μπορούν να συνδυαστούν για αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου (Fan et al., 2021). Επίσης, πολύ χρήσιμος βιοδείκτης, ειδικά για επιλογή θεραπευτικών επιλογών, είναι και το ctDNA, που μπορεί να ανιχνευτεί με υγρή βιοψία (Onoyama et al., 2022). Επιπλέον, το ctDNA μπορεί να αποτελεί και ένδειξη της φάσης στην οποία βρίσκεται ο καρκίνος, αφού μπορεί να υποδεικνύει μετάσταση (Onoyama et al., 2022). Τέλος, ως βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), τα οποία είναι ελεύθερα κύτταρα του αίματος με διάμετρο μεγαλύτερη των 4μm, που εκφράζουν επιθηλιακά εξωμεμβρανικά μόρια ενδεικτικά της καρκινικής τους προέλευσης, καθώς και τα εξωσώματα, τα οποία είναι εξωκυτταρικά κυστίδια μεγάλης σταθερότητας που μεταφέρουν βιομόρια, πχ ncRNAs, από κύτταρο σε κύτταρο (Ma et al., 2023).



Εικόνα 7: Κλινική εφαρμογή της υγρής βιοψίας και αξιοποίηση των βιοδεικτών που αυτή παρέχει για την διάγνωση του γαστρικού καρκίνου (Ma et al., 2023).

Στις παραπάνω εξετάσεις θα πρέπει να προστεθούν και τα λεγόμενα πρωτογενή μέτρα προφύλαξης, που περιλαμβάνουν την βελτίωση των καθημερινών συνηθειών των ανθρώπων που ανήκουν σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (μείωση του καπνίσματος και της κατανάλωσης αλκοολούχων ποτών, υγιεινή διατροφή φτωχή σε αλάτι, Μεσογειακή διατροφή, πλούσια σε φρούτα και λαχανικά, αυστηρή τήρηση μέτρων υγιεινής, κλπ) (Ilic & Ilic, 2022).

Βέβαια, με την συχνότητα του γαστρικού καρκίνου να πέφτει, υπάρχουν προβληματισμοί σχετικά με την οικονομικό κόστος των εξετάσεων αυτών για τα εθνικά προγράμματα υγείας, αφού θεωρείται ότι πιθανόν να ξεπεράσουν και το κόστος της υγειονομικής περίθαλψης των ασθενών (Lansdorp-Vogelaar et al., 2021). Γι' αυτό απαιτείται η εφαρμογή νέων διαγνωστικών μεθόδων που θα εγγυώνται μια πιο εξατομικευμένη διενέργεια των παραπάνω εξετάσεων (Sekiguchi et al., 2022). Ο γενετικός έλεγχος για την εύρεση συγκεκριμένων πολυμορφισμών, όπως για την ύπαρξη του αλληλομόρφου A του IL-8 rs4073 ή για την έκφραση του lncRNA H19 rs2839698, μόρια που συνδέονται με πιο επιθετικές μορφές γαστρικού καρκίνου, μπορεί να προσφέρει τέτοια εξατομικευση (W. J. Yang et al., 2023). Ωστόσο παρά τις προοπτικές του, εμφανίζει μειονεκτήματα, όπως την απαίτηση εμπειρίας και τεχνογνωσίας του χειριστή, το υψηλό κόστος και την έλλειψη εμπιστοσύνης που συχνά δείχνουν οι ασθενείς προς τέτοιες εξετάσεις (Williams et al., 2019). Επιπλέον, η χρήση των μοριακών διαχωρισμών του γαστρικού καρκίνου μπορεί να συμβάλλει σε μια πιο στοχευμένη επιλογή θεραπείας (Shin et al., 2023). Τέλος, η εξέταση του μικροβιώματος των ασθενών για την εύρεση βακτηρίων, όπως το *Streptococcus anginosus*, που μέσω του μεταβολισμού του παρέχει ενέργεια για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Sexton et al., 2020a), ή τα *Peptostreptococcus stomatis* και *Slackia exigua*, που παράγουν μεταβολίτες σαν το οξικό οξύ, οι οποίοι προκαλούν βλάβες στα γαστρικά κύτταρα, μπορεί να υποδείξει νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις (Schulz et al., 2019). Σίγουρα πάντως, η ανάπτυξη συνδυαστικών προληπτικών εξετάσεων, που να περιλαμβάνουν όλες τις παραπάνω τεχνικές μαζί με προσεκτική λήψη του οικογενειακού ιστορικού, των συνηθειών και άλλων δημογραφικών πληροφοριών για τους ασθενείς, θα βοηθήσει προς αυτόν τον τομέα (Alagesan et al., 2023).

Αν τα συμπτώματα γαστρικού καρκίνου είναι έκδηλα όταν ο ασθενής καταφύγει σε γιατρό γίνονται διαγνωστικές εξετάσεις για να αποφασιστεί το είδος και το στάδιο του γαστρικού καρκίνου, με πιο σημαντικές

τις ενδοσκοπήσεις, τις βιοψίες, απεικονιστικές τεχνικές όπως η μαγνητική τομογραφία ,καθώς και απλές εργαστηριακές εξετάσεις αίματος(Smyth et al., 2020).

Ο κύριος και ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης του γαστρικού καρκίνου που μπορεί να τον εξαλείψει πλήρως, εφόσον βέβαια η διάγνωση γίνει σε αρχικά στάδια, είναι η χειρουργική αφαίρεση(Y. Wang et al., 2021). Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του καρκίνου και τις δυνατότητες του ιατρικού ιδρύματος, το χειρουργείο μπορεί να στοχεύει σε ενδοσκοπική εκτομή του βλεννογόνου, σε οισοφαγεκτομή, και σε μερική ή και πλήρη γαστρεκτομή(Sexton et al., 2020b). Για μείωση της επεμβατικότητας αυτών των μεθόδων , υπάρχουν και οι εναλλακτικές της λαπαροσκόπησης και της ρομποτικής γαστρεκτομής, που επιταχύνουν τον χρόνο ανάρρωσης των ασθενών, αλλά απαιτείται περαιτέρω βελτίωσή τους(W. J. Yang et al., 2023).

Ωστόσο, επειδή συνήθως ο γαστρικός καρκίνος εντοπίζεται σε προχωρημένο στάδιο, το χειρουργείο δεν είναι αποτελεσματικό από μόνο του και συνδυάζεται με χημειοθεραπείες(J. Wen & Shen, 2023). Οι χημειοθεραπείες κατατάσσονται σε προεγχειρητικές, για να μειωθεί το μέγεθος του όγκου πριν αφαιρεθεί, χημειοθεραπείες που γίνονται το ίδιο χρονικό διάστημα με την χειρουργική αφαίρεση, μετεγχειρητικές, καθώς και ανακουφιστικές, που δεν στοχεύουν σε θεραπεία, αλλά σε ανακούφιση των συμπτωμάτων των ασθενών(Health Commission of the PRC, 2022), συνήθως όσων βρίσκονται στο στάδιο IV(Cislo et al., 2018). Έχει βρεθεί ότι όλες οι παραπάνω μορφές χημειοθεραπείας βελτιώνουν την μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών σε σχέση με την αποκλειστική χειρουργική αφαίρεση, ειδικά στην περίπτωση των όγκων θετικών στο HER2+, ενώ μπορούν να συνδυαστούν για ακόμη καλύτερα αποτελέσματα(Saunders et al., 2017). Βέβαια, ειδικά σε νεαρούς ασθενείς, δεν προτείνονται, λόγω των χαμηλών ποσοστών μακροχρόνιας επιβίωσης κατόπιν της θεραπείας και της χαμηλής ποιότητας ζωής, αφού προκαλούν παρενέργειες όπως γαστρική αιμορραγία, περιτονίτιδα, σηπτικό σοκ, νεφρικές βλάβες και καρδιακή ανακοπή(Fuchs et al., 2019). Άλλα μειονεκτήματά τους είναι η αντοχή που αναπτύσσεται σταδιακά από τους ασθενείς στα χρησιμοποιούμενα φάρμακα(W. J. Yang et al., 2023).

Άλλη μια θεραπευτική μέθοδος είναι η διεγχειρητική ραδιοθεραπεία, η οποία επιτρέπει στην στόχευση με την ακτινοβολία μόνο των καρκινικών ιστών (Pilar et al., 2017)και συνδέεται με χαμηλά ποσοστά επανεμφάνισης καρκίνου(Drognitz et al., 2008). Ο συνδυασμός ραδιοθεραπείας με προ- ή μετεγχειρητική χημειοθεραπεία θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική και κλασική θεραπευτική προσέγγιση(W. J. Yang et al., 2023).

Λόγω της δοκιμασμένης επιτυχίας της στην αντιμετώπιση άλλων μορφών στερεών καρκίνων, την τελευταία δεκαετία γίνεται προσπάθεια χρήσης της ανοσοθεραπείας για την θεραπεία του γαστρικού καρκίνου, και πιο ειδικά της ανοσοθεραπείας στόχευσης ανοσοκατασταλτικών μορίων(ICIs), της κυτταρικής ανοσοθεραπείας και των εμβολίων(Jin et al., 2022). Σχετικά με την πρώτη κατηγορία, χρησιμοποιούνται διάφορα ογκοκατασταλτικά μόρια που στόχο έχουν να απενεργοποιήσουν επιφανειακά μόρια των καρκινικών κυττάρων, τα οποία αλληλεπιδρώντας με προσδέτες των T κυττάρων, τα βοηθούν να ανοσοδιαφύγουν(Pardoll, 2012). Αυτά τα ογκοκατασταλτικά μόρια είναι συνήθως μονοκλωνικά αντισώματα, όπως το Trastuzumab, που στοχεύει το HER2(Cislo et al., 2018), ενώ καίριοι στόχοι τους είναι το PD-L1 των καρκινικών κυττάρων, που προσδένεται στο PD-1 των T κυττάρων προκαλώντας την απόπτωσή τους(D. hui Wang et al., 2015), και το CTLA4 των T κυττάρων, που όταν αλληλεπιδρά με τον προσδέτη του, B7-1/B7-2 , ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι CD28, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των T κυττάρων(K. Li et al., 2021). Στον γαστρικό καρκίνο μέχρι στιγμής δίνεται έμφαση στην στόχευση του PDL1, με το φάρμακο pembrolizumab, αφού εκφράζεται στο 25-65% των γαστρικών κυττάρων, ενώ η απενεργοποίησή του έχει στεφθεί με επιτυχία σε κλινικές δοκιμές(Kawazoe et al., 2017). Το pembrolizumab παρουσιάζει τοξικότητα, αλλά ο συνδυασμός του με άλλες θεραπευτικές επιλογές, όπως το Trastuzumab, την κάνει εξαιρετικά αποτελεσματική(W. J. Yang et al., 2023). Άλλα μόρια που μπορούν να στοχευθούν είναι το VEGF, ο EGFR, ο FGFR2 και το MET(Cislo et al., 2018). Όσον αφορά την κυτταρική ανοσοθεραπεία, αυτή στοχεύει στην αντιμετώπιση των καρκινικών κυττάρων με την χρήση κυτταροτοξικών κυττάρων(Johnston & Beckman, 2019).

Η πιο πολλά υποσχόμενη τεχνική είναι αυτή που χρησιμοποιεί Τ κύτταρα του ασθενή, αλλά γενετικά τροποποιημένα, για να αναγνωρίζουν ειδικά καρκινικά αντιγόνα, πχ το HER2 (CAR-Ts), καθώς έτσι αντιμετωπίζεται η απόρριψη των κυττάρων από τα MHC σύμπλοκα(Newick et al., 2017). Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί ιστοειδικά καρκινικά αντιγόνα για τον γαστρικό καρκίνο, επομένως αυτή η τεχνική δεν έχει αναπτυχθεί πολύ(W. J. Yang et al., 2023). Σε παρόμοια αρχικά στάδια βρίσκεται και η ανάπτυξη αντικαρκινικών μικροβίων, που θα ενδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή(Wagner et al., 2017; W. J. Yang et al., 2023). Για την περαιτέρω ανάπτυξη των παραπάνω μεθόδων, απαιτείται η καλύτερη κατανόηση του περίπλοκου μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων και των αλληλεπιδράσεών τους με το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και ο μοριακός διαχωρισμός των γαστρικών καρκίνων, αφού κάποιοι τύποι όπως ο MSI-H και ο EBV+ είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αυτήν την θεραπεία(Shin et al., 2023).

Στοιχεία που βοηθούν στην απόφαση για θεραπευτική μέθοδο είναι η τοποθεσία του πρωτογενούς όγκου, ποιοί ιστοί έχουν επηρεαστεί, το στάδιο του καρκίνου, η μετάσταση στους λεμφαδένες και ο αριθμός των μεταστάσεων(Y. Zhang et al., 2020).

1.2. Μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs)

Σε αντίθεση με παλιότερες αντιλήψεις, μόνο το 2% των RNA που μεταγράφονται από το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούν πρωτεΐνες(Qian et al., 2019). Το υπόλοιπο 98% πρόκειται για μη κωδικοποιητικά μετάγραφα(ncRNAs), τα οποία βέβαια σήμερα είναι γνωστό ότι δεν είναι άχρηστα μετάγραφα, αλλά επιτελούν σημαντικές επιγενετικές λειτουργίες(Qian et al., 2019). Τα μη κωδικοποιά RNA είναι μια ετερογενής ομάδα, καθώς διαφέρουν στο μήκος, στην δομή και στον ρόλο τους(Mahjoubin-Tehran et al., 2021). Διακρίνονται σε δομικά ncRNAs, στα οποία ανήκουν τα rRNAs και tRNAs, καθώς και σε ρυθμιστικά ncRNAs, τα οποία ταξινομούνται με βάση το μήκος τους σε μικρά ncRNA μήκους 20-50 νουκλεοτιδίων (miRNAs, siRNAs, piRNAs), μεσαία ncRNAs μήκους 50-200 νουκλεοτιδίων(snoRNAs) και μακρά ncRNAs (Xist, circRNAs)(Tamtaji et al., 2022).

1.2.1. Ιδιότητες των lncRNAs

Τα μακρά μη κωδικοποιά RNAs, ή αλλιώς ενδογενή ανταγωνιστικά RNAs (ceRNAs)(Y. Wang et al., 2018), είναι μετάγραφα με μήκος άνω των 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι σημαντικά για την κυτταρική λειτουργία, παρόλο που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες(Kopp & Mendell, 2018). Η έκφρασή τους είναι ιδιαίτερα χαμηλή συγκριτικά με τα mRNAs και τα microRNAs(Kopp & Mendell, 2018), καθώς οι υποκινητές τους έχουν λιγότερες αλληλουχίες αναγνώρισης μεταγραφικών παραγόντων(Rinn & Chang, 2024). Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ιστοειδικότητα και κυτταροειδικότητα(Y. Zhao et al., 2020) και γι' αυτό ενώ στην πραγματικότητα τα lncRNAs είναι περισσότερα από τα mRNAs,(υπολογίζονται σε 100.000 στον άνθρωπο)(L. Zhao et al., 2021), αυτή η ποικιλία συχνά υποτιμάται(Derrien et al., 2012). Επίσης, η έκφρασή τους εξαρτάται από την χρονική στιγμή και τα ερεθίσματα που δέχεται το κύτταρο από το περιβάλλον του(Y. Zhao et al., 2020). Σε αντίθεση με τα mRNAs, τα lncRNAs δεν διαθέτουν καλά χαρακτηρισμένα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs)(Kopp & Mendell, 2018), ενώ έχουν μικρό αριθμό εξωνίων, το μάτισμα των οποίων δεν είναι τόσο αποτελεσματικό(Statello et al., 2021a), γεγονός που ίσως ευθύνεται και για το ότι εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου και όχι στο κυτταρόπλασμα.(Rinn & Chang, 2024) Επιπλέον, η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία δεν είναι συντηρημένη μεταξύ των ειδών(Derrien et al., 2012), με εξαίρεση τους υποκινητές, που εμφανίζουν συντήρηση όμοια με εκείνη των mRNAs και των μοτίβων εναλλακτικού ματίσματος(Guttman et al., 2009), ενώ δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην αλληλουχία και την λειτουργία τους(Y. Zhao et al., 2020). Αντίθετα, η τρισδιάστατη δομή τους, ως αποτέλεσμα ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων αλλά και αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια DNA, RNA, ή πρωτεϊνών, εμφανίζει μεγάλη συντήρηση, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο ρόλος τους και ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους υπαγορεύεται μάλλον από την δομή τους(Carlevaro-Fita et al., 2019).

Όσον αφορά στην βιογένεσή τους, πολλοί θεωρούν ότι τα lncRNAs είναι παραπροϊόντα που παράγονται κατά την φυσιολογική μεταγραφή των κωδικοποιητικών γονιδίων (Tamtaji et al., 2022). Μπορούν να μεταγραφούν όχι μόνο από γονιδιακές αλληλουχίες, αλλά και από ρυθμιστικά στοιχεία του DNA, όπως από ενισχυτές και υποκινητές (Fang & Fullwood, 2016). Όπως και τα mRNAs, τα lncRNAs μεταγράφονται από την RNA pol II, με εξαίρεση κάποια που χρειάζονται την δράση της RNA pol III (Tamtaji et al., 2022). Για να πάρουν την τελική τους μορφή απαιτούν και αυτά διάφορες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως μάτισμα, προσθήκη καλύμματος στο 5' άκρο και πολύ-A ουράς στο 3' άκρο, καθώς και την δράση της RNAase P, που μέσω εγκοπών δημιουργεί ελλειπτικές δομές στο 3' άκρο, αυξάνοντας την σταθερότητά τους (J. X. Yang et al., 2016). Επίσης, περιέχουν συχνά τροποποιημένα νουκλεοτίδια, όπως N6-μεθυλοαδενοσίνη (m6A) και 5-μεθυλοκυτοσίνη (m5C), που επηρεάζουν φυσικά την τρισδιάστατη δομή και την λειτουργία τους (Oo et al., 2022). Παράγονται σε ειδικά υποκυτταρικά διαμερίσματα του πυρήνα, τα λεγόμενα "paraspeckles" (Naganuma & Hirose, 2013). Ο τελικός υποκυτταρικός εντοπισμός τους εξαρτάται από μοτίβα που φέρουν στην αλληλουχία τους και επιτρέπουν την σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων που τα παγιδεύουν στον πυρήνα ή βοηθούν τη εξαγωγή τους στο κυτταρόπλασμα με τους ίδιους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν και τα mRNAs (Tamtaji et al., 2022). Αφού βρεθούν στο κυτταρόπλασμα, πάλι ειδικά μοτίβα ορίζουν το υποκυτταρικό σωματίδιο στο οποίο θα βρεθούν (Tamtaji et al., 2022). Τέλος, μεταφέρονται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των εξωσωμάτων (Tamtaji et al., 2022).

Πέρα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά, λίγα είναι γνωστά για τα lncRNAs, καθώς παλιότερα θεωρούνταν άχρηστα μετάγραφα και οι ιδιότητές τους καθιστούσαν την απομόνωση και την μελέτη τους δύσκολη (Y. Zhao et al., 2020). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, όπως του CRISPR-Cas13, μιας τροποποίησης του συστήματος CRISPR-Cas9, τα lncRNAs μπορούν να στοχευθούν πολύ εύκολα, επιτρέποντας την αναλυτική μελέτη των λειτουργιών τους (R. W. Yao et al., 2019). Πέρα από το CRISPR-Cas 13, άλλες τεχνικές που προκαλούν απώλεια λειτουργίας των lncRNA στόχων και επομένως καταδεικνύουν τον ρόλο τους είναι το RNAi καθώς και η χρήση συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (ASOs), τα οποία λόγω του υβριδίου DNA-RNA που δημιουργούν, προσελκύουν την RNAase-H, η οποία αποικοδομεί το lncRNA στόχο (Y. Zhao et al., 2020). Και οι τρεις αυτές μέθοδοι έχουν περιορισμούς και δεν έχουν μεγάλη ευαισθησία, επομένως πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή (Y. Zhao et al., 2020). Σε γενικές γραμμές, οι λειτουργίες που έχουν βρεθεί να επιτελούν τα lncRNAs, μπορεί να ανήκουν σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό καθώς και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο και στηρίζονται στην αλληλεπίδρασή τους με μόρια στόχους όπως το DNA, άλλα μόρια RNA ή ακόμη και πρωτεΐνες (Y. Zhao et al., 2020). Πιο ειδικά, κάποιες λειτουργίες τους είναι η οργάνωση της δομής της χρωματίνης και η ρύθμιση των επιγενετικών τροποποιήσεων, η ωρίμανση των πρώιμων mRNAs (pre-mRNAs), η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων *in cis* ή *in trans*, η μετάφραση και η ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs, ο μεταβολισμός των κυτταρικών RNA, αλλά και η ρύθμιση του εντοπισμού, της δράσης και της αποικοδόμησης των κυτταρικών πρωτεϊνών (Schmitt & Chang, 2016). Μάλιστα, κάποιες μελέτες δείχνουν ότι ορισμένα lncRNAs έχουν και την δυνατότητα να κωδικοποιούν μικρού μήκους πεπτίδια, ο ρόλος των οποίων δεν έχει ερευνηθεί (Fadista et al., 2014). Επειδή ωστόσο πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα μεταγράφων, ο διαχωρισμός τους σε κατηγορίες και η άντληση πληροφοριών για την θέση τους στο γονιδίωμα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, τον μηχανισμό δράσης τους και την συντήρησή τους, βοηθά στην καλύτερη κατανόηση των λειτουργιών τους (Y. Zhao et al., 2020).

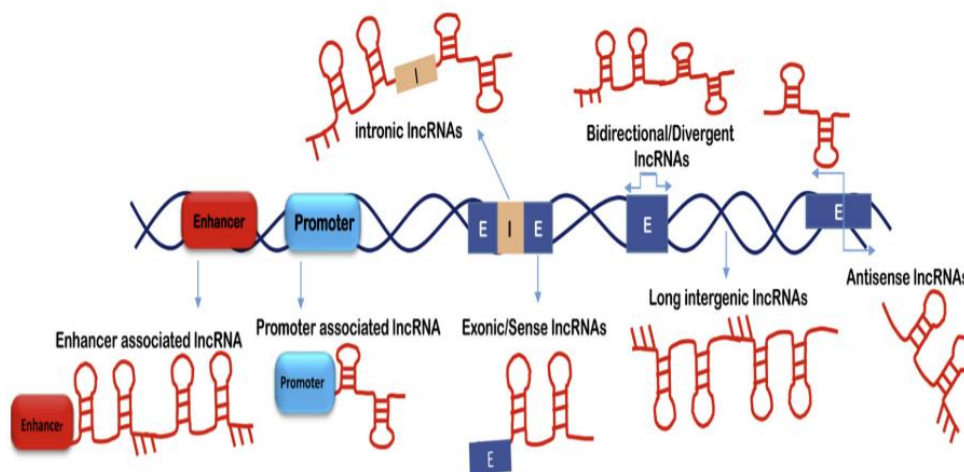
1.2.2. Ταξινόμηση των lncRNAs

- ❖ Με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα, μπορούν να διακριθούν σε (Uszczynska-Ratajczak et al., 2018) (Εικόνα 8):

1. **Γονιδιακά lncRNAs**: Ο γενετικός τους τόπος συμπίπτει με τον γενετικό τόπο κωδικοποιητικών γονιδίων (Uszczynska-Ratajczak et al., 2018). Ανάλογα με τον προσανατολισμό και την ενδογονιδιακή θέση τους, μπορούν να διακριθούν περεταίρω σε lncRNAs κύριας και συμπληρωματικής αλυσίδας ή και σε ιντρονικά και εξωνικά lncRNAs αντίστοιχα (Y. Zhao et al., 2020). Τα lncRNAs κύριας και συμπληρωματικής αλυσίδας μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ρυθμίζοντας το ένα την έκφραση του άλλου (Y. Zhao et al., 2020). Επίσης, εδώ ανήκουν και τα κυκλικά lncRNAs (circRNAs), τα οποία παράγονται κατά το μάτισμα των κωδικοποιών γονιδίων και σχηματίζουν σταθερούς κυκλικούς βρόχους (Beermann et al., 2016).

2. **Μέσογονιδιακά lncRNAs (lincRNAs)**: Ο γενετικός τους τόπος βρίσκεται ανάμεσα σε δύο κωδικοποιητικά γονίδια (Uszczynska-Ratajczak et al., 2018). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα αποκλίνοντα lncRNAs, τα οποία μεταγράφονται μαζί με γειτονικά mRNA (απέχουν λιγότερο από 1kb), από αμφίδρομους υποκινητές, και επομένως έχουν αντίθετο προσανατολισμό (Karusta & Feschotte, 2014). Η ταυτόχρονη μεταγραφή εξυπηρετεί την καλύτερη λειτουργία του υποκινητή (Albrecht & Ørom, 2016).

3. **lncRNAs ενισχυτών (eRNAs)**: Ο γενετικός τους τόπος συμπίπτει με τον ενισχυτή κωδικοποιητικών γονιδίων (Tamtaji et al., 2022).



Εικόνα 8: Η θέση των γονιδίων που κωδικοποιούν lncRNAs στο γονιδίωμα. Το E αντιπροσωπεύει τα εξώνια ενώ το I τα ιντρόνια (Dahariya et al., 2019).

❖ Με βάση τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους διακρίνονται σε (Bridges et al., 2021):

1. **Πυρηνικά lncRNAs**: Τα πυρηνικά lncRNAs είναι πιο ασταθή καθώς έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής (Ayure et al., 2015). Ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων δρώντας κυρίως ως ικρίωμα, αλληλεπιδρώντας με την χρωματίνη και ρυθμίζοντας την οργάνωσή της (Melé & Rinn, 2016).

2. **Κυτταροπλασματικά lncRNAs**: Στο κυτταρόπλασμα, τα lncRNAs συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια και επηρεάζουν την μεταγραφή των γονιδίων ρυθμίζοντας την μετα-μεταγραφική τροποποίηση και την μετάφραση των mRNAs που έχουν ήδη παραχθεί (Lin et al., 2016).

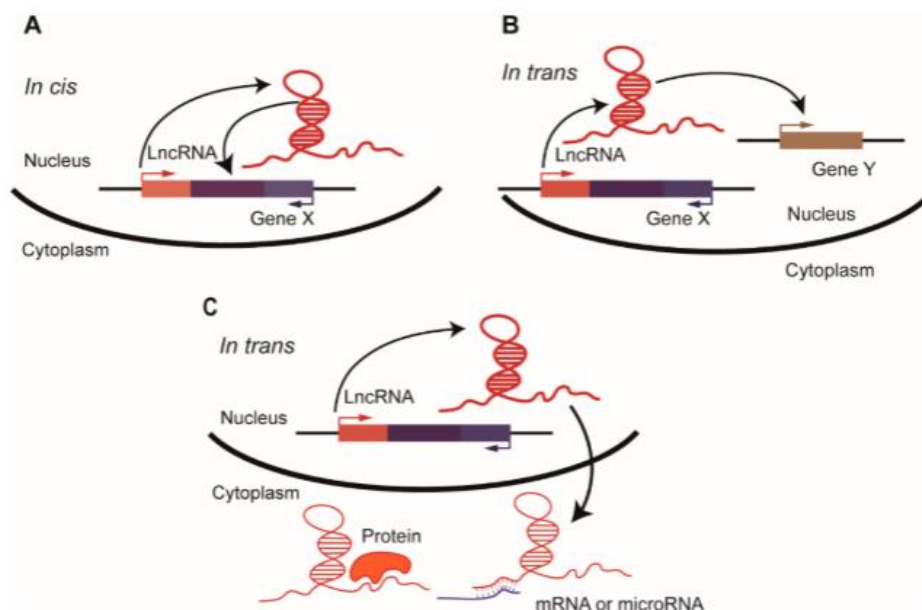
Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των lncRNAs είναι πολύ σημαντικός, καθώς καθορίζει την λειτουργία τους (Bridges et al., 2021). Ακόμη και lncRNAs με μεγάλη συντήρηση ανάμεσα σε δύο είδη, μπορεί να έχουν τελείως διαφορετική λειτουργία, ανάλογα με την θέση τους μέσα στο κύτταρο (Bridges et al., 2021).

❖ Με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, διακρίνονται σε (Y. Zhao et al., 2020) (**Εικόνα 9**):

1. **lncRNAs που δρουν in cis**: Επηρεάζουν την έκφραση γειτονικών τους γονιδίων (Y. Zhao et al., 2020). Αυτό μπορεί να γίνει είτε άμεσα χάρη στην πρωτοταγή αλληλουχία, που αλληλεπιδρά με το γονίδιο στόχο ή προσελκύει τους κατάλληλους μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα όπως η RNA Pol II, είτε έμμεσα εξαιτίας της μεταγραφής ή του ματίσματος του ίδιου του lncRNA ή και λόγω διαφόρων ρυθμιστικών στοιχείων DNA

εντός του γονιδίου του lncRNA που επιδρούν και στα γειτονικά κωδικοποιητικά γονίδια(Y. Zhao et al., 2020). Μάλιστα, κάποιες φορές το ίδιο το lncRNA δεν χρειάζεται καν να μεταγραφεί, αφού η γονιδιωματική του αλληλουχία επαρκεί για τον *cis* ρυθμιστικό του ρόλο(Engreitz et al., 2016).

