

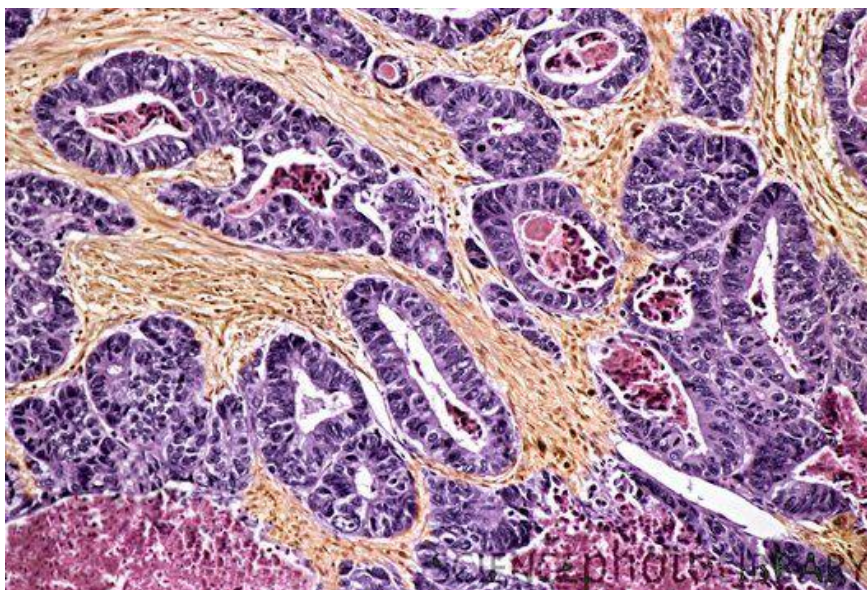
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΝΕΦΕΛΗ ΧΡΥΣΑΦΗ, ΑΜ 00245

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

*«Μελέτη και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός του lncRNA REAKTn στον
γαστρικό καρκίνο μέσω RNAi με χρήση λεντιών»*



Εικόνα 1: Οπτική μικροσκοπία τομής από αδενοκαρκίνωμα του στομάχου
(https://debbiesdream.org/stomach_cancer_101/types-of-stomach-cancer/)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Γιακουντής Αντώνιος:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Ψαρρά Άννα-Μαρία:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιοματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, χάρη στην πολύτιμη βοήθεια ενός πολύ άξιου καθηγητή, του κυρίου Γιακουντή Αντώνιου, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για όλα. Χωρίς την καθοδήγηση, την βοήθεια, τις γνώσεις, την εμπιστοσύνη και τον ασφαλή χώρο που μου προσέφερε ώστε να μπορώ να εκφράζω τις ιδέες, τις παρατηρήσεις και τους προβληματισμούς μου ελεύθερα, η εργασία αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κυρίες Λιαδάκη Καλλιόπη και Ψαρρά Άννα-Μαρία για τις παρατηρήσεις τους, την καθοδήγηση και την προθυμία να συμμετέχουν σε αυτό το ταξίδι. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μπεγγόλι Ελένη, η οποία ενδιαφέρθηκε να με βοηθήσει να γίνω πραγματικό μέλος του εργαστηρίου, απαντώντας στις ερωτήσεις και τους προβληματισμούς μου.

Καταλυτική ωστόσο ήταν η συμβολή δύο κοριτσιών, της Γούργου Μαρίας και της Πατουλιώτη Μαρίνας, των συνεργατών μου στο εργαστήριο, τις οποίες και ευχαριστώ άπειρα. Αν και άγνωστες στην αρχή, καταφέραμε να γίνουμε μια ομάδα με σωστό προγραμματισμό, κοινούς στόχους, και κυρίως πολύ όμορφο κλίμα συνεργασίας, ενδιαφέροντος, γέλιου, όπου μπορούσαμε να μοιραστούμε όλες τις σκέψεις μας άφοβα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου Αλεξία, που με μεγάλωσε με τόση αυτοθυσία ώστε να μπορώ να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου, τον πατέρα μου, Γιάννη, που αν και δεν είναι πια εδώ, είναι πάντα στην καρδιά μου, συνοδοιπόρος σε όλα μου τα εγχειρήματα, τον αδελφό μου Γιώργο για την αμέριστη αγάπη και στήριξη του, και τον σύντροφό μου Πάνο, που με κράτησε στα πόδια μου όσες φορές δεν ένιωσα σίγουρη.

Η εργασία αυτή είναι αποτέλεσμα δουλειάς πολλών μηνών, και νιώθω αμέριστη ευγνωμοσύνη για όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτό το εγχείρημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως, με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, κυρίως λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης και της περιορισμένης αποτελεσματικότητας των υπάρχουσών θεραπευτικών επιλογών. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα πολύπλοκη ασθένεια, με τρόπο ταξινόμησης ανάλογα με τα ιστολογικά και μοριακά ευρήματα. Τα τελευταία χρόνια, τα μακρά μη κωδικά RNA (lncRNA) έχουν αναδειχθεί ως σημαντικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, εμπλεκόμενοι σε κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετάσταση και η αντίσταση στα φάρμακα. Η αξιοποίηση αυτών των χαρακτηριστικών των lncRNA, τα καθιστά ιδανικούς βιοδείκτες τόσο για την διάγνωση όσο και την στοχευμένη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στο lncRNA REAKTn, το οποίο εμφανίζει διαφοροποιημένη έκφραση στον γαστρικό καρκίνο, με στόχο τη διερεύνηση της ρυθμιστικής του επίδρασης σε επιλεγμένα γονίδια-στόχους. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η γενετική τροποποίηση και αποσιώπηση της έκφρασης του REAKTn μέσω τεχνολογίας RNAi με χρήση λεντιών στις κυτταρικές σειρές AGS, GES1 και MKN45. Ακολούθησε μοριακή μελέτη μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) για την αξιολόγηση της έκφρασης του REAKTn και οκτώ συνολικά γονιδίων-στόχων, μεταξύ των οποίων τα REAKTn_TG1 και REAKTn_TG2, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, την επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάβαση και την απόπτωση. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε και φαινοτυπική ανάλυση με στόχο να βρεθεί ο τρόπος που συνδέεται η αποσιώπηση με καταστάσεις όπως η μεταστατική ικανότητα των κυττάρων ή η ικανότητα πολλαπλασιασμού. Τέλος, επιχειρήθηκε η κατασκευή γενετικά τροποποιημένων σταθερών κυτταρικών σειρών που θα επιτρέπουν την επαγωγή αποσιώπησης του REAKTn μεταγράφου με την χρήσης συστήματος επαγόμενης σίγησης TetR, το οποίο δεν έφερε τα επιθυμητά αποτελέσματα ωστόσο με τις κατάλληλες τροποποιήσεις μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά μελλοντικά ευρήματα.

Λέξεις-κλειδιά: γαστρικός καρκίνος, lncRNA, REAKTn, RNAi, λεντιοί, φορείς, γενετική τροποποίηση, γονίδια-στόχοι, μοριακή μελέτη, φαινοτυπική μελέτη, σύστημα TetR

ABSTRACT

Gastric cancer is one of the most widespread types of cancer worldwide, with high mortality rates, mainly due to late diagnosis and the limited effectiveness of existing therapeutic options. It is a particularly complex disease, classified based on histological and molecular findings. In recent years, long non-coding RNAs (lncRNA) have emerged as key regulators of gene expression, participating in critical cellular processes such as proliferation, apoptosis, metastasis, and drug resistance. These characteristics render lncRNA promising biomarkers for both the diagnosis and targeted treatment of gastric cancer. This study focuses on the lncRNA REAKTn, which exhibits differential expression in gastric cancer, aiming to investigate its regulatory effect on selected target genes. Initially, genetic modification and silencing of REAKTn expression were performed using RNAi-based lentiviral technology in AGS, GES1, and MKN45 cell lines. This was followed by molecular analysis using quantitative real-time PCR (RT-qPCR) to evaluate the expression of REAKTn and eight target genes, including REAKTn_TG1 and REAKTn_TG2, as well as genes related to cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and apoptosis. Subsequently, phenotypic analysis was also performed in order to investigate how REAKTn silencing is associated with cellular behaviors such as metastatic potential and proliferative capacity. Finally, an attempt was made to generate genetically modified stable cell lines with inducible silencing of the REAKTn transcript using the TetR-inducible knockdown system. Although this approach did not yield the desired results, with further optimization it could potentially lead to important future findings.

Key words: gastric cancer, lncRNA, REAKTn, RNAi, lentiviral vectors, gene silencing, genetic modification, target genes, molecular analysis, phenotypic analysis, TetR-inducible system

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

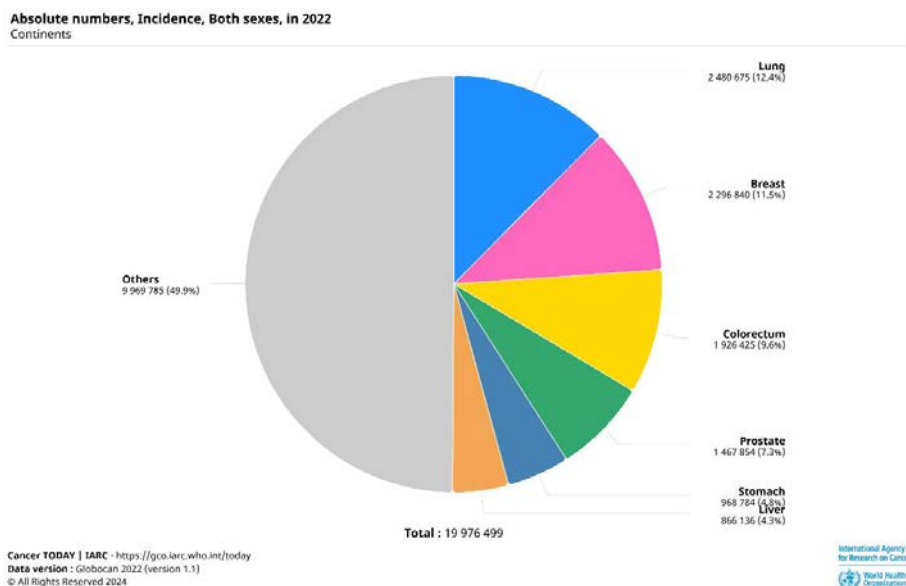
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Γαστρικός καρκίνος και επιδημιολογία	8
1.1.1 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης γαστρικού καρκίνου.....	10
1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου	11
1.2.1 Ιστολογική ταξινόμηση κατά Lauren	11
1.2.2 Μοριακή ταξινόμηση.....	12
1.3 Πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία γαστρικού καρκίνου	14
1.3.1 Στρατηγικές πρόληψης	14
1.3.2 Διάγνωση	14
1.3.3 Θεραπεία.....	15
1.4 Τα μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (Long Non-Coding RNAs – lncRNA) ...	16
1.4.1 Ταξινόμηση των lncRNA ανάλογα με την ενδοκυττάρια θέση και τον τρόπο δράσης	17
1.4.2. Ο ρόλος των lncRNA στον καρκίνο	20
1.5 Γονίδια HOX και ο ρόλος τους στον γαστρικό καρκίνο	22
2. ΣΚΟΠΟΣ	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
3.1. Υλικά	25
3.1.1 Αλληλουχίες.....	25
3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης.....	25
3.1.3 Βακτηριακά στελέχη.....	27
3.1.4 Κυτταρικές σειρές	27
3.2 Μέθοδοι	28
3.2.1 Διερευνητικές μέθοδοι έκφρασης lncRNA σχετικών με τον γαστρικό καρκίνο σε κυτταρικές σειρές	28
3.2.1.1 Σύνθεση cDNA.....	28
3.2.1.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR).....	29
3.2.2 Μέθοδοι παροδικής γενετικής τροποποίησης κυτταρικών σειρών με τη χρήση λεντιών	30
3.2.2.1 Απομόνωση RNA (RNA Extraction)	30
3.2.2.2 Αντίδραση με την DNase (DNase treatment)	30
3.2.2.3 Σύνθεση cDNA.....	31
3.2.2.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR).....	31
3.2.2.5 Δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay).....	31
3.2.2.6 Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay – CFA)	31

3.2.3 Μέθοδοι για την δημιουργία γενετικά τροποποιημένων σταθερών κυτταρικών σειρών	32
3.2.3.1 Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων (Oligo Annealing)	32
3.2.3.2 Αντίδραση λιγάσης (Ligation)	32
3.2.3.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH5a.....	33
3.2.3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini Prep).....	33
3.2.3.5 Αντίδραση πέψης (Ligation) και έλεγχος με χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (Agarose Gel-Electrophoresis)	34
3.2.3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση kit (Midi Prep).....	34
3.2.3.7 Γραμμοποίηση (Linearization) ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, έλεγχος αυτής και καθαρισμός τελικού προϊόντος με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου	35
3.2.3.8 Γενετική τροποποίηση σταθερών κυτταρικών σειρών	36
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
4.1 Διερευνητική μελέτη έκφρασης του REAKTn και των REAKTn_TG1, REAKTn_TG2 σε κυτταρικές σειρές φυσιολογικού και καρκινικού επιθηλίου .	37
4.2 Αποτελέσματα γενετικής τροποποίησης κυτταρικών σειρών με χρήση λεντιών	38
4.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay - CFA).....	40
4.4 Αποτελέσματα δευτερεύουσας qPCR για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο	42
4.5 Αποτελέσματα δοκιμασίας επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay).....	44
4.6 Αποτελέσματα προσπάθειας δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων σταθερών κυτταρικών σειρών.....	45
4.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για τον έλεγχο μετασχηματισμού του pTER/shREAKTn.....	45
4.6.2 Αποτελέσματα δεύτερης γραμμοποίησης του ανασυνδυασμένου φορέα	46
4.6.3 Αποτελέσματα γενετικής τροποποίησης κυττάρων με τον ευθυγραμμισμένο φορέα pTER/shREAKTn.....	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

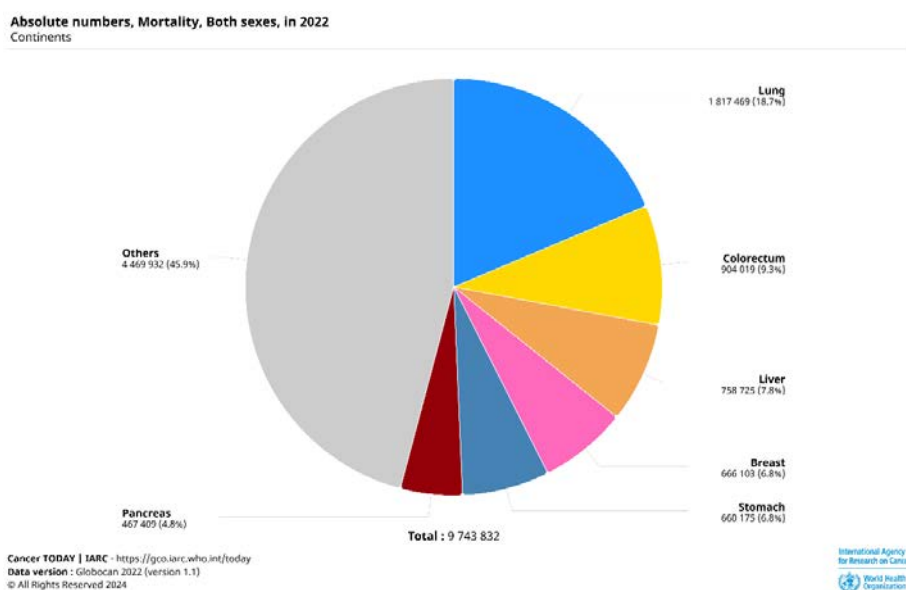
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γαστρικός καρκίνος και επιδημιολογία

Ο καρκίνος του στομάχου, ή γαστρικός καρκίνος, αποτελεί ένα μείζον υγειονομικό πρόβλημα, καθώς πρόκειται για την δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως [1, 2]. Είναι ο πέμπτος πιο συχνός καρκίνος, τόσο σε ποσοστό εμφάνισης όσο και θνησιμότητας, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του ήπατος. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με δεδομένα του World Health Organization (WHO), το 2022 εμφανίστηκαν 968.784 περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, εκ των οποίων οι 660.175 ήταν θανατηφόρες.

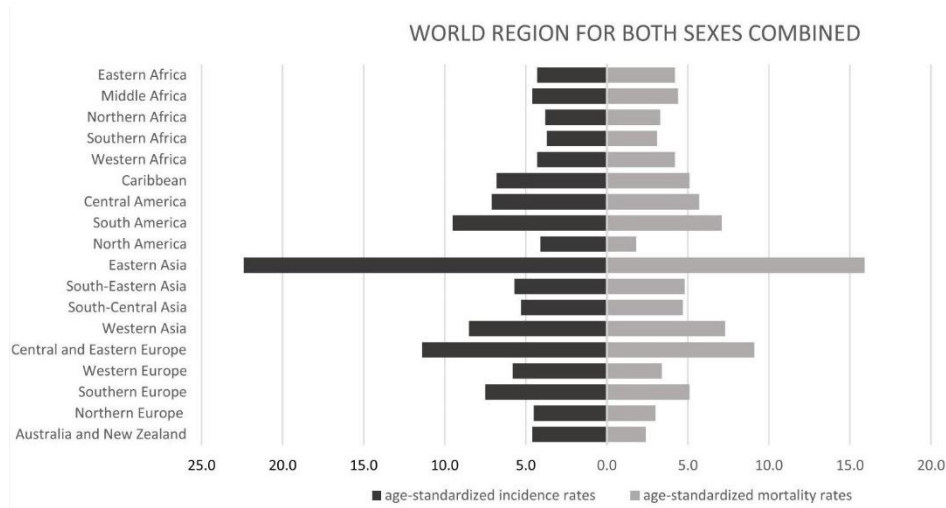


Εικόνα 2: Συχνότητα εμφάνισης τύπων καρκίνου παγκοσμίως, δεδομένα του WHO για το 2022



Εικόνα 3: Συχνότητα θνησιμότητας τύπων καρκίνου παγκοσμίως, δεδομένα του WHO για το 2022

Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο γαστρικός καρκίνος παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στην εμφάνισή του, ανάλογα με τον γεωγραφικό τόπο, το φύλο, την ηλικία και την καταγωγή [1-5]. Συγκεκριμένα, αναφορικά με το φύλο, εκτιμάται ότι η συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι περίπου 2:1, δηλαδή οι άνδρες έχουν διπλάσιες πιθανότητες εμφάνισής του. Σχετικά με τον γεωγραφικό τόπο, οι μεγαλύτερες περιπτώσεις εμφάνισης γαστρικού καρκίνου παρατηρούνται στη νοτιοανατολική Ασία, σε χώρες όπως η Κίνα, η Ιαπωνία και η Κορέα και κυρίως σε άνδρες [2]. Η συχνότητα εμφάνισης στον υπόλοιπο κόσμο μοιράζεται εξίσου σε κεντρική και ανατολική Ευρώπη και λατινική Αμερική, ενώ στην βόρεια Αμερική, την Ωκεανία και δυτική Ευρώπη δεν είναι πλέον τόσο συχνό φαινόμενο [1, 2, 6, 7]. Η Αφρική επίσης παρουσιάζει πολύ χαμηλά ποσοστά εμφάνισης και θανάτου λόγω γαστρικού καρκίνου [8].



Εικόνα 4: Ραβδόγραμμα με τα παγκόσμια ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας καρκίνου ανάλογα με τον γεωγραφικό τόπο[8].