2.lncRNAs που δρουν *in trans*: Απομακρύνονται από τον τόπο της μεταγραφής τους και ρυθμίζουν την έκφραση μη γειτονικών γονιδίων(Y. Zhao et al., 2020). Μπορούν να ρυθμίζουν την δομή της χρωματίνης αυτών των γονιδίων (ευχρωματίνη ή ετεροχρωματίνη, επομένως έκφραση ή αναστολή των αντίστοιχων γονιδίων), να επηρεάζουν την οργάνωση του γονιδιώματος στον πυρήνα (σχηματισμός νουκλεοσωμάτων και κατανομή ιστονών) ή και να αλληλεπιδρούν με άλλα RNA, πρωτεΐνες ή και λιπίδια, ρυθμίζοντας την δράση τους(Y. Zhao et al., 2020). Όλα τα παραπάνω μπορούν να τα επιτελέσουν μένοντας στον πυρήνα, αλλά επίσης μπορούν να μεταφερθούν και στο κυτταρόπλασμα(Y. Zhao et al., 2020).



Εικόνα 9: Τα lncRNAs μπορούν να δράσουν *in cis* (A), *in trans* μέσα στον πυρήνα (B), αλλά και *in trans* αφού εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα (C)(Y. Zhao et al., 2020).

Βέβαια, ανεξάρτητα από το αν επηρεάζουν γειτονικά ή όχι γονίδια, διακρίνονται και σε(Quinn & Chang, 2016) **(Εικόνα 10):**

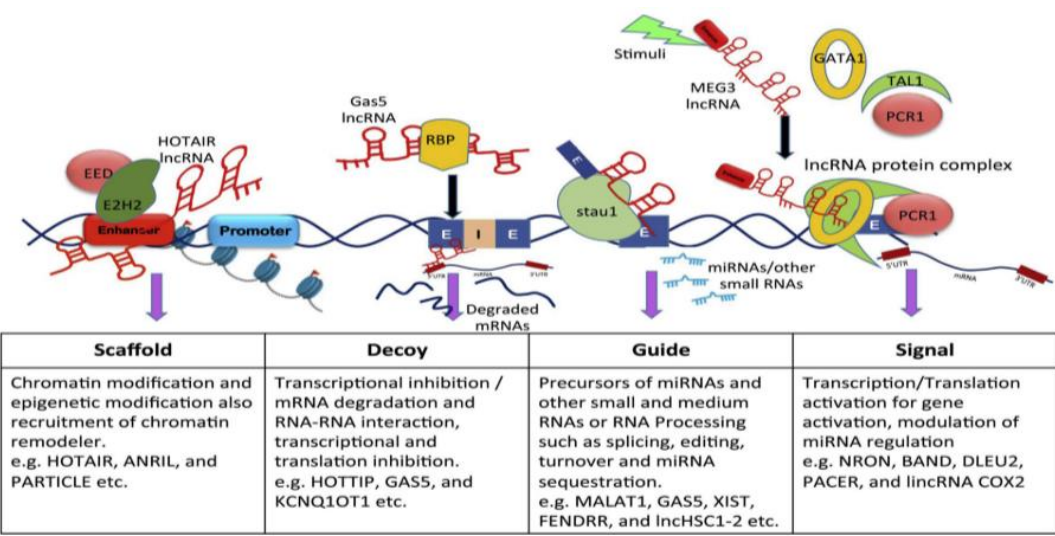
1.lncRNAs που λειτουργούν ως ικριώματα: Λειτουργούν ως ικριώματα, βοηθώντας μεταγραφικούς παράγοντες, επιγενετικούς τροποποιητές και ακόμη και την ίδια την χρωματίνη να αποκτήσουν την κατάλληλη διαμόρφωση(Hanly et al., 2018). Μπορεί να επάγουν ή και να καταστείλουν έκφραση γονιδίων(Hanly et al., 2018). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το ANRIL, το οποίο αλληλεπιδρά με πολλούς παράγοντες των συμπλόκων PCR1 και PCR2, σχηματίζοντας ετεροχρωματίνη στον γενετικό τόπο του IKN4 και καταστέλλοντας την μεταγραφή του(Aguilo et al., 2011).

2.lncRNAs που λειτουργούν ανταγωνιστικά: Λόγω συμπληρωματικότητας, αλληλεπιδρούν με mRNAs, παρεμποδίζοντας την μετάφρασή τους ή και προκαλώντας την αποικοδόμησή τους(Dahariya et al., 2019). Ένας ακόμη τρόπος δράσης τους είναι να λειτουργούν ως «μοριακά σφουγγάρια», να ανταγωνίζονται δηλαδή το γονιδίωμα για την σύνδεση με σημαντικούς παράγοντες, όπως με τις RBPs, αποτρέποντάς τες να συνδεθούν στην κανονική τους θέση και να επιτελέσουν τον ρόλο τους(He et al., 2016). Έτσι δρα το MALAT1, το οποίο συνδέεται και παγιδεύει miRNAs, αναστέλλοντας την δράση τους(Liu et al., 2017). Με miRNAs συνδέεται και το ceRNA GAPLINC, το οποίο προκαλεί γαστρικό καρκίνο αφού αλληλεπιδρά με τα miR211-3p των κυττάρων, επιτρέποντας το mRNA που κανονικά θα συνδεόταν με αυτά να εκφραστεί κανονικά, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να εκφράζουν CD44 στην επιφάνειά τους και να γίνονται μεταστατικά(Hu et al.,

2016).Βέβαια, η σύνδεση με miRNAs μπορεί να προστατεύει τα δεύτερα από αποικοδόμηση(Statello et al., 2021b), όπως κάνουν τα circRNAs(Dong et al., 2017).

3.lncRNAs οδηγοί: Βοηθούν μεταγραφικούς παράγοντες και επιγενετικούς τροποποιητές να συνδεθούν στις κατάλληλες αλληλουχίες των κωδικοποιητικών γονιδίων, προκειμένου αυτά να εκφραστούν(Dahariya et al., 2019). Για παράδειγμα, το FENDRR καθοδηγεί τους απαιτούμενους μεταγραφικούς παράγοντες στα κατάλληλα γονίδια για την ανάπτυξη του μεσοδέρματος στον ποντικό(Grote et al., 2013).

4.lncRNAs που δρουν σηματοδοτικά: Παράγονται ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα και δρουν ως συστατικά σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων(Dahariya et al., 2019). Για παράδειγμα, το lncRNA UCA1 ρυθμίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR και προκαλεί αναστολή της απόπτωσης, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου(L. M. Feng et al., 2017).



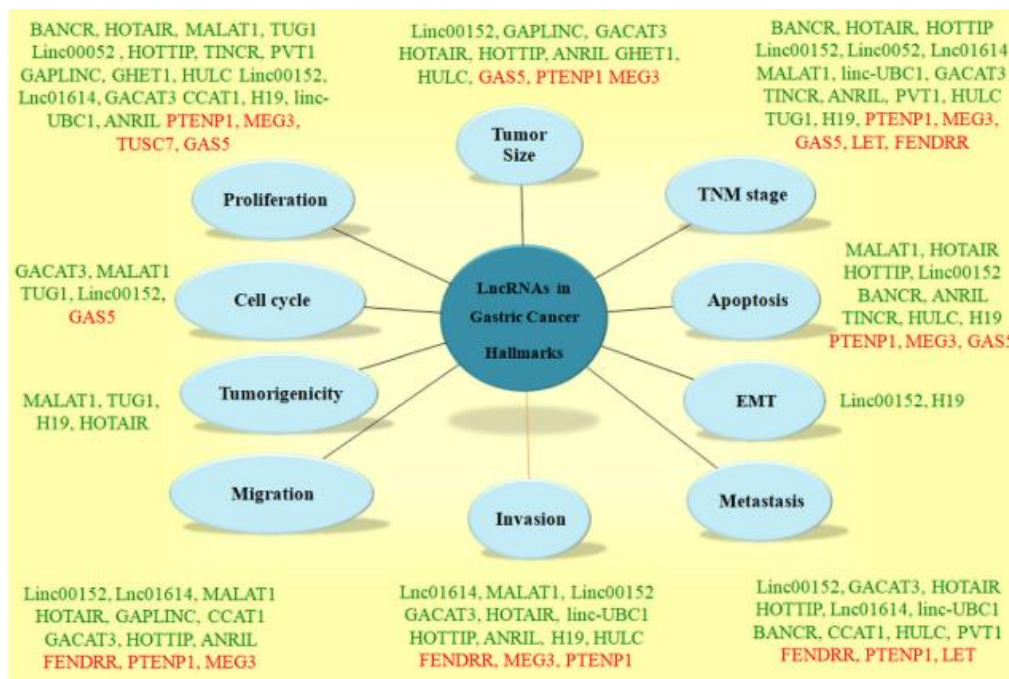
Εικόνα 10: Οι 4 μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNAs(Dahariya et al., 2019).

- ❖ Με βάση την συντήρησή τους, διακρίνονται σε(Ulitsky, 2016):
 - 1.lncRNAs Τάξης I:** Έχουν συντηρημένη την δομή των εξονίων τους (σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα MALAT1 και NEAT1)(Ulitsky, 2016).
 - 2. lncRNAs Τάξης II:** Έχουν συντηρημένη την αλληλουχία τους(Ulitsky, 2016).
 - 3. lncRNAs Τάξης III:** Έχουν συντηρημένο τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους(Ulitsky, 2016).
 - 4. lncRNAs Τάξης IV:** Δεν εμφανίζουν καμία συντήρηση(Ulitsky, 2016).

1.2.3.LncRNAs και καρκίνος

Τα lncRNAs μπορούν είτε να ενεργοποιήσουν είτε να καταστείλουν την έκφραση γονιδίων, επηρεάζοντας βιολογικές λειτουργίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο καθορισμός της γενεαλογίας, η οργανογένεση και η ομοιόσταση των ιστών, επομένως συμμετέχουν τόσο στην φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, όσο και στην ανάπτυξη ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου(KAZEMZADEH et al., 2015).

Χάρη στις τεχνολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς, ανακαλύφθηκε ότι τα lncRNAs σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση καρκίνου, καθώς έχουν βρεθεί ποιοτικές και ποσοτικές μεταλλάξεις τους σε καρκινικούς φαινοτύπους(Bhan & Mandal, 2014). Μπορούν να δράσουν είτε ως ογκογονίδια είτε ογκοκατασταλτικά(Baldassarre & Masotti, 2012). Σχετικά με τον γαστρικό καρκίνο, έχουν βρεθεί 88 lncRNAs με τροποποιημένη έκφραση σε καρκινικούς ιστούς(Y. Gu et al., 2015) **(Εικόνα 11)**.



Εικόνα 11: lncRNAs που συμμετέχουν στις κυτταρικές διαδικασίες – ορόσημα του γαστρικού καρκίνου. Με πράσινο αναγράφονται τα lncRNAs που δρουν ως ογκογονίδια, ενώ με κόκκινο αυτά που δρουν ογκοκατασταλτικά (Fattahi et al., 2020).

Σε αντίθεση με τα mRNAs, η έκφραση και οι διάφορες μεταλλάξεις (SNPs, αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, υπερμεθυλίωση υποκινητών κλπ.) των lncRNAs εμφανίζουν μεγάλη ειδικότητα ως προς τον τύπο καρκίνου, ενώ μπορούν να υποδείξουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αναστολή της απόπτωσης, μεταστατικά στάδια και άλλα σημαντικά ογκογόνα συμβάντα (Bhan et al., 2017). Επίσης, τα lncRNAs εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες, παραμένουν σχετικά σταθερά και μπορούν να ανιχνευτούν στα ανθρώπινα υγρά (πχ αίμα, ούρια κλπ.), μέσω υγρής βιοψίας (Yan et al., 2015). Συνεπώς, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως βιοδείκτες για την διάγνωση, την πρόγνωση και την θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου (Ali et al., 2018), ιδιότητες πολύ σημαντικές ειδικά στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου, για τον οποίο είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μη επεμβατικών βιοδεικτών που να προσφέρουν διαγνωστικές δυνατότητες σε πρώιμα στάδια (Allemani et al., 2018).

Επιπλέον, λόγω της μεγάλης ιστοειδικότητάς τους, καθώς και της σύνδεσής τους με τα στάδια του καρκίνου, τα lncRNAs μπορούν να αξιοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι για την ευαίσθητη και αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου (Dahariya et al., 2019). Αυτό μπορεί να γίνει με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω (RNAi, ASOs, CRISPR-CAS13), οι οποίες εισάγουν μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας, εμποδίζοντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές τους, μπλοκάροντας την αλληλεπίδρασή τους με τα μόρια στόχους τους (DNA, άλλα RNA, πρωτεΐνες) καθώς και με την χρήση απταμερών που θα μιμούνται την τρισδιάστατη δομή των lncRNAs δρώντας ανταγωνιστικά (Matsui & Corey, 2017). Πέρα από την θεραπευτική στόχευση των lncRNA που εμπλέκονται άμεσα στον καρκίνο, μπορούν να στοχευτούν και μόρια που θα βελτιώσουν την απόκριση του ασθενή σε ήδη υπάρχουσες θεραπείες (Bhan et al., 2017). Για παράδειγμα, όσον αφορά στον γαστρικό καρκίνο, το GAS5 αλληλεπιδρά ποσοτικά με τα miR-23a των καρκινικών κυττάρων, εμποδίζοντας την έκφραση της μεταλοθειονίνης 2A (MT2A), επομένως κάνει τον όγκο ανθεκτικό στην χημειοθεραπεία (Bhan et al., 2017). Συνεπώς, η στόχευσή του επιλύει το συγκεκριμένο πρόβλημα (Bhan et al., 2017).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος του στομάχου είναι μια σοβαρή παθολογία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, όπως η έλλειψη συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια, το μεγάλο κόστος ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης, η έντονη συσχέτισή του με καθημερινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι μπορούν να αποφευχθούν και η εμφάνισή του με μεγαλύτερη συχνότητα σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, καθιστούν σημαντική την προσεκτική μελέτη του. Ένας πολύ βασικός στόχος όσον αφορά στην καλύτερη κατανόηση του γαστρικού καρκίνου είναι ο μοριακός χαρακτηρισμός του, ώστε να ανακαλυφθούν βιομόρια που θα μπορούν να λειτουργήσουν ως διαγνωστικοί, προγνωστικοί αλλά και θεραπευτικοί βιοδείκτες, επιτρέποντας μια πιο εξατομικευμένη προσέγγιση της συγκεκριμένης ασθένειας. Τα lncRNAs έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια χάρη στην κατανόηση, με την βοήθεια των τεχνολογιών αλληλούχησης, του σημαντικού ρόλου τους στην ομοίωση του ανθρώπινου οργανισμού. Τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές μεταλλάξεις τους έχουν συσχετιστεί με περιστατικά καρκίνου του στομάχου, γεγονός που τα καθιστά υποψήφιους βιοδείκτες για την διάγνωση του, ενώ η εύκολη ανίχνευσή τους με μη επεμβατικές μεθόδους, όπως με υγρή βιοψία, τους προσφέρει μεγάλο πλεονέκτημα συγκριτικά με ήδη χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις.

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου ενός μη μελετημένου lncRNA, του RECUR1 (Regulating Cancer mUtation lncRNA 1), σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα στομάχου. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένοι λεντιοί που να περιλαμβάνουν στο γονιδίωμά τους ένα shRNA που να στοχεύει και να απενεργοποιεί την έκφραση του RECUR1. Μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με τους ιούς αυτούς, ακολούθησαν πειράματα μελέτης των επιπέδων έκφρασης τόσο του ίδιου του μεταγράφου του RECUR1, όσο και άλλων γονιδίων- στόχων αυτού του lncRNA. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν φαινοτυπικές μελέτες στους κυτταρικούς κλώνους, προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα για την επίδραση του RECUR1 σε συγκεκριμένα στάδια του καρκίνου, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και το μεταστατικό δυναμικό του. Παράλληλα, πάλι με την χρήση λεντιών ανασυνδυασμένων για να παράγουν ένα shRNA που να απενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 (Kruppel like factor 5), που έχει βρεθεί από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου να παίζει ρόλο στην ογκογένεση του καρκίνου του στομάχου και λεντιών που να παράγουν shRNA που να στοχεύει το κωδικοποιητικό γονίδιο CPR, σημαντικό στόχο του RECUR1, διενεργήθηκαν επιπλέον πειράματα αποσιώπησης για να μελετηθεί η επίδραση των KLF5 και CPR στην έκφραση του RECUR1, αλλά και του ρόλου του CPR στον καρκίνο του στομάχου γενικότερα.

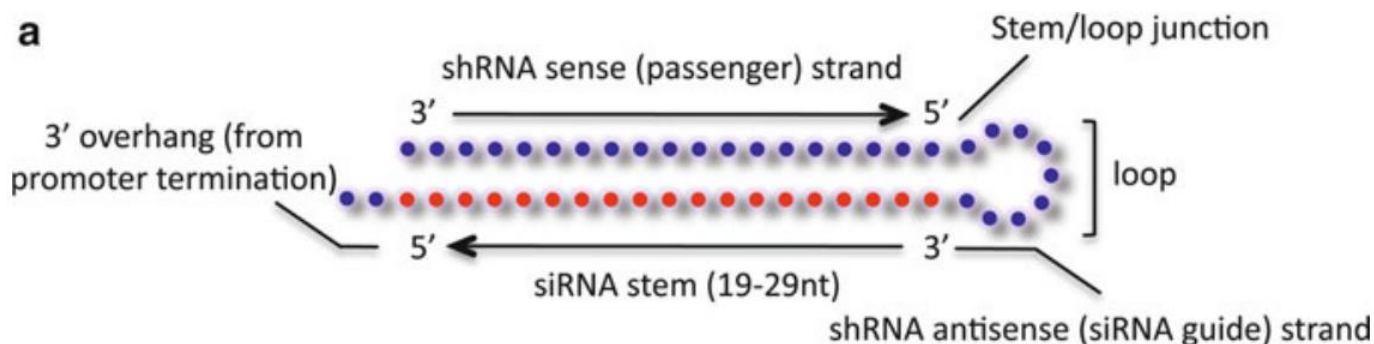
Ακόμη, σε δεύτερο στάδιο σχεδιάστηκε ένα shRNA που να στοχεύει και να απενεργοποιεί με ειδικότητα το κωδικοποιητικό γονίδιο CPR, το οποίο κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, με τον οποίο μετασχηματίστηκαν δεκτικά βακτήρια, για να τον παράγουν σε μεγάλες ποσότητες. Αφού απομονώθηκε και καθαρίστηκε από υπολείμματα, επιχειρήθηκε η διαμόλυνση κυττάρων για την παραγωγή σταθερά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών. Η επιλογή των θετικών κλώνων βασίστηκε στο σύστημα επαγόμενης σίγασης TetON. Κατόπιν, θα γίνονταν πάλι μελέτες επιπέδου έκφρασης διαφόρων γονιδίων στόχων καθώς και φαινοτυπικές παρατηρήσεις.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1. Αλληλουχίες

Για την μελέτη της έκφρασης και της πιθανής λειτουργίας του κωδικοποιητικού γονιδίου– στόχου (CPR), αποφασίστηκε η στόχευσή του με την μέθοδο του RNA interference (παρεμβολή RNA / RNAi), προκειμένου να προκληθεί η απώλεια λειτουργίας του. Αφού βρέθηκε η αλληλουχία του CPR με την βοήθεια του γονιδιωματολογικού φυλλομετρητή USCS, κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα siDESIGN της Horizon, ένα shRNA που να στοχεύει με ειδικότητα το CPR, οδηγώντας στην αποικοδόμησή του από το σύστημα RISC του κυττάρου. Ακολουθώντας την κλασική δομή των shRNAs (**Εικόνα 12**), σχεδιάστηκε η αλληλουχία του ειδικού shRNA που στοχεύει το CPR, ώστε να περιέχει 5' και 3' προεξέχοντα άκρα, αντίστοιχα αυτών που αφήνουν τα περιοριστικά ένζυμα BglIII και HindIII για να κλωνοποιηθεί στον κατάλληλο φορέα, μία αλληλουχία 19 νουκλεοτιδίων όμοια με το μετάγραφο στόχο (sense), μία αλληλουχία 19 νουκλεοτιδίων συμπληρωματική στο μετάγραφο στόχο (antisense), και ανάμεσά τους μία αλληλουχία που να επιτρέπει τον σχηματισμό βρόγχου.



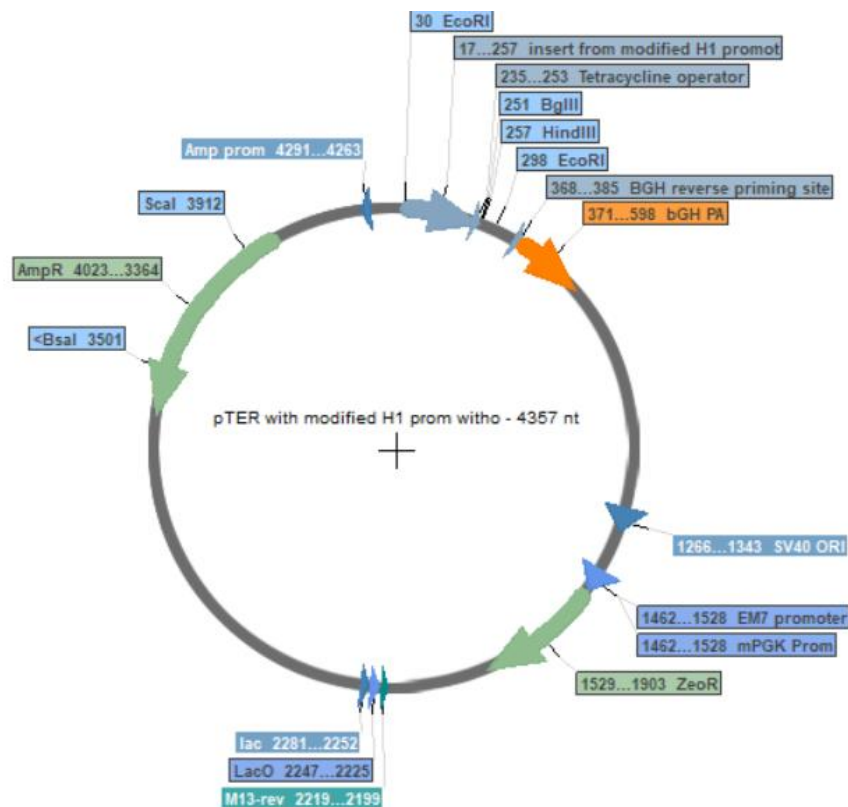
Εικόνα 12: Η κλασική δομή ενός shRNA (Lambeth & Smith, 2013).

3.1.2. Πλασμιδιακοί φορείς

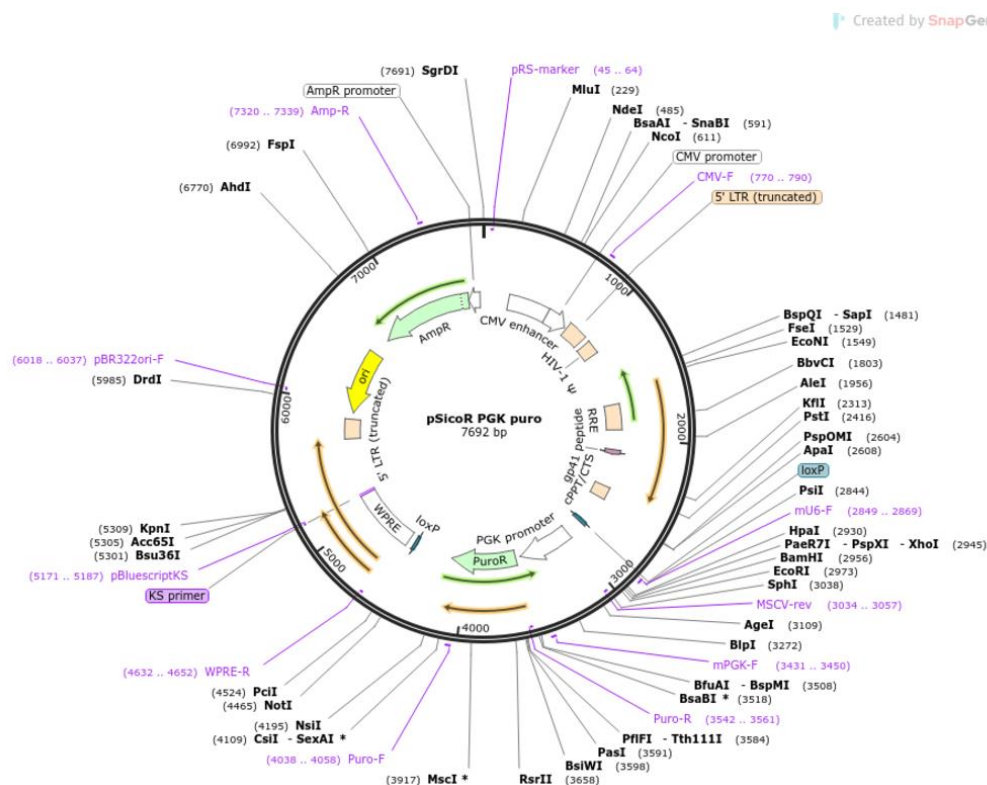
Η αλληλουχία του παραπάνω shRNA κλωνοποιήθηκε σε δύο πλασμιδιακούς φορείς, για τις δύο πειραματικές προσεγγίσεις γενετικής τροποποίησης κυττάρων θηλαστικών.

Ο πρώτος ήταν ο pTER(**Εικόνα 13**), μήκους 4357 νουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία σταθερά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών, αφού πολλαπλασιάστηκε σε κατάλληλα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα. Ο υποκινητής H1 του pTER του εργαστηρίου είχε παλιότερα συμπτυχθεί με την αλληλουχία του χειριστή TetO, στην οποία προσδένεται η αλληλουχία TetR. Έτσι, δίνει τη δυνατότητα επαγόμενης καταστολής της παραγωγής του διαγονιδίου shRNA με το σύστημα TetON, εφόσον εισαχθεί σε κύτταρα που παράγουν την TetR. Για την κλωνοποίηση με τα shRNA του CPR και του CPR1 χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα BglIII και HindIII, που αφήνουν κολλώδη άκρα και έχουν μοναδικές θέσεις κοπής στο γονιδίωμα του πλασμιδίου. Για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων αξιοποιήθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη που αυτός φέρει.

Ο δεύτερος φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pSicoR PGK puro, μήκους 7692 νουκλεοτιδίων (**Εικόνα 14**), που συνέβαλε στην παροδική γενετική τροποποίηση των κυττάρων θηλαστικών μέσω μόλυνσής τους με λεντιούς. Η κλωνοποίηση του με τα shRNA του CPR, του RECUR1 και του KLF5 έγινε με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων HpaI και XhoI, που αφήνουν τυφλά και κολλώδη άκρα αντίστοιχα και έχουν μοναδικές θέσεις κοπής στο γονιδίωμα του πλασμιδίου. Και αυτός πολλαπλασιάστηκε σε βακτηριακά κύτταρα πριν την εισαγωγή του στους ιούς, ενώ η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων έγινε πάλι χάρη στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη που φέρει στο γονιδίωμά του.



Εικόνα 13: Χάρτης του φορέα pTER που απεικονίζει τα σημαντικά λειτουργικά στοιχεία του και τις θέσεις κοπής των ενζύμων BglII, HindIII, EcoRI, Scal και Bsal. Πηγή: Serial Cloner



Εικόνα 14: Χάρτης του φορέα pSicoR PGK puro που απεικονίζει τα βασικά λειτουργικά στοιχεία του και ενδεικτικές θέσεις κοπής σημαντικών περιοριστικών ενζύμων. Πηγή: Addgene

Επιπλέον, για την παροδική γενετική τροποποίηση των κυττάρων θηλαστικών μέσω διαμόλυνσης με λεντιούς, χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα με τον pSicoR PGK puro άλλοι δύο πλασμιδιακοί φορείς. Ο pMD2.G, ο οποίος φέρει το γονίδιο για την πρωτεΐνη VSV G, απαραίτητη για την δημιουργία του φακέλου του

ιού, καθώς και ο psPax2, ο φορέας πακεταρίσματος, που φέρει τα υπόλοιπα γονίδια για τον σχηματισμό των λεντιών.

3.1.3. Βακτηριακά στελέχη

Ο πολλαπλασιασμός των παραπάνω ανασυνδυασμένων φορέων έγινε σε στελέχη του βακτηρίου *E.coli*.

Πιο συγκεκριμένα, ο φορέας pTER πολλαπλασιάστηκε σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a, τα οποία μετασχηματίζονται με μεγάλη αποτελεσματικότητα χάρη στην μετάλλαξη *recA1*, που προσδίδει σταθερότητα στην κλωνοποιημένη αλληλουχία και προτιμώνται για γενετικές τροποποιήσεις χάρη στην μετάλλαξη *endA*, που επιτρέπει την απομόνωση μεγάλης ποσότητας καθαρού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

Ο φορέας pSicoR PGK ruo πολλαπλασιάστηκε σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους XL1 Blue, που είναι το ίδιο αποτελεσματικά για μετασχηματισμούς και γενετικές τροποποιήσεις με τα DH5a, αφού φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις.

3.1.4. Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τα συγκεκριμένα πειράματα αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1):

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥΣ ΣΤΟΙΧΕΙΑ. ΠΗΓΗ: CELLOSaurus - CELL LINE ENCYCLOPEDIA

Κυτταρική σειρά	Πληροφορίες
GES1	Ανθρώπινα αθανатоποιημένα φυσιολογικά κύτταρα επιθηλιακής μορφολογίας με προέλευση από το γαστρικό επιθήλιο.
HFE	Ανθρώπινα αθανатоποιημένα φυσιολογικά κύτταρα επιθηλιακής μορφολογίας με προέλευση από το γαστρικό επιθήλιο.
AGS	Ανθρώπινα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα στομάχου, επιθηλιακής μορφολογίας, που απομονώθηκαν από ασθενή με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα.
NUGC-4	Ανθρώπινα πρώιμα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα γαστρικής προέλευσης, που απομονώθηκαν από ασθενή με μετάσταση σε λεμφαδένες.
KATOIII	Ανθρώπινα πρώιμα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα γαστρικής προέλευσης, που απομονώθηκαν από ασθενή με πλευριτική έκχυση.
MKN45	Ανθρώπινα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα στομάχου, απομονώθηκαν από ασθενή με ηπατική μετάσταση γαστρικού αδενοκαρκινώματος.

AGS	Ανθρώπινα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα στομάχου, επιθηλιακής μορφολογίας, που απομονώθηκαν από ασθενή με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, τροποποιημένα για να παράγουν την πρωτεΐνη TetR (υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο).
HEK-293	Αθανατοποιημένα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, επιθηλιακής μορφολογίας, απομονώθηκαν από νεφρικό επιθήλιο εμβρύου.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Διερεύνηση της έκφρασης διαφόρων lncRNA και γονιδίων στόχων τους σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου

3.2.1.1. Σύνθεση cDNA

Προκειμένου να αποφασιστεί ποια lncRNAs ή και γονίδια στόχοι τους σχετίζονται περισσότερο με τον γαστρικό καρκίνο, δείγματα RNA των CPR, Tspan8 και RECUR1, που ήδη υπήρχαν σε απόθεμα στους -80°C στο εργαστήριο, μετατράπηκαν σε cDNA. Για να βρεθεί η κατάλληλη ποσότητα RNA που θα προστεθεί στην αντίδραση, γίνονται υπολογισμοί ώστε η συγκέντρωση του RNA να είναι τουλάχιστον 100ng/μl, σε τελικό όγκο 10μl. Σε ένα σωληνάριο Eppendorf των 1,5ml τοποθετήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια (Πίνακας 2) για το πρώτο διάλυμα της αντίδρασης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 20μl)
RNA + ddH ₂ O	10μl
dNTPs, 10mM	1μl
Τυχαία εξαμερή, 10mM, Takara	1μl

Στην συνέχεια, το πρώτο διάλυμα επωάστηκε για 5 λεπτά στους 65°C και κατόπιν αναμείχθηκε με το δεύτερο διάλυμα που απαιτείται για την σύνθεση του cDNA (Πίνακας 3), τα συστατικά του οποίου φαίνονται παρακάτω.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΔΕΥΤΕΡΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 20μl)
First strand buffer, 5(x), Invitrogen	4μl
DTT, 0,1M, Invitrogen	2μl
MMLV (200 U/μl), Invitrogen	1μl
RNAase out (40U/μl), Invitrogen	1μl

Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2 ώρες και στο τέλος προστέθηκαν 380μl ddH₂O. Τέλος, η συγκέντρωση του cDNA μπορεί να μετρηθεί με το φωτόμετρο Quawell Q3000 UV. Το cDNA μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C.

3.2.1.2. Ποσοτική PCR (qPCR)

Στην συνέχεια, τα παραπάνω cDNA χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί μια αρχική ποσοτική PCR, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του επιπέδου έκφρασης γονιδίων. Η qPCR περιλαμβάνει 45 κύκλους σύνθεσης DNA 4 σταδίων ο καθένας (Πίνακας 4), κατά τους οποίους η ποσότητα του παραγόμενου

προϊόντος ανιχνεύεται χάρη στην χρήση της SYBRGREEN, που δεσμεύεται μόνο σε δίκλινα μόρια DNA και εκπέμπει φθορισμό. Για να αποφευχθούν λανθασμένα συμπεράσματα απαιτείται η κανονικοποίηση με ιδιοσύστατα γονίδια (housekeeping genes), των οποίων η έκφραση είναι σταθερή σε όλα τα είδη κυττάρων. Η qPCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Bio-Rad, και ο σχεδιασμός της αντίδρασης έγινε με το πρόγραμμα CFX manager. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Microsoft Excel. Στην συγκεκριμένη διερευνητική αντίδραση μελετήθηκαν τα προαναφερθέντα γονίδια, στις κυτταρικές σειρές GES1, HFE, AGS, NUGC4, KATOIII και MKN45, δηλαδή σε φυσιολογικές και καρκινικές σειρές στομάχου. Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΩΝ 45 ΚΥΚΛΩΝ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ PCR ΚΑΙ ΟΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΟΥΣ.

Στάδιο κύκλου qPCR	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 λεπτά
Αποδιάταξη	95 °C	20 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση εκκινήτων	58 °C	2 λεπτά
Επιμήκυνση	72 °C	15 δευτερόλεπτα

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΜΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 15μl)
cDNA δείγματος	4μl
Primers mix (Forward και Reversed), 10μM Eurofins	2μl
SYBR Master Mix(2X), KAPA	7,5μl
ddH ₂ O	1,5μl

3.2.2. Μέθοδοι για την δημιουργία παροδικά γενετικά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών με διαμόλυνση με λεντιούς

3.2.2.1. Απομόνωση RNA

Τρεις μέρες μετά από την γενετική τροποποίηση και αλλαγή θρεπτικού, έγινε απόχυση του υπερκειμένου από τα 18 πηγαδάκια του πειράματος για την απομόνωση RNA(κύτταρα GES-1, AGS και MKN-45 τροποποιημένα με τον pSicoR/shRECUR1, τον pSicoR/shKLF5 και τον pSicoR/sh2CPR) και προστέθηκαν 700μl διαλύματος τριζόλης στο καθένα. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε erppendorf και αφού επωάστηκαν για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 200μl χλωροφορμίου και έγινε ανάδευση με Vortex για 30 περίπου δευτερόλεπτα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000rpm στους 4°C για 5 λεπτά και έπειτα 500μl του υπερκειμένου αναμείχθηκαν με 500μl ισοπροπανόλης και επωάστηκαν για δέκα λεπτά στον πάγο. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 13.000rpm στους 4°C για 15 λεπτά και αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70%. Έγινε ακόμη μία φυγοκέντρηση στα 13.000rpm στους 4°C για 5 λεπτά και μετά την απόχυση του υπερκειμένου το ίζημα του RNA αφέθηκε να στεγνώσει. Τέλος, το απομονωμένο RNA επαναδιαλύθηκε σε 50μl ddH₂O και επωάστηκε για 5 λεπτά στους 65°C. Η συγκέντρωση του απομονωμένου RNA μετρήθηκε στο φωτόμετρο Quawell Q3000 UV. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C.

3.2.2.2. Κατεργασία με DNAase

Αφού απομονώθηκε το RNA των 18 δειγμάτων ακολούθησε η κατεργασία του με DNAase, ώστε να αποικοδομηθούν τυχόν υπολείμματα DNA . Σε 18 σωληνάρια Erppendorf τοποθετήθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 6):

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΕ DNAASE

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 30μl)
RNA + ddH ₂ O	25,5μl
Διάλυμα δράσης της DNAase, 10(x), ThermoFisher scientific	3μl
DNAase, ThermoFisher scientific	1μl
RNAase out (40U/μl), Invitrogen	0,5μl

Η ποσότητα του RNA υπολογίζεται με τέτοιον τρόπο ώστε η συγκέντρωσή του στον όγκο της αντίδρασης να μην υπερβαίνει τα 10μg συνολικά. Κατόπιν, το μείγμα αναδεύτηκε με Vortex για 3 περίπου δευτερόλεπτα και ακολούθησε μια σύντομη φυγοκέντρηση 1 λεπτού στα 13.000rpm (spin). Τέλος, το διάλυμα επωάστηκε για 1 ώρα στους 37°C.

Έπειτα, ακολούθησε η διαδικασία καθαρισμού με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.3.8. Με αυτόν τον τρόπο αυξήθηκε η καθαρότητα του RNA των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του απομονωμένου καθαρού RNA μετρήθηκε στο φωτόμετρο Quawell Q3000 UV. Το RNA μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C.

3.2.2.3. Σύνθεση cDNA

Στην συνέχεια, το υπερκάθαρο απομονωμένο RNA των 18 δειγμάτων του πειράματος μετατράπηκε σε cDNA, με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1.1.

3.2.2.4. Ποσοτική PCR (qPCR)

Τέλος, με το cDNA των παραπάνω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μία ποσοτική PCR όπως ακριβώς περιγράφεται και στην ενότητα 3.2.1.2, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των shRECUR1, shKLF5 και sh2CPR στην γονιδιακή έκφραση των τριών κυτταρικών σειρών.

3.2.2.5. Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (CFA)

Περίπου 10-14 μέρες μετά την τελευταία αλλαγή θρεπτικού στα κύτταρα των 6-well plates, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών, μια *in vitro* τεχνική για την μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού μεμονωμένων αποικιών κυττάρων. Την 5^η μέρα για το πείραμα με το shRECUR και την 4^η μέρα για το πείραμα με το sh2CPR έγινε λήψη φωτογραφιών με το μικροσκόπιο προκειμένου να εκτιμηθεί το μέγεθος των κλώνων που αναπτύχθηκαν, ενώ την δέκατη μέρα έγινε χρώση των τρυβλίων και των δύο πειραμάτων με μπλε του μεθυλενίου, προκειμένου να μετρηθεί ο αριθμός των αποικιών.

3.2.2.6. Δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound healing)

Τέλος, μία μέρα μετά την τελευταία αλλαγή θρεπτικού στα κύτταρα των 6-well plates, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία επούλωσης πληγών, μια *in vitro* μέθοδος για την μελέτη του μεταναστευτικού δυναμικού του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, έγινε χάραξη μίας γραμμής για να διαταραχθεί η συνοχή της στιβάδας των κυττάρων και λήφθηκαν φωτογραφίες την χρονική στιγμή 0, σε 24 ώρες και σε 48 ώρες (με εξαίρεση τα MKN45 κύτταρα που χρειάστηκαν 7 24ωρα) και στα ίδια σημεία της τομής, ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για το πώς η σίγηση των RECUR1 και CPR επιδρά στην μετανάστευση των καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων.

3.2.3. Μέθοδοι για την δημιουργία σταθερά γενετικά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών με διαμόλυνση με το pTER

3.2.3.1. Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων

Αρχικά ενώθηκαν η κύρια (sense oligos) και η συμπληρωματική (antisense oligos) αλυσίδα του shRNA του CPR προκειμένου να δημιουργηθεί ένα δίκλωνο μόριο. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης της υβριδοποίησης, με την προσθήκη σε ένα σωληνάριο Eppendorf των 1,5ml των ακόλουθων αντιδραστηρίων (Πίνακας 7):

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 100μl)
Sense oligos (100μM)	2μl
Antisense oligos (100μM)	2μl
Διάλυμα υβριδοποίησης (pTER και 100mM KoAc, 30mM Hepes, 2mM MgAc)	96μl

Η υβριδοποίηση ολοκληρώθηκε καθώς το διάλυμα επωαζόταν στους 100°C για 5 λεπτά. Τα υβριδοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια αποθηκεύονται στους 20°C.

3.2.3.2. Αντίδραση λιγάσης

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση λιγάσης προκειμένου να ενωθεί το δίκλωνο πλέον shRNA του CPR με τον πλασμιδιακό φορέα pTER. Το εργαστήριο διέθετε απόθεμα φορέα pTER που είχε ήδη υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και HindIII, στους -20°C. Σε ένα σωληνάριο Eppendorf των 1,5ml προστέθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια (Πίνακας 8):

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 10μl)
Υβριδοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια sh2CPR	4μl
Γραμμοποιημένος φορέας pTER (50ng/μl)	1μl
Διάλυμα για την δράση της T4 DNA λιγάσης, NEB	1μl
T4 DNA λιγάση, EnzyQuest	0,5μl
ddH2O	3,5μl

Για να συνδεθεί το δίκλωνο sh2CPR με τον φορέα pTER απαιτείται επώαση 16 ωρών στους 16°C. Σε αυτό το στάδιο δημιουργήθηκε και ένα αρνητικό control, δηλαδή ένας φορέας pTER που έκανε self-ligation, χωρίς να περιέχει κανένα διαγονίδιο. Για την παρασκευή του, αντί για 4μl sh2CPR προστέθηκαν 4μl επιπλέον ddH2O.

3.2.3.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών

Το επόμενο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός των βακτηρίων DH5a με τα προϊόντα της παραπάνω αντίδρασης λιγάσης. Στο εργαστήριο υπήρχαν ήδη σε απόθεμα στους -20°C δεκτικά κύτταρα DH5a. Σε δύο σωληνάκια Eppendorf των 1,5ml αναμείχθηκαν 50μl κυττάρων DH5a με 5μl του ανασυνδυασμένου και του self-ligated φορέα pTER αντίστοιχα. Ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Κατόπιν, εκτελέστηκε η διαδικασία του θερμικού σοκ, κατά την οποία το μείγμα επωάστηκε για 45 δευτερόλεπτα στο υδατόλουτρο στους 42°C και στην συνέχεια για 2 λεπτά στον πάγο. Με τις μεταβολές της θερμοκρασίας, οι φορείς pTER εισέρχονται στα βακτήρια. Προκειμένου να πολλαπλασιαστούν τα βακτήρια, συνεπώς και οι πλασμιδιακοί φορείς, προστέθηκαν σε κάθε Eppendorf 1ml θρεπτικού υλικού για υγρή καλλιέργεια βακτηρίων χωρίς αμπικιλίνη,

κάτω από άσηπτες συνθήκες. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν υπό ανάδευση (160 rpm) για 50 λεπτά στους 37°C και στην συνέχεια 300μl αυτών επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό για βακτήρια (άγαρ), με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml. Αφού οι στερεές αποικίες επωάστηκαν στους 37°C για 18 με 20 ώρες, επιλέχθηκαν 3 μεμονωμένες αποικίες μετασχηματισμένων πλέον βακτηρίων για το pTER/Sh2CPR και μία για το αρνητικό control και τοποθετήθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες σε 3ml υγρού θρεπτικού η κάθε μία, αυτή την φορά με αμπικιλίνη, σε συγκέντρωση 100μg/ml. Τέλος, οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν υπό ανάδευση (210rpm) στους 37°C για 18 με 20 ώρες, προκειμένου το pTER/sh2CPR να παραχθεί σε πολλά αντίγραφα.

3.2.3.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pTER και του αρνητικού control προκειμένου αυτά να εισαχθούν στα κύτταρα θηλαστικών. Στην αρχή αυτή η απομόνωση έγινε ακολουθώντας ένα απλό πρωτόκολλο του εργαστηρίου για να μην γίνει κατάχρηση των εμπορικών kit, σε περίπτωση που οι αποικίες που επιλέχθηκαν δεν περιείχαν φορείς pTER στους οποίους να είχε ενσωματωθεί το sh2CPR. Πιο συγκεκριμένα, μεταφέρθηκαν 2ml της κάθε υγρής καλλιέργειας σε ένα σωληνάριο Eppendorf των 2ml και φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά, στην μέγιστη ταχύτητα της φυγοκέντρου, δηλαδή στα 13.000rpm, στους 4°C. Μετά την απόχυση του υπερκείμενου, προστέθηκαν 100μl διαλύματος I (**Πίνακας 9**) ενώ το ίζημα φυλασσόταν στον πάγο και το δείγμα αναδεύτηκε με Vortex, με αποτέλεσμα τα βακτηριακά κύτταρα να έχουν μετατραπεί σε σφαιροπλάστες, έτοιμα να υποστούν λύση. Έπειτα έγινε προσθήκη 200μl διαλύματος II (**Πίνακας 9**) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αυτήν την φορά, επομένως τα βακτήρια λύθηκαν. Προστέθηκαν 150μl από το διάλυμα III (**Πίνακας 9**) και μετά από ήπια ανάδευση το μείγμα επωάστηκε για 5 λεπτά στον πάγο και μετουσιώθηκαν ακόμη και οι πρωτεΐνες. Στην συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στους 4°C στα 13.000rpm, και αποφεύγοντας το ίζημα, 400μl υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε νέο σωληνάριο Eppendorf των 1,5ml. Αμέσως μετά, προστέθηκαν στο Eppendorf 1ml EtOH 100% και έγινε επώαση για τουλάχιστον 20 λεπτά στους -80°C. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στα 13.000rpm και στους 4° C και κατόπιν της απόρριψης του υπερκείμενου προστέθηκαν 500μl EtOH 70%. Τέλος, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε μία τελευταία φορά για 5 λεπτά στους 4°C και στα 13.000rpm, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει τελείως. Εφόσον όλη η υγρασία είχε απομακρυνθεί, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH2O, επωάστηκε για 5 λεπτά στους 65°C, αναδεύτηκε με Vortex και μετά από μία σύντομη φυγοκέντρωση (spin) του 1 λεπτού, το καθαρό πλασμιδιακό DNA ήταν πλέον απομονωμένο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ HOMEMADE ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Διάλυμα	Σύσταση Διαλύματος
Διάλυμα I (3M KOAc, pH=6, 4oC)	50mM Tris, 10mM EDTA, ddH2O
Διάλυμα II (θερμοκρασία δωματίου)	1% SDS, 0,2M NaOH, ddH2O
Διάλυμα III (3M KOAc, pH=6, 4oC)	60ml 5M οξικό κάλιο, 11,5ml άνυδρο οξικό οξύ, 28,5ml ddH2O

3.2.3.5. Αντίδραση πέψης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα απομονωμένα πλασμίδια pTER φέρουν το διαγονίδιο sh2CPR, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση πέψης, συνοδευόμενη από μια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Πέρα από το αρνητικό control του self-ligated pTER, χρησιμοποιήθηκε και ένα θετικό control, δηλαδή ένας φορέας pTER από τα

αποθέματα του εργαστηρίου στους -20°C, που είχε ανασυνδυαστεί παλιότερα επιτυχώς, με άλλο διαγονίδιο. Η πέψη αποφασίστηκε να γίνει με την χρήση του ενζύμου EcoRI υψηλής πιστότητας (HF), καθώς όπως φαίνεται και από τον χάρτη του pTER (**Εικόνα 13**), στο γονιδίωμά του υπάρχουν δύο θέσεις κοπής του ενζύμου, μια πριν και μία μετά την θέση ένθεσης του διαγονιδίου. Αυτό επιτρέπει την διεξαγωγή συμπερασμάτων για την επιτυχία του ανασυνδυασμού, ανάλογα με τις ζωνώσεις που θα δώσουν τα θραύσματα στην τελική ηλεκτροφόρηση. Για τις αντιδράσεις πέψης, προετοιμάστηκαν συνολικά 5 σωληνάρια Eppendorf των 2ml, στο καθένα από τα οποία προστέθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια (**Πίνακας 10**):

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΕΨΗΣ.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Όγκος ανά αντίδραση (V _{TEP} = 25ML)
Απομονωμένος πλασμιδιακός φορέας	7μl
Διάλυμα CutSmart (10x) (NEB)	2,5μl
EcoRI HF (NEB)	1,5μl
ddH ₂ O	14μl

Ακολούθησε η επώαση των αντιδράσεων στους 37°C για 2 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκε η πέψη, σε κάθε Eppendorf προστέθηκαν 5μl 6(x) χρωστικής φόρτωσης (LD) και ετοιμάστηκε μία πηκτή αγαρόζης 1,5%, με ανάμιξη των ακόλουθων αντιδραστηρίων (**Πίνακας 11**):

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1,5%.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες ανά αντίδραση
Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x	300ml
Αγαρόζη (Nippon Genetics Europe)	4,5gr
Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr)	9μl

Πριν την προσθήκη του EtBr προηγήθηκε θέρμανση του μείγματος για 5 λεπτά. Αφού η πηκτή αγαρόζης τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και έπηξε, φορτώθηκαν 30μl από κάθε αντίδραση πέψης στα πηγαδάκια και 3μl ladder που υποδεικνύει διαφορές στο μέγεθος των θραυσμάτων μέχρι και 100bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 130V και μετά από περίπου μία ώρα τα θραύσματα έδωσαν διαφορετικές ζωνώσεις.

3.2.3.6. Απομόνωση καθαρού πλασμιδιακού DNA από ανακαλλιέργεια (midi prep).

Αφού επιβεβαιώθηκε ότι στον απομονωμένο pTER είχε εντεθεί το sh2CPR, ακολούθησε ανακαλλιέργεια υπό άσηπτες συνθήκες μίας εκ των τριών αποικιών σε 3ml υγρού θρεπτικού, με αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100μg/ml και εκ νέου απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, αυτήν την φορά με το MIDI plasmid kit της εταιρείας Macherey Nagel. Αυτό το στάδιο γίνεται προκειμένου να απομονωθεί επαρκής ποσότητα DNA καλύτερης ποιότητας, αναγκαίο για την γενετική τροποποίηση που θα ακολουθήσει. Το απομονωμένο DNA μετρήθηκε στο φωτόμετρο Quawell Q3000 UV.

3.2.3.7. Γραμμοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

Για να εισαχθούν τα απομονωμένα ανασυνδυασμένα πλασμίδια στα κύτταρα, θα πρέπει από κυκλικά να μετατραπούν σε γραμμικά, επομένως στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μία πέψη για να γραμμοποιηθούν. Χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Scal, το οποίο κόβει τον pTER όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13**, σε μια μοναδική θέση κοπής που δεν επηρεάζει το διαγονίδιο. Στην πραγματικότητα, η γραμμοποίηση έγινε δύο φορές, με μικρές τροποποιήσεις που φαίνονται παρακάτω (**Πίνακας 12**), προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερο αποτέλεσμα. Για την αποτελεσματικότερη λειτουργία του ενζύμου, την πρώτη φορά, το συνολικό απομονωμένο πλασμιδιακό DNA χωρίστηκε σε 3 σωληνάρια eppendorf , επομένως έγιναν συνολικά 3

πέψεις, με τις παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων (**Πίνακας 12Α**) στο καθένα. Την δεύτερη φορά, που έγινε μετά τον πρώτο καθαρισμό (περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1.8.), όλη η ποσότητα του καθαρισμένου απομονωμένου DNA υπέστη γραμμοποίηση σε μία μόνο αντίδραση (**Πίνακας 12Β**), για να γραμμοποιηθούν όσα μόρια δεν ευθυγραμμίστηκαν την πρώτη φορά.

Επιπλέον, παράλληλα με το κύριο ερευνητικό σκοπό, πραγματοποιήθηκε και γραμμοποίηση έτοιμου ανασυνδυασμένου pTER για το διαγονίδιο sh1CPR, που υπήρχε στα αποθέματα του εργαστηρίου στους -20°C, προκειμένου να δημιουργηθούν σταθερές γενετικά τροποποιημένες σειρές και για αυτό το γονίδιο -στόχο. Αυτήν την φορά χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Bsal, που όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 13** κόβει σε μοναδική θέση του pTER χωρίς να επηρεάζει το διαγονίδιο sh1CPR, ενώ πάλι για την καλύτερη λειτουργία του ενζύμου, το συνολικό πλασμιδιακό DNA χωρίστηκε σε 3 σωληνάρια Eppendorf και έγιναν 3 παράλληλες αντιδράσεις πέψης με τα ακόλουθα αντιδραστήρια (**Πίνακας 12**) στην κάθε μία:

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ. ΜΕ ΜΠΛΕ ΧΡΩΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ pTER/sh2CPR (Α ΚΑΙ Β), ΕΝΩ ΜΕ ΡΟΖ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ pTER/sh1CPR.

Γραμμοποίηση του πλασμιδίου pTER/sh2CPR				Γραμμοποίηση του πλασμιδίου pTER/sh1CPR	
Α		Β			
Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 50μl)	Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 50μl)	Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 30μl)
Πλασμιδιακό DNA	40μl	Πλασμιδιακό DNA	40μl	Πλασμιδιακό DNA	7μl
Διάλυμα δράσης του Scal, 10(x), Minotech	5μl	Διάλυμα δράσης του Scal	3μl	Διάλυμα δράσης του Bsal	3μl
Scal, Minotech	2μl	Scal	3,5μl	Bsal	2μl
ddH2O	2μl	ddH2O	3,5μl	ddH2O	18μl

Οι αντιδράσεις πέψης ολοκληρώθηκαν μετά από επώαση 4 ωρών στους 37°C. Για την πρώτη προσπάθεια γραμμοποίησης (Α) του pTER/sh2CPR, μετά από τις 3 πρώτες ώρες επώασης προστέθηκε άλλο 1μl ενζύμου Scal.

Μετά τις αντιδράσεις πέψης, πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές αгарόζης 1% (ίδια σύσταση με αυτή που περιγράφεται στον **Πίνακα 11**, απλά αντί για 1,5 gr αгарόζης προστέθηκαν 1gr), για να ελεγχθεί η επιτυχημένη ευθυγράμμιση των πλασμιδίων. Από την αντίδραση γραμμοποίησης του pTER/sh2CPR 5μl του συνολικού όγκου αναμείχθηκαν με 3μl χρωστικής φόρτωσης 6(x) και 10μl ddH2O, ενώ από την γραμμοποίηση του pTER/sh1CPR, 3μl του συνολικού όγκου αναμείχθηκαν με 3μl χρωστικής φόρτωσης 6(x) και 12μl ddH2O. Τα τελικά αυτά παρασκευάσματα φορτώθηκαν σε πηγαδάκια και η ηλεκτροφόρηση έγινε όπως ακριβώς περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1.5.

3.2.3.8. Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Αφού τα απομονωμένα πλασμίδια pTER/sh2CPR γραμμοποιήθηκαν, έπρεπε το DNA να καθαριστεί με το πρωτόκολλο φαινόλης χλωροφορμίου, προκειμένου να απομακρυνθούν οι όποιες προσμίξεις. Αυτό συμβάλλει στην πιο αποτελεσματική γενετική τροποποίηση των κυττάρων. Η διαδικασία του καθαρισμού επαναλήφθηκε δύο φορές, μία μετά την πρώτη γραμμοποίηση (Α) και μία μετά την δεύτερη (Β).

Επιπλέον, καθαρισμός με φαινόλη χλωροφόρμιο έγινε και για τον δεύτερο πειραματικό στόχο, δηλαδή την τροποποίηση των κυττάρων με τα πλασμίδια pTER/sh1CPR.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους που χρειάστηκαν φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 13):

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Η ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ. ΜΕ ΜΠΛΕ ΧΡΩΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΤΟΥ pTER/sh2CPR (Α ΚΑΙ Β), ΕΝΩ ΜΕ ΡΟΖ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΤΟΥ pTER/sh1CPR

Καθαρισμός pTER/sh2CPR				Καθαρισμός pTER/sh1CPR	
Α		Β			
Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 400μl)	Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 400μl)	Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (Vτελ = 400μl)
Πλασμιδιακό DNA	135μl	Πλασμιδιακό DNA	45μl	Πλασμιδιακό DNA	81μl
Sodium acetate, 3M, 10(x)	40μl	Sodium acetate, 3M, 10(x)	40μl	Sodium acetate, 3M, 10(x)	40μl
ddH ₂ O	225μl	ddH ₂ O	315μl	ddH ₂ O	279μl
Χλωροφόρμιο	400μl	Χλωροφόρμιο	400μl	Χλωροφόρμιο	400μl

Αφού προστέθηκε και το χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε ανάμιξη με Vortex για περίπου 10 με 15 δευτερόλεπτα, τα δείγματα και στις 3 αντιδράσεις καθαρισμού φυγοκεντρήθηκαν στα 13.000rpm για 5 λεπτά, στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση το DNA βρίσκεται στην πάνω, την οργανική φάση. Επομένως, αφού οι πάνω φάσεις προστέθηκαν σε νέα σωληνάρια Eppendorf των 1,5ml, προστέθηκαν επίσης 1ml 100% αιθανόλης και τα μείγματα επωάστηκαν στους -80°C για περίπου 12 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 13.000rpm, στους 4°C και αφού έγινε απόχυση των υπερκείμενων, προστέθηκαν στα ιζήματα 500μl αιθανόλης 70% και ξαναφυγοκεντρήθηκαν στα 13.000rpm, στους 4°C, αυτήν την φορά για 5 λεπτά. Κατόπιν απομακρύνθηκαν τα υπερκείμενα και τα ιζήματα αφέθηκαν να στεγνώσουν. Μετά την απομάκρυνση όλης της υγρασίας, επαναδιαλύθηκαν σε 40μl ddH₂O και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στους 65°C. Στην συνέχεια έγινε ανάμιξη για περίπου 10 δευτερόλεπτα με Vortex και ξανά επώαση για 5 λεπτά στους 65°C. Μετά από μία σύντομη φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 1 λεπτό (spin) στους 4°C, τα απομονωμένα πλασμίδια ήταν πλέον πεντακάθαρα και έτοιμα για να εκτελεστεί η γενετική τροποποίηση. Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε στο φωτόμετρο Quawell Q3000 UV.