World region	Incidence				Mortality				M:I ratio		
	Males		Females		Males		Females		Males	Females	Total
	Number of cases	ASR	Number of cases	ASR	Number of deaths	ASR	Number of deaths	ASR			
Africa											
Eastern Africa	4,919	4.9	5,042	4.2	4,261	4.3	4,454	3.7	0.9	0.9	0.9
Middle Africa	1,731	4.6	1,614	3.8	1,535	4.1	1,437	3.4	0.9	0.9	0.9
Northern Africa	5,414	5.4	3,983	3.5	4,489	4.5	3,238	2.9	0.8	0.8	0.8
Southern Africa	1,096	4.7	754	2.4	954	4.2	621	2.0	0.9	0.8	0.9
Western Africa	4,340	4.8	3,509	3.5	3,860	4.3	3,096	3.1	0.9	0.9	0.9
America											
Caribbean	2,549	9.0	1,696	5.0	2,091	7.3	1,303	3.7	0.8	0.8	0.8
Central America	7,470	8.7	6,355	6.1	6,019	7.0	4,814	4.6	0.8	0.8	0.8
South America	30,520	12.1	19,027	6.0	24,449	9.6	14,716	4.6	0.8	0.8	0.8
Northern America	18,175	5.4	11,597	3.1	8,090	2.3	5,301	1.3	0.4	0.5	0.4
Asia											
Eastern Asia	452,324	32.5	204,025	13.2	295,349	21.1	139,862	8.8	0.7	0.7	0.7
All but China	120,695	42.6	57,146	16.1	38,837	12.2	22,585	5.0	0.3	0.4	0.3
China	331,629	29.5	146,879	12.3	256,512	22.8	117,277	9.6	0.8	0.8	0.8
South-Eastern Asia	24,142	7.3	15,621	4.0	20,106	6.2	12,708	3.2	0.8	0.8	0.8
South-Central Asia	67,701	7.4	34,975	3.7	59,832	6.6	29,763	3.1	0.9	0.9	0.9
All but India	27,015	10.8	15,439	5.8	23,402	9.4	12,940	4.9	0.9	0.8	0.9
India	40,686	6.1	19,536	2.9	36,430	5.5	16,823	2.5	0.9	0.9	0.9
Western Asia	13,235	11.4	7,921	6.1	11,157	9.8	6,429	4.9	0.8	0.8	0.8
Europe											
Central-Eastern Europe	39,925	17.4	25,591	7.1	30,443	13.1	19,575	5.1	0.8	0.8	0.8
Northern Europe	7,263	6.2	4,214	3.1	4,830	3.9	2,938	2.0	0.7	0.7	0.7
Southern Europe	18,628	10.2	11,927	5.0	13,143	6.7	8,313	3.2	0.7	0.7	0.7
Western Europe	17,900	8.2	10,590	3.8	11,039	4.6	6,716	2.1	0.6	0.6	0.6
Oceania											
Australia/New Zealand	1,799	6.4	877	2.8	839	2.7	516	1.5	0.5	0.6	0.5
Melanesia	333	9.9	226	6.2	260	8.0	175	4.8	0.8	0.8	0.8
Micronesia/Polynesia	59	9.7	36	5.5	42	7.1	30	4.5	0.7	0.8	0.8
HDI											
Low HDI	12,195	5.4	10,034	3.8	10,784	4.8	8,856	3.4	0.9	0.9	0.9
Medium HDI	77,748	7.7	44,267	4.1	67,794	6.7	37,558	3.5	0.9	0.8	0.9
High HDI	397,829	21.2	189,074	9.0	310,756	16.6	150,478	7.0	0.8	0.8	0.8
Very high HDI	231,586	15.3	126,102	6.6	113,335	7.2	69,040	3.3	0.5	0.5	0.5
World	719,523	15.8	369,580	7.0	502,788	11.0	266,005	4.9	0.7	0.7	0.7

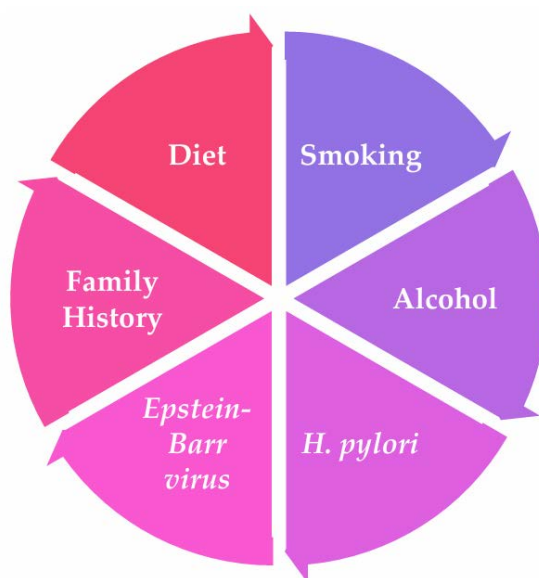
Table 7: New cases and deaths, age standardised incidence and mortality rates of gastric cancer (ICD10, C16) by sex, world region and Human Development Index (HDI), GLOBOCAN 2020. M:I, mortality:incidence; ASR, age-standardised rate per 100,000 population; HDI, human development index.

Εικόνα 5: Αναλυτικά ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας λόγω γαστρικού καρκίνου παγκοσμίως, σε σχέση με την ηλικία και το φύλο[9].

1.1.1 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης γαστρικού καρκίνου

Ο καρκίνος του στομάχου είναι μια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται ετερογενής, καθώς παρουσιάζει τόσο μορφολογικές όσο και γενετικές διαφορές, τόσο μεταξύ των όγκων όσο και μεταξύ των ασθενών [8]. Ωστόσο, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες, γενετικοί και εξωτερικοί, οι οποίοι φαίνεται να συντελούν στην εμφάνισή του.

Αναφορικά με τους εξωτερικούς παράγοντες, αυτοί μπορεί να είναι διατροφικοί, καθώς η υψηλή κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αλάτι και λιπαρά και ταυτόχρονα η χαμηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, μπορεί να είναι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου [1, 2, 6, 7, 10-13]. Επιπλέον, άλλοι εξωτερικοί παράγοντες μπορεί να είναι το κάπνισμα, η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ, προηγούμενες μολύνσεις του ατόμου από *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως καρκινογόνο τάξης 1, ή τον ιό Epstein-Barr (EBV), αλλά και παθήσεις όπως το έλκος του στομάχου, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και η αναιμία λόγω ανεπάρκειας βιταμίνης B12. [11, 13]



Εικόνα 6: Παράγοντες κινδύνου για τον γαστρικό καρκίνο [11]

Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί ορισμένοι εξωτερικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου, ωστόσο εξίσου σημαντικοί είναι και οι γενετικοί και κληρονομικοί παράγοντες.

Όσον αφορά την κληρονομικότητα, οι μελέτες δείχνουν ότι στην πραγματικότητα μόνο το 10-15% των περιπτώσεων εμφάνισης γαστρικού καρκίνου υπάρχουν συγκεντρωτικά μεταξύ οικογενειών, ενώ από αυτές μόλις το 1-3% είναι πραγματικά κληρονομικές. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου λόγω κληρονομικότητας γίνεται πιο έντονος αν η ασθένεια εμφανιστεί σε συγγενή πρώτου βαθμού ωστόσο αυτό δεν είναι κάτι απόλυτο και δεν ισχύει σε κάθε περίπτωση. [1-5, 14]

Οι κληρονομικοί τύποι γαστρικού καρκίνου μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες:

1. Κληρονομικός διάχυτος γαστρικός καρκίνος
2. Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και εγγύς πολυποδίαση του στομάχου
3. Οικογενής εντερικός γαστρικός καρκίνος

Από το σύνολο των περιπτώσεων κληρονομικού διάχυτου γαστρικού καρκίνου (Hereditary Diffuse Gastric Cancer, HDGC) ο οποίος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, το 30-40% των ασθενών φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο CDH1 που κωδικοποιεί την E-καδερίνη. Συγκεκριμένα η απώλεια ενός από τα αλληλόμορφα γονίδια και ταυτόχρονα η απενεργοποίηση του άλλου αλληλόμορφου μέσω μηχανισμών ρύθμισης όπως η υπερμεθυλίωση, αυξάνουν την περίπτωση εμφάνισης καρκίνου του στομάχου. Συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι το 67% των ανδρών και το 83% των γυναικών που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο CDH1 θα εμφανίσουν τελικά γαστρικό καρκίνο. Σε αυτή την περίπτωση συνιστάται προληπτική γαστρεκτομή, ιστολογικός έλεγχος στους ιστούς που αφαιρούνται, καθώς και γενετικός έλεγχος [2, 6, 13, 15-18].

Εκτός από τη συγκεκριμένη μετάλλαξη υπάρχουν και άλλες ασθένειες και σύνδρομα τα οποία μπορεί να συντελέσουν στην εμφάνιση καρκίνου του στομάχου, όπως η οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση που προκαλείται από μετάλλαξη στο γονίδιο APC, το σύνδρομο Lynch που προκαλείται από μετάλλαξη σε ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης, η νεανική πολυποδίαση και το σύνδρομο Peutz-Jeghers που αφορά μετάλλαξη στο γονίδιο STK11. [1, 2, 6, 13, 17]

1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου

Σε μια τόσο ετερογενή ασθένεια όπως ο καρκίνος του στομάχου, είναι πολύ σημαντικό να υπάρχει η σωστή ταξινόμηση των διάφορων τύπων καρκίνου προκειμένου να διευκολύνεται η διαδικασία διάγνωσης αλλά και η θεραπεία.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, ταξινομεί τους τύπους γαστρικού καρκίνου ως αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma), καρκίνωμα του δακτυλιοειδούς δακτυλίου (signet ring-cell carcinoma) και αδιαφοροποίητο καρκίνωμα (undifferentiated carcinoma). Ωστόσο, η ταξινόμηση κατά Lauren η οποία είναι κυρίως ιστολογικής φύσεως, είναι ίσως η πιο διαδεδομένη και πιο χρήσιμη από αυτή του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας, όπως επίσης και η αντίστοιχη μοριακή ταξινόμηση της κοινοπραξίας «Ατλας του Καρκινικού Γονιδιώματος» (The Cancer Genome Atlas Program, TCGA).

1.2.1 Ιστολογική ταξινόμηση κατά Lauren

Η παθολογοανατομική – ιστολογική ταξινόμηση του Lauren, προτάθηκε το 1965 και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με αυτή, ο καρκίνος του στομάχου διαχωρίζεται σε δύο κύριους τύπους, τον εντερικό και τον διάχυτο, οι οποίοι έχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους [19].

Τα καρκινώματα εντερικού τύπου παρουσιάζουν συχνά συμπεριφορά έλκους, και χαρακτηρίζονται από ορατούς αδένες και συνοχή μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, ενώ έχουν συνδεθεί και με παθήσεις όπως η χρόνια ατροφική γαστρίτιδα και η εντερική μεταπλασία στο στομάχι. Αυτός ο τύπος καρκίνου είναι πιο διαδεδομένος στις Ευρωπαϊκές χώρες και συνήθως εμφανίζεται στον άνω στόμαχο (πυλωρός), μετά από χρόνια προκαρκινική βλάβη [20].

Οι διάχυτοι καρκίνοι είναι μερικώς διαφοροποιημένες διηθητικές βλάβες, χωρίς συνοχή μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την πάχυνση του τοιχώματος του στομάχου. Το ενδιαφέρον στην περίπτωση του διάχυτου τύπου καρκίνου, είναι ότι αυτός προκύπτει από το φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, και γι' αυτό το λόγο είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος σε νεαρούς ασθενείς [11, 14, 21]. Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο διάχυτος τύπος γαστρικού καρκίνου εμφανίζεται με σχεδόν ίδια συχνότητα και στα δύο φύλα σε αντίθεση με τον εντερικού τύπου καρκίνο ο οποίος εμφανίζεται συνήθως στους άνδρες [21].

Εκτός από τους δύο αυτούς κύριους τύπους, υπάρχει και μια ακόμα υποκατηγορία, ο ενδιάμεσος τύπος γαστρικού καρκίνου, που συμπεριλήφθηκε στην ταξινόμηση καθώς παρουσιάζει ιστολογικά χαρακτηριστικά που δεν υπόκεινται ξεκάθαρα σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες και αποτελεί το 15% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου [11, 14].

1.2.2 Μοριακή ταξινόμηση

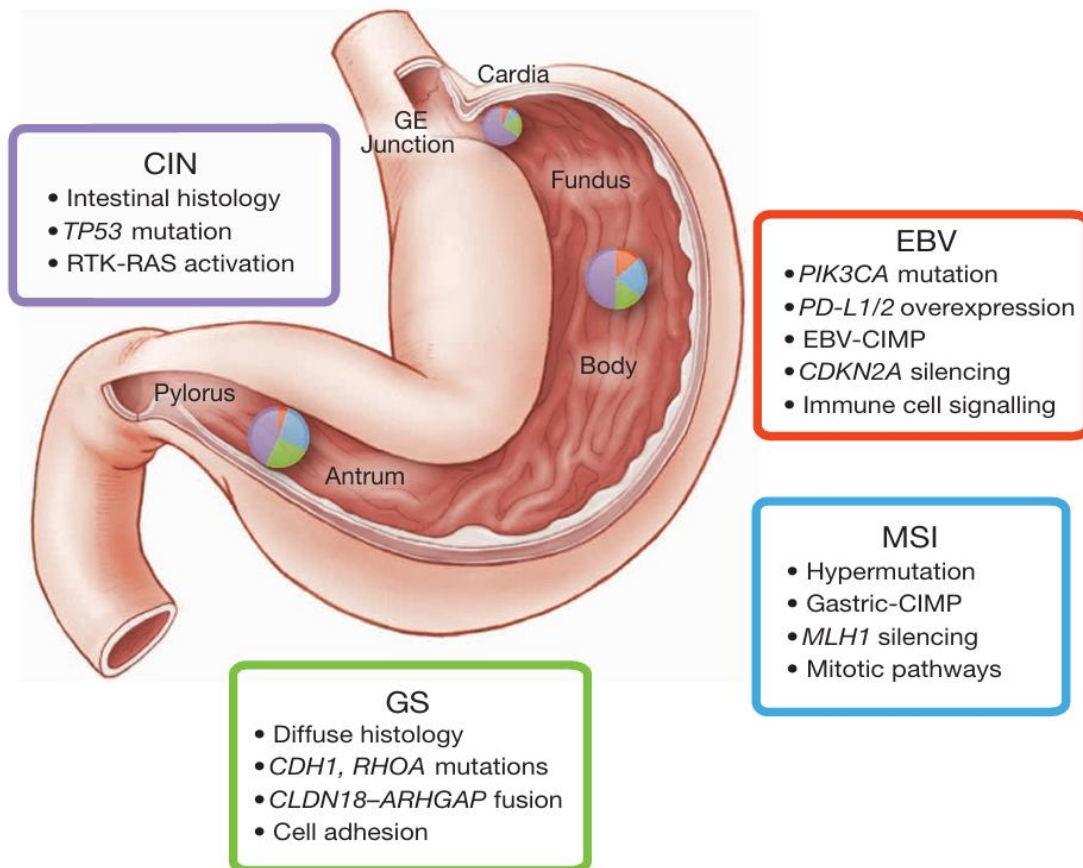
Ωστόσο, η ιστολογική ταξινόμηση των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου δεν λαμβάνει υπόψη το μοριακό προφίλ της ασθένειας, επομένως υπήρξε επιτακτική ανάγκη για ένα νέο σύστημα ταξινόμησης με βάση αυτό. Το 2014, προτάθηκε από την κοινοπραξία «Ατλας του Καρκινικού Γονιδιώματος» (The Cancer Genome Atlas Program, TCGA) ένα σύστημα μοριακής ταξινόμησης, το οποίο διαχωρίζει τον γαστρικό καρκίνο σε 4 υποκατηγορίες ανάλογα με τις πιθανές γονιδιακές μεταλλάξεις ή τα απορρυθμισμένα μοριακά μονοπάτια της κάθε περίπτωσης [22, 23].

Η ταξινόμηση και η μοριακή μελέτη του γαστρικού καρκίνου έγινε χρησιμοποιώντας τεχνικές γονιδιακής έκφρασης και αλληλούχησης του DNA (DNA Sequencing) καθώς και αποτελέσματα αναλύσεων μεταλλάξεων, mRNA, miRNA, πρωτεϊνών και αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων του DNA [6, 23].

Οι 4 υποκατηγορίες είναι οι εξής:

Υποκατηγορία Όγκων	Χαρακτηριστικά	Συχνότητα Εμφάνισης
Όγκοι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (EBV Positive Tumors, EBV+)	Υψηλά επίπεδα υπερμεθυλίωσης του DNA	9%
Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability Tumors, MSI)	Υψηλά επίπεδα μετάλλαξης στο γονιδίωμα, υπερμεθυλίωση του DNA, σίγηση MLH1	22%
Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (Genomic Stable Tumors, GS)	Χαμηλό φορτίο μεταλλάξεων, πιο επιθετική συμπεριφορά	20%
Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal Instability Tumors, CIN)	Υψηλό ποσοστό σωματικών ανωμαλιών στο ποσοστό αντιγράφων	50%

Όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης, οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια εμφανίζονται συνήθως στα αδενοκαρκινώματα της γαστρο-οισοφαγικής συμβολής, ενώ οι όγκοι θετικοί στον EBV συνήθως βρίσκονται στο κυρίως μέρος του στομάχου και είναι πολύ πιο συχνοί στους άνδρες, σε αντίθεση με άλλους τύπους όπως οι όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια που εμφανίζονται περισσότερο σε γυναίκες [7].



Εικόνα 7: Οι τέσσερις υποκατηγορίες της μοριακής ταξινόμησης του γαστρικού καρκίνου από το πρόγραμμα TCGA[23]

1.3 Πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία γαστρικού καρκίνου

1.3.1 Στρατηγικές πρόληψης

Αλλαγές στη διατροφή και τις συνήθειες

Η πρόληψη του γαστρικού καρκίνου σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ενημέρωση του πληθυσμού σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου.

Ειδικότερα, όσον αφορά το κομμάτι της διατροφής και υγείας, με την ένταξη φρούτων και λαχανικών καθώς και τροφών πλούσιων σε φολικό οξύ, καροτενοειδή και αντιοξειδωτικά, τον περιορισμό στην κατανάλωση αλατιού, την συχνή σωματική άσκηση, τον περιορισμό του καπνίσματος και του αλκοόλ, μπορεί να υπάρχει σημαντική μείωση στις πιθανότητες εμφάνισης της ασθένειας [11, 13].

Έλεγχος, εξέταση και θεραπεία μόλυνσης από *Helicobacter pylori*

Η μόλυνση από το συγκεκριμένο βακτήριο έχει χαρακτηριστεί ως καρκινογόνο πρώτης κατηγορίας, επομένως είναι επιτακτικής σημασίας ο έλεγχος και η αντιμετώπισή της. Θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για τη δημόσια υγεία καθώς και για τις συνθήκες διαβίωσης σε ορισμένες χώρες, οι οποίες επιτρέπουν την ανάπτυξη και επικράτηση μολύνσεων από *H.pylori*. Η εξέταση γίνεται συνήθως με χρήση δείγματος ορού, ενώ οι θεραπείες για την εξόντωση του *H.pylori* έχει δείξει αποδεδειγμένα μικρότερα ποσοστά εμφάνισης γαστρικού καρκίνου [5, 24].

1.3.2 Διάγνωση

Τα πιο κοινά συμπτώματα που σχετίζονται με τον γαστρικό καρκίνο είναι η δυσπεψία, η ανορεξία, η απώλεια βάρους, και ο πόνος στην κοιλιακή χώρα, ενώ σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί δυσφαγία ή γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση.

Καθώς οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί στα πρώτα στάδια, η διάγνωση πολλές φορές καθυστερεί. Η διάγνωση στα πρώτα στάδια, γίνεται με τη χρήση ενδοσκοπικής υπερηχογραφίας στην γαστρεντερική περιοχή, ή με την χρήση ακτινών. Η ενδοσκοπική εξέταση ελέγχει τον οισοφάγο, το στομάχι και το δωδεκαδάχτυλο, ενώ μπορεί να ανιχνεύσει εισβολή του όγκου στο στομάχι καθώς και μετάσταση στους γειτονικούς λεμφαδένες. Οι ακτινολογικές εξετάσεις περιλαμβάνουν συνήθως υπολογιστική τομογραφία (computed tomography, CT, αξονική), μαγνητική τομογραφία (MRI) και ¹⁸F-Φθοριοδεοξυγλυκόζη (FDG) – Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET Scan), η οποία μπορεί να ανιχνεύσει μέχρι και μεταστάσεις στα οστά, αλλά και άλλες που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τις πιο απλές μεθόδους απεικόνισης [10, 17, 24, 25].

1.3.3 Θεραπεία

Αναφορικά με τη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου, υπάρχουν πολλές διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις οι οποίες εξαρτώνται κυρίως από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η ασθένεια τη στιγμή της διάγνωσης. Συνήθως η θεραπεία περιλαμβάνει μεθόδους όπως χειρουργική αφαίρεση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία ή και συνδυασμό αυτών.

Για διάγνωση στα αρχικά στάδια της νόσου, δίνεται προτεραιότητα στην αφαίρεση της κακοήθειας παρά στην συστηματική χημειοθεραπεία[18].

Η ενδοσκοπική εκτομή του βλεννογόνου (Endoscopic mucosal resection, EMR) είναι μια ελάχιστα παρεμβατική μέθοδος που προτιμάται στα αρχικά στάδια της νόσου, και ειδικότερα όταν υπάρχει πολύ μικρή πιθανότητα μετάστασης στους λεμφαδένες [25, 26]. Σε ασθενείς που δεν μπορεί να γίνει ενδοσκοπική αφαίρεση, υπάρχει δυνατότητα λαπαροσκοπικής εγχείρησης, μιας μεθόδου που επιτρέπει σχετικά γρήγορη ανάρρωση και λιγότερο πόνο. Γενικότερα, η χειρουργική αφαίρεση έχει ως στόχο την αφαίρεση του όγκου και των γειτονικών μολυσμένων ιστών και μπορεί να αφορά μόνο τον όγκο, μέρος του στομάχου ή ακόμα και ολική γαστρεκτομή [10, 11, 26].