3.2.3.9. Γενετική τροποποίηση κυτταρικών σειρών

Τέλος, τα καθαρά απομονωμένα πλασμίδια pTER/sh1CPR και pTER/sh2CPR χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο για να τροποποιήσουν την κυτταρική σειρά AGS, που ήδη είχε τροποποιηθεί για να εκφράζει την πρωτεΐνη TetR. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία και για τα δύο πειράματα. Αρχικά, στο eppendorf με το πλασμιδιακό DNA προστέθηκαν 250μl FBS, ενώ σε ένα δεύτερο eppendorf των 1,5ml προστέθηκαν πάλι 250μl FBS και κατάλληλη ποσότητα ενός λιπόφιλου παράγοντα, ώστε η αναλογία [πλασμίδιο]/[λιπόφιλος παράγοντας] να είναι 1:4. Αυτός ο λιπόφιλος παράγοντας επιτρέπει στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια να εισαχθούν στα κύτταρα. Προηγουμένως, ο λιπόφιλος παράγοντας είχε επωαστεί για 5 λεπτά στους 50-60°C. Αφού τα διαλύματα επωάστηκαν για 5 λεπτά και γινόταν κατά διαστήματα ήπια ανάδευσή τους, το περιεχόμενο των δύο σωληναρίων αναμείχθηκε και ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά.

Κατόπιν, έγινε θρυψινοποίηση και αλλαγή θρεπτικού (RPMI) στα κύτταρα, ενώ 10μl αυτών τοποθετήθηκαν σε ένα eppendorf που περιείχε 80ml FBS και 10μl χρωστικής Trypan Blue προκειμένου να βρεθεί η συγκέντρωση των κυττάρων με την χρήση μίας πλάκας Neubauer. Με την βοήθεια του μικροσκοπίου μετρήθηκαν τα ζωντανά κύτταρα και κατάλληλος όγκος αυτών προστέθηκε σε ένα νέο falcon, ώστε συνολικά να υπάρχουν 2.000.000 κύτταρα (απαραίτητος αριθμός για γενετική τροποποίηση). Στο ίδιο falcon προστέθηκε και κατάλληλη ποσότητα RPMI για να γίνει ο τελικός όγκος 1ml. Αφού τελείωσε η εικοσάλεπτη

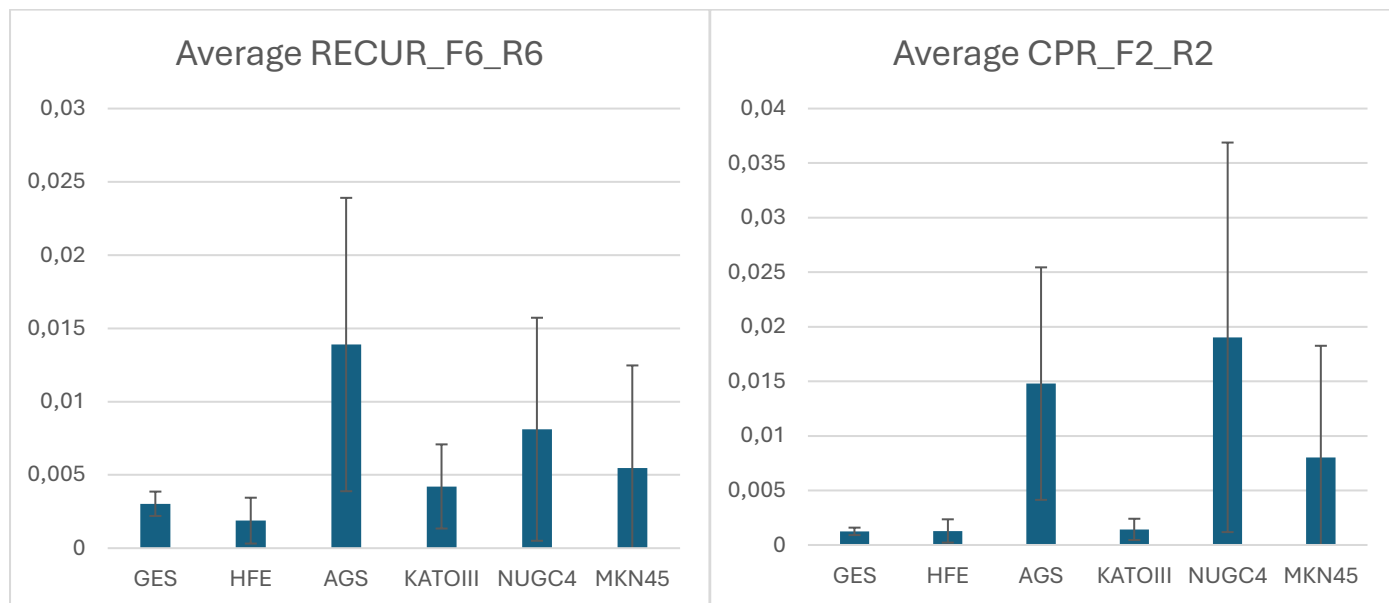
επώαση, στο falcon αυτό προστέθηκαν και τα 500μl του πλασμιδίου με τον λιπόφιλο παράγοντα και μετά από νέα επώαση 20 λεπτών για να γίνει καλή ανάμειξη των δύο διαλυμάτων, εισήχθησαν στο falcon 5,5 ml θρεπτικού. Τέλος, τα 7ml των κυττάρων με το πλασμίδιο και τον λιπόφιλο παράγοντα τοποθετήθηκαν σε φλάσκα που ήδη περιείχε 10ml RPMI με αντιβιοτικά συντήρησης.

Μετά από 24 ώρες, ακολούθησε αλλαγή θρεπτικού και επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων με την ταυτόχρονη χρήση δύο αντιβιοτικών, της βλαστισιδίνης, που χρησιμοποιείται για την επιλογή των κυττάρων που όντως παράγουν την πρωτεΐνη TetR, καθώς και της ζηοσίνης, που βοηθά στην επιλογή μόνο των κυττάρων στα οποία έχουν εισαχθεί οι πλασμιδιακοί φορείς pTER, αφού ο pTER περιέχει το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 13**. Συγκεκριμένα, σε 50ml RPMI με FBS και αντιβιοτικά συντήρησης, προστέθηκαν 50μl βλαστισιδίνης και 250μl ζηοσίνης, και μετά από καλή ανάμειξη, 15ml αυτού του θρεπτικού εισήχθησαν στην φλάσκα των μετασχηματισμένων AGS, από τα οποία είχε αφαιρεθεί ο χθεσινός ορός. Μετά και από αυτήν την διαδικασία, τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 10-14 μέρες μέχρι να αρχίσουν να αναπτύσσονται κλώνοι.

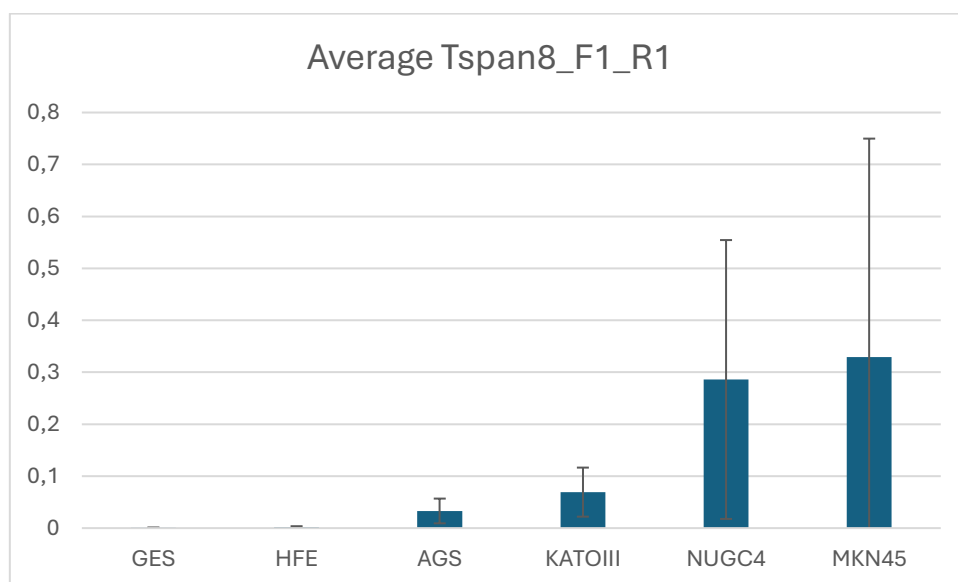
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Διερεύνηση της έκφρασης του RECUR1 και γονιδίων στόχων του σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου

Αρχικά μελετήθηκε με qPCR η έκφραση του RECUR1 και δύο γονιδίων στόχων του, των CPR και Tspan8, στις κυτταρικές σειρές AGS, HFE, GES-1, NUGC4, KATOIII και MKN45. Για κάθε γονίδιο σε κάθε κυτταρική σειρά έγιναν δύο βιολογικές επαναλήψεις, και ως επίπεδο έκφρασης θεωρήθηκε η μέση τιμή αυτών. Για την κανονικοποίηση της έκφρασής τους χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος έκφρασης των γονιδίων GAPDH, RPLP1 και Actin, τα οποία είναι ιδιοσυστάτα, εκφράζονται δηλαδή στα ίδια επίπεδα σε όλα τα είδη κυττάρων. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αυτών απεικονίζονται παρακάτω (**Εικόνες 15α – 15β**).



Εικόνα 15α: Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίου RECUR1(αριστερά) και CPR (δεξιά), κανονικοποιημένα με τον μέσο όρο έκφρασης των ιδιοσυστάτων γονιδίων GAPDH, RPLP1 και Actin.



Εικόνα 15β: Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Tspan8, κανονικοποιημένα με τον μέσο όρο έκφρασης των ιδιοσυστάτων γονιδίων GAPDH, RPLP1 και Actin.

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου ακολουθούν παρόμοια πρότυπα έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, το CPR φαίνεται να εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε όλες τις

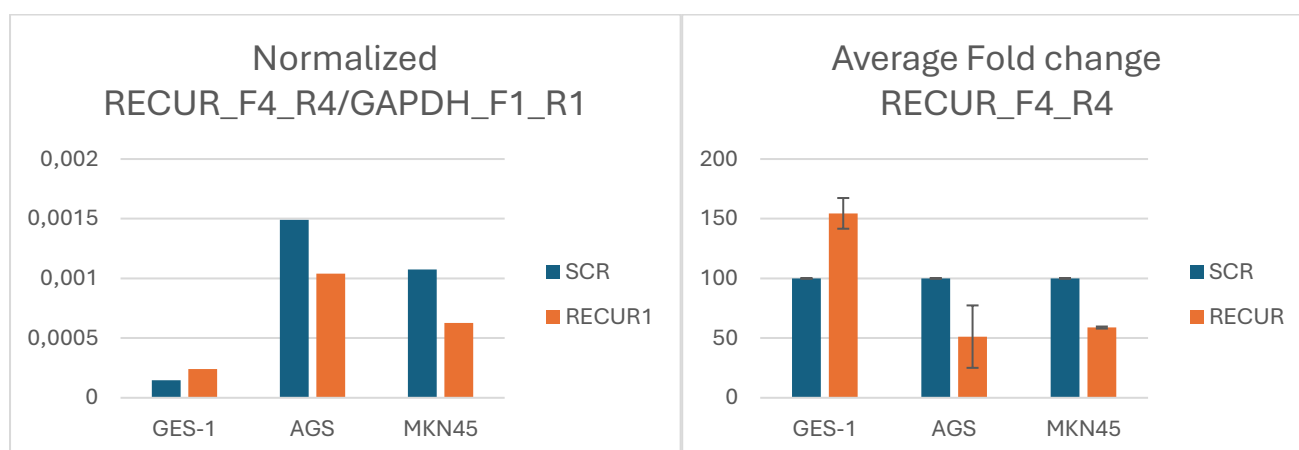
καρκινικές σειρές σε σχέση με τα φυσιολογικά γαστρικά κύτταρα, με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στα κύτταρα NUGC4, ενώ η μικρότερη αύξηση παρατηρείται στην κυτταρική σειρά KATOIII. Όσον αφορά το RECUR1, και αυτό υπερεκφράζεται σε όλες τις καρκινικές σειρές, όμως εδώ η μεγαλύτερη αύξηση εμφανίζεται στα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα (AGS) και όχι στα μεταστατικά. Τέλος, το γονίδιο Tsran8 δεν εκφράζεται σχεδόν καθόλου στις φυσιολογικές κυτταρικές σειρές του στομάχου, σε αντίθεση με τις καρκινικές σειρές, στις οποίες εκφράζεται σε μεγάλη ποσότητα, ειδικά στα μεταστατικά κύτταρα.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα RECUR1 και CPR, τα οποία εκφράζονται σημαντικά και στις φυσιολογικές και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Και για τα δύο γονίδια χρησιμοποιήθηκαν ήδη ανασυνδυασμένοι pSicoR φορείς που υπήρχαν στο εργαστήριο και έγινε διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών GES, AGS και MKN45, προκειμένου να συγκριθούν φυσιολογικά, πρωτογενή καρκινικά και μεταστατικά κύτταρα. Επιπλέον, για το CPR αποφασίστηκε να εντεθεί και σε πλασμιδιακό φορέα pTER και να παραχθούν σταθερές κυτταρικές σειρές GES1, AGS και MKN45 στις οποίες να είναι απενεργοποιημένο.

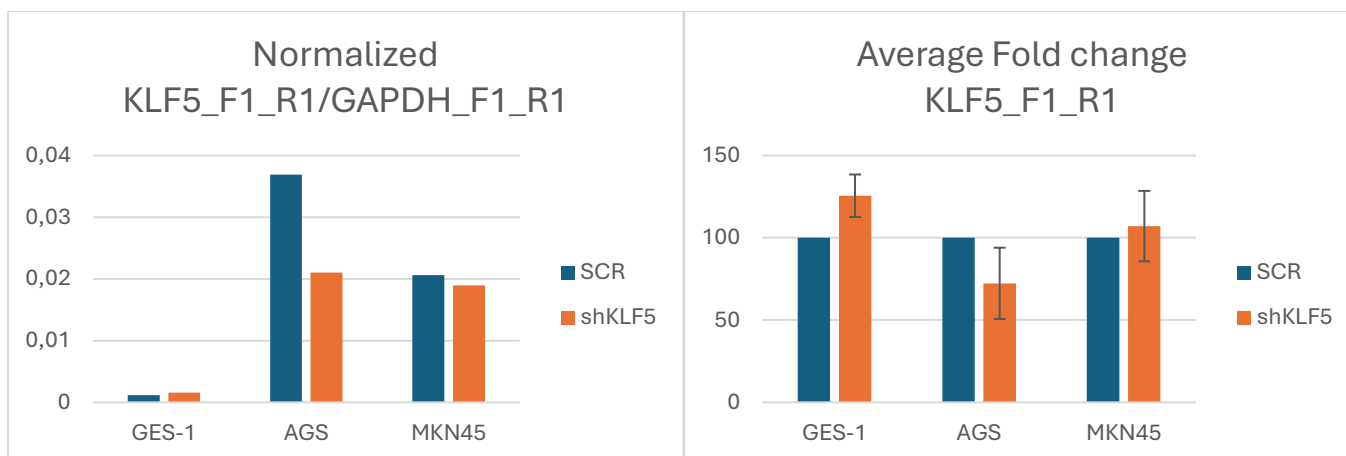
4.2. Αποτελέσματα παροδικής γενετικής τροποποίησης των κυτταρικών σειρών με τα pSicoR/shRECUR1, pSicoR/shKLF5 και pSicoR/sh2CPR μέσω λεντιών

4.2.1. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης των στοχευμένων γονιδίων στις τροποποιημένες με λεντιούς κυτταρικές σειρές

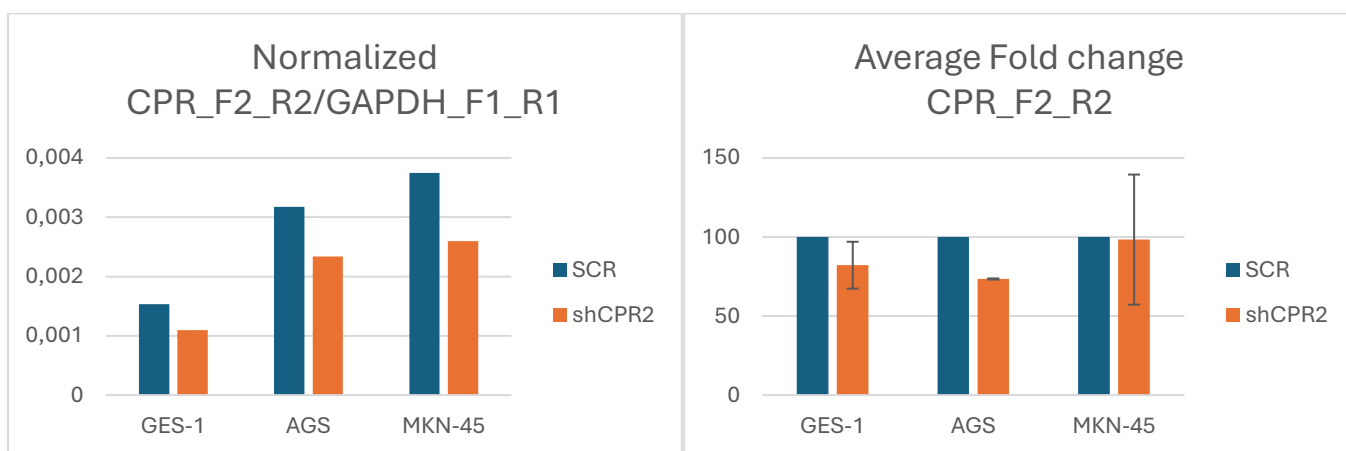
Σε πρώτη φάση διενεργήθηκαν qPCR προκειμένου να εξακριβωθεί αν η αποσιώπηση των γονιδίων στόχων στέφθηκε με επιτυχία. Για κάθε γονίδιο, με την χρήση των κατάλληλων primers πραγματοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις και η τιμή έκφρασής του προέκυψε από τον μέσο όρο αυτών. Για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρία ιδιόσυστατα γονίδια αναφοράς, τα GAPDH, Actin και RPLP1, ενώ κατόπιν, οι κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης διαιρέθηκαν με την τιμή έκφρασης του shSCR για περαιτέρω κανονικοποίηση. Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των RECUR1 (**Εικόνα 16**), KLF5 (**Εικόνα 17**) και CPR (**Εικόνα 18**) στις κυτταρικές σειρές GES1, AGS και MKN45.



Εικόνα 16: Αριστερά απεικονίζεται το διάγραμμα έκφρασης του RECUR1 κανονικοποιημένο ενδεικτικά με το GAPDH, ενώ δεξιά απεικονίζονται οι μέσες τιμές της έκφρασης του RECUR1 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με τις τιμές έκφρασης του shSCR και μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους.



Εικόνα 17: Αριστερά απεικονίζεται το διάγραμμα έκφρασης του KLF5 κανονικοποιημένο ενδεικτικά με το GAPDH, ενώ δεξιά απεικονίζονται οι μέσες τιμές της έκφρασης του KLF5 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με τις τιμές έκφρασης του shSCR και μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους.



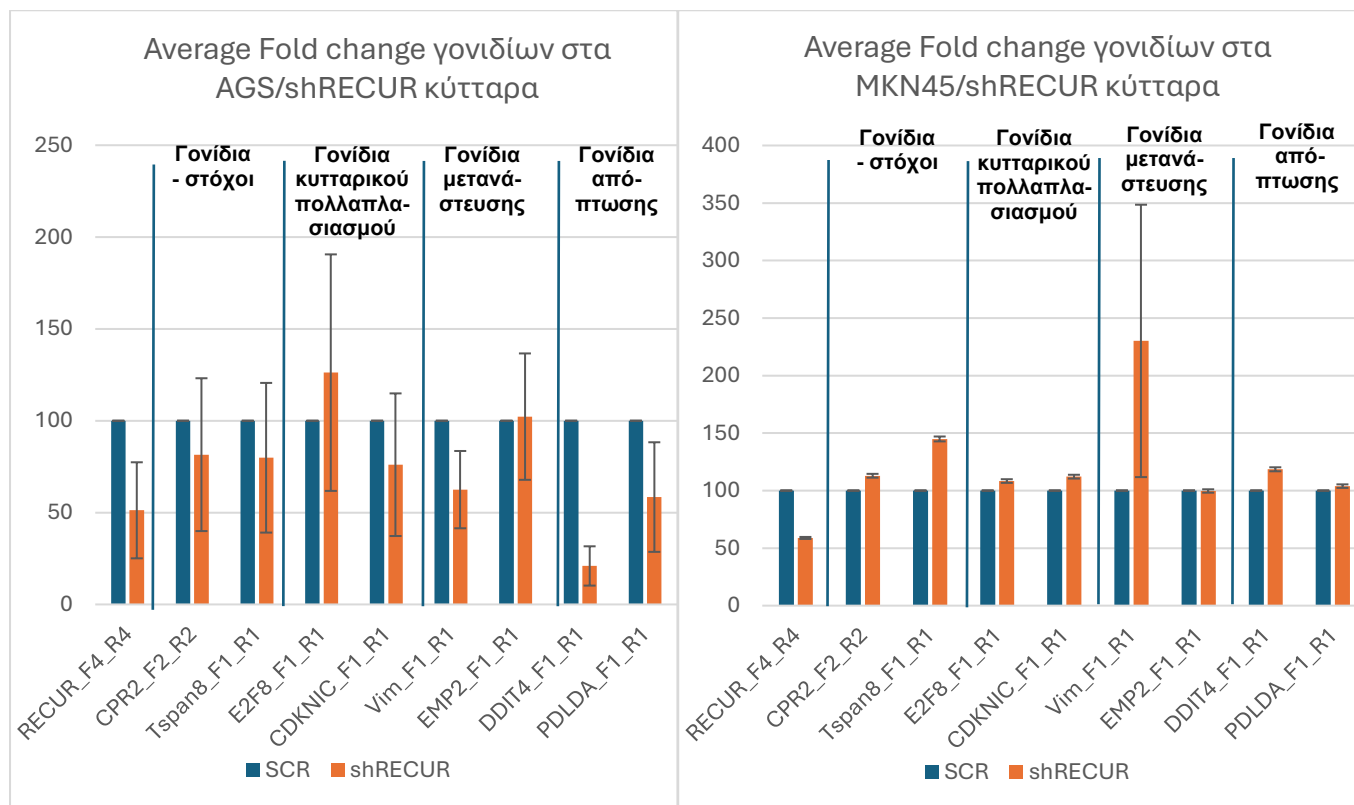
Εικόνα 18: Αριστερά απεικονίζεται το διάγραμμα έκφρασης του CPR κανονικοποιημένο ενδεικτικά με το GAPDH, ενώ δεξιά απεικονίζονται οι μέσες τιμές της έκφρασης του CPR με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με τις τιμές έκφρασης του shSCR και μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ότι η αποσιώπηση του RECUR1 έγινε μόνο στις κυτταρικές σειρές AGS και MKN45, το KLF5 αποσιωπήθηκε μόνο στα AGS κύτταρα, ενώ η έκφραση του CPR σιγήθηκε στις κυτταρικές σειρές GES1 και AGS. Να σημειωθεί ότι για τα γονίδια RECUR1 και KLF5, οι κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης στα GES1 κύτταρα δεν μπορούν να ληφθούν υπ' όψιν λόγω της χαμηλής έκφρασης τόσο του shSCR όσο και των ίδιων των διαγονιδίων στα GES1, όπως φαίνεται στα διαγράμματα με τις κανονικοποιημένες τιμές. Επομένως, στα επόμενα βήματα μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της αποσιώπησης των γονιδίων στόχων μόνο στις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές.

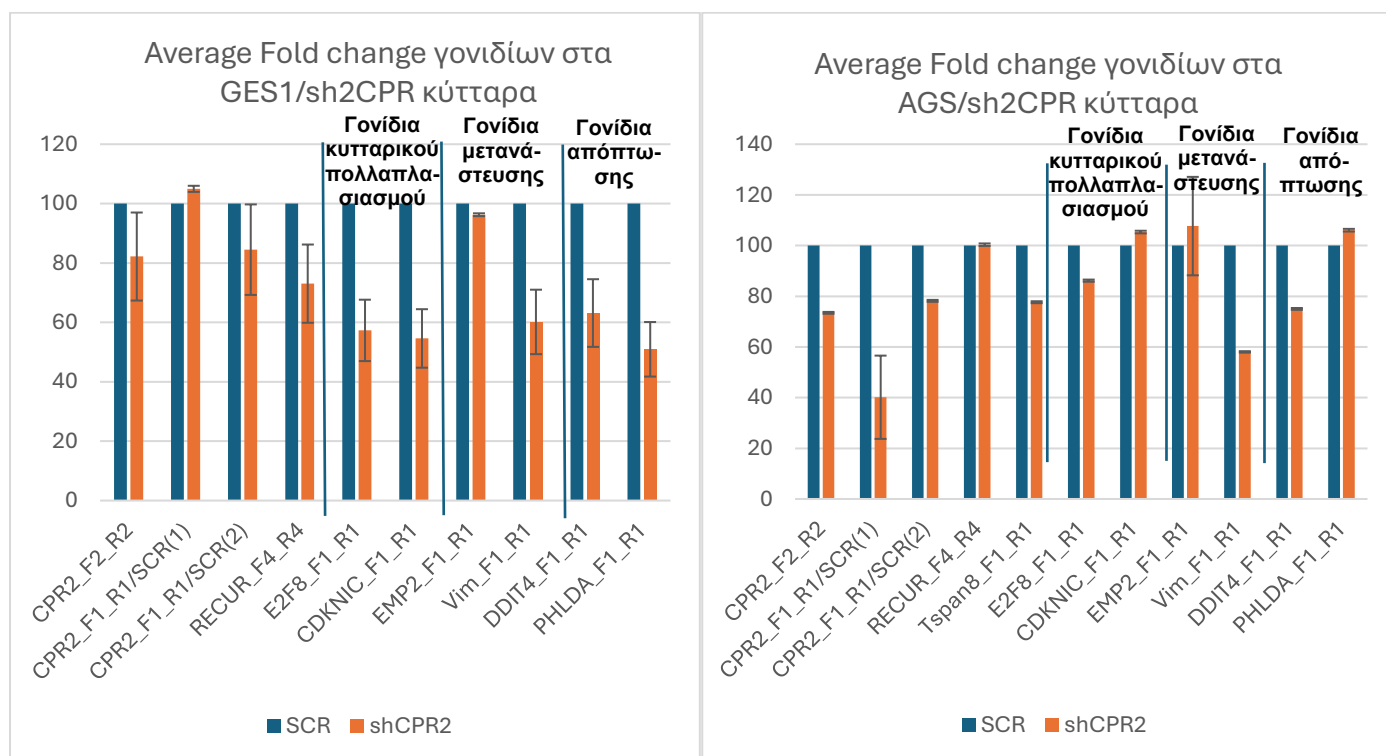
4.2.2. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες

Στην συνέχεια, ακολούθησαν επιπλέον qPCR, στις οποίες με την χρήση των κατάλληλων primers μελετήθηκε επιπλέον η έκφραση ορισμένων ενδεικτικών γονιδίων που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, με σκοπό να κατανοηθεί η δράση των RECUR1 και CPR στα φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα του στομάχου. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η έκφραση του Tsran8, που αποτελεί γονίδιο με σημαντικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο, όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της qPCR που διενεργήθηκε στην ενότητα 4.1, των E2F8 και CDKNIC, που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, των Vim και EMP2, που συμμετέχουν στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάσταση, και των DDIT4 και PHLDA, που επηρεάζουν την διαδικασία της απόπτωσης. Επίσης, στα κύτταρα στα οποία έγινε σίγηση του RECUR1 μελετήθηκε και η έκφραση του CPR, ενώ στα κύτταρα στα οποία είχε γίνει σίγηση του CPR μελετήθηκε η έκφραση του

RECUR1, για να διαλευκανθεί η μεταξύ τους σχέση. Η έκφραση όλων αυτών των γονιδίων μελετήθηκε και στις 3 κυτταρικές σειρές, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τον τρόπο που αναφέρεται στην ενότητα 4.2.1. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις **Εικόνες 19 και 20**, ενώ η ερμηνεία τους περιορίστηκε στις κυτταρικές σειρές AGS και MKN45 για τα shRECUR1 constructs και στις σειρές GES1 και AGS για τα sh2CPR constructs.



Εικόνα 19: Οι μέσες τιμές έκφρασης των γονιδίων – στόχων του RECUR1 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με την έκφρασή του shSCR, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους, στα AGS κύτταρα (αριστερά) και στα MKN45 κύτταρα (δεξιά).

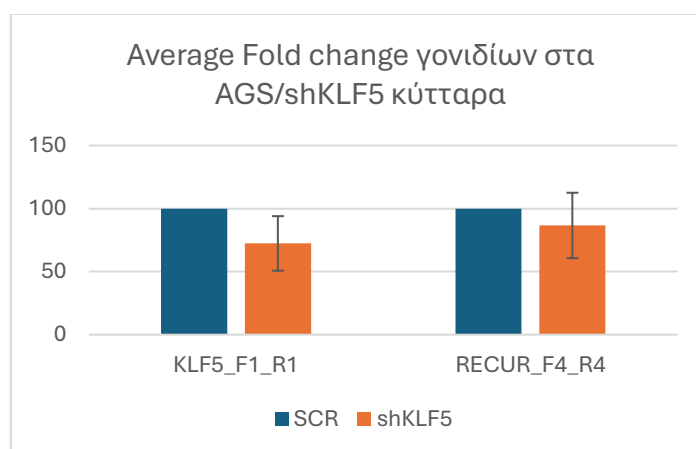


Εικόνα 20: Οι μέσες τιμές έκφρασης των γονιδίων – στόχων του CPR με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με την έκφρασή του shSCR, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους, στα GES1 κύτταρα (αριστερά) και στα AGS κύτταρα (δεξιά).

Μελετώντας τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αποσιώπηση του RECUR1 δεν επηρέασε την έκφραση του CPR, ωστόσο οδήγησε σε υπερέκφραση του Tsran8 κατά 41% στα MKN45 κύτταρα, υπερέκφραση του E2F8 κατά 26% στα AGS κύτταρα (το ποσοστό στην πραγματικότητα είναι μεγαλύτερο λόγω προβλήματος στην κανονικοποίηση των τιμών στα AGS κύτταρα με την χρήση της Actin, γεγονός που αιτιολογεί και την μεγάλη τυπική απόκλιση) και καμία σημαντική μεταβολή του CDKNIC. Όσον αφορά την Vim, δεν μπορούν να ληφθούν υπόψιν οι τιμές έκφρασης ούτε στα AGS ούτε στα MKN45 κύτταρα, αφού δεν σημειώθηκε επαρκής έκφραση του γονιδίου ούτε στα shSCR ούτε στα shRECUR1 constructs. Η αποσιώπηση του RECUR1 οδήγησε επίσης σε υπερέκφραση του EMP2 στα AGS κύτταρα (μεγάλη τυπική απόκλιση και εδώ, θεωρείται σωστό το ποσοστό υπερέκφρασης 26% που δίνει η κανονικοποίηση με την GAPDH, αφού πάλι υπάρχει πρόβλημα στην κανονικοποίηση με την Actin), σε υποέκφραση του DDIT4 στα AGS κύτταρα και σε μια μικρή τάση υπερέκφρασης στα MKN45 κύτταρα (μικρό ποσοστό – 18%, στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας) καθώς και σε υποέκφραση κατά 42% στα AGS κύτταρα.

Σχετικά με την αποσιώπηση του CPR, παρατηρείται ότι προκάλεσε υποέκφραση του RECUR1 κατά 27% στα GES1 κύτταρα, μειορρύθμιση του Tsran8 κατά 23% στα AGS κύτταρα, μειορρύθμιση του E2F8 στα GES1 κύτταρα και μια τάση μείωσης της έκφρασής του στα AGS (μικρό ποσοστό – 14%, στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας), μειορρύθμιση του CDKNIC στα GES1 κύτταρα κατά 46%, μειορρύθμιση της Vim κατά 40% στα GES1 κύτταρα και καμία επίδραση στο EMP2. Επίσης, η σίγηση του CPR οδήγησε σε μειορρύθμιση του DDIT4 κατά 37% στα GES1 κύτταρα και κατά 25% στα AGS, καθώς και μειορρύθμιση του PHLDA1 κατά 50% στα GES1 κύτταρα.

Στις κυτταρικές σειρές που έγινε αποσιώπηση του KLF5 μελετήθηκε μόνο η επίδρασή της στην έκφραση του RECUR1, για να αναλυθεί η μεταξύ τους σχέση. Οι αναλύσεις έγιναν όπως αναφέρεται και στην ενότητα 4.2.1, και τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21: Οι μέσες τιμές έκφρασης των KLF5 και RECUR1 με βάση τα GAPDH και Actin, κανονικοποιημένες με την έκφρασή του shSCR, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους, στα AGS κύτταρα.

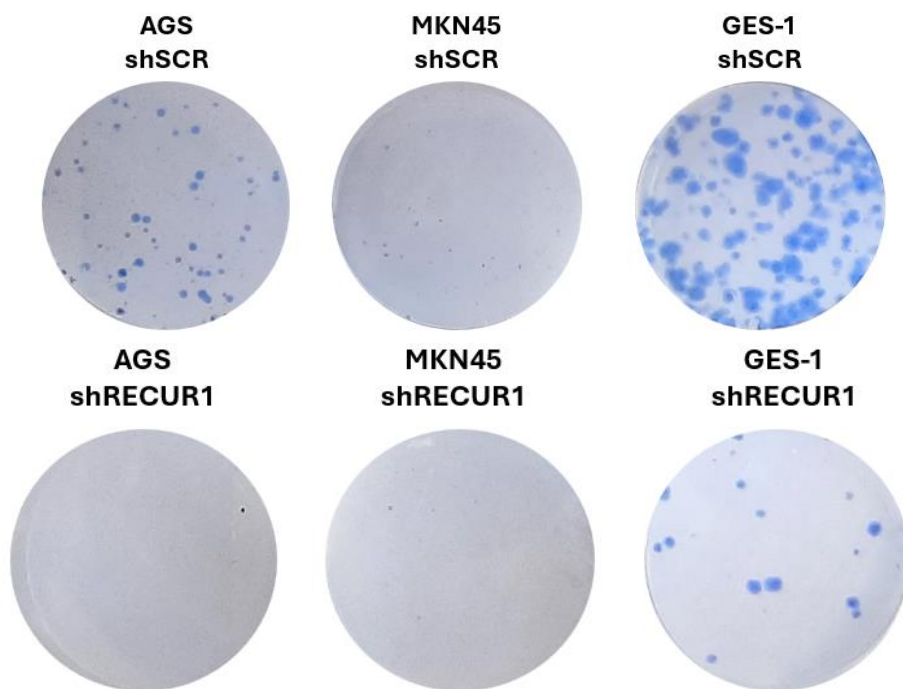
Προφανώς, συμπεράσματα για την συσχέτιση μεταξύ RECUR1 και KLF5 μπορούν να προκύψουν μόνο από τα AGS κύτταρα, γιατί μόνο εκεί πέτυχε μια σχετική αποσιώπηση του KLF5. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αποσιώπηση του KLF5 οδήγησε σε μειορρύθμιση του RECUR1 στα AGS κύτταρα.

4.2.3. Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (CFA)

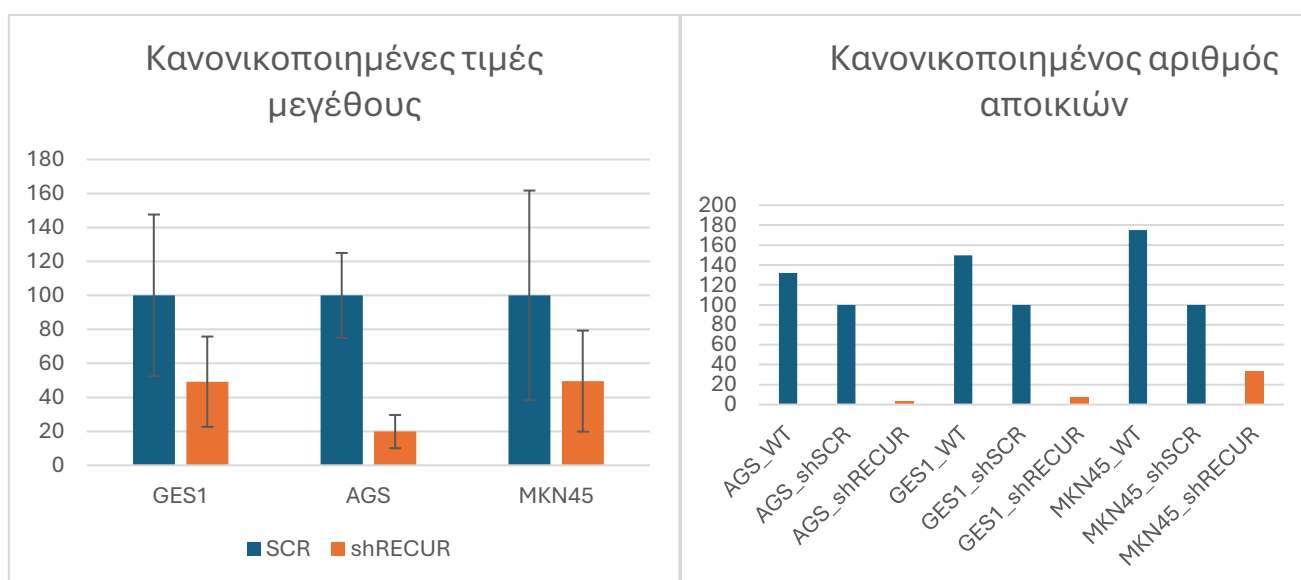
Αφού έγιναν οι μοριακές αναλύσεις, ακολούθησαν και φαινοτυπικά πειράματα για να προκύψουν συμπεράσματα για τον ρόλο των γονιδίων RECUR1 και CPR στην ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών, για να ελεγχθεί κατά πόσο η σίγηση αυτών των γονιδίων επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρακάτω απεικονίζονται οι φωτογραφίες των τρυβλίων που έφεραν το αρνητικό control (shSCR), καθώς και το αποσιωπημένο γονίδιο (shRECUR1 ή sh2CPR)

κατόπιν χρώσης με την χρωστική μπλε του μεθυλενίου, μαζί με τα διαγράμματα που απεικονίζουν τις αλλαγές αυτές με νούμερα (**Εικόνες 22 – 25**), όπως προέκυψαν με την ανάλυση των εικόνων με το πρόγραμμα ImageJ.

Όπως φαίνεται από την **Εικόνα 22**, η σίγηση του RECUR1 οδήγησε σε μείωση του αριθμού των κυτταρικών κλώνων και στις δύο κυτταρικές σειρές όπου επιτεύχθηκε (AGS και MKN45), και πιο συγκεκριμένα από 53 αποικίες στα AGS/shSCR, κατόπιν σίγησης του RECUR1 έμειναν 2, ενώ στα MKN45 κύτταρα, από 24 αποικίες έμειναν 8, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 23**. Μάλιστα, η σίγηση του RECUR1 φαίνεται να οδήγησε και σε μείωση του μεγέθους των κλώνων, κατά 81% στα AGS κύτταρα και κατά 51% στα MKN45 κύτταρα.



Εικόνα 22: Φωτογραφίες κατόπιν δοκιμασίας CFA σε GES1, AGS και MKN45 κύτταρα πριν (shSCR) και μετά την σίγηση του RECUR1 (shRECUR1).

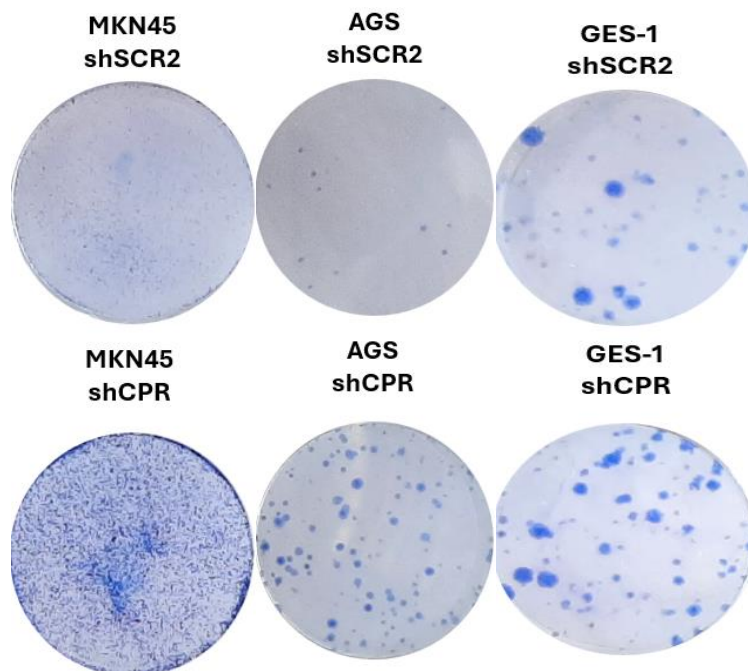


Εικόνα 23: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας CFA για εύρεση του μεγέθους (αριστερά) καθώς και του αριθμού των αποικιών πριν (shSCR) και μετά (shRECUR1) την σίγηση του RECUR1 με την χρήση του προγράμματος ImageJ.

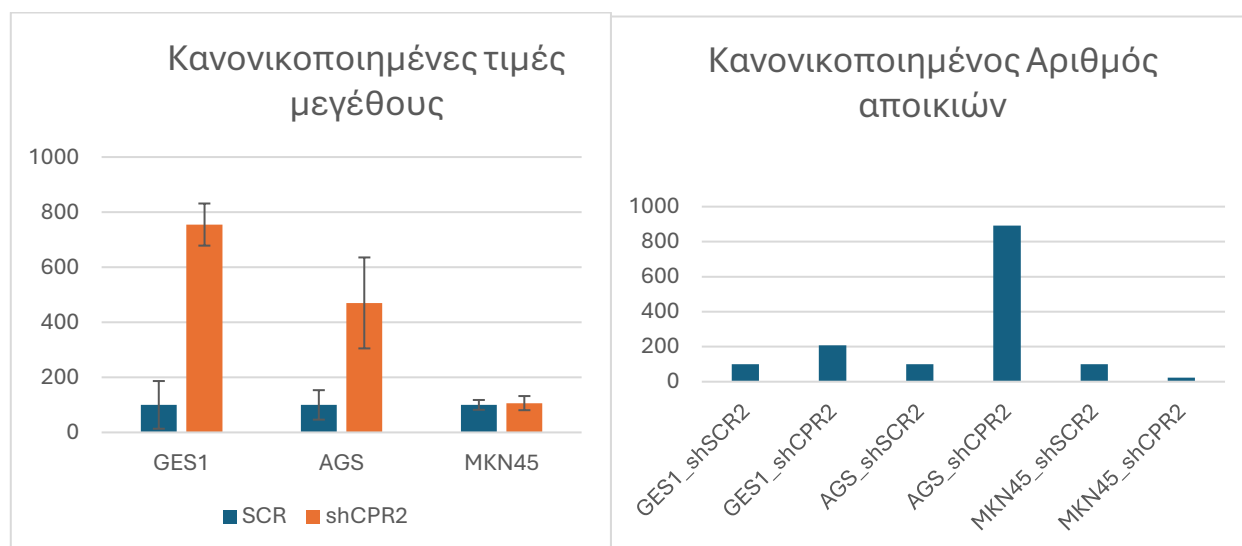
Όπως φαίνεται από την **Εικόνα 24**, η σίγηση του CPR οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των κυτταρικών κλώνων και στις δύο κυτταρικές σειρές όπου επιτεύχθηκε (GES1 και AGS), και πιο συγκεκριμένα από 39

αποικίες στα GES1/shSCR, κατόπιν σίγησης του RECUR1 υπήρχαν 81, ενώ στα AGS κύτταρα, από 11 αποικίες δημιουργήθηκαν 98, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 25**. Μάλιστα, η σίγηση του RECUR1 φαίνεται να οδήγησε και σε αύξηση του μεγέθους των κλώνων, κατά 654% στα GES1 κύτταρα και κατά 370% στα AGS κύτταρα.

Να σημειωθεί ότι τόσο για τα shRECUR όσο και για τα sh2CPR πειράματα, το μέγεθος των κλώνων θεωρήθηκε 100% στα shSCR constructs, δηλαδή στα αρνητικά control.



Εικόνα 24: Φωτογραφίες κατόπιν δοκιμασίας CFA σε GES1, AGS και MKN45 κύτταρα πριν (shSCR) και μετά την σίγηση του CPR (sh2CPR).

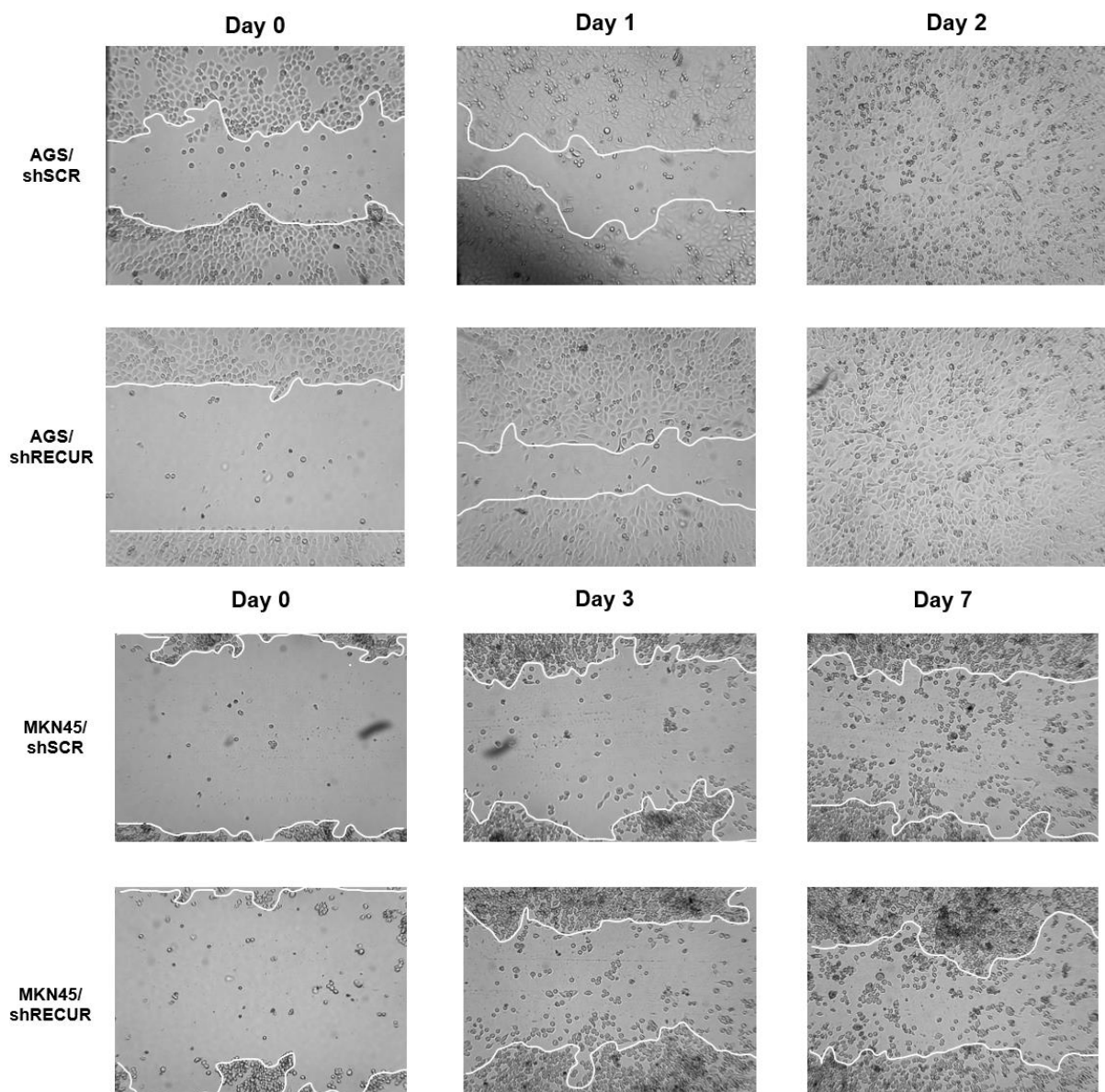


Εικόνα 25: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας CFA για εύρεση του μεγέθους (αριστερά) καθώς και του αριθμού των αποικιών πριν (shSCR) και μετά (sh2CPR) την σίγηση του CPR με την χρήση του προγράμματος ImageJ.

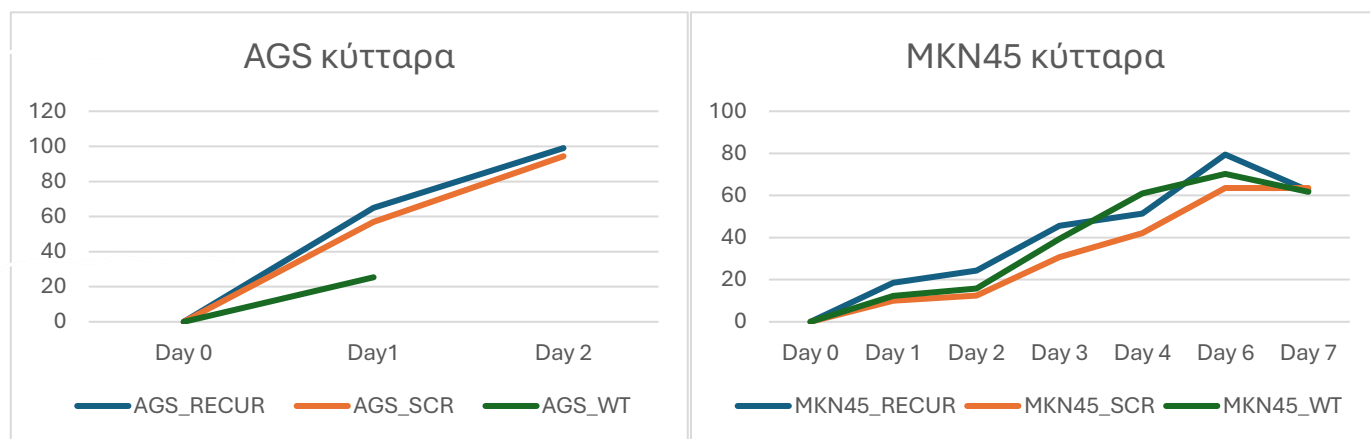
4.2.4. Δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών (WH)

Ταυτόχρονα με το CFA έγινε και δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών, για να ελεγχθεί η επίδραση της σίγησης των γονιδίων RECUR1 και CPR στο μεταστατικό δυναμικό των φυσιολογικών και γαστρικών καρκινικών κυττάρων. Στις **Εικόνες 26 και 28** φαίνονται φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των τρυβλίων σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, με Day 0 να ορίζεται η μέρα που έγινε χάραξη της γραμμής, για τα shRECUR

και sh2CPR κύτταρα αντίστοιχα. Επίσης, στις **Εικόνες 27 και 29** απεικονίζονται τα διαγράμματα που δείχνουν με νούμερα το ποσοστό μείωσης των πληγών με την πάροδο του χρόνου. Ως 0 θεωρείται το μέγεθος της πληγής την χρονική στιγμή της χάραξής της.

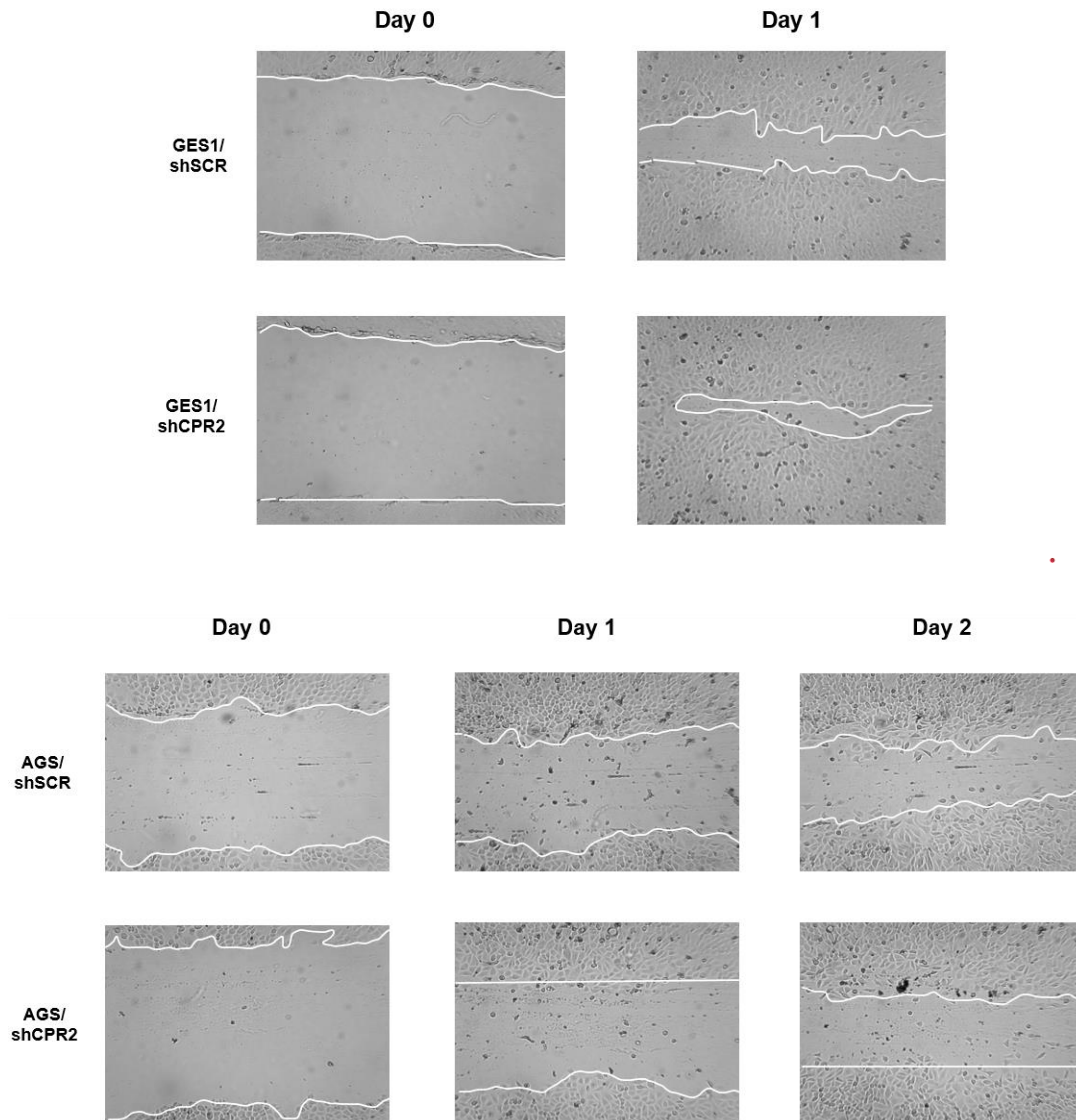


Εικόνα 26: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο κατόπιν δοκιμασίας Wound healing σε AGS και MKN45 κύτταρα πριν (shSCR) και μετά (shRECUR) την αποσιώπηση του γονιδίου RECUR1.

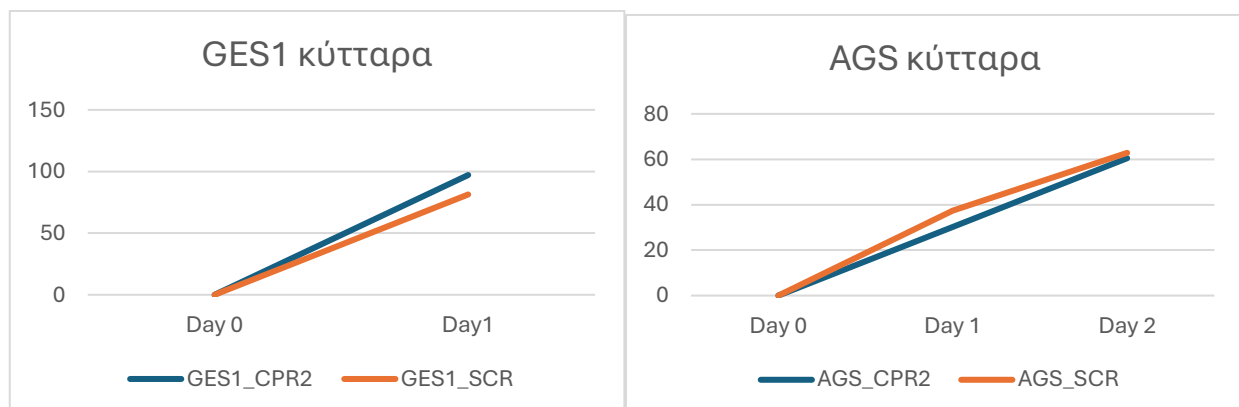


Εικόνα 27: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του Wound healing για την ποσοτικοποίηση του μεταστατικού δυναμικού των AGS (αριστερά) και MKN45 κυττάρων πριν (shSCR) και μετά (shRECUR1) την αποσιώπηση του RECUR1.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις παραπάνω εικόνες είναι ότι η αποσιώπηση του RECUR1 αυξάνει την ταχύτητα με την οποία επουλώνεται η πληγή, δηλαδή αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων, καθώς και ότι η σίγηση του συγκεκριμένου γονιδίου έχει μεγαλύτερες επιδράσεις στα AGS παρά στα MKN45 κύτταρα, αφού η πληγή κλείνει σε λιγότερες μέρες και σε μεγαλύτερο βαθμό (σχεδόν 100% σε τρεις μέρες, σε σχέση με το 70% σε 8 μέρες, που παρατηρείται στα MKN45 κύτταρα).



Εικόνα 28: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο κατόπιν δοκιμασίας Wound healing σε GES1 και AGS κύτταρα πριν (shSCR) και μετά (sh2CPR) την αποσιώπηση του γονιδίου CPR.