Η λεμφαδενεκτομή (εκτομή των λεμφαδένων) είναι μια διαδικασία η οποία επιλέγεται συχνά ως συνδυαστική θεραπεία στον γαστρικό καρκίνο και περιλαμβάνει την αφαίρεση των λεμφαδένων που υπάρχουν κοντά σε κάποιον όγκο ώστε να εξαλειφθούν πιθανά καρκινικά κύτταρα που μπορεί να έχουν κάνει μετάσταση εκεί και μπορεί να εξαπλωθούν και σε άλλα όργανα μέσω του λεμφικού συστήματος [27, 28].

Για ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο και ασθενείς με επιθετικές μορφές καρκίνου η προτεινόμενη θεραπεία είναι η χημειοθεραπεία, η οποία μπορεί να συνδυαστεί με ακτινοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία, περιλαμβάνει χρήση φαρμάκων με σκοπό την θανάτωση ή την αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο νεο-βοηθητικά ώστε να συρρικνώσει τον όγκο πριν ακολουθήσει χειρουργική αφαίρεσή του, ή και βοηθητικά μετά την χειρουργική αφαίρεση ώστε να εξοντώσει υπολειπόμενα καρκινικά κύτταρα. Τα κυριότερα και συνηθέστερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι η καπεσιταβίνη, σισπλατίνη, δοσεταξέλη, επιρουβικίνη, φθοριοουρακίλη (5-FU), λευκοβορίνη και οξαλιπλατίνη [29-35].

Η ακτινοθεραπεία, χρησιμοποιεί ακτίνες υψηλής ενέργειας που στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα και τα θανατώνουν ή αναστέλλουν περεταίρω τον πολλαπλασιασμό τους. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο προεγχειρητικά όσο και μετεγχειρητικά όπως και η χημειοθεραπεία, δηλαδή είτε για να συρρικνώσει τον όγκο, είτε για να εξαλείψει τα κύτταρα που παραμένουν μετά την εγχείρηση. Ωστόσο, ο ρόλος της σαν θεραπεία του γαστρικού καρκίνου είναι αμφιλεγόμενος, καθώς το βασικό της επίτευγμα μέχρι στιγμής είναι το να ανακουφίζει από τα συμπτώματα της δυσφαγίας, της αιμορραγίας και του πόνου που συνδέεται με τη νόσο[36].

Λαμβάνοντας υπόψη την επιθετικότητα της νόσου και τα περιορισμένα διαγνωστικά εργαλεία στα πρώιμα στάδια, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων βιοδεικτών που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην έγκαιρη διάγνωση και την εξατομικευμένη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου· σε αυτό το πλαίσιο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA.

1.4 Τα μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (Long Non-Coding RNAs – lncRNA)

Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας προτάθηκε το 1961, και αφορά τον τρόπο που αποθηκεύεται, μεταφέρεται και εκφράζεται η γενετική πληροφορία. Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα, το νουκλεϊκό οξύ RNA θεωρείται απλώς η ενδιάμεση κατάσταση της γενετικής πληροφορίας μεταξύ του DNA και της πρωτεΐνης [37]. Ωστόσο, μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις όσον αφορά την χαρτογράφηση του γονιδιώματος είναι ότι ενώ πάνω από το 85% του γονιδιώματος μεταγράφεται, λιγότερο από το 2% κωδικοποιεί γονίδια τα οποία στη συνέχεια κωδικοποιούν και φτιάχνουν πρωτεΐνες [38].

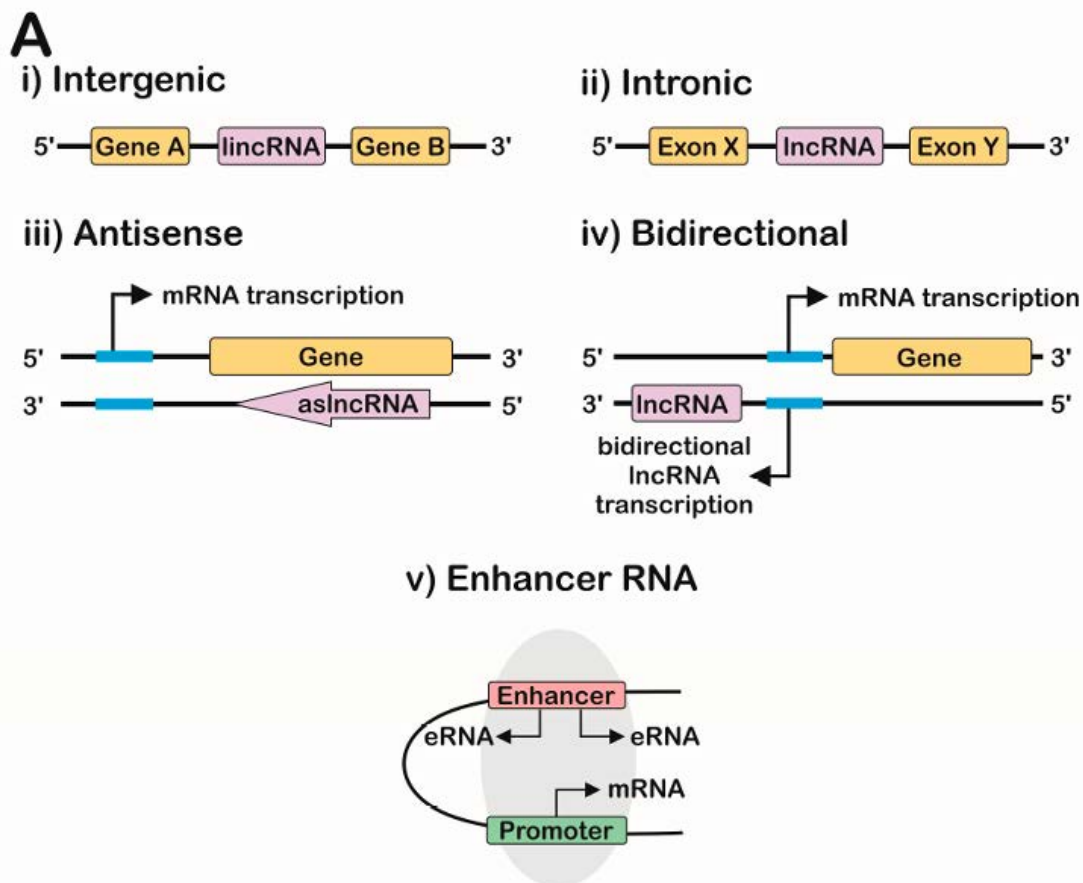
Τα τελευταία χρόνια, το RNA δεν θεωρείται απλά ένα ενδιάμεσο στάδιο της γενετικής πληροφορίας, αλλά έχει βρεθεί να συμμετέχει σε πολυάριθμες βιολογικές λειτουργίες πέραν της μεταγραφής – μετάφρασης. Ορισμένες από αυτές τις λειτουργίες είναι η προστασία της ακεραιότητας των χρωμοσωμάτων, η διατήρηση της γονιδιωματικής αρχιτεκτονικής, η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X, η αποτύπωση, η μεταγραφή, η μετάφραση και η επιγενετική ρύθμιση [39].

Αυτές οι μορφές του RNA οι οποίες δεν έχουν εμφανές ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame – ORF) και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ονομάζονται μη-κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNAs) [40].

Σύμφωνα με το μέγεθός τους, τα ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά RNAs μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs, με μέγεθος <200 bp, τα οποία είναι τα miRNAs, siRNAs και piRNAs) και σε μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNAs - lncRNA) τα οποία έχουν μέγεθος >200 bp και φτάνουν μέχρι 100 kbp [37, 41].

Σύμφωνα με τους τρόπους βιογένεσής τους, τα lncRNA μπορούν να ταξινομηθούν επιπλέον σε: μεσογονιδιακά lncRNA (lincRNAs), ιντρονικά lncRNA, αντιπαράλληλα lncRNA (aslncRNA ή natural antisense transcripts, NATs), αμφίδρομα lncRNA και RNAs ενισχυτών (eRNAs) [42].

Τα lncRNA παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα mRNA και δημιουργούνται μέσω της διαδικασίας μεταγραφής του DNA. Τα περισσότερα lncRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (Pol II) επομένως παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με το mRNA όπως 5' κάλυπτρα, 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά καθώς και μάτισμα. Ταυτόχρονα, σε αντίθεση με το mRNA, μπορούν να είναι και γραμμικά αλλά και κυκλικά, έχουν λιγότερα εξώνια, χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα, και παρουσιάζουν επίσης ιστοειδική ή κυτταροειδική έκφραση [42, 43].



Εικόνα 8: Τύποι lncRNA όπου διακρίνονται: i) διαγονιδιακά (intergenic) lncRNA τα οποία υπάρχουν μεταξύ δύο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ii) ιντρονικά (intronic) lncRNA τα οποία υπάρχουν μεταξύ δύο εξωνίων ενός γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνες, iii) αντιπαράλληλα lncRNA τα οποία μεταγράφονται από συμπληρωματικές αλυσίδες, iv) αμφίδρομα lncRNA που σχηματίζονται από αμφίδρομη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και v) ενισχυτικά lncRNA τα οποία προέρχονται από περιοχές ενισχυτών και μεσολαβούν στην τοποθέτηση των μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Τροποποιημένη από [42])

1.4.1 Ταξινόμηση των lncRNA ανάλογα με την ενδοκυττάρια θέση και τον τρόπο δράσης

Τα lncRNA, ανάλογα με τις λειτουργίες και τον σκοπό που επιτελούν, είναι δυνατόν να βρίσκονται τόσο στον πυρήνα του κυττάρου όσο και στο κυτταρόπλασμα.

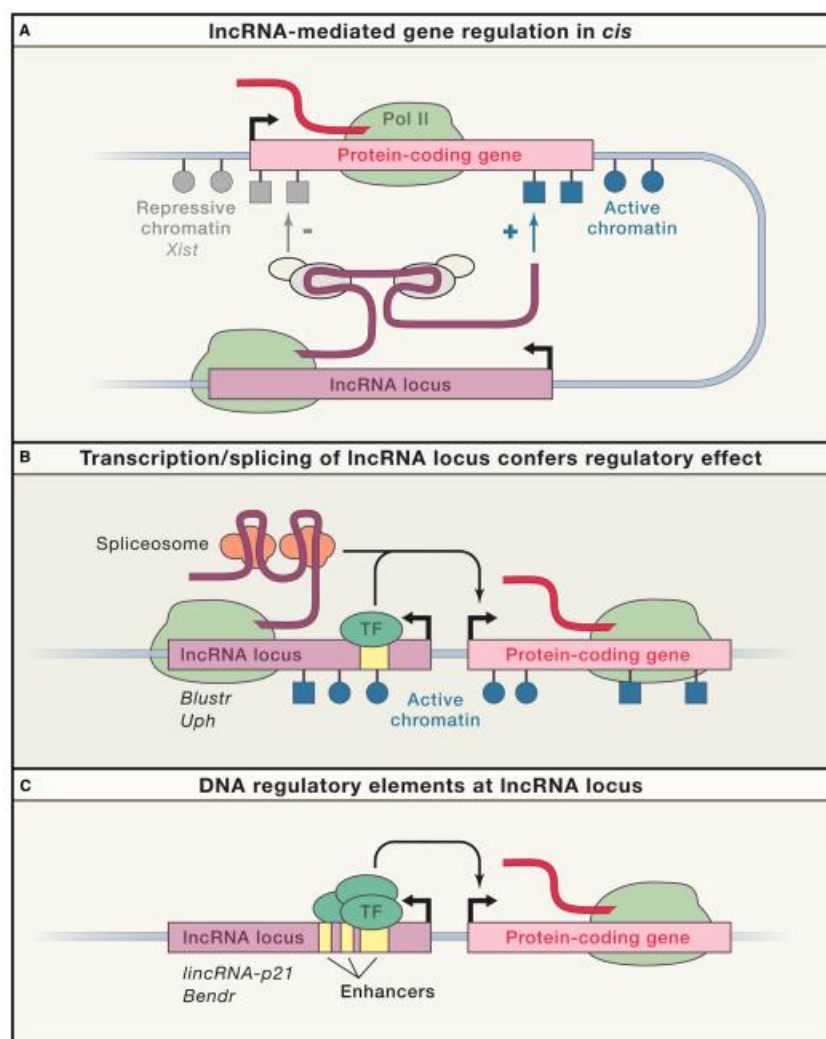
Τα **πυρηνικά lncRNA** λειτουργούν πρωτίστως ως ρυθμιστές της οργάνωσης του πυρήνα και της λειτουργίας του. Επιπλέον, μπορούν να ρυθμίσουν την αρχιτεκτονική και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, κι αυτό γιατί μπορούν να προάγουν την πρόσληψη μορίων που την τροποποιούν. Μια άλλη σημαντική λειτουργία των πυρηνικών lncRNA είναι ότι μπορούν να ρυθμίσουν την μεταγραφή δημιουργώντας βρόγχους R, που είναι τρίκλωνες δομές νουκλεϊκού οξέος οι οποίες βοηθούν στην πρόσληψη μεταγραφικών παραγόντων, αλλά επιδρούν επίσης με τον μηχανισμό της RNA πολυμεράσης II [44-46].

Τα **κυτταροπλασματικά lncRNA** ρυθμίζουν τη σταθερότητα του mRNA, τροποποιούν και ρυθμίζουν τη μετάφραση και αλλά και τις μετα-μεταφραστικές διαδικασίες. Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους τα κυτταροπλασματικά lncRNA ρυθμίζουν την σταθερότητα του mRNA, για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα miRNAs, ή με την πρόσληψη ειδικών πρωτεϊνών που αποικοδομούν το mRNA [44-46].

Ωστόσο, ακριβώς επειδή υπάρχει η διάκριση των lncRNA τα οποία ανάλογα με το που βρίσκονται επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες, έχει νόημα να διακρίνουμε τα lncRNA με βάση τις επιδράσεις που ασκούν στην αλληλουχία του DNA στην εκάστοτε περίπτωση.

Τα **cis – δραστικά lncRNA** επηρεάζουν τόσο την έκφραση γειτονικών, ως προς τον γενετικό τους τόπο, γονιδίων όσο και την κατάσταση της χρωματίνης. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους:

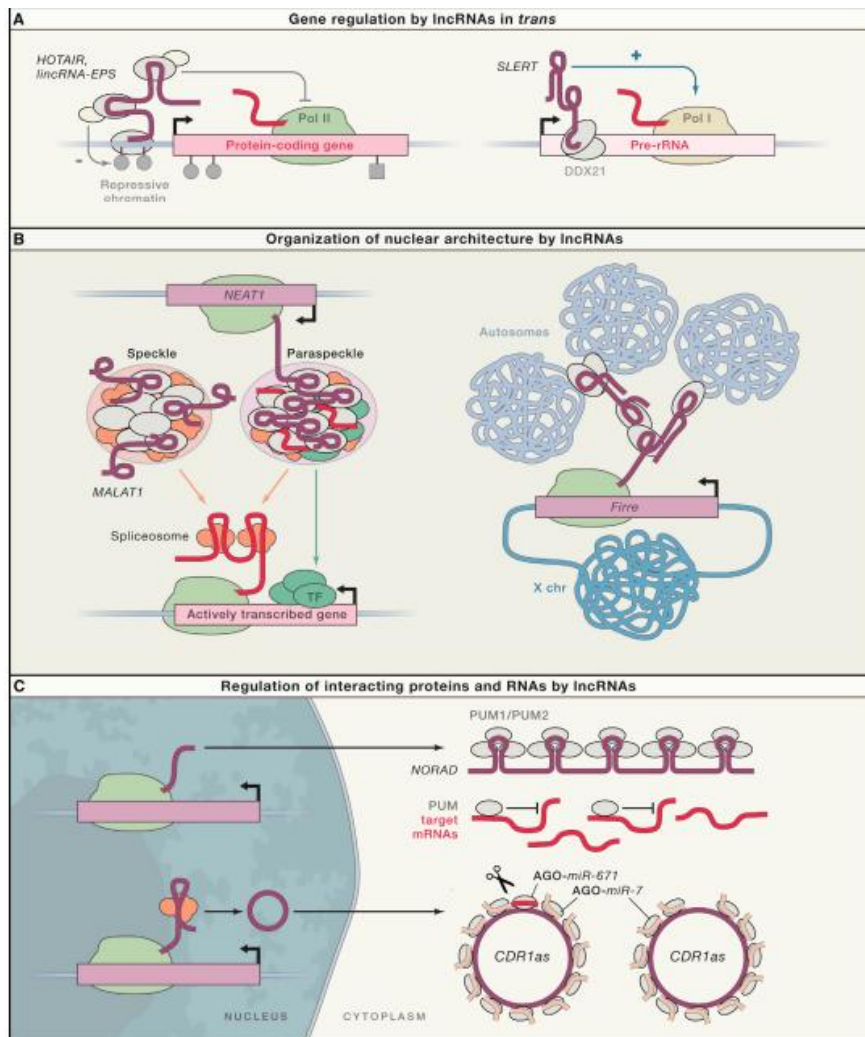
- Το ίδιο το lncRNA έχει την ικανότητα να προσλαμβάνει ρυθμιστικούς παράγοντες και να τροποποιεί την δομή της χρωματίνης
- Το lncRNA υπόκειται στην διαδικασία της μεταγραφής και του ματίσματος και αποκτά μια λειτουργικότητα να ρυθμίζει γονίδια, ανεξάρτητα από την ίδια του την αλληλουχία.
- Στον υποκινητή του lncRNA ή στον ευρύτερο γονιδιακό τόπο υπάρχουν στοιχεία DNA τα οποία μπορούν να ρυθμίζουν την δομή της χρωματίνης ή/και την έκφραση γονιδίων [46, 47].



Εικόνα 9: Μηχανισμοί δράσης των cis - δραστικών lncRNA [47]

Τα ***trans*** – **δραστικά lncRNA** μπορούν να ρυθμίσουν την γονιδιακή έκφραση και σε διαφορετικά χρωμοσώματα, δηλαδή να δράσουν μέσω *in trans* ρύθμισης μακριά από τον γενετικό τους τόπο. Αυτά τα lncRNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε:

- Απομακρυσμένοι από την περιοχή της μεταγραφής ρυθμιστές της χρωματίνης και της γονιδιακής έκφρασης
- Ρυθμιστές της πυρηνικής δομής και αρχιτεκτονικής
- Ρυθμιστές που αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια όπως πρωτεΐνες και μόρια RNA [38-40, 43, 46, 48]

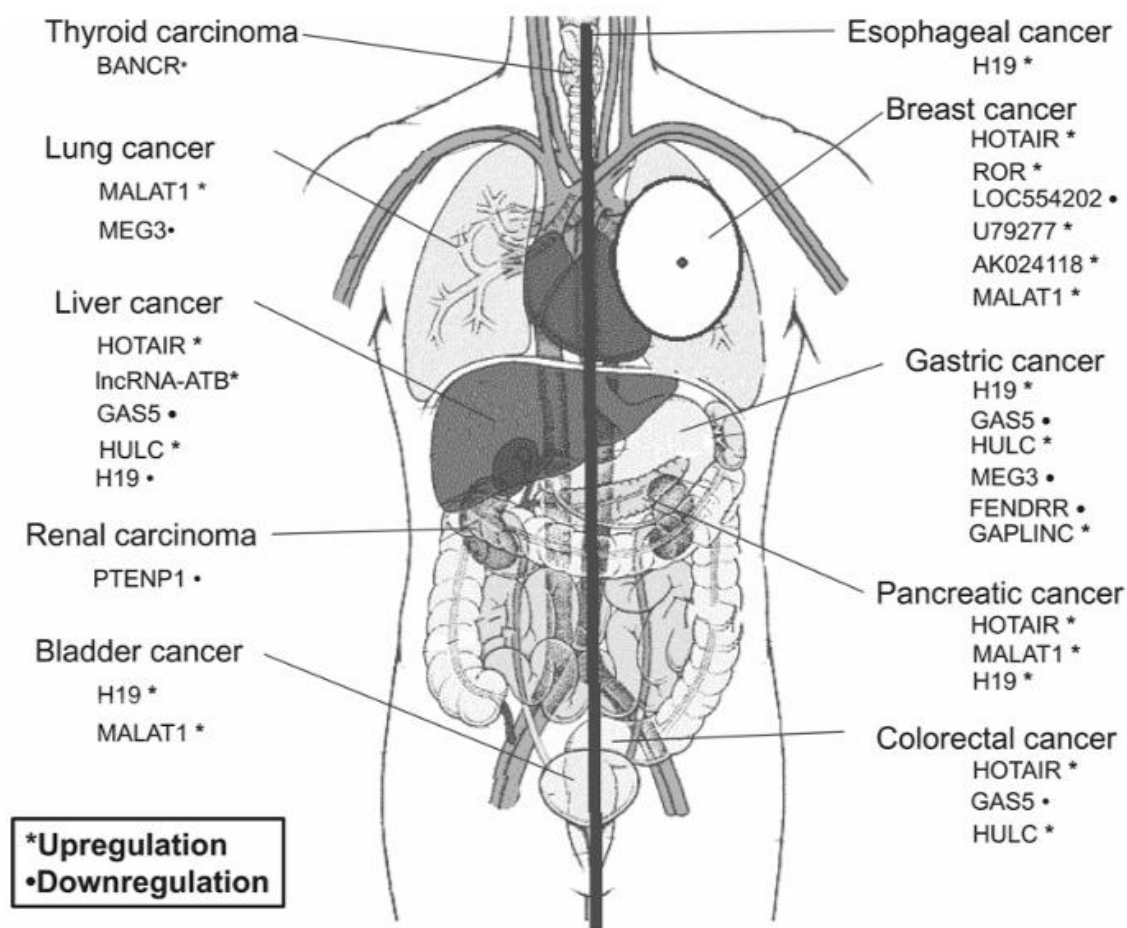


Εικόνα 10: Μηχανισμοί δράσης των *trans* - δραστικών lncRNA [47]

1.4.2. Ο ρόλος των lncRNA στον καρκίνο

Τα lncRNA, σε όποια κατηγορία κι αν υπάγονται, εμπλέκονται ενεργά σε όλες τις λειτουργίες του κυττάρου, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μεταγραφή, την μετάφραση, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και την απόπτωση [49].