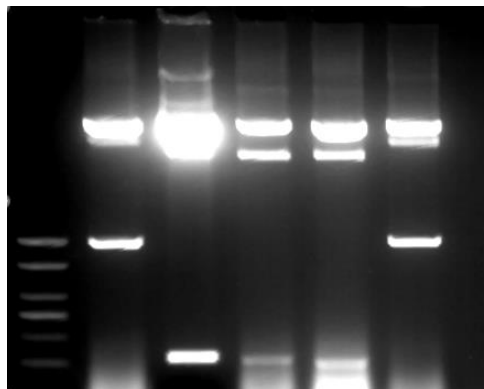


Όσον αφορά την σίγηση του CPR, τα παραπάνω φαινοτυπικά αποτελέσματα δεν επιδεικνύουν σημαντική διαφορά στον ρυθμό μείωσης της πληγής ανάμεσα στα shSCR και στα sh2CPR κύτταρα, ωστόσο φαίνεται η αποσιώπηση του CPR να κάνει τα φυσιολογικά κύτταρα πιο μεταστατικά, ενώ να έχει αντίθετες επιδράσεις στα πρωτογενή καρκινικά. Πάντως, παρατηρείται σχεδόν ολοκληρωτική επούλωση των πληγών σε 24 μόνο ώρες, ενώ φαίνεται η σίγηση του CPR να έχει πιο έντονα αποτελέσματα στα GES1 κύτταρα.

4.3. Αποτελέσματα σταθερά τροποποιημένης κυτταρικής σειράς AGS με pTER/sh2CPR και pTER/sh1CPR

4.3.1. Έλεγχος ανασυνδυασμού του απομονωμένου pTER/sh2CPR

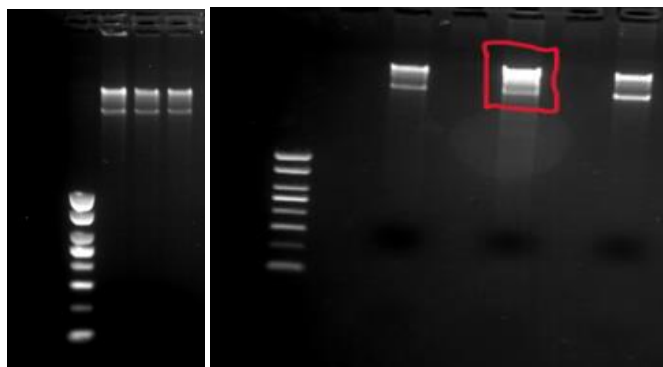
Πριν γίνει προσπάθεια απομόνωσης του pTER/sh2CPR με midi prep, δηλαδή με την χρήση εμπορικού κιτ, διενεργήθηκε μία αντίδραση πέψης με την χρήση του ενζύμου EcoRI, ενώ τα θραύσματα που προέκυψαν έτρεξαν σε πηκτή αгарόζης. Όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 30**, μέσω της ηλεκτροφόρησης προέκυψε το συμπέρασμα ότι ο pTER όντως περιείχε το ένθεμα sh2CPR και δεν ήταν κενός, αφού εμφανίζεται μία επιπλέον ζώνη πέρα από την μία μοναδική ζώνη του σκέτου φορέα και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις, όπως ακριβώς συμβαίνει και στον θετικό μάρτυρα του πειράματος. Επομένως, ακολούθησε ανακαλλιέργεια μίας εκ των τριών αποικιών μετασχηματισμένων βακτηρίων με pTER/sh2CPR, προκειμένου να γίνει στην συνέχεια εμπορική απομόνωση πλασμιδιακού DNA.



Εικόνα 30: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από τις 3 αντιδράσεις πέψης του pTER/sh2CPR. Η σειρά φόρτωσης από αριστερά προς τα δεξιά είναι: ladder, αρνητικός μάρτυρας (self-ligated pTER), θετικός μάρτυρας (pTER με άλλο διαγονίδιο), 3 βιολογικές επαναλήψεις της αντίδρασης πέψης με EcoRI.

4.3.2. Έλεγχος γραμμοποίησης του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA

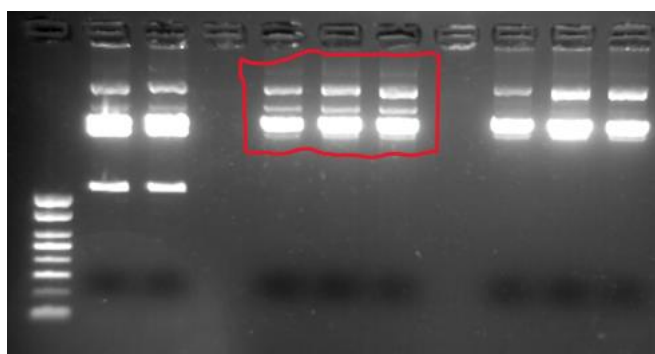
Αφού η συγκέντρωση του pTER/sh2CPR κατόπιν της απομόνωσής του με midi prep βρέθηκε ίση με 85,8ng/μl, ακολούθησαν δύο προσπάθειες γραμμοποίησης του πλασμιδίου με την χρήση του ενζύμου Scal, για να εισαχθεί μετά στα AGS κύτταρα. Κατόπιν της δράσης του ενζύμου, τα θραύσματα έτρεξαν σε πήκτωμα αгарόζης. Η πρώτη προσπάθεια γραμμοποίησης δεν πέτυχε, καθώς όπως φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 31**), οι ζώνες που δημιουργήθηκαν δεν είχαν μέγεθος που να υποδεικνύει την δράση του ενζύμου. Μετά και από την δεύτερη προσπάθεια γραμμοποίησης, τα αποτελέσματα ήταν λίγο καλύτερα, αλλά και πάλι τα πλασμίδια δεν είχαν ευθυγραμμιστεί πλήρως.



Εικόνα 31: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πρώτη (αριστερά) και την δεύτερη (δεξιά) προσπάθεια γραμμοποίησης του pTER/sh2CPR. Οι ζώνες δεν αντιστοιχούν σε ευθυγραμμισμένο τμήμα DNA. Στην αριστερή εικόνα στο πρώτο πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκε ο ladder, ενώ τα υπόλοιπα 3 πηγαδάκια αντιστοιχούν στις 3 αντιδράσεις πέψης με τις οποίες έγινε η γραμμοποίηση. Στην δεξιά εικόνα πάλι στο πρώτο πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκε ο ladder, ενώ το πηγαδάκι που αντιστοιχεί στον pTER/sh2CPR είναι αυτό με την κόκκινη ένδειξη.

Τέλος, μετά και από τη αντίδραση γραμμοποίησης, έγινε καθαρισμός του pTER/sh2CPR με φαινόλη/χλωροφόρμιο και η συγκέντρωση του πλασμιδίου βρέθηκε με την βοήθεια του φωτόμετρου ίση με 91,2ng/μl. Ακολούθησε η γενετική τροποποίηση των κυττάρων AGS.

Αντίδραση γραμμοποίησης πραγματοποιήθηκε και για την δεύτερη πειραματική διαδικασία, στον pTER/sh1CPR, προτού γίνει και η δική του εισαγωγή στα κύτταρα AGS. Σε αυτήν την περίπτωση, η γραμμοποίηση στέφθηκε με μεγαλύτερη επιτυχία, όπως φαίνεται και από το ακόλουθο πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την προσπάθεια γραμμοποίησης του pTER/sh1CPR. Οι ζώνες αντιστοιχούν σε ευθυγραμμισμένο τμήμα DNA. Στο πρώτο πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκε ο ladder, ενώ τα πηγαδάκια που αντιστοιχούν στις 3 πέψεις με τις οποίες έγινε η γραμμοποίηση του pTER/sh1CPR είναι αυτά με την κόκκινη ένδειξη.

Αφού και το pTER/sh2CPR καθαρίστηκε, η συγκέντρωσή του βρέθηκε με την βοήθεια του φωτόμετρου ίση με 406,7ng/μl.

4.3.3. Γενετική τροποποίηση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Μετά την γενετική τροποποίηση των AGS κυττάρων με τα pTER/sh1CPR και pTER/sh2CPR, τα κύτταρα αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν με την χρήση διπλού αντιβιοτικού, προκειμένου να αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα που μπορούσαν να εκφράζουν την πρωτεΐνη TetR για να επιτρέπεται η επαγόμενη σίγηση των sh1CPR και sh2CPR αντίστοιχα, ενώ ταυτόχρονα είχαν μετασχηματιστεί από τα πλασμιδιακά DNA. Δυστυχώς, σε κανένα από τα δύο πειράματα δεν αναπτύχθηκαν κλώνοι.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μία ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μεγάλη πολυπλοκότητα και ετερογένεια, στοιχεία που σε συνδυασμό με την υψηλή συχνότητα εμφάνισής του και την μεγάλη θνησιμότητά του, τον καθιστούν από τους πιο δύσκολους τύπους καρκίνου (Ilic & Ilic, 2022). Επιπλέον, η έλλειψη μεγάλου εύρους διαγνωστικών τεχνικών και ο περιορισμός των προληπτικών εξετάσεων σε άκρως επεμβατικές διαδικασίες αποθαρρύνουν τους ασθενείς από το να εντάξουν τον έλεγχο για καρκίνο του στομάχου στις ετήσιες ιατρικές εξετάσεις τους (L. Yang et al., 2020). Τα Long Non-Coding RNAs (LncRNAs) κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος ως υποψήφιοι διαγνωστικοί βιοδείκτες, καθώς μπορούν να ανιχνευθούν με απλές και μη επεμβατικές μεθόδους, προσδίδοντας ευαισθησία και εξειδίκευση στην διάγνωση της ασθένειας, ενώ πολλές λειτουργίες τους έχουν συσχετιστεί με την καρκινογένεση (Mattick et al., 2023).

Το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής επικεντρώνει το ερευνητικό του πρόγραμμα σε νέα, μη μελετημένα LncRNAs προσπαθώντας να χαρακτηρίσει την συνολική δράση τους, τον μηχανισμό ρύθμισής τους και την συμμετοχή τους στην καρκινογένεση. Με αυτόν τον τρόπο αποσκοπεί στην εύρεση πιθανών διαγνωστικών βιοδεικτών που θα επιλύσουν προβλήματα αντίστοιχα με αυτά που φέρει η διάγνωση του γαστρικού καρκίνου.

Υπάρχουν πολλά στοιχεία στην βιβλιογραφία για τον τρόπο δράσης καθώς και την ρύθμιση της έκφρασης των LncRNAs στην καρκινογένεση (Silva et al., 2015). Μία κατηγορία LncRNAs είναι και τα *cis* δραστικά, τα οποία επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων που βρίσκονται σε κοντινό γενετικό τόπο (C. Tong & Yin, 2021). Ένα χαρακτηριστικό *cis* δραστικό lncRNA με σημαντική καρκινογόνο δράση είναι το HGMA1- lncRNA, το οποίο δρα επιγενετικά μεθυλιώνοντας την αλληλουχία του γειτονικού του γονιδίου HGMA1 (Stewart et al., 2021). Με αυτόν τον τρόπο το ογκογονίδιο HGMA1, που δρα ως τροποποιητής της δομής της χρωματίνης, σταματά να εκφράζεται, με αποτέλεσμα το HGMA1- lncRNA να δρα ογκοκατασταλτικά (Stewart et al., 2021). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι στο αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα, το HGMA1 – lncRNA υποεκφράζεται, με αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση του HGMA1 και την ανάπτυξη όγκων (Stewart et al., 2021). Άλλο ένα *cis* δραστικό lncRNA είναι το MACC1-AS1, το οποίο μάλιστα σχετίζεται με την καρκινογένεση του στομάχου αυξάνοντας την μεταβολική πλαστικότητα των γαστρικών κυττάρων (Y. Zhao et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, δρα ως ογκογονίδιο, καθώς η υπερέκφρασή του έχει βρεθεί να ενεργοποιεί την πρωτεΐνη AMPK, η οποία οδηγεί στην εξωπυρήνωση της Lin28, γεγονός που προκαλεί την σταθεροποίηση του mRNA του γειτονικού γονιδίου MACC1, που λειτουργεί ως ογκογονίδιο (Y. Zhao et al., 2018). Σχετικά με την ρύθμιση της έκφρασης των ίδιων των LncRNAs, έχει βρεθεί ότι όσον αφορά στον γαστρικό καρκίνο, πολλά lncRNAs επηρεάζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5, όπως για παράδειγμα το LINC00346 (Peng Xu et al., 2019). Βέβαια, δεν αποκλείεται η μεταγραφή κάποιων άλλων να εξαρτάται και από τα ίδια τα γονίδια στόχους τους, μέσω συστημάτων θετικής ή αρνητικής ανατροφοδότησης (Liang et al., 2018).

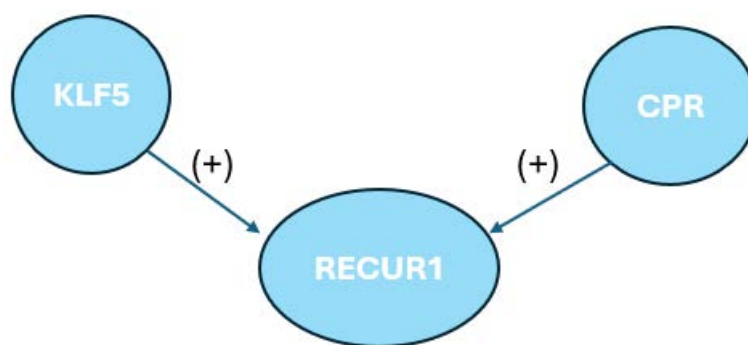
Πολύ συχνό είναι τα lncRNAs να επηρεάζουν και την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες που μπορούν να καταστούν καρκινογόνες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση και η απόπτωση (Oo et al., 2022). Ενδεικτικά, το ANRIL είναι ένα συμπληρωματικό lncRNA, το οποίο δρα ως ογκογονίδιο αφού συνδέεται με το σύμπλοκο PRC2 και καταστέλλει επιγενετικά το miR-99a/miR449a (E.-B. Zhang et al., n.d.). Έτσι, ενισχύεται η έκφραση των μονοπατιών mTOR και CDK6/E2F1, ενώ μειώνεται η έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων INK4b (p15), ARF (p14) και INK4a (p16), γεγονότα που οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των γαστρικών κυττάρων (E.-B. Zhang et al., n.d.). Για την έκφρασή του είναι απαραίτητη η σύνδεση του παράγοντα Tet2 στον υποκινητή του (Deng et al., 2016). Άλλο ένα lncRNA που δρα ως ογκογονίδιο είναι το H19, το οποίο αλληλεπιδρώντας με το miR-675 καταστέλλει την έκφραση της αποπτωτικής πρωτεΐνης FADD, με αποτέλεσμα να απορρυθμίζεται η δράση των κασπασών 8 και 3 και να αναστέλλεται ο κυτταρικός

θάνατος(Ding et al., 2017). Επιπλέον, οδηγεί σε γαστρικό καρκίνο και επειδή εμποδίζει την δράση της πρωτεΐνης p53(F. Yang et al., 2012). Ακόμη, το MAPKAPK5-AS1, δρα ως ικρίωμα βοηθώντας στην συγκέντρωση των απαραίτητων ενεργοποιητών της μετάφρασης στον γενετικό τόπο του γειτονικού του γονιδίου MK5, οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση του παράγοντα της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάπτωσης SNAI1, επομένως δρα ως ογκογονίδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου, προωθώντας την μετάσταση(T. Yang et al., 2020). Ένα lncRNA που δρα ογκοκατασταλτικά είναι το GAS5, το οποίο καταστέλλει την έκφραση του miR-222 ενεργοποιώντας το μονοπάτι PTEN/AKT/mTOR, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την έκφραση του p21 και μειώνει την έκφραση του CDK6, αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο(Pei et al., 2017). Τέλος, ογκοκατασταλτικά δρα και το MEG3, η έκφραση του οποίου ρυθμίζεται από το miR-148a, που καταστέλλει την δράση της DNMT-1, επομένως εμποδίζει την μεθυλίωση του υποκινητή του(H. Li et al., 2016). Η ογκοκατασταλτική του δράση οφείλεται στο ότι αλληλεπιδρά με τα miR-181 των γαστρικών κυττάρων, εμποδίζοντάς τα να συνδεθούν και να απενεργοποιήσουν την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL-2(Peng et al., 2015), ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιεί την δράση του p53(Sun et al., 2014).

Τέλος, υπάρχουν πολλά στοιχεία σχετικά με την χρήση των lncRNAs ως βιοδείκτες. Όσον αφορά στον γαστρικό καρκίνο, ως διαγνωστικός βιοδείκτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το LINC00152 (ανίχνευση στο πλάσμα), το οποίο δρα ως ογκογονίδιο και καταστέλλει την έκφραση των p15 και p21, προωθώντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό(D. L. Chen et al., 2016). Ως προγνωστικός βιοδείκτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το HOTAIR, το οποίο αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο PRC2, μεθυλιώνει τον υποκινητή του miR34a, καταστέλλει την έκφρασή του, και άρα προκαλεί μετάσταση και επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση(X. Feng & Huang, 2019). Επομένως, η μεγάλη ποσότητά του στο πλάσμα αποτελεί ένδειξη κακής πρόγνωσης(X. Feng & Huang, 2019). Τέλος, ως θεραπευτικός βιοδείκτης, η υπερέκφραση του PVT1 υποδεικνύει ότι ο γαστρικός καρκίνος θα εμφανίζει ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία μέσω πολλαπλών φαρμάκων (MDR) και στην συσπλατίνη(X. W. Zhang et al., 2015).

Λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις παραπάνω πληροφορίες που υπάρχουν στην βιβλιογραφία για τον γαστρικό καρκίνο και την σχέση του με τα lncRNAs, καθώς και στοιχεία από προηγούμενα ερευνητικά προγράμματα του εργαστηρίου, στην συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκε να μελετηθεί η δράση του *cis* δραστικού lncRNA RECUR1. Μελετήθηκε η γενικότερη επίδρασή του στον γαστρικό καρκίνο αλλά και πιο ειδικά στην έκφραση του κωδικοποιητικού RNA CPR, που από προηγούμενες μελέτες φαίνεται να συνδέεται με τον καρκίνο του στομάχου και κωδικοποιείται από γειτονικό γενετικό τόπο, καθώς και η πιθανή ρύθμιση του RECUR1 τόσο από το ίδιο το μετάγραφο στόχο του, το CPR, όσο και από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5. Επιπλέον μελετήθηκε και ανεξάρτητα η επίδραση του mRNA CPR στον γαστρικό καρκίνο σε μια προσπάθεια πιο ολοκληρωμένης προσέγγισης του θέματος.

Συνολικά, όσον αφορά τις ρυθμιστικές σχέσεις μεταξύ των γονιδίων RECUR1, CPR και KLF5, τα συμπεράσματα που προκύπτουν υποδηλώνουν ότι τόσο ο μεταγραφικός παράγοντας KLF5 όσο και το γονίδιο CPR ρυθμίζουν θετικά την έκφραση του RECUR1.



Εικόνα 33: Οι ρυθμιστικές σχέσεις του συστήματος έκφρασης των γονιδίων RECUR1, CPR και KLF5.

Για την κατανόηση των παρατηρήσεων στις μεταβολές έκφρασης των γονιδίων – στόχων είναι απαραίτητη η γνώση των λειτουργιών τους. Το Tspan8 είναι ένα ογκογονίδιο που κωδικοποιεί για μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, σχετίζεται με την βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων και προωθεί την μετάσταση, ενώ εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες σε μεταστατικές και όχι πρωτογενείς καρκινικές σειρές(R. Zhu et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα, συμβάλλει στην αύξηση του καρκινικού βλαστικού φαινοτύπου μέσω της ρύθμισης του Sonic Hedgehog μονοπατιού(R. Zhu et al., 2019). Βοηθώντας στην σύνδεση της πρωτεΐνης ATXN3 στο PTCH1, εμποδίζει την αποικοδόμηση του δεύτερου από το κυτταρικό πρωτεάσωμα και άρα το σταθεροποιεί(R. Zhu et al., 2019). Η σταθεροποίηση της PTCH1 βοηθά στην σύνδεση της κινάσης GRK2 στην πρωτεΐνη SMO, φωσφοριλώνοντάς την και προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την απελευθέρωση της πρωτεΐνης GLI1, που με την σειρά της μετατοπίζεται στον πυρήνα και οδηγεί στην μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων όπως τα SOX1 και NANOG, που προωθούν την βλαστικότητα(R. Zhu et al., 2019). Ακόμη, επηρεάζει την μετάσταση αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο της E-καδερίνης με την πρωτεΐνη p120ctn, και μετατοπίζοντας την στην μεμβράνη, επομένως αυξάνει την κινητικότητα των κυττάρων(Greco et al., 2010).

Το E2F8 κωδικοποιεί για έναν πρώιμο μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας των E2F παραγόντων και δρα ως ογκογονίδιο προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό(Z. Zhang et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, ρυθμίζει την διέλευση των κυττάρων από το G1 στο S στάδιο του κυτταρικού κύκλου προάγοντας το Wnt/ β -catenin σηματοδοτικό μονοπάτι και έτσι διασφαλίζει ότι ο πυρήνας διαιρείται την κατάλληλη χρονική στιγμή(M. Zhang et al., 2023). Στο συγκεκριμένο μονοπάτι, η β -κατενίνη συνδέεται με τους Wnt υποδοχείς, μεταφέρεται στο εσωτερικό του πυρήνα και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων μερικά εκ των οποίων συμμετέχουν και στον κυτταρικό κύκλο(M. Zhang et al., 2023). Επίσης, ο E2F8 αλληλεπιδρά με μόρια κλειδιά του κυτταρικού κύκλου, όπως το CCND1 και το p21(αναστολέας των κινάσων κυκλίνης)(M. Zhang et al., 2023). Υψηλή έκφρασή παρατηρείται συχνά στους γαστρικούς καρκίνους(Wu & Wu, 2021). Αντίθετα, το γονίδιο CDKN1C κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p57, έναν αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, επομένως δρα ογκοκατασταλτικά(Algar et al., 2009).

Το γονίδιο Vim κωδικοποιεί την πρωτεΐνη βιμεντίνη, που είναι ένα ενδιάμεσο ινίδιο τύπου III (Type III IFs), μεγέθους 57-kDa και δρα ως ογκογονίδιο προωθώντας την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση(Paulin et al., 2022). Ενώ φυσιολογικά, ως τμήμα του κυτταροσκελετού θα περίμενε κανείς να βρίσκεται ενδοκυτταρικά, μπορεί να υπάρχει και στην κυτταρική μεμβράνη καθώς και στον πυρήνα, επηρεάζοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων(Paulin et al., 2022). Η υπερέκφραση της συνδέεται με πολλούς επιθηλιακούς καρκίνους, όπως με τον γαστρικό καρκίνο, στον οποίο θεωρείται και ένδειξη μετάστασης του λεμφοειδούς αδένος, ενώ συνδέεται με διάγνωση όγκου υψηλής επιθετικότητας και χαμηλής προγνωστικής αξίας(Satelli & Li, 2011). Η ρύθμισή της γίνεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF- κ B, που συνδέονται στον υποκινητή της και την ενεργοποιούν(Satelli & Li, 2011).

Το γονίδιο EMP2 κωδικοποιεί την επιθηλιακή μεμβρανική πρωτεΐνη 2, μια μεμβρανική πρωτεΐνη που ρυθμίζει τον ρόλο των ιντεγκρινών στην ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας(Mozaffari et al., 2023). Έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο αφού προωθεί την μετάσταση και την αγγειογένεση μέσω της ρύθμισης της κινάσης FAK και του υποδοχέα SCR(W. Zhu et al., 2024). Πιο συγκεκριμένα, αυξάνοντας την έκφρασή τους οδηγεί σε αύξηση του παράγοντα HIFa, που ενεργοποιεί την μεταγραφή μεταβολικών γονιδίων τα οποία συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της υποξίας και άρα στην αγγειογένεση, καθώς και της πρωτεΐνης VEGF(W. Zhu et al., 2024). Μέσω του μονοπατιού FAK/Src προωθεί και την κυτταρική μετανάστευση και την είσοδο των κυττάρων σε νέους ιστούς, οδηγώντας σε μετάσταση(Mozaffari et al., 2023).

Το γονίδιο DDDIT4 παράγει μια συντηρημένη πρωτεΐνη ικρίωμα η οποία συμμετέχει στην διαδικασία της γαστρικής μεταπλασίας, αλλά έχει βρεθεί ότι εμποδίζει και την διαδικασία της απόπτωσης, επομένως δρα ως ογκογονίδιο(Miao et al., 2021). In vivo πειράματα σε ποντίκια με γαστρικό καρκίνο έδειξαν ότι αποσιώπηση

του DDIT4 οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης του καρκίνου καθώς και σε υποέκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και αύξηση των προ-αποπτωτικών (Du et al., 2018).

Το γονίδιο PHLDA1 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με PH επικράτεια χάρη στην οποία μπορεί να αλληλεπιδρά με μεμβρανικές πρωτεΐνες (Baldavira et al., 2021). Έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τον καρκίνο, αφού δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, επηρεάζοντας την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Nagai, 2016). Στον γαστρικό καρκίνο συχνά παρατηρείται υποέκφραση του PHLDA-1, η οποία μάλιστα σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι δρα ογκοκατασταλτικά, αφού έχει προ-αποπτωτική δράση (P. Zhao et al., 2015).

Για μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση, παράλληλα με τις μοριακές παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν και φαινοτυπικές μελέτες για την μελέτη του ρόλου των γονιδίων RECUR1 και CPR στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (CFA) και στην μετάσταση (WH). Στις κυτταρικές σειρές AGS και MKN45, στις οποίες επιτεύχθηκε με επιτυχία η αποσιώπηση του RECUR1, από τα πειράματα του WH παρατηρήθηκε ότι μετά την σίγηση του γονιδίου τα κύτταρα έγιναν πιο μεταστατικά, αφού η πληγή που προκλήθηκε ξεκίνησε να επουλώνεται πολύ πιο γρήγορα από το αρνητικό control (shSCR). Επίσης, τα αποτελέσματα ήταν πιο έντονα στα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα (AGS), παρά στα μεταστατικά (MKN45) (**Εικόνα 27**). Όσον αφορά το CFA, παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση του RECUR1 οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των κυτταρικών κλώνων και μάλιστα και σε μείωση του αριθμού των αποικιών (**Εικόνες 22 και 23**). Τα παραπάνω φαινοτυπικά αποτελέσματα συμφωνούν με τις μοριακές παρατηρήσεις που αφορούν την μετάσταση, δηλαδή ότι σίγηση του RECUR1 οδηγεί σε υπερέκφραση των Tspan8 και EMP. Επομένως, μπορεί να προκύψει το συμπέρασμα ότι το RECUR1 προστατεύει από τον καρκίνο εμποδίζοντας την μετάσταση, ωστόσο σε αρχικά στάδια της νόσου θα μπορούσε να δρα προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αντίθεση που παρουσιάζουν κάποιες μοριακές παρατηρήσεις οφείλονται στο γεγονός ότι τα γονίδια – στόχοι που ελέγχθηκαν ήταν ενδεικτικά, και ο ρόλος τους μπορεί να επισκιάζεται από άλλα γονίδια του κυτταρικού κύκλου που δεν έχουν ελεγχθεί, δεδομένου ότι ο κυτταρικός κύκλος σαν μηχανισμός περιλαμβάνει πολλούς βρόγχους αρνητικής ανάδρασης ως σημεία ελέγχου.

Όσον αφορά τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις της αποσιώπησης του CPR, η δοκιμασία WH έδειξε ότι στα φυσιολογικά κύτταρα (GES1) η σίγηση του γονιδίου έκανε τα κύτταρα πιο μεταστατικά, αφού η πληγή έκλεισε πιο γρήγορα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ στα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα (AGS), η αποσιώπηση του CPR τα κάνει λιγότερο μεταστατικά, μειώνοντας τον ρυθμό επούλωσης της πληγής. Τα αποτελέσματα μάλιστα ήταν πιο έντονα στα GES1 παρά στα AGS κύτταρα (**Εικόνα 29**). Από την δοκιμασία CFA προέκυψε το συμπέρασμα ότι η αποσιώπηση του CPR οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των κυτταρικών κλώνων (**Εικόνες 24 και 25**), δηλαδή ότι το CPR εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δρα προστατεύοντας από τον καρκίνο. Το σύνολο των φαινοτυπικών αποτελεσμάτων για το CPR διαφωνούν με τις μοριακές παρατηρήσεις, καθώς τα γονίδια-στόχοι που ελέγχθηκαν ήταν και πάλι ενδεικτικά. Επιπροσθέτως, δεν μπορούν να αποκλειστούν και φαινόμενα κυτταρικού στρες που εμφανίζονται συχνά σε πειράματα διαμόλυνσης με λεντιούς και θα μπορούσαν να επηρεάζουν την έκφραση κάποιων από τα γονίδια που ελέγχθηκαν ανεξάρτητα από την σίγηση των στόχων, δυσχεραίνοντας την σύνδεσή τους με τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις. Αξίζει να σημειωθεί όμως, πως αν με βάση την **Εικόνα 33** θεωρήσουμε ότι το CPR οδηγεί σε αύξηση του RECUR1, τότε η προστατευτική δράση έναντι της μετάστασης (τουλάχιστον στα GES1 κύτταρα), συμφωνεί με τις δράσεις του RECUR1 και μπορεί να αποδοθεί σε αυτή την σχέση ρύθμισης.