Σε αυτό το πλαίσιο, καθώς γνωρίζουμε αποδεδειγμένα ότι τα lncRNA επιτελούν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των γονιδίων, είναι πολύ φυσικό το γεγονός ότι απορρυθμισμένα lncRNA εμπλέκονται και στον καρκίνο. Συγκεκριμένα, τα lncRNA μπορούν να έχουν τόσο ογκογόνο όσο και ογκοκατασταλτικό ρόλο, ενώ μάλιστα μπορούν να επηρεάσουν και την μετάσταση του εκάστοτε όγκου [43, 50].



Εικόνα 11: Παραδείγματα lncRNA που συμμετέχουν σε πολυάριθμους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού [51].

Με κριτήριο τον τρόπο με τον οποίο τα lncRNA λειτουργούν στον καρκίνο, μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες: αυτά που διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος, αυτά που προκαλούν βλάβη στο DNA, αυτά που συμμετέχουν σε μεταβολικές διαταραχές, επιθηλιακή – μεσεγχυματική μετατροπή, αυτά που σχετίζονται με την βλαστικότητα των κυττάρων και αυτά που παρουσιάζουν χημική αντίσταση[52].

Πιο συγκεκριμένα, ένας βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη του καρκίνου είναι η συσσώρευση βλαβών στο DNA ή μεταλλάξεων που δεν έχουν αντιμετωπιστεί από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης που διαθέτει το κύτταρο. Έχει βρεθεί σχέση μεταξύ ορισμένων lncRNA τα οποία ενεργοποιούν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, ένα από τα βασικότερα γονίδια που αποτρέπουν την εξάπλωση όγκων [53-55]. Ακόμη, τα lncRNA μπορούν να ρυθμίζουν την αναδιαμόρφωση του ανοσοποιητικού μικροπεριβάλλοντος του εκάστοτε όγκου,

καθώς είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα λειτουργούν χωρίς να δέχονται επίθεση από το ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Το μικροπεριβάλλον του όγκου περιλαμβάνει καρκινικά κύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού αλλά και σωματικά κύτταρα όπως ινοβλάστες[56]. Τα lncRNA έχουν την ιδιότητα να τροποποιούν τις λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και να προσλαμβάνουν μακροφάγα που στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα [57-59].

Εκτός όμως από τον ρόλο των lncRNA στην αντιμετώπιση του καρκίνου, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου λειτουργούν σαν ογκογονίδια, και επιτελούν σημαντικό ρόλο στη μετάσταση του όγκου. Η επιθηλιακή – μεσεγχυματική μετατροπή είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά με διαφορετικές ιδιότητες. Τα καρκινικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο μεταίχμιο της επιθηλιακής και μεσεγχυματικής κατάστασης φέρουν χαρακτηριστικά και των δύο τύπων κυττάρων. Απόρροια αυτού, είναι το γεγονός ότι μπορούν να επιβιώνουν και να προσβάλλουν γειτονικά όργανα, κάτι που σε ένα περιστατικό καρκίνου συνεπάγεται μετάσταση του όγκου σε άλλα όργανα και ιστούς. Έχουν βρεθεί αρκετά lncRNA τα οποία ενεργοποιούν τον συγκεκριμένο μηχανισμό και οδηγούν στη μετάσταση, όπως το HOTAIR που προάγει κυρίως τον καρκίνο του μαστού, του ήπατος και του παγκρέατος [60-63].

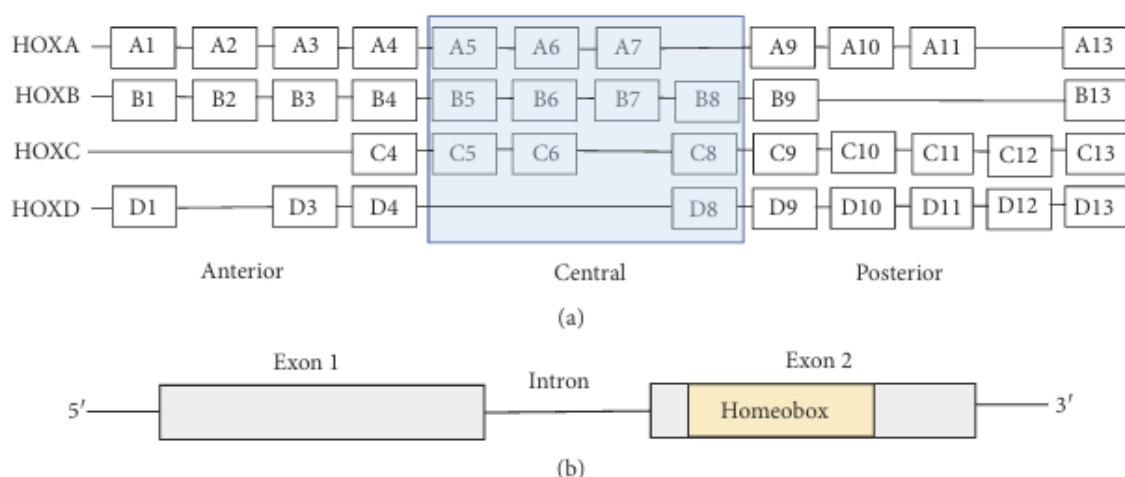
Αναφορικά με τον γαστρικό καρκίνο, έχουν βρεθεί συγκεκριμένα lncRNA η έκφραση των οποίων φαίνεται να διαφοροποιείται. Το lncRNA H19 είναι ένα από τα βασικότερα στη συγκεκριμένη περίπτωση, και σύμφωνα με μελέτες που εξετάζουν τα επίπεδα έκφρασής του σε ασθενείς με καρκίνο έναντι υγιών ασθενών, δείχνει να υπερεκφράζεται. Επιπλέον, υπάρχει διαφορά στην έκφρασή του ακόμα και σε ασθενείς γαστρικού καρκίνου αρχικού σταδίου έναντι των υγιών ατόμων. Ακόμα μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η έκφραση του H19 ήταν σημαντικά μειωμένη σε μετεγχειρητικούς ασθενείς, κάτι που υποδηλώνει ότι όντως η έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA μπορεί να λειτουργήσει ως καρκινικός βιοδείκτης για τον γαστρικό καρκίνο[51, 64].

Διαπιστώνεται η τεράστια σημασία που έχει η μελέτη των lncRNA καθώς και το πώς αυτά εμπλέκονται στον καρκίνο, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες τόσο για την έγκαιρη διάγνωση όσο και τη στοχευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία.

1.5 Γονίδια HOX και ο ρόλος τους στον γαστρικό καρκίνο

Δεδομένου ότι τα δύο πιθανά γονίδια στόχοι του υπό μελέτη lncRNA REAKTn κωδικοποιούν γονίδια HOX, ακολουθεί μια σύντομη αναφορά στην λειτουργία τους τόσο στην φυσιολογία όσο και στη νόσο. Τα γονίδια HOX ή homeobox είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που επιτελούν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου, την ομοιοστάση των ιστών και την κυτταρική διαφοροποίηση. Τα γονίδια HOX ανακαλύφθηκαν πρώτα στο είδος *Drosophila melanogaster* και σχετίζονται με την ανάπτυξή της. Στον άνθρωπο, τα γονίδια HOX απαντώνται σε ομάδες – οικογένειες (clusters) που είναι τέσσερις σε αριθμό: HOXA, HOXB, HOXC, HOXD και καθεμία βρίσκεται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Συνολικά έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί 39 μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι κωδικοποιούνται από γονίδια HOX και με τη σειρά τους ρυθμίζουν γονίδια στόχους [65, 66].

Τα γονίδια HOX περιέχουν δύο εξώνια και ένα ιντρόνιο, ενώ στο εσωτερικό του δεύτερου εξωνίου υπάρχει πάντα μια περιοχή πρόσδεσης DNA. Από πειράματα φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια HOX περιλαμβάνουν μια συντηρημένη αλληλουχία 180 – 183 ζευγών βάσεων που κωδικοποιεί μια ομοιοδομή με συγκεκριμένο μοτίβο έλικας – στροφής – έλικας με σύνολο 60 – 61 αμινοξέα [67, 68].

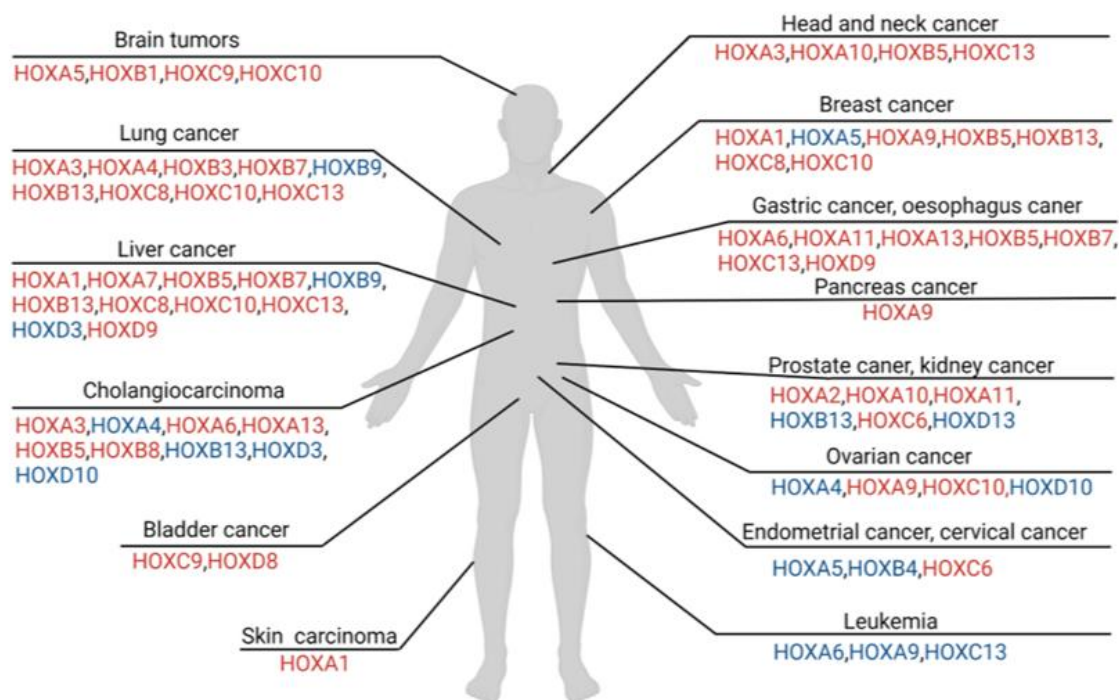


Εικόνα 12: Τα γονίδια HOX στον άνθρωπο, α) Κατάταξη και ομαδοποίηση των γονιδίων HOX σε 4 οικογένειες β) Δομή των γονιδίων HOX όπου φαίνονται τα δύο εξώνια καθώς και η περιοχή homeobox. Τροποποιημένο από [69]

Όπως είναι φυσικό, γονίδια με τόσο καίριο ρόλο στην ανάπτυξη του ανθρώπου μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις αν απορρυθμιστούν. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις σε γονίδια HOX έχουν συνδεθεί με διάφορες παθήσεις και διαταραχές που σχετίζονται με την δυσμορφία των άκρων ή των δοντιών, ενώ η γενικότερη απορρύθμισή τους, συμβάλλει στην εμφάνιση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Επιπλέον, επειδή η εμβρυογένεση και η ογκογένεση μοιράζονται αρκετά κοινά χαρακτηριστικά όπως η ραγδαία ανάπτυξη και η κυτταρική διαφοροποίηση, είναι λογικό να υπάρχει αυτή η σύνδεση μεταξύ γονιδίων HOX και καρκίνου [70, 71].

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι τα γονίδια HOX μπορούν να συμπεριφέρονται και σαν ογκογονίδια αλλά και σαν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν τα γονίδια HOX να λειτουργήσουν στον καρκίνο.

Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την χωροχρονική απορρύθμιση, κατά την οποία η έκφραση των γονιδίων HOX σε έναν αναπτυσσόμενο όγκο διαφέρει χωροχρονικά με την έκφραση που παρατηρείται στον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό. Ο δεύτερος μηχανισμός σχετίζεται με την γονιδιακή κυριαρχία κατά την οποία ένα γονίδιο HOX εκφράζεται σε έναν ιστό στον οποίο όμως δεν εκφράζεται καθόλου υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ ο τρίτος μηχανισμός αφορά επιγενετική απορρύθμιση κατά την οποία ενώ μπορεί να υπάρχει φυσιολογική έκφραση των γονιδίων HOX, υπάρχουν επιγενετικές μεταβολές στα γονίδια λόγω μεθυλίωσης σε περιοχές ελέγχου τους [71, 72].



Εικόνα 13: Γονίδια HOX που συμμετέχουν σε διάφορους τύπους καρκίνου. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που υπερεκφράζονται στον εκάστοτε καρκίνο, ενώ με μπλε χρώμα αυτά που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση[67].

Όπως φαίνεται, τα γονίδια HOX εμπλέκονται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, στον γαστρικό καρκίνο εμπλέκονται περίπου 20 – 25 διαφορετικά γονίδια HOX. Μερικά από αυτά είναι το γονίδιο HOXB5 το οποίο επηρεάζει την έκφραση της β-καδεΐνης (υπερέκφραση) και προκαλεί εισβολή και μετάσταση του όγκου, ενώ άλλο παράδειγμα είναι το HOXC10 το οποίο έχει ρόλο σε πολλά είδη καρκίνου (μαστού, θυροειδούς, πνεύμονα κ.α.), όμως συγκεκριμένα στον γαστρικό καρκίνο φαίνεται να εμπλέκεται στη μετάσταση[70, 73, 74].

Βλέποντας το πόσο σημαντικό ρόλο επιτελούν τα γονίδια HOX στην περίπτωση του καρκίνου, στην καρκινογένεση, στην πρόοδο της νόσου, στην μετάσταση ή στην καταστολή, εύλογα γεννιέται το ερώτημα για το κατά πόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση της νόσου και παράλληλα ως μέσα – στόχοι για την αποτελεσματική θεραπεία της.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μία από τις συχνότερες και πιο θανατηφόρες μορφές καρκίνου παγκοσμίως, καταλαμβάνοντας σταθερά μία από τις πρώτες θέσεις στη σχετική παγκόσμια κατάταξη θνησιμότητας από κακοήθειες. Η ασυμπτωματική του φύση στα πρώιμα στάδια, σε συνδυασμό με την ετερογένειά του τόσο σε μορφολογικό όσο και σε μοριακό επίπεδο, καθιστούν δύσκολη την έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματική αντιμετώπισή του. Παρά την πρόοδο στην κατανόηση της βιολογίας του, η ανάγκη για νέους, πιο αξιόπιστους διαγνωστικούς και θεραπευτικούς δείκτες παραμένει επιτακτική. Στο πλαίσιο αυτό, τα μακρά μη κωδικά RNA (lncRNA) έχουν προσελκύσει το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Λόγω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε μεταγραφικό και επιγενετικό επίπεδο, αλλά και της ειδικότητάς τους ως προς τον τύπο του ιστού και του καρκίνου, τα lncRNA αναδεικνύονται σε σημαντικούς μοριακούς ρυθμιστές και εν δυνάμει βιοδείκτες για πολλές μορφές κακοήθειας, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της λειτουργίας ενός μη μελετημένου lncRNA, του REAKTn, στον γαστρικό καρκίνο, με έμφαση στη ρύθμιση της έκφρασης υποψήφιων γονιδίων-στόχων και τη διερεύνηση της επίδρασής του σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Η σίγαση του REAKTn πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λεντιϊκών φορέων που φέρουν ειδικά σχεδιασμένα shRNA, τα οποία μεταφέρθηκαν σε καρκινικές και φυσιολογικές γαστρικές κυτταρικές σειρές (AGS, MKN45, GES1). Ακολούθησαν μοριακές αναλύσεις (RT-qPCR) για την αξιολόγηση της έκφρασης του REAKTn και οκτώ συνολικά γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και την απόπτωση. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση με σκοπό τη συσχέτιση της αποσιώπησης του REAKTn με μεταβολές στην πολλαπλασιαστική και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων.

Τέλος, επιχειρήθηκε η δημιουργία σταθερά γενετικά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών με επαγωγή αποσιώπησης του REAKTn μέσω του συστήματος σίγασης TetR, το οποίο, παρά τα τεχνικά εμπόδια που προέκυψαν, μπορεί να αποτελέσει τη βάση για μελλοντικές μελέτες πιο σταθερής και μακροχρόνιας ρύθμισης της έκφρασης του συγκεκριμένου lncRNA, ενισχύοντας τη συνολική κατανόηση του ρόλου του στη μοριακή παθοφυσιολογία του γαστρικού καρκίνου.

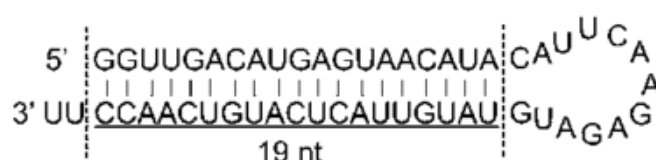
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1 Αλληλουχίες

Προκειμένου να γίνει προσπάθεια για τον χαρακτηρισμό της έκφρασης του lncRNA REAKTn αλλά και των δύο γονιδίων – στόχων του TG1, TG2, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρεμβολής RNA, με τίτλο RNA interference (RNAi). Το πρώτο βήμα είναι ο σχεδιασμός μας αλληλουχίας short – hairpin RNA (shRNA) που θα είναι εξειδικευμένη και σχεδιασμένη αποκλειστικά για το lncRNA REAKTn. Η αλληλουχία shRNA σχεδιάστηκε με αλγόριθμους σχεδιασμένους στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και φέρει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Αλληλουχία 19 νουκλεοτιδίων όμοια με το μετάγραφο – στόχο (sense)
- Αλληλουχία 19 νουκλεοτιδίων συμπληρωματική του μεταγράφου – στόχου (antisense)
- Αλληλουχία που συνδέει τις δύο αλυσίδες με μορφή «φουρκέτας» (hairpin)
- Κατάλληλα άκρα 5', 3' τα οποία αντιστοιχούν στα άκρα των αλληλουχιών που κόβουν τα περιοριστικά ένζυμα HindIII, BglIII τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα

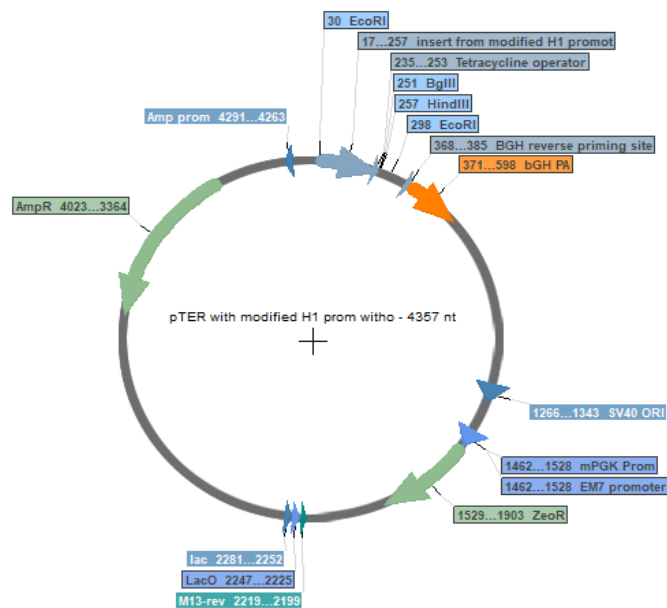


Εικόνα 14: Δομή ενός shRNA, όπου διακρίνονται οι αλυσίδες sense, antisense και hairpin loop [75]

3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης

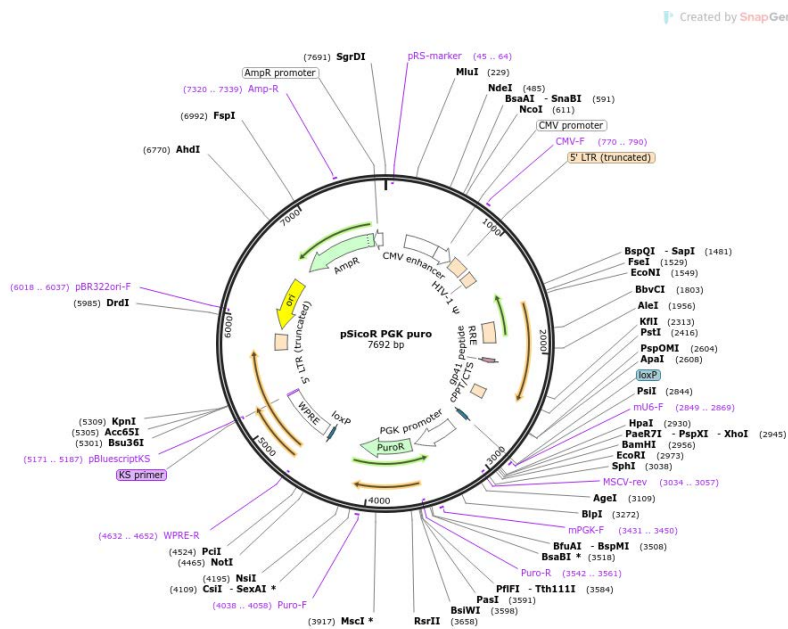
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης του shRNA REAKTn σε δύο πλασμιδιακούς φορείς.