Για να μελετηθεί καλύτερα η επίδραση του mRNA CPR, έγινε μία προσπάθεια δημιουργίας σταθερά γενετικά τροποποιημένων κυττάρων AGS, μέσω του συστήματος επαγόμενης σίγησης TetR, καθώς αυτή η τεχνική απαλλάσσει τα κύτταρα από τις στρεσογόνες καταστάσεις που προκαλεί η μόλυνση με λεντιούς και επιπλέον επιτρέπει την επιλεκτική ενεργοποίηση της αποσιώπησης του γονιδίου – στόχου. Ωστόσο, η ποσότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε για να γίνει η γενετική τροποποίηση δεν ήταν

επαρκής, με αποτέλεσμα να κύτταρα να μην επιβιώσουν από την θετική επιλογή με χρήση διπλού αντιβιοτικού.

Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία είναι ότι το RECUR1 είναι ένα από τα πιθανά lncRNA στόχους του KLF5 που απορρυθμίζονται κατά τον γαστρικό καρκίνο, ότι αυτό με την σειρά του ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, δρώντας κυρίως ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο και ότι το CPR δρα επίσης ογκοκατασταλτικά, με την δράση αυτή να οφείλεται κυρίως στην ρύθμιση της έκφρασης του RECUR1.

Μελλοντικοί στόχοι που προκύπτουν από την παρούσα εργασία είναι η επανάληψη σε πρώτη φάση της διαδικασίας δημιουργίας σταθερά τροποποιημένων κυττάρων στα οποία να έχει γίνει αποσιώπηση του CPR μέσω του συστήματος TetR , και αφού αυτό στεφθεί με επιτυχία, παρόμοιο εγχείρημα μπορεί να γίνει και για το RECUR1. Προς αυτήν την κατεύθυνση θα συνέβαλε η δημιουργία και ο σχεδιασμός πιο αποδοτικών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pTER. Ακόμη, περισσότερα πειράματα θα μπορούσαν να διενεργηθούν για την μελέτη της υπόθεσης ότι το CPR επηρεάζει την έκφραση του RECUR1, καθώς και για τον έλεγχο της έκφρασης περισσότερων γονιδίων-στόχων κατόπιν αποσιώπησης των RECUR1 και CPR. Επιπλέον, χρήσιμη θα ήταν η χρήση της τεχνικής του CRISPR με στόχο να γίνει υπερέκφραση των δύο γονιδίων και να μελετηθεί περεταίρω η μοριακή δράση τους αλλά και τα φαινοτυπικά αποτελέσματα. Τέλος, θα μπορούσαν να γίνουν μεταγραφομικές αναλύσεις για να αναλυθεί και σε πρωτεϊνικό επίπεδο η λειτουργία της πρωτεΐνης που παράγεται από το γονίδιο CPR, ενώ ταυτόχρονα θα μπορούσαν να διενεργηθούν Western Blots για να εξακριβωθεί αν η αποσιώπηση των RECUR1 και CPR έχει επιδράσεις μόνο σε μεταγραφικό ή και σε μεταφραστικό επίπεδο(Curtis & Nardulli, 2009).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguilo, F., Zhou, M. M., & Walsh, M. J. (2011). Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. In *Cancer Research* (Vol. 71, Issue 16, pp. 5365–5369).
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4379>
- Akbari, A., Ashtari, S., Tabaiean, S. P., Mehrdad-Majd, H., Farsi, F., Shojaei, S., & Agah, S. (2022). Overview of epidemiological characteristics, clinical features, and risk factors of gastric cancer in Asia-Pacific region. In *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 493–505). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1111/ajco.13654>
- Alagesan, P., Goodwin, J. C., Garman, K. S., & Epplen, M. (2023). Cancer Progress and Priorities: Gastric Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 32(4), 473–486. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-22-0994>
- Albrecht, A. S., & Ørom, U. A. (2016). Bidirectional expression of long ncRNA/protein-coding gene pairs in cancer. *Briefings in Functional Genomics*, 15(3), 167–173. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elv048>
- Algar, E. M., Muscat, A., Dagar, V., Rickert, C., Chow, C. W., Biegel, J. A., Ekert, P. G., Saffery, R., Craig, J., Johnstone, R. W., & Ashley, D. M. (2009). Imprinted CDKN1C is a tumor suppressor in rhabdoid tumor and activated by restoration of SMARCB1 and histone deacetylase inhibitors. *PLoS ONE*, 4(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004482>
- Ali, M. M., Akhade, V. S., Kosalai, S. T., Subhash, S., Statello, L., Meryet-Figuere, M., Abrahamsson, J., Mondal, T., & Kanduri, C. (2018). PAN-cancer analysis of S-phase enriched lncRNAs identifies oncogenic drivers and biomarkers. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03265-1>
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., Bonaventure, A., Valkov, M., Johnson, C. J., Estève, J., Ogunbiyi, O. J., Azevedo e Silva, G., Chen, W. Q., Eser, S., Engholm, G., Stiller, C. A., Monnereau, A., Woods, R. R., Visser, O., ... Lewis, C. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet*, 391(10125), 1023–1075.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3)
- Ang, Y. L. E., Yong, W. P., & Tan, P. (2016). Translating gastric cancer genomics into targeted therapies. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 100, pp. 141–146). Elsevier Ireland Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.02.007>
- Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2017). Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. In *Helicobacter* (Vol. 22, Issue 4). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/hel.12386>
- Arnold, M., Ferlay, J., Van Berge Henegouwen, M. I., & Soerjomataram, I. (2020). Global burden of oesophageal and gastric cancer by histology and subsite in 2018. *Gut*, 69(9), 1564–1571. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321600>
- Arnold, M., Park, J. Y., Camargo, M. C., Lunet, N., Forman, D., & Soerjomataram, I. (2020). Is gastric cancer becoming a rare disease? A global assessment of predicted incidence trends to 2035. *Gut*, 69(5), 823–829. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320234>
- Assaad, S., Chaaban, R., Tannous, F., & Costanian, C. (2018a). Dietary habits and *Helicobacter pylori* infection: A cross sectional study at a Lebanese hospital. *BMC Gastroenterology*, 18(1).
<https://doi.org/10.1186/s12876-018-0775-1>
- Assaad, S., Chaaban, R., Tannous, F., & Costanian, C. (2018b). Dietary habits and *Helicobacter pylori* infection: A cross sectional study at a Lebanese hospital. *BMC Gastroenterology*, 18(1).
<https://doi.org/10.1186/s12876-018-0775-1>

- Avgerinos, K. I., Spyrou, N., Mantzoros, C. S., & Dalamaga, M. (2019). Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. In *Metabolism: Clinical and Experimental* (Vol. 92, pp. 121–135). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.001>
- Ayupe, A. C., Tahira, A. C., Camargo, L., Beckedorff, F. C., Verjovski-Almeida, S., & Reis, E. M. (2015). Global analysis of biogenesis, stability and sub-cellular localization of lncRNAs mapping to intragenic regions of the human genome. *RNA Biology*, 12(8), 877–892. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1062960>
- Baldassarre, A., & Masotti, A. (2012). Long non-coding RNAs and p53 regulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 12, pp. 16708–16717). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms131216708>
- Baldavira, C. M., Machado-Rugolo, J., Prieto, T. G., Bastos, D. R., Balancin, M., Ab'Saber, A. M., Yaegashi, L. B., Souza, P. C., Farhat, C., Takagaki, T. Y., Nagai, M. A., & Capelozzi, V. L. (2021). The expression patterns and prognostic significance of pleckstrin homology-like domain family A (PHLDA) in lung cancer and malignant mesothelioma. *Journal of Thoracic Disease*, 13(2), 689–707. <https://doi.org/10.21037/JTD-20-2909>
- Bass, A. J., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, S. M., Miller, M., Bernard, B., Hinoue, T., Laird, P. W., Curtis, C., Shen, H., Weisenberger, D. J., Schultz, N., Shen, R., Weinhold, N., Kelsen, D. P., Bowlby, R., Chu, A., Kasaian, K., Mungall, A. J., ... Liu, J. (2014a). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
- Bass, A. J., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, S. M., Miller, M., Bernard, B., Hinoue, T., Laird, P. W., Curtis, C., Shen, H., Weisenberger, D. J., Schultz, N., Shen, R., Weinhold, N., Kelsen, D. P., Bowlby, R., Chu, A., Kasaian, K., Mungall, A. J., ... Liu, J. (2014b). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
- Basso, D., Zambon, C. F., Letley, D. P., Stranges, A., Marchet, A., Rhead, J. L., Schiavon, S., Guariso, G., Ceroti, M., Nitti, D., Rugge, M., Plebani, M., & Atherton, J. C. (2008). Clinical Relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Gene Polymorphisms. *Gastroenterology*, 135(1), 91–99. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.041>
- Beermann, J., Piccoli, M.-T., Viereck, J., & Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev*, 96, 1297–1325. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2015.-Ad>
- Bernini, M., Barbi, S., Roviello, F., Scarpa, A., Moore, P., Pedrazzani, C., Beghelli, S., Marrelli, D., & De Manzoni, G. (2006). Family history of gastric cancer: A correlation between epidemiologic findings and clinical data. *Gastric Cancer*, 9(1), 9–13. <https://doi.org/10.1007/s10120-005-0350-7>
- Bertuccio, P., Alicandro, G., Rota, M., Pelucchi, C., Bonzi, R., Galeone, C., Bravi, F., Johnson, K. C., Hu, J., Palli, D., Ferraroni, M., López-Carrillo, L., Lunet, N., Ferro, A., Malekzadeh, R., Zaridze, D., Maximovitch, D., Vioque, J., Navarrete-Munoz, E. M., ... La Vecchia, C. (2019). Citrus fruit intake and gastric cancer: The stomach cancer pooling (StoP) project consortium. *International Journal of Cancer*, 144(12), 2936–2944. <https://doi.org/10.1002/ijc.32046>
- Best, L. M. J., Takwoingi, Y., Siddique, S., Selladurai, A., Gandhi, A., Low, B., Yaghoobi, M., & Gurusamy, K. S. (2018). Non-invasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2018, Issue 3). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012080.pub2>
- Bhan, A., & Mandal, S. S. (2014). Long noncoding RNAs: Emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. In *ChemMedChem* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1932–1956). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300534>

- Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: A new paradigm. In *Cancer Research* (Vol. 77, Issue 15, pp. 3965–3981). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>
- Blaser, M. J. (2012). Equilibria of humans and our indigenous microbiota affecting asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(2), 69–71. <https://doi.org/10.1513/pats.201108-048MS>
- Blaser, M. J., & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), 887–894. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2245>
- Böger, C., Behrens, H.-M., Mathiak, M., Krüger, S., Kalthoff, H., & Röcken, C. (2016). PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 17). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Boysen, T., Mohammadi, M., Melbye, M., Hamilton-Dutoit, S., Vainer, B., Hansen, A. V., Wohlfahrt, J., & Friberg, J. (2009). EBV-associated gastric carcinoma in high- and low-incidence areas for nasopharyngeal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 101(3), 530–533. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605168>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 220, Issue 2). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/JCB.202009045>
- Brown, H. S., Cantrell, S., Tang, H., Epplen, M., & Garman, K. S. (2022). Racial Differences in Helicobacter pylori Prevalence in the US: A Systematic Review. In *Gastro Hep Advances* (Vol. 1, Issue 5, pp. 857–868). American Gastroenterological Association. <https://doi.org/10.1016/j.gastha.2022.06.001>
- Butt, J., Varga, M. G., Wang, T., Tsugane, S., Shimazu, T., Zheng, W., Abnet, C. C., Yoo, K. Y., Park, S. K., Kim, J., Jee, S. H., Qiao, Y. L., Shu, X. O., Waterboer, T., Pawlita, M., & Epplen, M. (2019). Smoking, Helicobacter pylori serology, and gastric cancer risk in prospective studies from China, Japan, and Korea. In *Cancer Prevention Research* (Vol. 12, Issue 10, pp. 667–674). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0238>
- Carlevaro-Fita, J., Polidori, T., Das, M., Navarro, C., Zoller, T. I., & Johnson, R. (2019). Ancient exapted transposable elements promote nuclear enrichment of human long noncoding RNAs. *Genome Research*, 29(2), 208–222. <https://doi.org/10.1101/gr.229922.117>
- Cavaleiro-Pinto, M., Peleteiro, B., Lunet, N., & Barros, H. (2011). Helicobacter pylori infection and gastric cardia cancer: Systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes and Control*, 22(3), 375–387. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9707-2>
- Chen, C., Zhou, Q., Wu, R., Li, B., Chen, Q., Zhang, X., & Shi, C. (2019). A Comprehensive Survey of Genomic Alterations in Gastric Cancer Reveals Recurrent Neoantigens as Potential Therapeutic Targets. <http://edicogenome.com/dragen->
- Chen, D. L., Ju, H. Q., Lu, Y. X., Chen, L. Z., Zeng, Z. L., Zhang, D. S., Luo, H. Y., Wang, F., Qiu, M. Z., Wang, D. S., Xu, D. Z., Zhou, Z. W., Pelicano, H., Huang, P., Xie, D., Wang, F. H., Li, Y. H., & Xu, R. H. (2016). Long non-coding RNA XIST regulates gastric cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-101 to modulate EZH2 expression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0420-1>
- Cisto, M., Filip, A. A., Johan, G., Offerhaus, A., Ciset, B., Rawicz-Pruszyński, K., Skierucha, M., & Polkowski, W. P. (2018). Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 27, pp. 19427–19442). www.oncotarget.com

- Cormedi, M. C. V., Katayama, M. L. H., Guindalini, R. S. C., Faraj, S. F., & Folgueira, M. A. A. K. (2018). Survival and prognosis of young adults with gastric cancer. *Clinics*, 73. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e651s>
- Corso, S., & Giordano, S. (2016). How Can Gastric Cancer Molecular Profiling Guide Future Therapies? In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 22, Issue 7, pp. 534–544). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.05.004>
- Curtis, C. D., & Nardulli, A. M. (2009). Using RNA interference to study protein function. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 505, 187–204. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-575-0_11
- Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Palapati, A., & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. In *Molecular Immunology* (Vol. 112, pp. 82–92). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>
- Davis, E. J., Beebe-Dimmer, J. L., Yee, C. L., & Cooney, K. A. (2014). Risk of second primary tumors in men diagnosed with prostate cancer: A population-based cohort study. *Cancer*, 120(17), 2735–2741. <https://doi.org/10.1002/cncr.28769>
- Deng, W., Jin, L., Zhuo, H., Vasiliou, V., & Zhang, Y. (2021). Alcohol consumption and risk of stomach cancer: A meta-analysis. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 336). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109365>
- Deng, W., Wang, J., Zhang, J., Cai, J., Bai, Z., & Zhang, Z. (2016). TET2 regulates LncRNA-ANRIL expression and inhibits the growth of human gastric cancer cells. *IUBMB Life*, 68(5), 355–364. <https://doi.org/10.1002/iub.1490>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 22(9), 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- di Martino, E., Smith, L., Bradley, S. H., Hemphill, S., Wright, J., Renzi, C., Bergin, R., Emery, J., & Neal, R. D. (2022). Incidence trends for twelve cancers in younger adults—a rapid review. In *British Journal of Cancer* (Vol. 126, Issue 10, pp. 1374–1386). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01704-x>
- Ding, L., Zhang, S., Xu, M., Zhang, R., Sui, P., & Yang, Q. (2017). MicroRNA-27a contributes to the malignant behavior of gastric cancer cells by directly targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 2. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0516-2>
- Dong, Y., He, D., Peng, Z., Peng, W., Shi, W., Wang, J., Li, B., Zhang, C., & Duan, C. (2017). Circular RNAs in cancer: an emerging key player. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–8). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0370-2>
- Drognitz, O., Henne, K., Weissenberger, C., Bruggmoser, G., Göbel, H., Hopt, U. T., Frommhold, H., & Ruf, G. (2008). Long-Term Results After Intraoperative Radiation Therapy for Gastric Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 70(3), 715–721. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.07.2331>
- Du, F., Sun, L., Chu, Y., Li, T., Lei, C., Wang, X., Jiang, M., Min, Y., Lu, Y., Zhao, X., Nie, Y., & Fan, D. (2018). DDIT4 promotes gastric cancer proliferation and tumorigenesis through the p53 and MAPK pathways. *Cancer Communications*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0315-y>
- Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., McDonel, P. E., Guttman, M., & Lander, E. S. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature*, 539(7629), 452–455. <https://doi.org/10.1038/nature20149>

- Etemadi, A., Safiri, S., Sepanlou, S. G., Ikuta, K., Bisignano, C., Shakeri, R., Amani, M., Fitzmaurice, C., Nixon, M. R., Abbasi, N., Abolhassani, H., Advani, S. M., Afarideh, M., Akinyemiju, T., Alam, T., Alikhani, M., Alipour, V., Allen, C. A., Almasi-Hashiani, A., ... Sajadi, P. (2020). The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 5(1), 42–54. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30328-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30328-0)
- Fadista, J., Vikman, P., Laakso, E. O., Mollet, I. G., Esguerra, J. Lou, Taneera, J., Storm, P., Osmark, P., Ladenvall, C., Prasad, R. B., Hansson, K. B., Finotello, F., Uvebrant, K., Ofori, J. K., Di Camillo, B., Krus, U., Cilio, C. M., Hansson, O., Eliasson, L., ... Groop, L. (2014). Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38), 13924–13929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402665111>
- Fan, X., Qin, X., Zhang, Y., Li, Z., Zhou, T., Zhang, J., You, W., Li, W., & Pan, K. (2021). Screening for gastric cancer in China: Advances, challenges and visions. *Chinese Journal of Cancer Research*, 33(2), 168–180. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2021.02.05>
- Fang, Y., & Fullwood, M. J. (2016). Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* (Vol. 14, Issue 1, pp. 42–54). Beijing Genomics Institute. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.09.006>
- Fattahi, S., Kosari-Monfared, M., Golpour, M., Emami, Z., Ghasemiyan, M., Nouri, M., & Akhavan-Niaki, H. (2020). LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: A novel approach to personalized medicine. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 235, Issue 4, pp. 3189–3206). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.29260>
- Feng, L. M., Wang, X. F., & Huang, Q. X. (2017). Thymoquinone induces cytotoxicity and reprogramming of EMT in gastric cancer cells by targeting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Journal of Biosciences*, 42(4), 547–554. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9708-3>
- Feng, X., & Huang, S. (2019). Effect and mechanism of long noncoding RNAs HOTAIR on occurrence and development of gastric cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(5), 6899–6907. <https://doi.org/10.1002/jcb.26594>
- Ferro, A., Costa, A. R., Morais, S., Bertuccio, P., Rota, M., Pelucchi, C., Hu, J., Johnson, K. C., Zhang, Z. F., Palli, D., Ferraroni, M., Yu, G. P., Bonzi, R., Peleteiro, B., López-Carrillo, L., Tsugane, S., Hamada, G. S., Hidaka, A., Malekzadeh, R., ... Lunet, N. (2020). Fruits and vegetables intake and gastric cancer risk: A pooled analysis within the Stomach cancer Pooling Project. *International Journal of Cancer*, 147(11), 3090–3101. <https://doi.org/10.1002/ijc.33134>
- Fitzgerald, R. C., Hardwick, R., Huntsman, D., Carneiro, F., Guilford, P., Blair, V., Chung, D. C., Norton, J., Ragunath, K., Van Krieken, J. H., Dwerryhouse, S., & Caldas, C. (2010). Hereditary diffuse gastric cancer: Updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *Journal of Medical Genetics*, 47(7), 436–444. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.074237>
- Fock, K. M., Katelaris, P., Sugano, K., Ang, T. L., Hunt, R., Talley, N. J., Lam, S. K., Xiao, S. D., Tan, H. J., Wu, C. Y., Jung, H. C., Hoang, B. H., Kachintorn, U., Goh, K. L., Chiba, T., & Rani, A. A. (2009). Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for Helicobacter pylori infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 24(10), 1587–1600. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05982.x>
- Franco, A. T., Johnston, E., Krishna, U., Yamaoka, Y., Israel, D. A., Nagy, T. A., Wroblewski, L. E., Piazuelo, M. B., Correa, P., & Peek, R. M. (2008). Regulation of gastric carcinogenesis by Helicobacter pylori virulence factors. *Cancer Research*, 68(2), 379–387. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0824>

- Fuchs, C. S., Shitara, K., Di Bartolomeo, M., Lonardi, S., Al-Batran, S. E., Van Cutsem, E., Ilson, D. H., Alsina, M., Chau, I., Lacy, J., Ducreux, M., Mendez, G. A., Alavez, A. M., Takahari, D., Mansoor, W., Enzinger, P. C., Gorbounova, V., Wainberg, Z. A., Hegewisch-Becker, S., ... Asmis, T. R. (2019). Ramucirumab with cisplatin and fluoropyrimidine as first-line therapy in patients with metastatic gastric or junctional adenocarcinoma (RAINFALL): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 20(3), 420–435. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30791-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30791-5)
- Garcia-Pelaez, J., Barbosa-Matos, R., São José, C., Sousa, S., Gullo, I., Hoogerbrugge, N., Carneiro, F., & Oliveira, C. (2022). Gastric cancer genetic predisposition and clinical presentations: Established heritable causes and potential candidate genes. *European Journal of Medical Genetics*, 65(1). <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2021.104401>
- Goldenring, J. R., & Nomura, S. (2006). Differentiation of the gastric mucosa III. Animal models of oxyntic atrophy and metaplasia. In *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* (Vol. 291, Issue 6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00187.2006>
- Grad, C., Grad, S., Fărcaș, R. A., Popa, S., & Dumitrașcu, D. L. (2023). Changing trends in the epidemiology of gastric cancer. In *Medicine and Pharmacy Reports* (Vol. 96, Issue 3, pp. 229–234). Universitatea de Medicina si Farmacie Iuliu Hatieganu. <https://doi.org/10.15386/mpr-2538>
- Graham, D. Y. (1997). SPECIAL REPORTS AND REVIEWS Helicobacter pylori Infection in the Pathogenesis of Duodenal Ulcer and Gastric Cancer: A Model. In *GASTROENTEROLOGY* (Vol. 113).
- Graham, D. Y. (2015). Helicobacter pylori update: Gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. In *Gastroenterology* (Vol. 148, Issue 4, pp. 719-731.e3). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.040>
- Greco, C., Bralet, M. P., Ailane, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Rubinstein, E., Naour, F. Le, & Boucheix, C. (2010). E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. *Cancer Research*, 70(19), 7674–7683. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4482>
- Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., Koch, F., Währisch, S., Beisaw, A., Macura, K., Bläss, G., Kellis, M., Werber, M., & Herrmann, B. G. (2013). The Tissue-Specific lncRNA Fendrr Is an Essential Regulator of Heart and Body Wall Development in the Mouse. *Developmental Cell*, 24(2), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.012>
- Gu, L., Chen, M., Guo, D., Zhu, H., Zhang, W., Pan, J., Zhong, X., Li, X., Qian, H., & Wang, X. (2017). PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182692>
- Gu, Y., Chen, T., Li, G., Yu, X., Lu, Y., Wang, H., & Teng, L. (2015). LncRNAs: Emerging biomarkers in gastric cancer. In *Future Oncology* (Vol. 11, Issue 17, pp. 2427–2441). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fon.15.175>
- Gunathilake, M. N., Lee, J., Choi, I. J., Kim, Y. Il, Ahn, Y., Park, C., & Kim, J. (2019). Association between the relative abundance of gastric microbiota and the risk of gastric cancer: a case-control study. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50054-x>
- Guo, J., Yu, W., Su, H., & Pang, X. (2017). Genomic landscape of gastric cancer: molecular classification and potential targets. In *Science China Life Sciences* (Vol. 60, Issue 2, pp. 126–137). Science in China Press. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0034-1>
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B. W., Cassady, J. P., Cabili, M. N., Jaenisch, R., Mikkelsen, T. S., Jacks, T., Hacohen, N., Bernstein, B. E., Kellis, M., Regev, A., Rinn, J. L., & Lander, E. S. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223–227. <https://doi.org/10.1038/nature07672>

- Hanly, D. J., Esteller, M., & Berdasco, M. (2018). Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: Emerging targets in cancer? In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 373, Issue 1748). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0074>
- Hassin, O., & Oren, M. (2023). Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 22, Issue 2, pp. 127–144). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00571-8>
- He, C., Sidoli, S., Warneford-Thomson, R., Tatomer, D. C., Wilusz, J. E., Garcia, B. A., & Bonasio, R. (2016). High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*, 64(2), 416–430. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.034>
- Health Commission of the PRC, N. (2022). National guidelines for diagnosis and treatment of gastric cancer 2022 in China (English version). *Chinese Journal of Cancer Research*, 34(3), 207–237. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2022.03.04>
- Heer, E., Ruan, Y., Mealey, N., Quan, M. L., & Brenner, D. R. (2020). The incidence of breast cancer in Canada 1971–2015: trends in screening-eligible and young-onset age groups. *Canadian Journal of Public Health*, 111(5), 787–793. <https://doi.org/10.17269/s41997-020-00305-6>
- Hong, S., Won, Y. J., Park, Y. R., Jung, K. W., Kong, H. J., & Lee, E. S. (2020). Cancer statistics in Korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2017. *Cancer Research and Treatment*, 52(2), 335–350. <https://doi.org/10.4143/crt.2020.206>
- Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D. Y., Wong, V. W. S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
- Hu, Y., Tian, H., Xu, J., & Fang, J. Y. (2016). Roles of competing endogenous RNAs in gastric cancer. *Briefings in Functional Genomics*, 15(3), 266–273. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elv036>
- Iizasa, H., Kartika, A. V., Fekadu, S., Okada, S., Onomura, D., Wadi, A. F. A. A., Khatun, M. M., Moe, T. M., Nishikawa, J., & Yoshiyama, H. (2022). Development of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: Infection, inflammation, and oncogenesis. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 28, Issue 44, pp. 6249–6257). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i44.6249>
- Ilic, M., & Ilic, I. (2022). Epidemiology of stomach cancer. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 28, Issue 12, pp. 1187–1203). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i12.1187>
- Ismaila, B. O., & Misauno, M. A. (2013). Gastrointestinal endoscopy in Nigeria - A prospective two year audit. *Pan African Medical Journal*, 14. <https://doi.org/10.11604/pamj.2013.14.22.1865>
- Jang, J., Lee, S., Ko, K. P., Abe, S. K., Rahman, M. S., Saito, E., Islam, M. R., Sawada, N., Shu, X. O., Koh, W. P., Sadakane, A., Tsuji, I., Kim, J., Oze, I., Nagata, C., Tsugane, S., Cai, H., Yuan, J. M., Gao, Y. T., ... Park, S. K. (2022). Association between Body Mass Index and Risk of Gastric Cancer by Anatomic and Histologic Subtypes in over 500,000 East and Southeast Asian Cohort Participants. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 31(9), 1727–1734. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-22-0051>
- Jin, X., Liu, Z., Yang, D., Yin, K., & Chang, X. (2022). Recent Progress and Future Perspectives of Immunotherapy in Advanced Gastric Cancer. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.948647>
- Johnston, F. M., & Beckman, M. (2019). Updates on Management of Gastric Cancer. In *Current Oncology Reports* (Vol. 21, Issue 8). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0820-4>

- Jun, J. K., Choi, K. S., Lee, H. Y., Suh, M., Park, B., Song, S. H., Jung, K. W., Lee, C. W., Choi, I. J., Park, E. C., & Lee, D. (2017). Effectiveness of the Korean National Cancer Screening Program in Reducing Gastric Cancer Mortality. *Gastroenterology*, 152(6), 1319–1328.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.029>
- Kapusta, A., & Feschotte, C. (2014). Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: Mechanisms and biological implications. In *Trends in Genetics* (Vol. 30, Issue 10, pp. 439–452). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.08.004>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. In *Cell* (Vol. 170, Issue 6, pp. 1062–1078). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kato, S., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Tanaka, H., Kumagai, T., Ota, H., Katsuyama, T., Asaka, M., & Tatematsu, M. (2006). High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells. *International Journal of Cancer*, 119(7), 1558–1566. <https://doi.org/10.1002/ijc.21810>
- Kawazoe, A., Kuwata, T., Kuboki, Y., Shitara, K., Nagatsuma, A. K., Aizawa, M., Yoshino, T., Doi, T., Ohtsu, A., & Ochiai, A. (2017). Clinicopathological features of programmed death ligand 1 expression with tumor-infiltrating lymphocyte, mismatch repair, and Epstein–Barr virus status in a large cohort of gastric cancer patients. *Gastric Cancer*, 20(3), 407–415. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0631-3>
- KAZEMZADEH, M. I. N. A., SAFARALIZADEH, R. E. Z. A., & ORANG, A. V. (2015). LncRNAs: emerging players in gene regulation and disease pathogenesis. *Journal of Genetics*, 94(4), 771–784. <https://doi.org/10.1007/s12041-015-0561-6>
- Khoder, G., Sualeh Muhammad, J., Mahmoud, I., Soliman, S. S. M., & Burucoa, C. (2019). Prevalence of *helicobacter pylori* and its associated factors among healthy asymptomatic residents in the united arab emirates. *Pathogens*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens8020044>
- Kim, J., Bowlby, R., Mungall, A. J., Robertson, A. G., Odze, R. D., Cherniack, A. D., Shih, J., Peadamallu, C. S., Cibulskis, C., Dunford, A., Meier, S. R., Kim, J., Raphael, J., Wu, H. T., Wong, A. M., Willis, J. E., Bass, A. J., Derks, S., Garman, K., ... Zhang, J. (2017). Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature*, 541(7636), 169–174. <https://doi.org/10.1038/nature20805>
- Kim, J. H., Kim, S. S., Lee, J. H., Jung, D. H., Cheung, D. Y., Chung, W. C., & Park, S. H. (2018). Early detection is important to reduce the economic burden of gastric cancer. *Journal of Gastric Cancer*, 8(1), 82–89. <https://doi.org/10.5230/jgc.2018.18.e7>
- Kim, S. R., Kim, K., Lee, S. A., Kwon, S. O., Lee, J. K., Keum, N., & Park, S. M. (2019). Effect of red, processed, and white meat consumption on the risk of gastric cancer: An overall and dose-response meta-analysis. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11040826>
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. In *Cell* (Vol. 172, Issue 3, pp. 393–407). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Kunz, P. L., Gubens, M., Fisher, G. A., Ford, J. M., Lichtensztajn, D. Y., & Clarke, C. A. (2012). Long-term survivors of gastric cancer: A California population-based study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(28), 3507–3515. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.8028>
- Kwak, J. H., & Paik, J. K. (2020). Vitamin d status and gastric cancer: A cross-sectional study in Koreans. *Nutrients*, 12(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/nu12072004>
- Lagergren, K., Lagergren, J., & Brusselaers, N. (2014). Hormone replacement therapy and oral contraceptives and risk of oesophageal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 135(9), 2183–2190. <https://doi.org/10.1002/ijc.28869>

- Lambeth, L. S., & Smith, C. A. (2013). Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods in Molecular Biology*, 942, 205–232. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-119-6_12
- Lansdorp-Vogelaar, I., Meester, R. G. S., Laszkowska, M., Escudero, F. A., Ward, Z. J., & Yeh, J. M. (2021). Cost-effectiveness of prevention and early detection of gastric cancer in Western countries. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vols. 50–51). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2021.101735>
- Leja, M., Park, J. Y., Murillo, R., Liepniece-Karele, I., Isajevs, S., Kikuste, I., Rudzite, D., Krike, P., Parshutin, S., Polaka, I., Kirsners, A., Santare, D., Folkmanis, V., Daugule, I., Plummer, M., & Herrero, R. (2017). Multicentric randomised study of *Helicobacter pylori* eradication and pepsinogen testing for prevention of gastric cancer mortality: The GISTAR study. *BMJ Open*, 7(8). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016999>
- Li, H., Li, W., Liu, S., Zong, S., Wang, W., Ren, J., Li, Q., Hou, F., & Shi, Q. (2016). DNMT1, DNMT3A and DNMT3B Polymorphisms Associated With Gastric Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *EBioMedicine*, 13, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.028>
- Li, K., Zhang, A., Li, X., Zhang, H., & Zhao, L. (2021). Advances in clinical immunotherapy for gastric cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1876, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188615>
- Liang, W. C., Ren, J. L., Wong, C. W., Chan, S. O., Waye, M. M. Y., Fu, W. M., & Zhang, J. F. (2018). LncRNA-NEF antagonized epithelial to mesenchymal transition and cancer metastasis via cis-regulating FOXA2 and inactivating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncogene*, 37(11), 1445–1456. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0041-y>
- Lin, A., Li, C., Xing, Z., Hu, Q., Liang, K., Han, L., Wang, C., Hawke, D. H., Wang, S., Zhang, Y., Wei, Y., Ma, G., Park, P. K., Zhou, J., Zhou, Y., Hu, Z., Zhou, Y., Marks, J. R., Liang, H., ... Yang, L. (2016). The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 α signalling in triple-negative breast cancer. *Nature Cell Biology*, 18(2), 213–224. <https://doi.org/10.1038/ncb3295>
- Liu, P., Yang, H., Zhang, J., Peng, X., Lu, Z., Tong, W., & Chen, J. (2017). The lncRNA MALAT1 acts as a competing endogenous RNA to regulate KRAS expression by sponging miR-217 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05274-4>
- López, M. J., Carbajal, J., Alfaro, A. L., Saravia, L. G., Zanabria, D., Araujo, J. M., Quispe, L., Zevallos, A., Buleje, J. L., Cho, C. E., Sarmiento, M., Pinto, J. A., & Fajardo, W. (2023). Characteristics of gastric cancer around the world. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 181). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103841>
- Luo, H., Xu, G., Li, C., He, L., Luo, L., Wang, Z., Jing, B., Deng, Y., Jin, Y., Li, Y., Li, B., Tan, W., He, C., Seeruttun, S. R., Wu, Q., Huang, J., Huang, D. wang, Chen, B., Lin, S. bin, ... Xu, R. hua. (2019). Real-time artificial intelligence for detection of upper gastrointestinal cancer by endoscopy: a multicentre, case-control, diagnostic study. *The Lancet Oncology*, 20(12), 1645–1654. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30637-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30637-0)
- Ma, S., Zhou, M., Xu, Y., Gu, X., Zou, M., Abudushalamu, G., Yao, Y., Fan, X., & Wu, G. (2023). Clinical application and detection techniques of liquid biopsy in gastric cancer. In *Molecular Cancer* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01715-z>
- Mahjoubin-Tehran, M., Rezaei, S., Jesmani, A., Birang, N., Morshedi, K., Khanbabaei, H., Khan, H., Piranvisheh, A., Nejati, M., Aschner, M., & Mirzaei, H. (2021). New epigenetic players in stroke pathogenesis: From non-coding RNAs to exosomal non-coding RNAs. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 140). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111753>

- Matsui, M., & Corey, D. R. (2017). Non-coding RNAs as drug targets. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Issue 3, pp. 167–179). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.117>
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(6), 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Mauri, G., Sartore-Bianchi, A., Russo, A. G., Marsoni, S., Bardelli, A., & Siena, S. (2019). Early-onset colorectal cancer in young individuals. In *Molecular Oncology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 109–131). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12417>
- Melé, M., & Rinn, J. L. (2016). “Cat’s Cradling” the 3D Genome by the Act of LncRNA Transcription. In *Molecular Cell* (Vol. 62, Issue 5, pp. 657–664). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.011>
- Mentis, A. F. A., Boziki, M., Grigoriadis, N., & Papavassiliou, A. G. (2019). Helicobacter pylori infection and gastric cancer biology: tempering a double-edged sword. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(13), 2477–2486. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03044-1>
- Miao, Z. F., Sun, J. X., Adkins-Threats, M., Pang, M. J., Zhao, J. H., Wang, X., Tang, K. W., Wang, Z. N., & Mills, J. C. (2021). DDIT4 Licenses Only Healthy Cells to Proliferate During Injury-induced Metaplasia. *Gastroenterology*, 160(1), 260–271.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.016>
- Microsatellite instability in gastric carcinomas 583*. (1999).
- Miranti, E. H., Stolzenberg-Solomon, R., Weinstein, S. J., Selhub, J., Männistö, S., Taylor, P. R., Freedman, N. D., Albanes, D., Abnet, C. C., & Murphy, G. (2017). Low vitamin B12 increases risk of gastric cancer: A prospective study of one-carbon metabolism nutrients and risk of upper gastrointestinal tract cancer. *International Journal of Cancer*, 141(6), 1120–1129. <https://doi.org/10.1002/ijc.30809>
- Morgan, E., Arnold, M., Camargo, M. C., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Meheus, F., Verhoeven, R. H. A., Vignat, J. E. O., Laversanne, M., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2022). *The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Mozaffari, K., Mekonnen, M., Harary, M., Lum, M., Aguirre, B., Chandla, A., Wadehra, M., & Yang, I. (2023). Epithelial membrane protein 2 (EMP2): A systematic review of its implications in pathogenesis. In *Acta Histochemica* (Vol. 125, Issue 1). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2022.151976>
- Mukaisho, K. I., Nakayama, T., Hagiwara, T., Hattori, T., & Sugihara, H. (2015). Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: Interactions among pH, Helicobacter pylori, and bile acids. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00412>
- Musumba, C., Jorgensen, A., Sutton, L., Van Eker, D., Moorcroft, J., Hopkins, M., Pritchard, D. M., & Pirmohamed, M. (2012). The relative contribution of NSAIDs and Helicobacter pylori to the aetiology of endoscopically-diagnosed peptic ulcer disease: Observations from a tertiary referral hospital in the UK between 2005 and 2010. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 36(1), 48–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05118.x>
- Muzaheed. (2020). Helicobacter pylori Oncogenicity: Mechanism, Prevention, and Risk Factors. In *Scientific World Journal* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/3018326>
- Nagai, M. A. (2016). Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer (Review). In *Biomedical Reports* (Vol. 4, Issue 3, pp. 275–281). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/br.2016.580>

- Naganuma, T., & Hirose, T. (2013). Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs. In *RNA Biology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 456–461). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/rna.23547>
- Nakamura, J., Tanaka, T., Kitajima, Y., Noshiro, H., & Miyazaki, K. (2014). Methylation-mediated gene silencing as biomarkers of gastric cancer: A review. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 20, Issue 34, pp. 11991–12006). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i34.11991>
- Negovan, A., Iancu, M., Fülöp, E., & Bănescu, C. (2019). Helicobacter pylori and cytokine gene variants as predictors of premalignant gastric lesions. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 25, Issue 30, pp. 4105–4124). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i30.4105>
- Nemtsova, M. V, Kuznetsova, E. B., & Bure, I. V. (2023). Chromosomal Instability in Gastric Cancer: Role in Tumor Development, Progression, and Therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms242316961>
- Newick, K., O'Brien, S., Moon, E., & Albelda, S. M. (2017). CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annual Review of Medicine*, 68, 139–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062315-120245>
- Onoyama, T., Ishikawa, S., & Isomoto, H. (2022). Gastric cancer and genomics: review of literature. In *Journal of Gastroenterology* (Vol. 57, Issue 8, pp. 505–516). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00535-022-01879-3>
- Oo, J. A., Brandes, R. P., & Leisegang, M. S. (2022). Long non-coding RNAs: novel regulators of cellular physiology and function. In *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 474, Issue 2, pp. 191–204). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02641-z>
- Palframan, S. L., Kwok, T., & Gabriel, K. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for Helicobacter pylori pathogenesis. In *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 92). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00092>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 4, pp. 252–264). <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Park, J. Y., Forman, D., Waskito, L. A., Yamaoka, Y., & Crabtree, J. E. (2018). Epidemiology of Helicobacter pylori and CagA-positive infections and global variations in gastric cancer. *Toxins*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/toxins10040163>
- Paulin, D., Lilienbaum, A., Kardjian, S., Agbulut, O., Li, Z., & Bernard, S. (2022). *Vimentin: Regulation and Pathogenesis*.
- Pei, Y. F., Zhang, Y. J., Lei, Y., Wu, D. W., Ma, T. H., & Liu, X. Q. (2017). Hypermethylation of the CHRDL1 promoter induces proliferation and metastasis by activating Akt and Erk in gastric cancer. *Oncotarget*, 8(14), 23155–23166. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15513>
- Peng, W., Si, S., Zhang, Q., Li, C., Zhao, F., Wang, F., Yu, J., & Ma, R. (2015). Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0197-7>
- peng Xu, T., Ma, P., yu Wang, W., Shuai, Y., fen Wang, Y., Yu, T., Xia, R., & qian Shu, Y. (2019). KLF5 and MYC modulated LINC00346 contributes to gastric cancer progression through acting as a competing endogenous RNA and indicates poor outcome. *Cell Death and Differentiation*, 26(11), 2179–2193. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0236-y>
- Pilar, A., Gupta, M., Laskar, S. G., & Laskar, S. (2017). Intraoperative radiotherapy: Review of techniques and results. In *ecancermedicalscience* (Vol. 11). Cancer Intelligence. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.750>

- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
- Puliga, E., Corso, S., Pietrantonio, F., & Giordano, S. (2021). Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 95). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102175>
- Qian, X., Zhao, J., Yeung, P. Y., Zhang, Q. C., & Kwok, C. K. (2019). Revealing lncRNA Structures and Interactions by Sequencing-Based Approaches. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 44, Issue 1, pp. 33–52). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.012>
- Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 17, Issue 1, pp. 47–62). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>
- Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. In *Przegląd Gastroenterologiczny* (Vol. 14, Issue 1, pp. 26–38). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>
- Ren, J. S., Kamangar, F., Forman, D., & Islami, F. (2012). Pickled food and risk of gastric cancer - A systematic review and meta-analysis of English and Chinese literature. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 21(6), 905–915. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0202>
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2024). *Annual Review of Biochemistry Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions*. 31, 49. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917>
- Sasazuki, S., Sasaki, S., & Tsugane, S. (2002). Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *International Journal of Cancer*, 101(6), 560–566. <https://doi.org/10.1002/ijc.10649>
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 18, pp. 3033–3046). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>
- Saumoy, M., Schneider, Y., Shen, N., Kahaleh, M., Sharaiha, R. Z., & Shah, S. C. (2018). Cost Effectiveness of Gastric Cancer Screening According to Race and Ethnicity. *Gastroenterology*, 155(3), 648–660. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.05.026>
- Saunders, J. H., Bowman, C. R., Reece-Smith, A. M., Pang, V., Dorrington, M. S., Mumtaz, E., Soomro, I., Kaye, P., Madhusudan, S., & Parsons, S. L. (2017). The role of adjuvant platinum-based chemotherapy in esophagogastric cancer patients who received neoadjuvant chemotherapy prior to definitive surgery. *Journal of Surgical Oncology*, 115(7), 821–829. <https://doi.org/10.1002/jso.24601>
- Schmitt, A. M., & Chang, H. Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. In *Cancer Cell* (Vol. 29, Issue 4, pp. 452–463). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.010>
- Schulz, C., Schütte, K., Mayerle, J., & Malfertheiner, P. (2019). The role of the gastric bacterial microbiome in gastric cancer: *Helicobacter pylori* and beyond. In *Therapeutic Advances in Gastroenterology* (Vol. 12). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1756284819894062>
- Sekiguchi, M., Oda, I., Matsuda, T., & Saito, Y. (2022). Epidemiological Trends and Future Perspectives of Gastric Cancer in Eastern Asia. In *Digestion* (Vol. 103, Issue 1, pp. 22–28). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000518483>

- Serra, O., Galán, M., Ginesta, M. M., Calvo, M., Sala, N., & Salazar, R. (2019). Comparison and applicability of molecular classifications for gastric cancer. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 77, pp. 29–34). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.05.005>
- Sexton, R. E., Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020a). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 39, Issue 4, pp. 1179–1203). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09925-3>
- Sexton, R. E., Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020b). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 39, Issue 4, pp. 1179–1203). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09925-3>
- Shadifar, M., Ataee, R., Ataie, A., Morad, A., Gorgi, H., Nasrabadi, N. N., & Nouri, S. (2015). Genetic and molecular aspects of *Helicobacter pylori* in gastritis, pre-cancerous conditions and gastric adenocarcinoma. In *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* (Vol. 8).
- Shah, S. C., Dai, Q., Zhu, X., Peek, R. M., Smalley, W., Roumie, C., & Shrubsole, M. J. (2020). Associations between calcium and magnesium intake and the risk of incident gastric cancer: A prospective cohort analysis of the National Institutes of Health-American Association of Retired Persons (NIH-AARP) Diet and Health Study. *International Journal of Cancer*, 146(11), 2999–3010. <https://doi.org/10.1002/ijc.32659>
- Sharaf, R. N., Shergill, A. K., Odze, R. D., Krinsky, M. L., Fukami, N., Jain, R., Appalaneni, V., Anderson, M. A., Ben-Menachem, T., Chandrasekhara, V., Chathadi, K., Decker, G. A., Early, D., Evans, J. A., Fanelli, R. D., Fisher, D. A., Fisher, L. R., Foley, K. Q., Hwang, J. H., ... Cash, B. D. (2013). Endoscopic mucosal tissue sampling. *Gastrointestinal Endoscopy*, 78(2), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2013.04.167>
- Shin, W. S., Xie, F., Chen, B., Yu, P., Yu, J., To, K. F., & Kang, W. (2023). Updated Epidemiology of Gastric Cancer in Asia: Decreased Incidence but Still a Big Challenge. In *Cancers* (Vol. 15, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers15092639>
- Shirani, M., Pakzad, R., Haddadi, M. H., Akrami, S., Asadi, A., Kazemian, H., Moradi, M., Kaviar, V. H., Zomorodi, A. R., Khoshnood, S., Shafieian, M., Tavasolian, R., Heidary, M., & Saki, M. (2023). The global prevalence of gastric cancer in *Helicobacter pylori*-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08504-5>
- Silva, A., Bullock, M., & Calin, G. (2015). The clinical relevance of long non-coding RNAs in cancer. In *Cancers* (Vol. 7, Issue 4, pp. 2169–2182). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers7040884>
- Smith, S., Fowora, M., & Pellicano, R. (2019). Infections with *Helicobacter pylori* and challenges encountered in Africa. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 25, Issue 25, pp. 3183–3195). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i25.3183>
- Smyth, E. C., Nilsson, M., Grabsch, H. I., van Grieken, N. C., & Lordick, F. (2020). Gastric cancer. In *The Lancet* (Vol. 396, Issue 10251, pp. 635–648). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5)
- Solaymani-Dodaran, M., Logan, R. F. A., West, J., Card, T., & Coupland, C. (2004). Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut*, 53(8), 1070–1074. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.028076>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021a). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 96–118). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021b). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 96–118). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>

- Stewart, G. L., Sage, A. P., Enfield, K. S. S., Marshall, E. A., Cohn, D. E., & Lam, W. L. (2021). Deregulation of a Cis-Acting lncRNA in Non-small Cell Lung Cancer May Control HMGA1 Expression. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.615378>
- Strong, V. E., Russo, A., Yoon, S. S., Brennan, M. F., Coit, D. G., Zheng, C. H., Li, P., & Huang, C. M. (2017). Comparison of Young Patients with Gastric Cancer in the United States and China. *Annals of Surgical Oncology*, 24(13), 3964–3971. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-6073-2>
- Sun, M., Xia, R., Jin, F., Xu, T., Liu, Z., De, W., & Liu, X. (2014). Downregulated long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *Tumor Biology*, 35(2), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1142-z>
- Sung, H., Siegel, R. L., Torre, L. A., Pearson-Stuttard, J., Islami, F., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Shuval, K., Gapstur, S. M., Jacobs, E. J., Giovannucci, E. L., & Jemal, A. (2019). Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(2), 88–112. <https://doi.org/10.3322/caac.21499>
- Sycuro, L. K., Pincus, Z., Gutierrez, K. D., Biboy, J., Stern, C. A., Vollmer, W., & Salama, N. R. (2010). Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes helicobacter pylori's helical shape and stomach colonization. *Cell*, 141(5), 822–833. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.046>
- Tamtaji, O. R., Derakhshan, M., Noshabad, F. Z. R., Razaviyan, J., Hadavi, R., Jafarpour, H., Jafari, A., Rajabi, A., Hamblin, M. R., Mahabady, M. K., Taghizadieh, M., & Mirzaei, H. (2022). Non-Coding RNAs and Brain Tumors: Insights Into Their Roles in Apoptosis. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.792185>
- Tan, A. C., Chan, D. L., Faisal, W., & Pavlakis, N. (2018). New drug developments in metastatic gastric cancer. In *Therapeutic Advances in Gastroenterology* (Vol. 11). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1756284818808072>
- Tong, C., & Yin, Y. (2021). Localization of RNAs in the nucleus: cis- and trans- regulation. In *RNA Biology* (Vol. 18, Issue 12, pp. 2073–2086). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1894025>
- Ulitsky, I. (2016). Evolution to the rescue: Using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 17, Issue 10, pp. 601–614). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.85>
- Uszczynska-Ratajczak, B., Lagarde, J., Frankish, A., Guigó, R., & Johnson, R. (2018). Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 19, Issue 9, pp. 535–548). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0017-y>
- van Tong, H., Brindley, P. J., Meyer, C. G., & Velavan, T. P. (2017). Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. In *EBioMedicine* (Vol. 15, pp. 12–23). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.034>
- Wagner, A. D., Syn, N. L. X., Moehler, M., Grothe, W., Yong, W. P., Tai, B. C., Ho, J., & Unverzagt, S. (2017). Chemotherapy for advanced gastric cancer. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2017, Issue 8). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004064.pub4>
- Wang, D. hui, Guo, L., & Wu, X. hua. (2015). Checkpoint inhibitors in immunotherapy of ovarian cancer. In *Tumor Biology* (Vol. 36, Issue 1, pp. 33–39). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2848-2>
- Wang, Q., Liu, G., & Hu, C. (2019). Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology Research*, 12(6), 275–282. <https://doi.org/10.14740/gr1187>

- Wang, S., Zheng, R., Arnold, M., Abnet, C., Zeng, H., Zhang, S., Chen, R., Sun, K., Li, L., An, L., Bray, F., Wei, W., & He, J. (2022). Global and national trends in the age-specific sex ratio of esophageal cancer and gastric cancer by subtype. *International Journal of Cancer*, 151(9), 1447–1461. <https://doi.org/10.1002/ijc.34158>
- Wang, Y., Gao, L., Zhu, B., Zhu, H., Luo, Y., Wang, Q., & Zuo, J. (2018). Integrative analysis of long non-coding RNA acting as ceRNAs involved in chilling injury in tomato fruit. *Gene*, 667, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.05.030>
- Wang, Y., Zhang, L., Yang, Y., Lu, S., & Chen, H. (2021). Progress of gastric cancer surgery in the era of precision medicine. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 17, Issue 4, pp. 1041–1049). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.56735>
- Wang, Z., El-Serag, H. B., & Thrift, A. P. (2021). Increasing Incidence of Advanced Non-cardia Gastric Cancers Among Younger Hispanics in the USA. *Digestive Diseases and Sciences*, 66(5), 1669–1672. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06397-x>
- Wang, Z., Xu, J., Shi, Z., Shen, X., Luo, T., Bi, J., & Nie, M. (2016). Clinicopathologic characteristics and prognostic of gastric cancer in young patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 51(9), 1043–1049. <https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1180707>
- Watari, J., Chen, N., Amenta, P. S., Fukui, H., Oshima, T., Tomita, T., Miwa, H., Lim, K. J., & Das, K. M. (2014). Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 20, Issue 18, pp. 5461–5473). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5461>
- Wei, H., Pu, K., Liu, X. G., Li, B. X., Zhang, H. S., Wang, H., Wang, H., Sun, W. M., & Wang, Y. P. (2019). The diagnostic value of circulating microRNAs as a biomarker for gastric cancer: A meta-analysis. *Oncology Reports*, 41(1), 87–102. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6782>
- Wen, J., & Shen, H. (2023). Trend of gastric cancer incidence and death rate in adolescents and young adults: A retrospective cohort study based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 38(3), 393–403. <https://doi.org/10.1111/jgh.16064>
- Wen, Y. F., Chen, M. X., Yin, G., Lin, R., Zhong, Y. J., Dong, Q. Q., & Wong, H. M. (2021). The global, regional, and national burden of cancer among adolescents and young adults in 204 countries and territories, 1990–2019: a population-based study. *Journal of Hematology and Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01093-3>
- Williams, C. D., Bullard, A. J., O’Leary, M., Thomas, R., Redding, T. S., & Goldstein, K. (2019). Racial/Ethnic Disparities in BRCA Counseling and Testing: a Narrative Review. *Journal of Racial and Ethnic Health Disparities*, 6(3), 570–583. <https://doi.org/10.1007/s40615-018-00556-7>
- Wu, T., & Wu, L. (2021). The Role and Clinical Implications of the Retinoblastoma (RB)-E2F Pathway in Gastric Cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.655630>
- Yan, X., Hu, Z., Feng, Y., Hu, X., Yuan, J., Zhao, S. D., Zhang, Y., Yang, L., Shan, W., He, Q., Fan, L., Kandalaft, L. E., Tanyi, J. L., Li, C., Yuan, C. X., Zhang, D., Yuan, H., Hua, K., Lu, Y., ... Zhang, L. (2015). Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell*, 28(4), 529–540. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.006>
- Yang, F., Bi, J., Xue, X., Zheng, L., Zhi, K., Hua, J., & Fang, G. (2012). Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS Journal*, 279(17), 3159–3165. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x>
- Yang, J., Liu, Z., Zeng, B., Hu, G., & Gan, R. (2020). Epstein–Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype. In *Cancer Letters* (Vol. 495, pp. 191–199). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.09.019>

- Yang, J. X., Rastetter, R. H., & Wilhelm, D. (2016). Non-coding RNAs: An introduction. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 886, pp. 13–32). Springer New York LLC.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_2
- Yang, L., Ying, X., Liu, S., Lyu, G., Xu, Z., Zhang, X., Li, H., Li, Q., Wang, N., & Ji, J. (2020). Gastric cancer: Epidemiology, risk factors and prevention strategies. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(6), 695–704.
<https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.03>
- Yang, T., Chen, W. C., Shi, P. C., Liu, M. R., Jiang, T., Song, H., Wang, J. Q., Fan, R. Z., Pei, D. S., & Song, J. (2020). Long noncoding RNA MAPKAPK5-AS1 promotes colorectal cancer progression by cis-regulating the nearby gene MK5 and acting as a let-7f-1-3p sponge. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01633-8>
- Yang, W. J., Zhao, H. P., Yu, Y., Wang, J. H., Guo, L., Liu, J. Y., Pu, J., & Lv, J. (2023). Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 29, Issue 16, pp. 2452–2468). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i16.2452>
- Yao, Q., Qi, X., & Xie, S. H. (2020). Sex difference in the incidence of cardia and non-cardia gastric cancer in the United States, 1992–2014. *BMC Gastroenterology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01551-1>
- Yao, R. W., Wang, Y., & Chen, L. L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 5, pp. 542–551). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0311-8>
- Ye, X., Fu, J., Yang, Y., Gao, Y., Liu, L., & Chen, S. (2013). Frequency-Risk and Duration-Risk Relationships between Aspirin Use and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071522>
- Zhang, E.-B., Kong, R., Yin, D.-D., You, L.-H., Sun, M., Han, L., Xu, T.-P., Xia, R., Yang, J.-S., De, W., & Chen, J. F. (n.d.). Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a (Vol. 5, Issue 8). www.impactjournals.com/oncotarget
- Zhang, K., Yin, J., Huang, H., Wang, L., Guo, L., Shi, J., & Dai, M. (2020). Expenditure and Financial Burden for Stomach Cancer Diagnosis and Treatment in China: A Multicenter Study. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00310>
- Zhang, M., Xu, Y., Zhang, Y., & Lou, G. (2023). E2F8 knockdown suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest via Wnt/β-Catenin pathway in ovarian cancer. *Chinese Journal of Physiology*, 66(4), 266–275. <https://doi.org/10.4103/cjop.CJOP-D-22-00142>
- Zhang, X. W., Bu, P., Liu, L., Zhang, X. Z., & Li, J. (2015). Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(3), 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.121>
- Zhang, Y., Lin, Y., Duan, J., Xu, K., Mao, M., & Wang, X. (2020). A population-based analysis of distant metastasis in stage iv gastric cancer. *Medical Science Monitor*, 26. <https://doi.org/10.12659/MSM.923867>
- Zhang, Z., Li, J., Huang, Y., Peng, W., Qian, W., Gu, J., Wang, Q., Hu, T., Ji, D., Ji, B., Zhang, Y., Wang, S., & Sun, Y. (2018). Upregulated miR-1258 regulates cell cycle and inhibits cell proliferation by directly targeting E2F8 in CRC. *Cell Proliferation*, 51(6). <https://doi.org/10.1111/cpr.12505>
- Zhao, L., Wang, J., Li, Y., Song, T., Wu, Y., Fang, S., Bu, D., Li, H., Sun, L., Pei, D., Zheng, Y., Huang, J., Xu, M., Chen, R., Zhao, Y., & He, S. (2021). NONCODEV6: An updated database dedicated to long non-coding RNA annotation in both animals and plants. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D165–D171. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1046>

- Zhao, P., Lu, Y., & Liu, L. (2015). Correlation of decreased expression of PHLDA1 protein with malignant phenotype of gastric adenocarcinoma. In *Int J Clin Exp Pathol* (Vol. 8, Issue 5, pp. 5230–5235). www.ijcep.com/
- Zhao, Y., Liu, Y., Lin, L., Huang, Q., He, W., Zhang, S., Dong, S., Wen, Z., Rao, J., Liao, W., & Shi, M. (2018). The lncRNA MACC1-AS1 promotes gastric cancer cell metabolic plasticity via AMPK/Lin28 mediated mRNA stability of MACC1. *Molecular Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0820-2>
- Zhao, Y., Teng, H., Yao, F., Yap, S., Sun, Y., & Ma, L. (2020). Challenges and strategies in ascribing functions to long noncoding RNAs. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12061458>
- Zhu, R., Gires, O., Zhu, L., Liu, J., Li, J., Yang, H., Ju, G., Huang, J., Ge, W., Chen, Y., Lu, Z., & Wang, H. (2019). TSPAN8 promotes cancer cell stemness via activation of sonic Hedgehog signaling. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10739-3>
- Zhu, W., Song, S., Xu, Y., Sheng, H., & Wang, S. (2024). EMP3: A promising biomarker for tumor prognosis and targeted cancer therapy. *Cancer Biomarkers*, 40(3–4), 227–239. <https://doi.org/10.3233/CBM-230504>
- Zubarayev, M., Min, E. K., & Son, T. (2019). Clinical and molecular prognostic markers of survival after surgery for gastric cancer: Tumor-node-metastasis staging system and beyond. In *Translational Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 4, Issue August). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.08.05>