Για το πρώτο μέρος του πειράματος, δηλαδή την προσπάθεια δημιουργίας σταθερών κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pTER, μήκους 4357 νουκλεοτιδίων, το οποίο χρησιμοποιείται αρκετά σε πειράματα RNAi και έκφρασης γονιδίων. Έχει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, και αναπτύσσεται στους 37°C. Ο υποκινητής του συγκεκριμένου πλασμιδίου είναι ο H1, ωστόσο από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, ο υποκινητής έχει τροποποιημένη την αλληλουχία του χειριστή TetO όπου προσδένεται η πρωτεΐνη TetR, γεγονός που μετατρέπει το σύστημα σε επαγωγικό με στόχο την επαγωγόμενη σίγηση γονιδίων. Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες HindIII και BglIII οι οποίες κόβουν την πλασμιδιακή αλληλουχία προκειμένου να μπορέσει να γίνει ένταξη (insert) του shRNA REAKTn.



Εικόνα 15: Graphic map του πλασμιδιακού φορέα pTER με τροποποιημένο εκκινητή H1 όπου απεικονίζονται τα σημεία κοπής με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες HindIII, BglIII, EcoRI (Κατασκευασμένο στο πρόγραμμα SerialCloner)

Για το δεύτερο μέρος του πειράματος, όπου έγινε γενετική τροποποίηση με τη χρήση λεντιών, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pSicoR PGK puro, ο οποίος είναι μεγαλύτερος από τον pTER και έχει 7700 νουκλεοτίδια. Χρησιμοποιείται γενικά σε πειράματα γενετικής τροποποίησης και έκφρασης με λεντιούς. Έχει, όπως ο pTER γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και αναπτύσσεται στους 37°C. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για να κοπεί ο φορέας και να μπορέσει να γίνει εισαγωγή των ενθεμάτων shRNA REAKTn και KLF5, είναι οι HpaI και XhoI οι οποίες αφήνουν τυφλά μονόκλωνα άκρα.



Εικόνα 16: Graphic map του πλασμιδιακού φορέα pSicoR όπου απεικονίζονται τα σημεία κοπής με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες HpaI, XhoI.

3.1.3 Βακτηριακά στελέχη

Μετά την εισαγωγή του ενθέματος στους πλασμιδιακούς φορείς, πρέπει να γίνει επιλογή αυτών που ανασυνδυάστηκαν, δηλαδή αυτών στους οποίους πέτυχε η ένθεση του shRNA. Η επιλογή αυτή, γίνεται σε βακτήρια *Escherichia coli* (*E.coli*), τα οποία για το πρώτο πείραμα με τον φορέα pTER ήταν του στελέχους DH5a, ενώ για το δεύτερο πείραμα με τον φορέα pSicoR ήταν του στελέχους XL1 Blue.

Το στέλεχος DH5a χάρη στην μετάλλαξη *recA1*, προσφέρει υψηλή απόδοση μετασχηματισμού και μεγάλη αποτελεσματικότητα όσον αφορά την ένθεση shRNA, ενώ η μετάλλαξη *endA* έχει ως αποτέλεσμα να προσφέρει υψηλή απόδοση και ποιότητα DNA[76].

Το στέλεχος XL1 Blue, είναι αντίστοιχο του στελέχους DH5a καθώς φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις και προσφέρει κι αυτό σταθερότητα ενθέματος, υψηλή απόδοση μετασχηματισμένων κυττάρων και υψηλή ποιότητα DNA[77].

3.1.4 Κυτταρικές σειρές

Για τα δύο πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός κυτταρικών σειρών, οι οποίες περιλαμβάνουν τόσο καρκινικά κύτταρα σε διάφορες φάσεις της νόσου, όσο και φυσιολογικά κύτταρα. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και τα βασικά τους χαρακτηριστικά (Από διάφορες πηγές)

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή
GES – 1	Αθανатоποιημένα κύτταρα φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου
HFE	Αθανатоποιημένα κύτταρα φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου
AGS	Πρωταρχικά καρκινικά κύτταρα με επιθηλιακή μορφολογία, από 54χρονη ασθενή με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα [78]
NUGC-4	Πρωταρχικά μεταστατικά καρκινικά κύτταρα με σφαιρική επιθηλιακή μορφολογία, απομονώθηκαν από καρκίνωμα του ανθρώπινου στομάχου με δακτυλιοειδή δακτύλιο με μετάσταση στους παραγαστρικούς λεμφαδένες [79]
KATOIII	Πρωταρχικά μεταστατικά καρκινικά κύτταρα με στρογγυλή μορφολογία, απομονώθηκαν από ασθενή με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα [80]
MKN45	Μεταστατικά κύτταρα ανθρώπινου στομάχου, απομονωμένα από ασθενή με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα με μετάσταση στο ήπαρ [81]
HEK – 293	Φυσιολογικά κύτταρα εμβρύου που απομονώθηκαν από νεφρό

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Διερευνητικές μέθοδοι έκφρασης lncRNA σχετικών με τον γαστρικό καρκίνο σε κυτταρικές σειρές

3.2.1.1 Σύνθεση cDNA

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν πάρα πολλά lncRNA τα οποία σχετίζονται με πολλούς τύπους καρκίνου, επομένως το πρώτο βήμα είναι να γίνει μια διερεύνηση ώστε να αποφασιστεί ποια από αυτά αφορούν τον γαστρικό καρκίνο. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν DNase treated RNA εκχυλίσματα από κυτταρικές σειρές που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο από προηγούμενες μελέτες, δηλαδή ολικό RNA το οποίο έχει υποβληθεί σε κατεργασία με DNase.

Για την αντίδραση σύνθεσης cDNA πρέπει το RNA που θα προστεθεί να βρίσκεται σε συγκέντρωση 1000 ng/μl σε τελικό όγκο διαλύματος 10 μl. Επιπλέον, σημαντική παρατήρηση είναι ότι όλο το πρωτόκολλο για την σύνθεση του cDNA δουλεύεται στον πάγο, διαφορετικά θα υπάρξει αλλοίωση του δείγματος.

Μετά τους κατάλληλους υπολογισμούς για την εύρεση της ποσότητας RNA που θα προστεθεί σε κάθε διάλυμα, έγινε η ανάμειξη του πρώτου διαλύματος Eppendorf 1,5 ml ως εξής:

Πίνακας 2: Σύσταση 1^{ου} διαλύματος για τη σύνθεση cDNA

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
RNA + ddH ₂ O (Water for Injection)	10
dNTPs, 10 mM	1
Random hexamers/Oligo dTs, 10mM	1

Το διάλυμα απαιτεί επώαση στους 65°C για ακριβώς 5 λεπτά, κι έπειτα επανατοποθέτηση στον πάγο προκειμένου να γίνει ανάμειξη με το δεύτερο διάλυμα της αντίδρασης, το οποίο περιέχει:

Πίνακας 3: Σύσταση 2^{ου} διαλύματος για τη σύνθεση cDNA

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
Buffer MMLV, 5x, (Invitrogen)	4
DTT, 100mM, (Invitrogen)	2
MMLV, (Invitrogen)	1
RNase out, (Invitrogen)	1

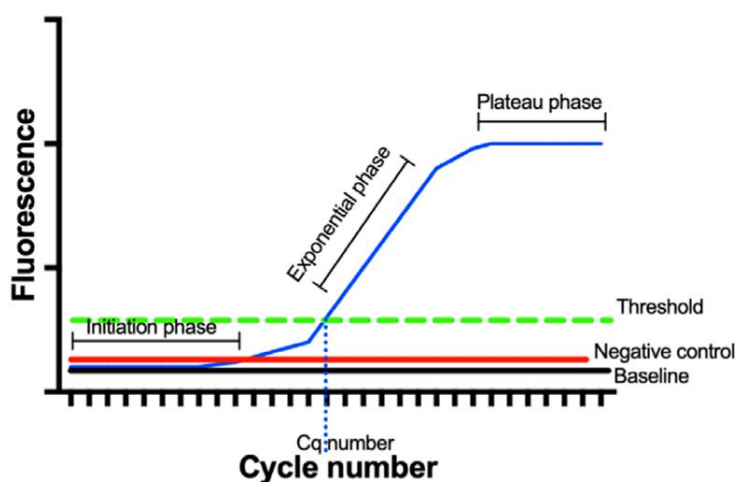
Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20 μl. Ακολουθεί επώαση του μείγματος στους 37°C για 2 ώρες, ενώ μετά το πέρας της επώασης, προστίθενται 380 μl ddH₂O ώστε να φτάσει το διάλυμα σε τελικό όγκο 400 μl. Σε αυτό το σημείο μπορεί να μετρηθεί η συγκέντρωση με φωτόμετρο nanodrop Quawell Q3000 κι αν πρέπει να γίνει αποθήκευση, μπορούν τα δείγματα να αποθηκευτούν στους -20°C μέχρι το επόμενο βήμα.

3.2.1.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR)

Η ποσοτική PCR (qPCR) ή real – time qPCR είναι μια τεχνική η οποία συνδυάζει την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA με την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσής της κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, και όχι στο τέλος της ενίσχυσης του δείγματος[82]. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι από τις σημαντικότερες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα καθώς έτσι μπορεί να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων – στόχων.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται στην qPCR στηρίζονται στην εκπομπή φθορισμού. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, περιλαμβάνει την SYBR®Green, μια φθορίζουσα χρωστική η οποία συνδέεται μόνο σε δίκλωνο DNA τη στιγμή που αυτό δημιουργείται[83]. Επιπλέον, έγινε χρήση και άλλων γονιδίων τα οποία ονομάζονται ιδιόσυστατα (housekeeping genes), τα οποία επιτελούν τον ρόλο του παράγοντα κανονικοποίησης για την μετέπειτα ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Amplification curve



Εικόνα 17: Τυπική καμπύλη ενίσχυσης που περιλαμβάνει τη φάση έναρξης (initiation phase) όπου το σήμα φθορισμού είναι πολύ μικρό, φάση ενίσχυσης (exponent phase) όπου λαμβάνεται ισχυρό σήμα το οποίο φτάνει σε ένα μέγιστο. Επιπλέον υπάρχει ένα κατώφλι (threshold), κάτω από το οποίο το σήμα φθορισμού δεν είναι μετρήσιμο. Τροποποιημένο από [83]

Στη διερευνητική φάση μετρήθηκε η έκφραση του lncRNA REAKTn στις κυτταρικές σειρές GES1, HFE, AGS, NUGC4, KATOIII, MKN45 προκειμένου να βρεθεί σε ποιες από αυτές εκφράζεται περισσότερο, άρα σχετίζεται με τον γαστρικό καρκίνο. Το πρωτόκολλο για την qPCR περιλαμβάνει την ανάμειξη διαλύματος με ορισμένη σύσταση, προσθήκη του cDNA που συντέθηκε στο προηγούμενο βήμα και την φόρτωση των δειγμάτων στο μηχάνημα qPCR της εταιρίας Bio-Rad.

Πίνακας 4: Διάλυμα αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
cDNA	4
Forward and Reverse Primer Mix, 10μM, Eurofins	2
SYBR®Green, (2x), KAPA	1,5
ddH ₂ O	1,5

3.2.2 Μέθοδοι παροδικής γενετικής τροποποίησης κυτταρικών σειρών με τη χρήση λεντιών

3.2.2.1 Απομόνωση RNA (RNA Extraction)

Αφού έγινε η γενετική τροποποίηση και πέρασαν 72h, έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού υγρού με απόχυση, και κατόπιν γρήγορη προσθήκη 700μl τριζόλης κατευθείαν πάνω στα κύτταρα. Ακολούθησε επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο. Στη συνέχεια, προσθήκη 200 χλωροφορμίου και πολύ καλή ανάδευση με χρήση Vortex για τουλάχιστον 30 sec. Τα δείγματα υπόκεινται σε φυγοκέντρηση στις 13.000 RPM, για 5 min και σε θερμοκρασία 4°C. Με πολύ προσεκτικές κινήσεις, γίνεται διαχωρισμός του υπερκείμενου και τοποθέτηση σε νέο Eppendorf, όπου αναμειγνύεται με 500 μl ισοπροπανόλης, και μετά από ήπια ανακίνηση, ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση για 15 min στις 13.000 RPM και θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο αυτής της φυγοκέντρησης απορρίπτεται, στο υπολοιπούμενο διάλυμα γίνεται προσθήκη 70% παγωμένης αιθανόλης, ανάδευση με χρήση Vortex και ξανά φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 RPM. Μετά από πολύ προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου, το Eppendorf που πλέον περιέχει μόνο το RNA αφήνεται στον πάγο, σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι για 15-20 min ώστε να στεγνώσει και να απομακρυνθεί κάθε ίχνος υγρασίας. Τέλος, έγινε επαναδιάλυση του RNA σε 50μl ddH₂O, επώαση για 5 min στους 65°C και μέτρηση της συγκέντρωσης στο φωτόμετρο Quawell Q3000 UV.

3.2.2.2 Αντίδραση με την DNase (DNase treatment)

Η DNase είναι ένα ένζυμο το οποίο υδρολύει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς εντός του DNA, και αυτή η διαδικασία γίνεται ώστε να καθαρίσει το δείγμα του RNA Extraction από τυχόν υπολείμματα DNA. Αρχικά, γίνεται προετοιμασία του Master Mix της αντίδρασης ως εξής:

Πίνακας 5: Διάλυμα Master Mix για DNase treatment

Αντιδραστήρια	Ποσότητες σε μl
RNA + ddH ₂ O	25,5
Buffer DNase, 10x, ThermoFisher Scientific	3
DNase, ThermoFisher Scientific	1
RNase out (40U/μl), Invitrogen	0,5

Η ποσότητα του RNA στο διάλυμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg συνολικά. Στη συνέχεια, το διάλυμα αναδεύεται με χρήση Vortex για 3 sec, ακολουθεί μια πολύ σύντομη φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 RPM και το διάλυμα μπαίνει απευθείας για επώαση στο υδατόλουτρο για 1h στους 37°C.

Μετά το πέρας της επώασης, γίνεται κατεργασία με φαινόλη/χλωροφόρμιο και αλκοόλη, που γίνεται ώστε να καθαριστεί το δείγμα και να έχουμε υψηλότερη ποιότητα τελικού προϊόντος.

Μόλις βγουν τα δείγματα από το υδατόλουτρο, τοποθετούνται ξανά στον πάγο, και σε αυτά προστίθενται 40μl Sodium Acetate RNA, 3M με pH = 5,6 καθώς και 310 μl ddH₂O. Έπειτα γίνεται σε κάθε δείγμα προσθήκη 400μl PheOH/Chloroform, ακολουθεί ανάδευση με Vortex έως 1min και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 RPM και 4°C.

Με πολύ προσεκτικές κινήσεις, μεταφέρονται 400 µl από το υπερκείμενο διάλυμα σε ένα νέο Eppendorf στον πάγο. Γίνεται προσθήκη 1000 µl παγωμένης EtOH 100%, ήπια ανάδευση με ανακίνηση του tube 4-5 φορές και στη συνέχεια αποθήκευση για τουλάχιστον 1h στους -80°C, όπου αν το επιθυμεί κανείς, μπορεί σε αυτό το στάδιο να αφήσει τα δείγματα αποθηκευμένα για μερικές εβδομάδες.

Μετά το πέρας του χρόνου, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 min στις 13.000 RPM και 4°C και το υπερκείμενο που προκύπτει αποχύνεται με προσοχή. Γίνεται ακόμα μια προσθήκη παγωμένης EtOH 70% και ακόμα μια φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 RPM και στους 4°C. Το υπερκείμενο πρέπει να απομακρυνθεί από το tube με πολύ προσοχή, και συνήθως προτιμάται να αφαιρεθεί η μεγαλύτερη ποσότητα με μια πιπέτα των 1000µl και το υπόλοιπο με μια πιπέτα των 200 µl, ενώ σκοπός είναι να αφαιρεθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης. Στη συνέχεια, τα tube αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου στον πάγο για 15-20 min ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη. Ακολουθεί επαναδιάλυση της πελέτας με 40µl ddH₂O και προσθήκη στους 65°C για 5 min, γεγονός που διευκολύνει την διαδικασία της επαναδιάλυσης. Τέλος, γίνεται Vortex για 1 min, spin και πάλι Vortex, το οποίο ολοκληρώνει τη διαδικασία. Στο σημείο αυτό, έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης κάθε δείγματος στο φωτόμετρο Quawell Q3000 UV και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.2.2.3 Σύνθεση cDNA

Το DNase treated RNA που απομονώθηκε με την προηγούμενη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση cDNA με την διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.1.1.

3.2.2.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR)

Το cDNA, πλέον, που συντέθηκε από τα δείγματα, υποβλήθηκε σε έναν κύκλο qPCR όπου μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά η έκφραση των γονιδίων μετά την γενετική τροποποίηση. Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.1.2.

3.2.2.5 Δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay)

Τα κύτταρα από τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, αναπτύχθηκαν σε 6-well plates. Αφού έγινε η επώαση, τα κύτταρα δοκιμάστηκαν στην ικανότητά τους να μεταναστεύουν, γεγονός που συσχετίζεται με την ικανότητα του όγκου να έχει μεταστάσεις. Η δοκιμασία αυτή περιλαμβάνει τη χάραξη μιας τομής, με τη χρήση του tip μιας πιπέτας, πάνω στα στρωμένα κύτταρα στα 6-well plates. Μετά από την χάραξη της τομής, λήφθηκαν φωτογραφίες από το σημείο της τομής σε 3 χρονικά διαστήματα, 0h, 24h, 48h ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση της μεταναστευτικής ικανότητας του κάθε είδους κυττάρων, καθώς και να διαπιστωθεί αν η σίγηση των γονιδίων REAKTn, KLF5 επηρεάζει αυτή την ικανότητα.

3.2.2.6 Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay – CFA)

Αφού τα κύτταρα είχαν αναπτυχθεί, έγινε μια δοκιμασία ελέγχου για το αν τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν αποικίες μετά τη γενετική τους τροποποίηση. Η διαδικασία αυτή έγινε περίπου 14 μέρες μετά την γενετική τροποποίηση και περιλαμβάνει τη λήψη φωτογραφιών των plates κάτω από το μικροσκόπιο με σκοπό να μελετηθούν το μέγεθος και ο αριθμός των αποικιών, γεγονός που έγινε εφικτό με την χρώση των τρυβλίων με χρωστική μπλε του μεθυλενίου.

3.2.3 Μέθοδοι για την δημιουργία γενετικά τροποποιημένων σταθερών κυτταρικών σειρών

3.2.3.1 Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων (Oligo Annealing)

Το πρώτο βήμα για τη γενετική τροποποίηση είναι να υβριδοποιηθούν οι δύο αλυσίδες του shRNA του REAKTn που κατασκευάστηκε. Τα αντιδραστήρια για την υβριδοποίηση είναι:

Πίνακας 6: Σύσταση διαλύματος υβριδοποίησης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
Oligo sense	2
Oligo antisense	2
Annealing Buffer (pTER + 100mM KoAc, 30mM Hepes, 2mM MgAc)	96

Τα αντιδραστήρια προστίθενται σε Eppendorf 1,5 ml και ακολουθεί επώαση στους 100°C για 5 min.

3.2.3.2 Αντίδραση λιγάσης (Ligation)

Τα υβριδοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να ενωθούν με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο φορέας pTER. Όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 3.1.2, ο φορέας pTER έχει υποστεί επεξεργασία με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BgIII οι οποίες κόβουν την πλασμιδιακή αλληλουχία προκειμένου να μπορέσει να γίνει η ένθεση του shRNA του REAKTn. Η πέψη αυτή είχε γίνει σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου, οπότε ο φορέας υπήρχε ήδη έτοιμος. Ωστόσο, μαζί με την αντίδραση αυτή, παρασκευάστηκε και ένα δείγμα φορέα pTER το οποίο δεν περιέχει κανένα shRNA αλλά ddH₂O αν' αυτού, κι έτσι λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας. Η αντίδραση σχηματισμού του ονομάζεται αντίδραση self – ligation.

Τα αντιδραστήρια για την αντίδραση λιγάσης είναι τα εξής:

Πίνακας 7: Σύσταση διαλύματος αντίδρασης λιγάσης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
Annealed oligos	4
pTER (HindIII-BgII, 50 ng/μl)	1
Buffer T4 ligase (10x), NEB	1
T4 DNA Ligase (400ng/μl), EnzyQuest	0,5
ddH₂O	3,5

Καθώς η λιγάση λειτουργεί στους 16°C όπου τα μόρια DNA δεν έχουν θερμική ενέργεια ώστε να ταλαντώνονται, αυτή η σταθερή θερμοκρασία μπορεί να επιτευχθεί στο μηχάνημα της PCR, χρησιμοποιώντας το ως incubator. Έτσι, το διάλυμα της αντίδρασης έμεινε μέσα στο μηχάνημα της PCR σε συνθήκες:

Πίνακας 8: Συνθήκες επώασης διαλύματος λιγάσης

Θερμοκρασία	16°C
Χρόνος	Infinite
Lid temp	OFF

3.2.3.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH5a

Στην κατάψυξη του εργαστηρίου, στους -80°C , υπήρχαν ήδη έτοιμα βακτηριακά κύτταρα του στελέχους DH5a τα οποία αποψύχθηκαν και σε δύο Eppendorf tube 1,5mL αναμείχθηκαν με 5μl Ligated pTER και Self-ligated pTER αντίστοιχα, ενώ έπειτα έγινε επώασή τους στον πάγο για 20 min. Στο διάστημα των 20 min, επιτρέπεται στα κύτταρα να έρθουν σε επαφή με το DNA χάρη στα κατιόντα που περιέχονται στο διάλυμα των κυττάρων τα οποία εξουδετερώνουν το αρνητικό φορτίο της φωσφολιπιδικής μεμβράνης και του DNA. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί η διαδικασία του θερμικού σοκ, το οποίο περιλαμβάνει την τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42°C αυστηρά για 45 sec, ενώ κατευθείαν μετά μεταφέρονται στον πάγο για 2 min. Στη συνέχεια, με πιπέτα γίνεται προσθήκη 1mL θρεπτικού χωρίς αντιβιοτικό (αμπικιλίνη) και γίνεται ανάδευση για 50 λεπτά στους 37°C και από την ποσότητα του διαλύματος λαμβάνονται 300μl και γίνεται επίστρωση σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό. Τέλος, έγινε επώαση στους 37°C για όλο το βράδυ, και οι καλλιέργειες ήταν έτοιμες το επόμενο πρωί. Από τις αποικίες που δημιουργήθηκαν στο τρυβλίο, επιλέχθηκαν 3 μετασχηματισμένες και μια τέταρτη ως αρνητικός μάρτυρας και με ένα tip πιπέτας, έγινε μεταφορά μερικών κυττάρων τους σε υγρό θρεπτικό υλικό για κατασκευή υγρής καλλιέργειας. Η υγρή καλλιέργεια τοποθετείται υπό ανάδευση στον επωαστικό θάλαμο για άλλο ένα βράδυ ώστε να γίνει ανάπτυξη των κυττάρων και να είναι έτοιμη για χρήση.

3.2.3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini Prep)

Αφού τα κύτταρα επώαστηκαν για ένα βράδυ, έγινε η απομόνωση του πλασμιδιακού γενετικού υλικού. Το πρώτο βήμα, είναι η μεταφορά 2ml από την υγρή καλλιέργεια σε Eppendorf των 2ml και έγινε φυγοκέντρωση για 2 min στις 13.000 RPM και στους 4°C . Το υπερκείμενο απομακρύνεται, γίνεται προσθήκη 100μl ψυχρού Buffer I και ανάδευση με χρήση Vortex. Γίνεται έπειτα προσθήκη 200μl Buffer II το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς περιέχει SDS το οποίο σε οποιαδήποτε άλλη θερμοκρασία μπορεί να δημιουργήσει ίζημα, και ήπια ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να επωαστεί για 5 min και έπειτα γίνεται προσθήκη του τρίτου διαλύματος, 150μl ψυχρού Buffer III και ξανά ήπια ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 min και φυγοκέντρωση για 15 min στις 13.000 RPM και στους 4°C και έπειτα λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και μεταφέρεται σε νέο tube, όπου γίνεται προσθήκη 1ml 100% αιθανόλης και γίνεται ανάδευση. Το μείγμα αφήνεται για 20 min στους -80°C και έπειτα ακολουθεί η διαδικασία καθαρισμού του, που περιλαμβάνει φυγοκέντρωση για 20 min στις 13.000 RPM και στους 4°C , απόχυση του υπερκείμενου, προσθήκη 600μl 70% αιθανόλης και ξανά φυγοκέντρωση για 5 min στις 13.000 RPM και στους 4°C . Τελικό βήμα είναι να αφαιρεθεί το tube στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 min προκειμένου να στεγνώσει πλήρως ώστε να επαναδιαλυθεί σε 100μl ζεστού ddH₂O (με τη βοήθεια Vortex και Spin).

Πίνακας 9: Σύσταση των διαλυμάτων που απαιτούνται για το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

Διάλυμα	Σύσταση
Buffer I	50mM Tris, 10mM EDTA, ddH ₂ O
Buffer II	1% SDS, 0,2M NaOH, ddH ₂ O
Buffer III	60ml 5M CH ₃ COOK, 11,5ml άνυδρο CH ₃ COOH, 28,5 ml ddH ₂ O

3.2.3.5 Αντίδραση πέψης (Ligation) και έλεγχος με χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης (Agarose Gel-Electrophoresis)

Η αντίδραση πέψης, επιβεβαιώνει την επιτυχία του ανασυνδυασμού των πλασμιδίων με το shRNA REAKTn. Πολύ σημαντικό για την σωστή πέψη, είναι να χρησιμοποιηθεί ένα περιοριστικό ένζυμο (ενδονουκλεάση), το οποίο να κόβει το πλασμίδιο παραπάνω από μια φορά. Στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI που πληροί αυτά τα κριτήρια καθώς έχει δύο θέσεις κοπής μέσα στο πλασμίδιο, εκατέρωθεν της θέσης όπου υπάρχει το ένθεμα shRNA. Η πέψη περιλαμβάνει την προετοιμασία 5 μειγμάτων σε Eppendorf 2ml και την επώασή τους σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C για 2h. Τα 5 Eppendorf αντιστοιχούν στα 3 αρχικά δείγματα, τον αρνητικό μάρτυρα που δεν περιέχει ένθεμα, αλλά κι έναν θετικό μάρτυρα που περιέχει το πλασμίδιο pTER ανασυνδυασμένο με ένα άλλο παλιότερο διαγονίδιο. Η σύσταση των μειγμάτων είναι η εξής:

Πίνακας 10: Σύσταση διαλυμάτων αντίδρασης πέψης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
Πλασμιδιακό DNA (από προηγούμενη μέθοδο)	7
Buffer CutSmart 10x (NEB)	2,5
EcoRI High Fidelity (NEB)	1,5
ddH ₂ O	14

Κατά τη διάρκεια της επώασης, ετοιμάστηκε μια πηκτή αгарόζης με ποσοστό 1,5% και ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x, και αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, έγινε προσθήκη 5μl χρωστικής (loading dye) στα Eppendorf. Από κάθε δείγμα, 30 μl φορτώθηκαν στην πηκτή. Εκτός από τα 5 δείγματα, φορτώθηκε κι ένα δείγμα που καλείται ladder το οποίο είναι ο τρόπος με τον οποίο θα ελεγχθούν οι ζώνες που θα προκύψουν. Η παροχή ρεύματος ρυθμίστηκε στα 130V και τα δείγματα αφέθηκαν να «τρέξουν» στην πηκτή για περίπου μια ώρα.

3.2.3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση kit (Midi Prep)

Μετά την ηλεκτροφόρηση κι αφού γίνεται επιβεβαίωση ανασυνδυασμού, είναι σημαντικό να επαναληφθεί το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA προκειμένου το τελικό γενετικό υλικό να είναι όσο καλύτερης ποιότητας γίνεται, και ταυτόχρονα να υπάρχει σε ικανοποιητική ποσότητα, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες για επιτυχή γενετική τροποποίηση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο με ένα kit του οποίου τα διαλύματα και κυρίως τα Buffer θα είναι πολύ καλύτερης ποιότητας και ακρίβειας από τα αντίστοιχα homemade. Για αυτή τη διαδικασία, έγινε ξανά ανακαλλιέργεια των αποικιών σε υγρό αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό κι έπειτα έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με εταιρικό MIDI plasmid kit της εταιρίας Macherey Nagel.

3.2.3.7 Γραμμοποίηση (Linearization) ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, έλεγχος αυτής και καθαρισμός τελικού προϊόντος με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου

Η γραμμοποίηση είναι μια διαδικασία που αποσκοπεί στην μετατροπή των πλασμιδίων από κυκλικά σε γραμμικά. Η γραμμοποίηση γίνεται με την χαρακτηριστική αντίδραση πέψης με χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης και συγκεκριμένα το ένζυμο ScaI, ενώ το πρωτόκολλο της αντίδρασης είναι ίδιο με αυτό της αντίδρασης πέψης που περιεγράφηκε στην ενότητα 3.2.3.5.

Πίνακας 11: Σύσταση διαλύματος αντίδρασης γραμμοποίησης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
Πλασμίδιο	40
Buffer ScaI, 10x, Minotech	5
ScaI, Minotech	2
ddH₂O	2

Η αντίδραση γραμμοποίησης επαναλήφθηκε για ακόμη μια φορά προκειμένου να γραμμοποιηθούν όλα τα πλασμίδια επιτυχώς. Η δεύτερη αντίδραση έγινε με ελαφρώς τροποποιημένες τις ποσότητες των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 12: Σύσταση διαλυμάτων 2ης γραμμοποίησης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μl
Πλασμίδιο	40
Buffer ScaI, 10x, Minotech	3
ScaI, Minotech	3,5
ddH₂O	3,5

Όπως έγινε και μετά την αντίδραση πέψης που περιεγράφηκε στην ενότητα 3.2.3.5. , έτσι και στην συγκεκριμένη αντίδραση, έγινε έλεγχος της επιτυχίας γραμμοποίησης με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Κατά τη διάρκεια της τετράωρης επώασης της αντίδρασης γραμμοποίησης, ετοιμάστηκε μια πηκτή αгарόζης με ποσοστό 1% και ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Στο τέλος της επώασης, έγινε λήψη δείγματος όγκου ίσου με το 1/10 του συνολικού όγκου αντίδρασης, δηλαδή 5μl από κάθε δείγμα. Στα νέα δείγματα έγινε προσθήκη 10μl ddH₂O και 3μl χρωστική (loading dye) μέχρι ο όγκος των διαλυμάτων φόρτωσης να φτάσει τα 15μl. Μετά την φόρτωση στην πηκτή, η παροχή ρεύματος ρυθμίστηκε στα 130V και τα δείγματα αφέθηκαν να «τρέξουν» για περίπου μια ώρα.

Μετά τον έλεγχο της γραμμοποίησης και πριν γίνει η γενετική τροποποίηση στα κύτταρα, είναι απαραίτητος ο καθαρισμός των δειγμάτων που περιέχουν τα, πλέον, γραμμοποιημένα πλασμίδια με το ένθεμα shRNA REAKTn προκειμένου να υπάρχει η μέγιστη δυνατή απόδοση καθώς και όσο το δυνατόν μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας του πειράματος. Η διαδικασία καθαρισμού γενετικών υλικών, γίνεται με το πρωτόκολλο φαινόλη/χλωροφόρμιο, το οποίο περιεγράφηκε εκτενώς στην ενότητα 3.2.2.2. Το πρωτόκολλο αυτό εκτελέστηκε 2 φορές, μετά από κάθε αντίδραση γραμμοποίησης, και μετά την μέτρηση της συγκέντρωσης, είχε ολοκληρωθεί η διαδικασία προετοιμασίας για την γενετική τροποποίηση.

3.2.3.8 Γενετική τροποποίηση σταθερών κυτταρικών σειρών

Για τη γενετική τροποποίηση επιλέχθηκαν οι κυτταρικές σειρές AGS, MKN45, των οποίων οι ιδιότητες έχουν αναλυθεί σε προηγούμενη ενότητα.

Αρχικά, γίνεται επαναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA σε 250μl θρεπτικού υλικού χωρίς όρο FBS (Fetal Bovine Serum) ενώ σε ένα δεύτερο tube, γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού χωρίς ορό και λιπόφιλου παράγοντα PPEI σε αναλογία 4:1 αναφορικά με το πλασμίδιο. Συγκεκριμένα για το construct REAKTn όπου το πλασμιδιακό DNA υπήρχε σε ποσότητα 3 μg, έγινε προσθήκη 12μg λιπόφιλου παράγοντα. Ο λιπόφιλος παράγοντας θα πρέπει προηγουμένως να έχει επωαστεί στο dry bath στους 55-60°C για 5min. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου, και έπειτα σε ένα falcon, γίνεται ανάμειξη των περιεχομένων των 2 φιαλιδίων και ξανά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20min.

Στις κυτταρικές καλλιέργειες έγινε αφαίρεση του παλιού θρεπτικού υλικού και αντικατάστασή του με ένα νέο χωρίς ορό FBS. Ακολουθεί θρυψινοποίηση με προσθήκη 2,5ml θρυψίνης στην κάθε φλάσκα για να ξεπλυθούν τα κύτταρα και αφαίρεση της θρυψίνης με ορολογική πιπέτα. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για ακόμα μια φορά προκειμένου να γίνει η αποκόλληση των κυττάρων και έπειτα η φλάσκα τοποθετείται στους 37°C για 5min για να ενεργοποιηθεί και να λειτουργήσει η θρυψίνη. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, πρέπει να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη, κι αυτό γίνεται με προσθήκη 2,5ml FBS. Με ορολογική πιπέτα λαμβάνονται τα κύτταρα από τη φλάσκα και εξαναγκάζονται να περάσουν από το στόμιο της πιπέτας για 10-15 φορές (διαδικασία passage) ενώ έπειτα μεταφέρονται σε ένα falcon, με μια μικρή ποσότητα να παραμένει στη φλάσκα για ανακαλλιέργεια. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 378g για 5min, αφαίρεση του υπερκείμενου με ορολογική πιπέτα, προσθήκη 1ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού μέσου στο falcon και ήπια ανάδευση.

Παράλληλα σε ένα tube, γίνεται μείγμα από 80μl θρεπτικού υλικού και 10μl Trypan Blue, μιας χρωστικής που βάφει μπλε τον πυρήνα των αποπτωτικών κυττάρων κι έτσι μπορεί να γίνει διαχωρισμός μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

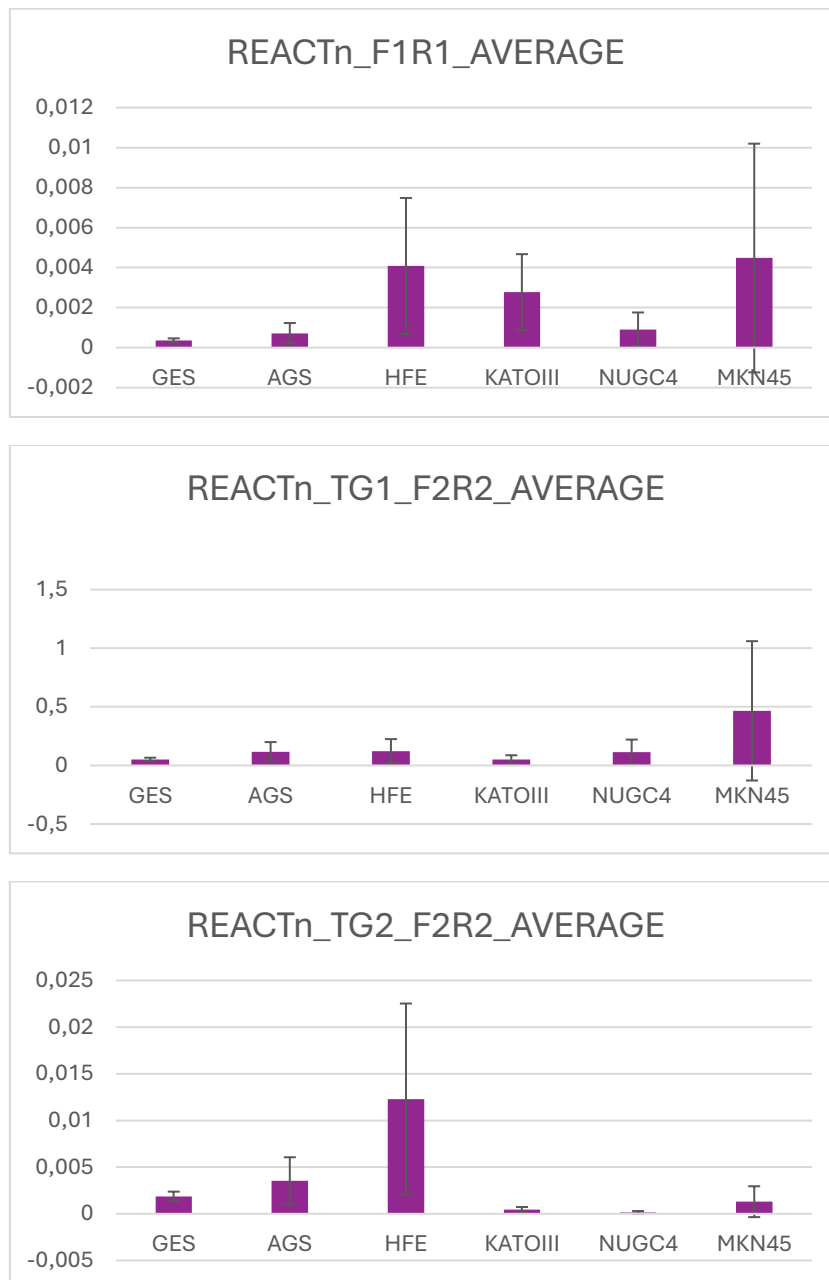
Γίνεται λήψη 10μl από το falcon με το κυτταρικό εναιώρημα και προστίθεται στο μείγμα θρεπτικού υλικού – trypan blue, επομένως δημιουργείται ένα συνολικό μείγμα όγκου 100μl. Από το μείγμα, 10μl προστίθενται σε πλάκα Neubauer προκειμένου να γίνει μέτρηση των ζωντανών κυττάρων. Για ένα κλασσικό πείραμα γενετικής τροποποίησης απαιτούνται περίπου 2.000.000 κύτταρα, έτσι με κατάλληλους υπολογισμούς και αναγωγή αριθμού κυττάρων σε όγκο, γίνεται προσθήκη του απαραίτητου όγκου σε ένα νέο falcon και προσθήκη θρεπτικού υλικού μέχρι τελικό όγκο 1ml.

Αυτό το μείγμα κυττάρων και θρεπτικού υλικού, προστίθεται στο tube που περιέχει το μείγμα πλασμιδίου – λιπόφιλου παράγοντα και επωάζεται για 20min. Τέλος, γίνεται προσθήκη 3,5ml πλήρους θρεπτικού υλικού μέχρι τελικό όγκο 7ml και μετά την επώαση, το μείγμα αποχύνεται σε μεγάλα πιάτα petri τα οποία περιέχουν ήδη 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τα πιάτα αφήνονται στους 37°C να επωαστούν. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε μετά από 24 ώρες, μετά από αλλαγή του θρεπτικού, κι έγινε με την χρήση δύο αντιβιοτικών, της βλαστισιδίνης και της ζιροσίνης. Η τελική επώαση των κυττάρων διήρκεσε περίπου 14 ημέρες, μέχρι να παρατηρηθεί ανάπτυξη κλώνων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Διερευνητική μελέτη έκφρασης του REAKTn και των REAKTn_TG1, REAKTn_TG2 σε κυτταρικές σειρές φυσιολογικού και καρκινικού επιθηλίου

Η διερευνητική qPCR ήταν η πρώτη qPCR που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή προκειμένου να εξακριβωθεί σε ποιες κυτταρικές σειρές υπάρχει μεγαλύτερη έκφραση του REAKTn. Σε όλα τα διαγράμματα που θα ακολουθήσουν, έγινε κανονικοποίηση με την χρήση 3 γονιδίων τα οποία ονομάζονται ιδιοσυστάτα (housekeeping), και των οποίων η έκφραση δεν αλλάζει από σειρά σε σειρά.

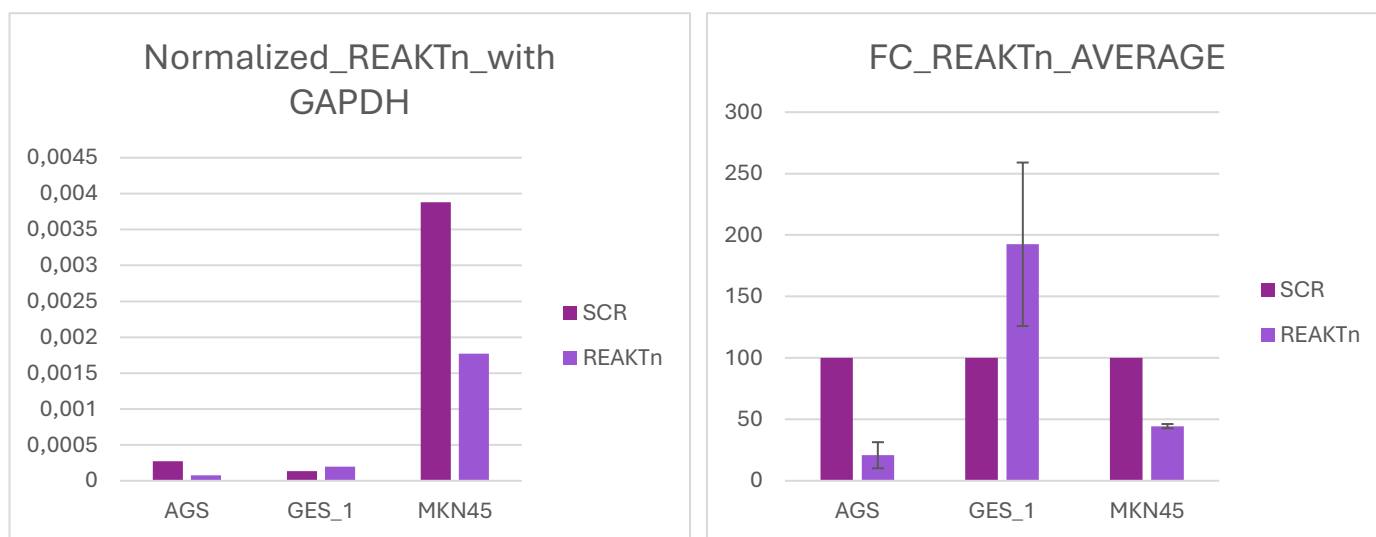


Εικόνα 18: Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης των REAKTn, REAKTn_TG1, REAKTn_TG2 σε φυσιολογικές και καρκινικές σειρές, χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο της κανονικοποίησης με τα 3 ιδιοσυστάτα γονίδια GAPDH, Actin, RPLP1.

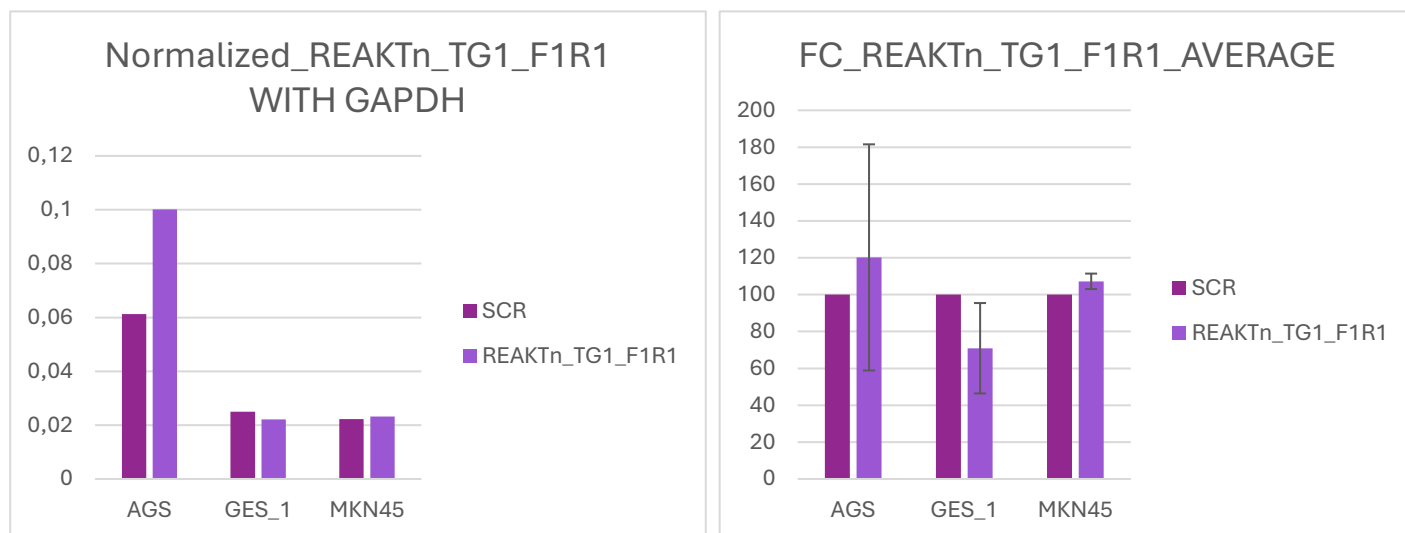
Από τα παραπάνω διαγράμματα (Εικόνα 18), φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης διαφέρουν ανάλογα με την κυτταρική σειρά. Συγκεκριμένα, το REAKTn αλλά και το REAKTn_TG2 εκφράζονται αρκετά στην φυσιολογική κυτταρική σειρά HFE, σε αντίθεση με το REAKTn_TG1. Επιπλέον, σημαντική είναι η έκφραση του REAKTn και REAKTn_TG1 στην μεταστατική καρκινική σειρά MKN45. Η γενικότερη παρατήρηση είναι ότι το REAKTn εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με το REAKTn_TG1 του οποίου η έκφραση εντοπίζεται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα και μάλιστα σε μεταστατικά, ενώ το REAKTn_TG2 εκφράζεται κυρίως σε φυσιολογικά κύτταρα. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκαν προς μελέτη και τα 3, ώστε να μπορέσει να εντοπιστεί η μεταξύ τους σχέση, τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα όσο και σε καρκινικά, ενώ το ενδιαφέρον της μελέτης προσανατολίστηκε στις κυτταρικές σειρές AGS, GES1 και MKN45.

4.2 Αποτελέσματα γενετικής τροποποίησης κυτταρικών σειρών με χρήση λεντιών

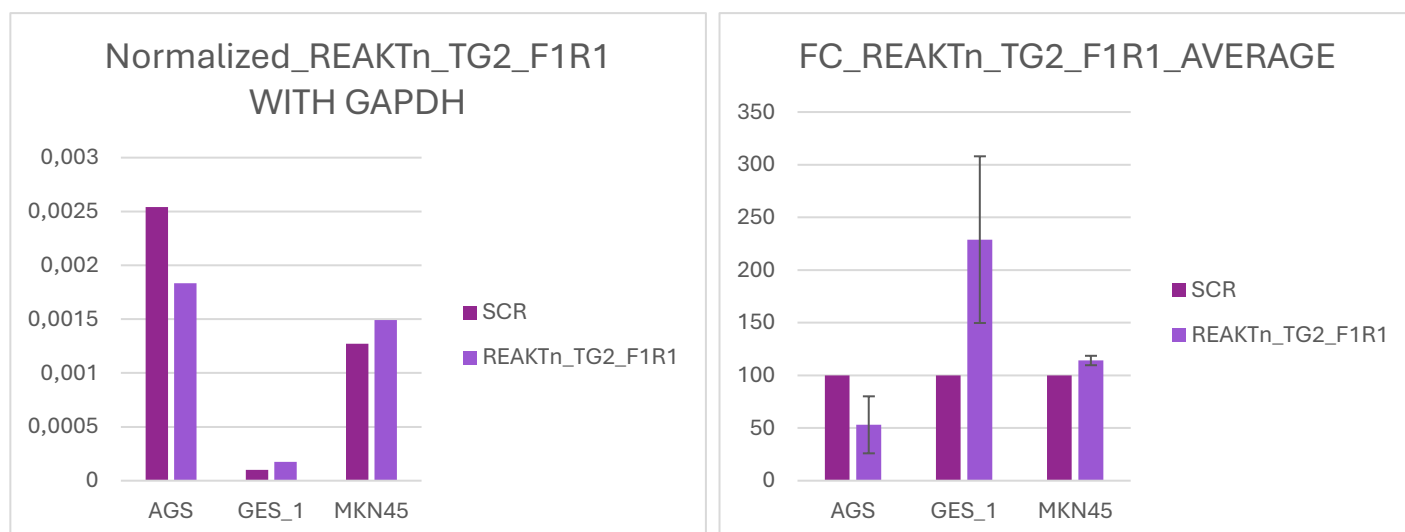
Μετά την γενετική τροποποίηση, ακολούθησε qPCR ώστε να ελεγχθούν τα αποτελέσματά της όσον αφορά την αποσιώπηση των γονιδίων. Όπως και στην προηγούμενη ενότητα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης, κανονικοποιήθηκαν με τα τρία ιδιόσυστα γονίδια GAPDH, Actin, RPLP1 αλλά έγινε και δεύτερη κανονικοποίηση, με διαίρεση των τιμών με τις τιμές του δείγματος shSCR (scrambled) το οποίο αποτελούσε τον αρνητικό μάρτυρα των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο μπορούν όλα τα αποτελέσματα να συγκριθούν μεταξύ τους με βάση τις τιμές του SCR.



Εικόνα 19: α) Διάγραμμα έκφρασης REAKTn, κανονικοποιημένο με το housekeeping gene GAPDH, β) Μέση τιμή έκφρασης REAKTn (μέσος όρος από GAPDH, ACTIN) μετά από κανονικοποίηση με τις τιμές έκφρασης του shSCR.



Εικόνα 20: α) Διάγραμμα έκφρασης REAKTn_TG1 κανονικοποιημένο με το housekeeping gene GAPDH, β) Μέση τιμή έκφρασης REAKTn_TG1 (μέσος όρος από GAPDH, ACTIN) μετά από κανονικοποίηση με τις τιμές έκφρασης του shSCR.

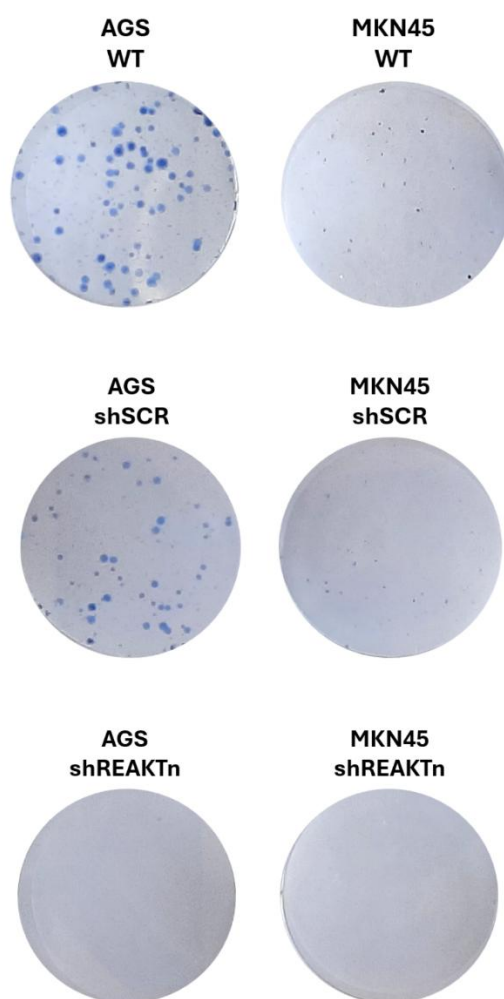


Εικόνα 21: α) Διάγραμμα έκφρασης REAKTn_TG2 κανονικοποιημένο με το housekeeping gene GAPDH, β) Μέση τιμή έκφρασης REAKTn_TG2 (μέσος όρος από GAPDH, ACTIN) μετά από κανονικοποίηση με τις τιμές έκφρασης του shSCR

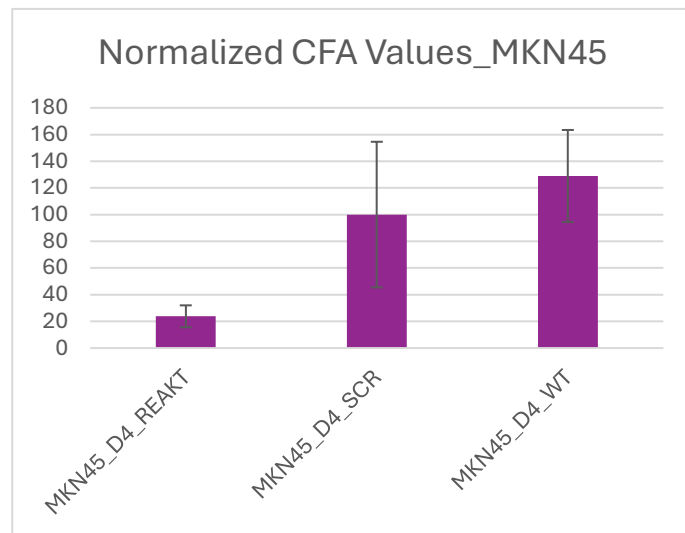
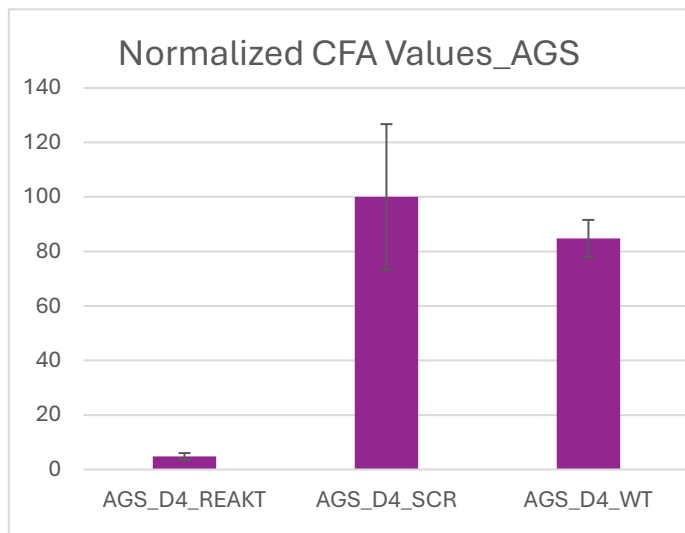
Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα (Εικόνες 19, 20, 21), η έκφραση του REAKTn φαίνεται να μειώθηκε στα κύτταρα AGS, MKN45 ενώ υπήρχε μεγάλη αύξηση έκφρασης στα GES1, κάτι που δηλώνει αποτυχία της καταστολής. Για αυτό τον λόγο, τα επόμενα πειράματα εστίασαν στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές AGS και MKN45. Όσον αφορά το γονίδιο στόχο REAKTn_TG1, η έκφρασή του μειώθηκε μόνο στα GES1 ενώ το REAKTn_TG2 μόνο στα AGS.

4.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay - CFA)

Η δοκιμασία αυτή, έγινε στα πλαίσια της φαινοτυπικής ανάλυσης της σίγησης των γονιδίων, και από αυτή τη δοκιμασία μπορεί να ελεγχθεί το πόσο η σίγηση αυτή επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μετά τον σχηματισμό των αποικιών, έγινε χρώση των τρυβλίων με μπλε του μεθυλενίου και καταμέτρηση των αποικιών κάτω από φυσικό φως. Οι φωτογραφίες που προέκυψαν από το μικροσκόπιο, αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ImageJ το οποίο δίνει στατιστικά αποτελέσματα σχετικά με τον αριθμό και το μέγεθός τους.



Εικόνα 22: Φωτογραφίες των τρυβλίων μετά από χρώση με μπλε του μεθυλενίου. Απεικονίζονται οι κυτταρικές σειρές AGS, MKN45, ο αρνητικός μάρτυρας shSCR που υποδηλώνει πώς ήταν το τρυβλίο πριν τη σίγηση, και το δείγμα shREAKTn στο οποίο φαίνονται τα αποτελέσματα της σίγησης.

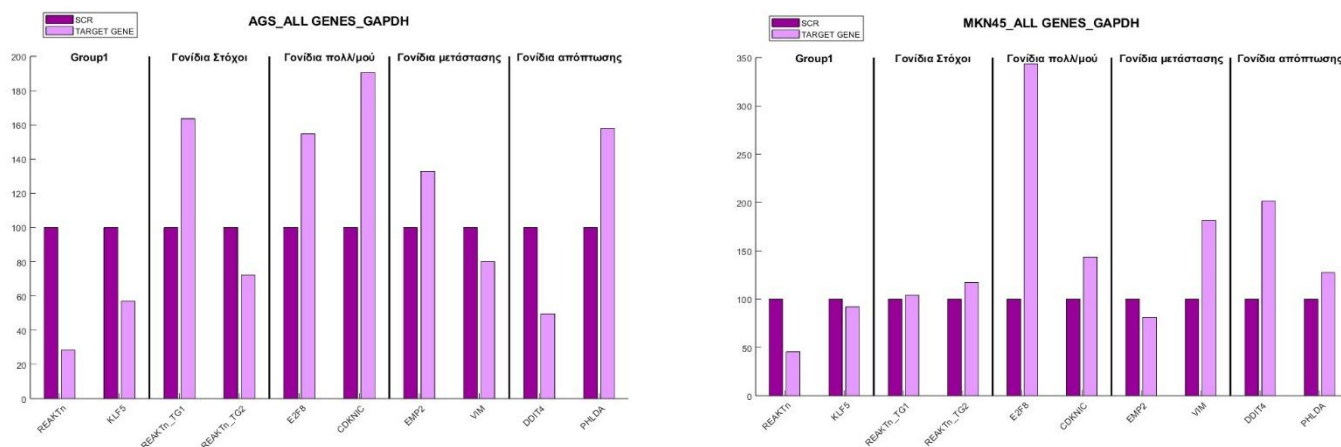


Εικόνα 23: Αριστερά, φαίνεται το αποτέλεσμα σίγησης του shREAKTn στα κύτταρα AGS. Οι τιμές είναι κανονικοποιημένες με βάση τον αρνητικό μάρτυρα SCR. Δεξιά, το αποτέλεσμα σίγησης του shREAKTn, στα κύτταρα MKN45, με τιμές πάλι κανονικοποιημένες με βάση τον αρνητικό μάρτυρα. Και στα δύο διαγράμματα έχουν προστεθεί οι τυπικές αποκλίσεις, ενώ τα αποτελέσματα είναι από την τελευταία ημέρα παρατήρησης των κυττάρων, την ημέρα 4.

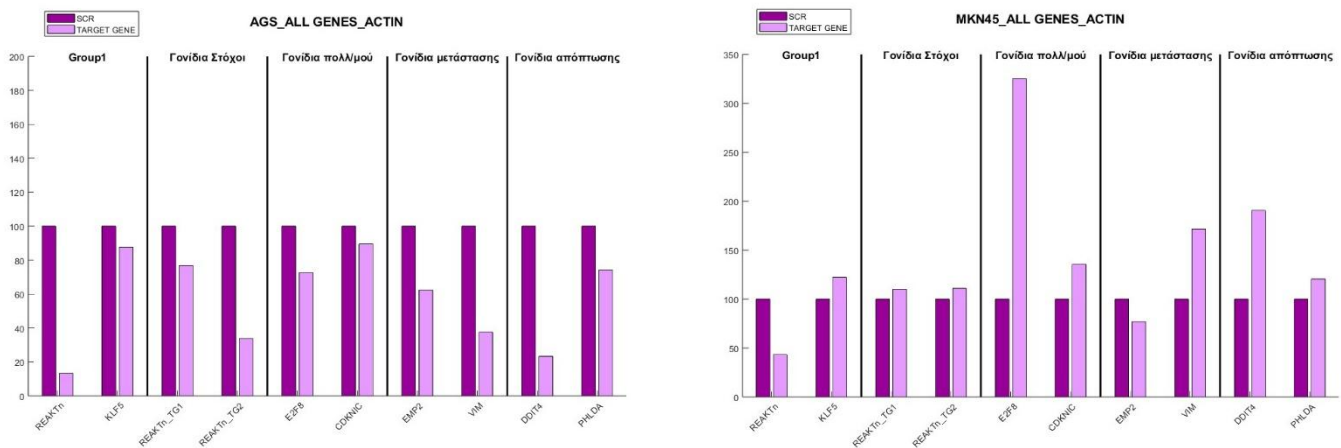
Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα (**Εικόνα 23**) η σίγηση του shREAKTn είχε ως αποτέλεσμα δραματική μείωση του αριθμού των αποικιών στα AGS κύτταρα, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των αποικιών στα AGS κύτταρα είναι μόλις 4,75%, ενώ στα MKN45 κύτταρα το ποσοστό είναι 23,8%.

4.4 Αποτελέσματα δευτερεύουσας qPCR για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο

Μετά την μελέτη του shREAKTn και των γονιδίων-στόχων του, έγινε μελέτη ορισμένων γονιδίων τα οποία έχουν σημαντικούς ρόλους σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, με την χρήση της μεθόδου qPCR. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν και στις 3 κυτταρικές σειρές, τα γονίδια E2F8, CDKN1C που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα Vim, EMP2 που συμμετέχουν στην επιθηλιομεσεγγυματική μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, και των DDIT4, PHLDA που είναι γονίδια σχετικά με την απόπτωση.



Εικόνα 24: Μέσες τιμές έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος, κανονικοποιημένα με το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH αλλά και διαιρεμένα με τις τιμές έκφρασης του shSCR στα AGS, MKN45 κύτταρα



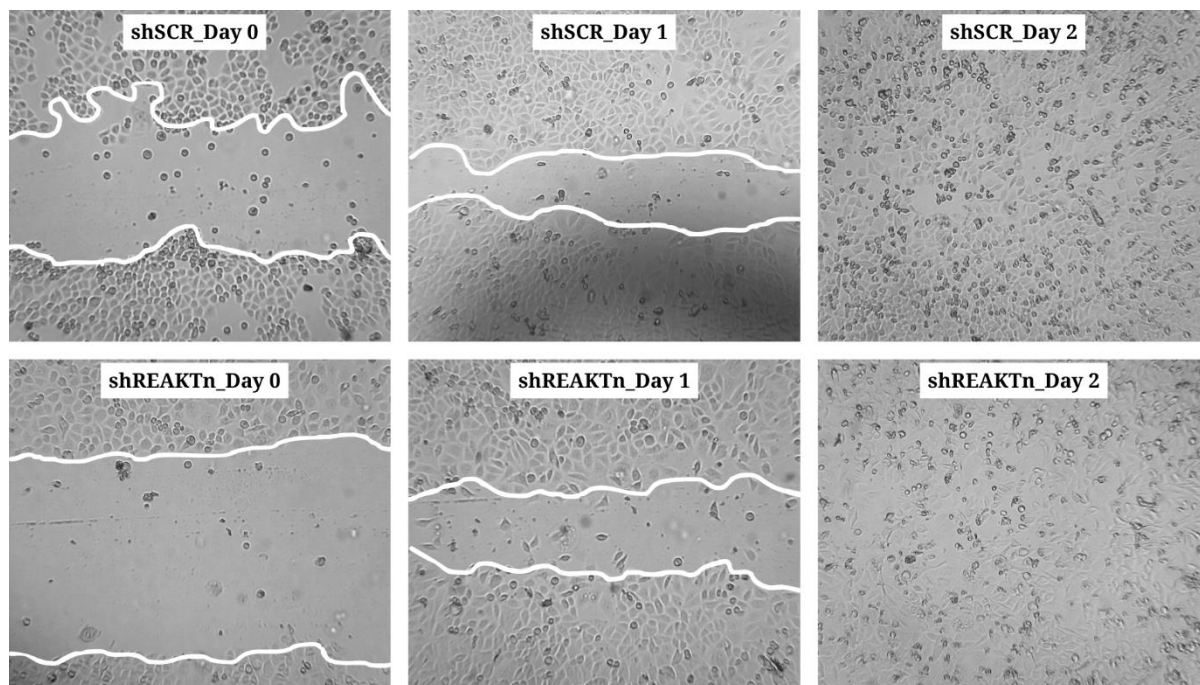
Εικόνα 25: Μέσες τιμές έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος, κανονικοποιημένα με το ιδιοσύστατο γονίδιο Actin αλλά και διαιρεμένα με τις τιμές έκφρασης του shSCR στα AGS, MKN45 κύτταρα

Ορισμένα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα είναι ότι η σίγηση του REAKTn στα AGS κύτταρα (κανονικοποιημένα με GAPDH), προκάλεσε μείωση της έκφρασης του REAKTn_TG2 κατά 23%, του Vim κατά 20% και του DDIT4 κατά 51%, ενώ προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του REAKTn_TG1 κατά 63%, του E2F8 κατά 54%, του CDKNIC κατά 90%, του EMP2 κατά 32% και του PHLDA κατά 58%. Όσο για τα MKN45 κύτταρα κανονικοποιημένα με GAPDH, εκτός από την 19% μείωση έκφρασης του EMP2, όλα τα εξεταζόμενα γονίδια παρουσίασαν σημαντική αύξηση της έκφρασης.

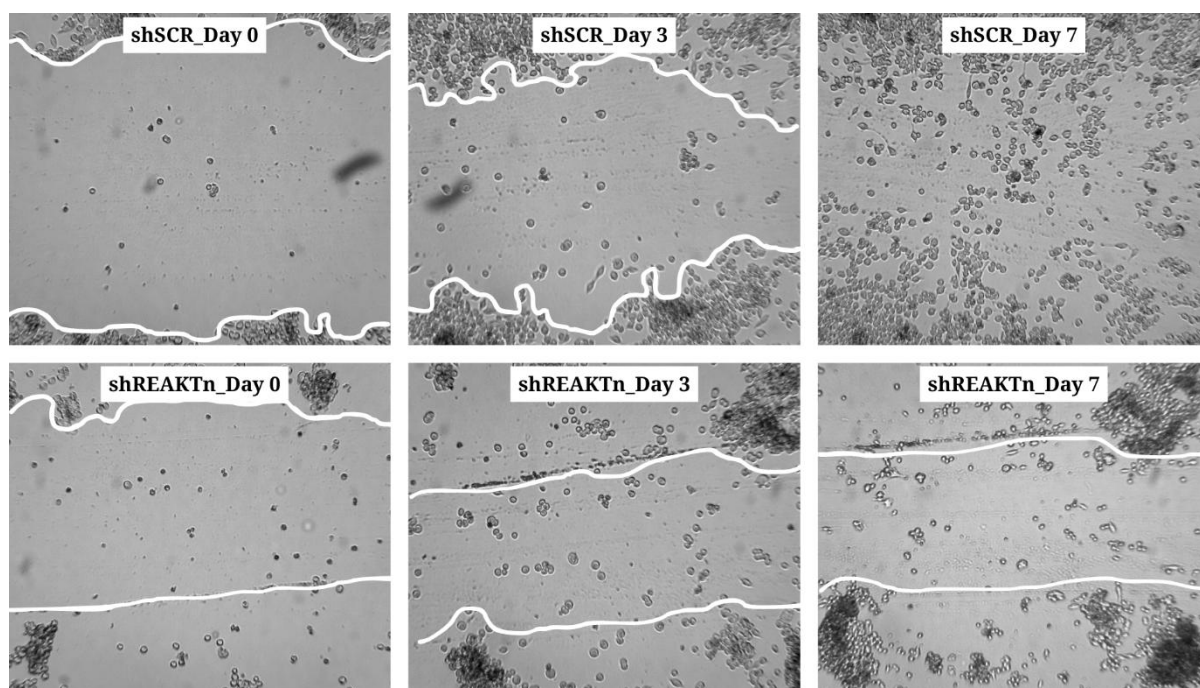
Αναφορικά με τα AGS κύτταρα κανονικοποιημένα με Actin, υπήρξε μείωση της έκφρασης του REAKTn_TG1 κατά 24%, του REAKTn_TG2 κατά 67%, του E2F8 κατά 28%, του CDKNIC κατά 11%, του EMP2 κατά 38%, του Vim κατά 63%, του DDIT4 του 77% και του PHLDA κατά 26%. Στα αντίστοιχα MKN45 κύτταρα υπάρχει μείωση του EMP2 κατά 24% όμως η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων είχε σημαντική αύξηση.

4.5 Αποτελέσματα δοκιμασίας επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay)

Η δεύτερη φαινοτυπική ανάλυση που έγινε ήταν η δοκιμασία επούλωσης πληγών, όπου ελέγχεται η ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων προς το σημείο όπου υπάρχει πληγή ώστε να ξεκινήσουν τη διαδικασία επούλωσης της. Η δοκιμασία αυτή, εκτός από το μεταναστευτικό δυναμικό, μας δίνει πληροφορίες για το αν τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν μεταστάσεις.

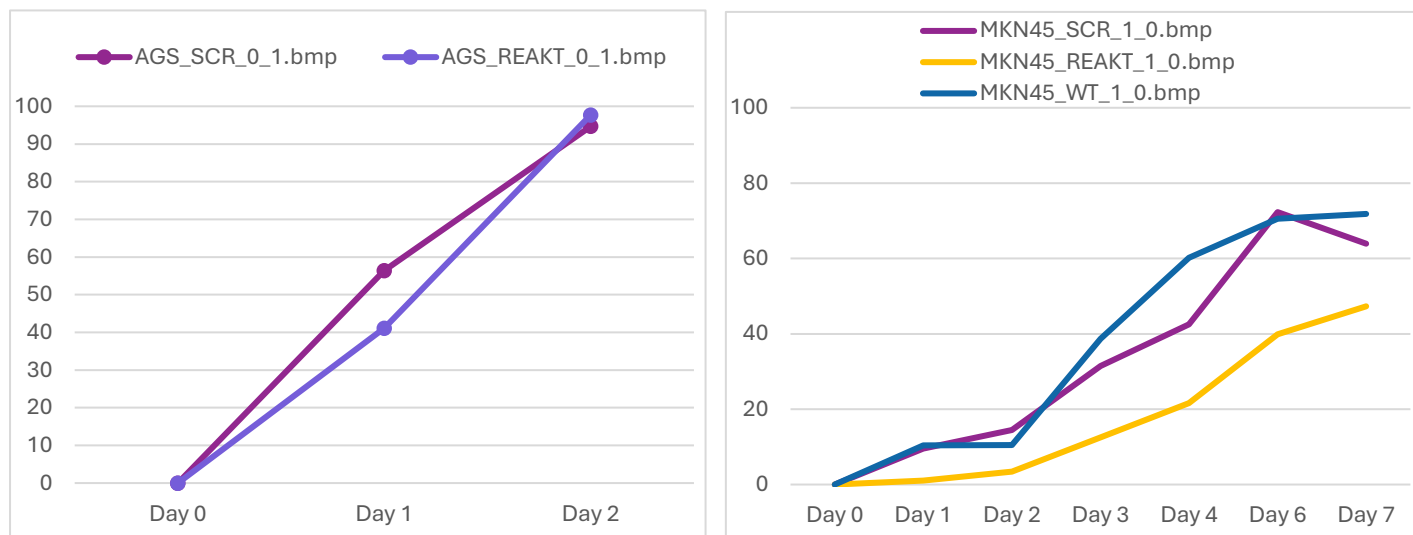


Εικόνα 26: Φωτογραφίες από το οπτικό μικροσκόπιο των κυττάρων AGS, όπου φαίνεται η διαδικασία επούλωσης της αρχικής πληγής (Day 0) τις επόμενες ημέρες (Day 1, Day 2). Η πρώτη σειρά αφορά τον αρνητικό μάρτυρα SCR, ενώ η δεύτερη σειρά αφορά το εξεταζόμενο shRNA, shREAKTn.



Εικόνα 27: Φωτογραφίες από το οπτικό μικροσκόπιο των κυττάρων MKN45, όπου φαίνεται η διαδικασία επούλωσης της αρχικής πληγής (Day 0) τις επόμενες ημέρες (Day 3, Day 7). Η πρώτη σειρά αφορά τον αρνητικό μάρτυρα SCR, ενώ η δεύτερη σειρά αφορά το εξεταζόμενο shRNA, shREAKTn.

Τα κύτταρα MKN45, είχαν πολύ διαφορετική συμπεριφορά από τα AGS και GES1. Συγκεκριμένα, άργησαν πολύ να ανταποκριθούν στην διαδικασία επούλωσης, η οποία κράτησε πολύ περισσότερες ημέρες σχετικά με τα άλλα δύο είδη κυττάρων όπου η πληγή έκλεισε σχεδόν στο 100% μέσα σε δύο ημέρες. Στα MKN45, έγινε λήψη φωτογραφιών ακόμα και 7 ημέρες μετά την χάραξη της πληγής, όπου και πάλι στα τρυβλία που υπήρχε το εξεταζόμενο δείγμα shREAKTn, η πληγή δεν είχε κλείσει εντελώς ούτε την 7^η ημέρα.

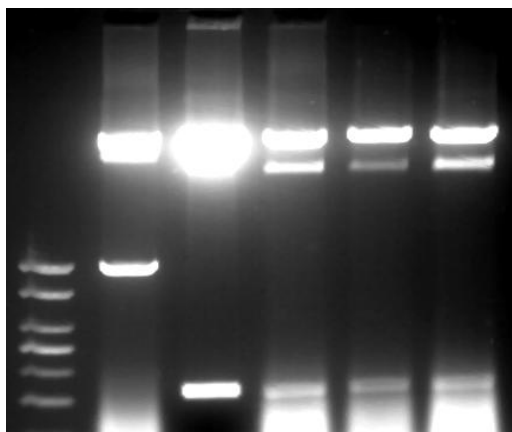


Εικόνα 28: Διαγραμματική απεικόνιση της δοκιμασίας επούλωσης πληγών στα AGS και MKN45 κύτταρα, όπου μέσω στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζεται το επί τοις 100 ποσοστό επούλωσης της αρχικής πληγής με το πέρασμα των ημερών

4.6 Αποτελέσματα προσπάθειας δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων σταθερών κυτταρικών σειρών

4.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης για τον έλεγχο μετασχηματισμού του pTER/shREAKTn

Έχοντας εξασφαλίσει έναν ογκοεπαγωγικό φαινότυπο και με δεδομένη την αλλαγή της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν σε καρκινοειδικές λειτουργίες, το επόμενο βήμα ήταν η προετοιμασία για την επαγόμενη σύγηση του REAKTn, μέσω κλωνοποίησης ενός shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pTER. Η πρώτη αντίδραση ηλεκτροφόρησης έγινε για να διαπιστωθεί αν έγινε σωστά ο μετασχηματισμός των πλασμιδιακών φορέων pTER, δηλαδή αν οι φορείς έλαβαν το εξεταζόμενο ένθεμα shRNA.



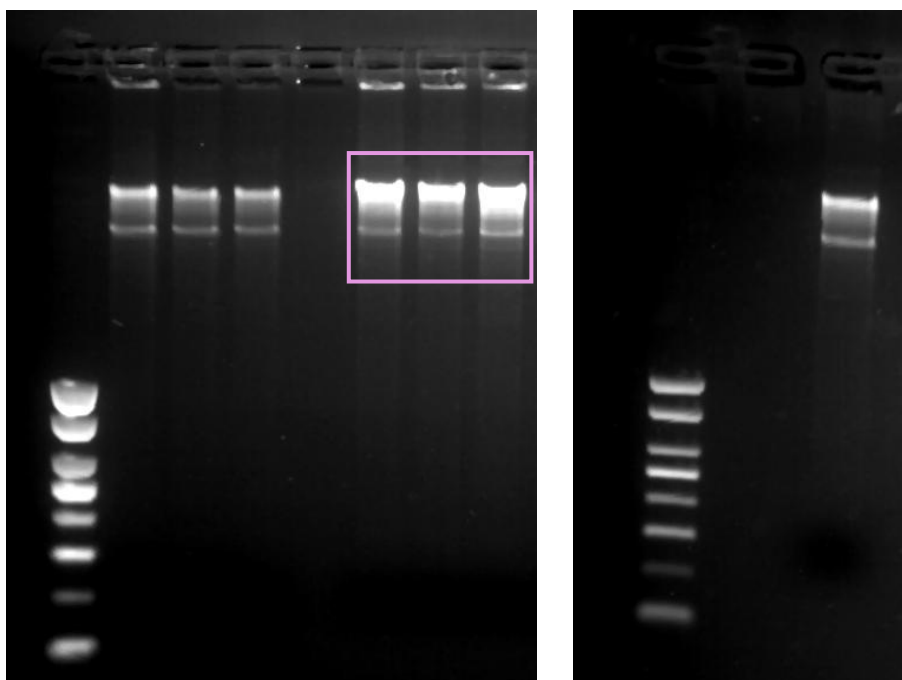
Εικόνα 29: Gel - electrophoresis για έλεγχο μετασχηματισμού pTER. Από αριστερά, η σειρά φόρτωσης είναι ladder, negative control, positive control, 3 δείγματα pTER/shREAKTn

Ο αρνητικός μάρτυρας είναι ένα self-ligated pTER, ενώ ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα προηγούμενο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο του εργαστηρίου δηλαδή ένας φορέας pTER που είχε δεχθεί ένα άλλο ένθεμα, κι όχι το shREAKTn. Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η ζώνη που περιέχεται στον θετικό μάρτυρα εμφανίζεται και στις επαναλήψεις του φορέα pTER/shREAKTn, ωστόσο εμφανίζεται και μια επιπλέον ζώνη αρκετά ψηλά στην πορεία που διένυσε το δείγμα στην πηκτή, η οποία δεν εμφανίζεται ξεκάθαρα στον θετικό μάρτυρα. Η ζώνη αυτή μαρτυρά τον επιτυχημένο ανασυνδυασμό του πλασμιδιακού φορέα και επιβεβαιώνει ότι ο φορέας έλαβε το εξεταζόμενο ένθεμα.

4.6.2 Αποτελέσματα δεύτερης γραμμοποίησης του ανασυνδυασμένου φορέα

Σε συνέχεια της προηγούμενης ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε μια ακόμα προσπάθεια γραμμοποίησης του ανασυνδυασμένου φορέα με χρήση διαφορετικού περιοριστικού ενζύμου. Ο λόγος για τον οποίο έγινε αυτή η διαδικασία, είναι γιατί η συγκέντρωση του construct pTER/shREAKTn που μετρήθηκε μετά την διαδικασία απομόνωσης MIDI prep, ήταν αρκετά χαμηλή, μόλις 91,0 ng/ul.

Το νέο περιοριστικό ένζυμο που επιλέχθηκε για να γίνει γραμμοποίηση του construct ήταν το ScaI, ενώ έγιναν δύο προσπάθειες γραμμοποίησης για καλύτερα αποτελέσματα.



Εικόνα 30: Αριστερά, η πρώτη προσπάθεια γραμμοποίησης του construct με χρήση του ενζύμου περιορισμού ScaI, και δεξιά η δεύτερη προσπάθεια.

Τόσο η πρώτη όσο και η δεύτερη προσπάθεια δεν έφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα γραμμοποίησης. Στην δεύτερη προσπάθεια, οι ζώνες είναι περισσότερο καλοσχηματισμένες και σαφείς από ό,τι στην πρώτη προσπάθεια, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο το αν αντιστοιχούν σε σωστή ευθυγράμμιση του πλασμιδίου. Η συγκέντρωση του φορέα που μετρήθηκε μετά την γραμμοποίηση ήταν 126,4 ng/ul, και πρόκειται για την τελική συγκέντρωση με την οποία έγινε εισαγωγή του πλασμιδίου στις κυτταρικές σειρές.

4.6.3 Αποτελέσματα γενετικής τροποποίησης κυττάρων με τον ευθυγραμμισμένο φορέα pTER/shREAKTn

Οι σταθερές κυτταρικές σειρές AGS, MKN45 τροποποιήθηκαν γενετικά με την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου και ευθυγραμμισμένου construct, και στη συνέχεια, έγινε χρήση διπλού αντιβιοτικού και επώαση για περίπου 10 ημέρες προκειμένου να αναπτυχθούν κλώνοι που θα μπορούν να επάγουν την σίγηση του shREAKTn. Μετά το πέρας των 10 ημερών, δεν είχαν παρατηρηθεί κλώνοι σε καμία κυτταρική σειρά, γεγονός που σημαίνει ότι η προσπάθεια γενετικής τροποποίησης και δημιουργία σταθερών επαγόμενων κυτταρικών σειρών δεν λειτούργησε, πιθανότατα λόγω μη αποτελεσματικής γραμμοποίησης του πλασμιδίου.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο γαστρικός καρκίνος, είναι μια πολύπλευρη και πολύπλοκη ασθένεια, που την δεδομένη στιγμή βρίσκεται 5^{ος} στην παγκόσμια κατάταξη όσον αφορά την συχνότητα και 4^{ος} όσον αφορά την θνησιμότητά του. Σε συνδυασμό με την μεγάλη λίστα παραγόντων κινδύνου και την συχνή απουσία ή λανθασμένη διάγνωση των συμπτωμάτων, ο γαστρικός καρκίνος ανιχνεύεται συχνά σε προχωρημένο στάδιο, όταν είναι ήδη πολύ αργά για τον ασθενή[84]. Επιπλέον, η εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου παρουσιάζει γεωγραφική ποικιλομορφία, με τα επιδημιολογικά δεδομένα αλλάζουν συνεχώς, ενώ οι μηχανισμοί με τους οποίους λειτουργεί και αναπτύσσεται ο γαστρικός καρκίνος είναι περίπλοκοι και ορισμένοι δεν έχουν αποκρυπτογραφηθεί επαρκώς, γεγονός που δυσχεραίνει την μελέτη του[22, 85, 86].

Μέσα στην πληθώρα από ήδη υπάρχουσες μεθόδους διάγνωσης και θεραπείας, ξεχωρίζουν τα τελευταία χρόνια τα μακρά μη-κωδικοποιητικά RNAs, γνωστά ως lncRNA. Τα lncRNA θεωρούνται βασικοί ρυθμιστές του γαστρικού καρκίνου, καθώς συμμετέχουν τόσο στην εξέλιξη της ασθένειας, όσο και στις αλληλεπιδράσεις με διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια[87, 88]. Ο δράση των lncRNA ως βιοδείκτες, ποικίλει ανάλογα με τη θέση που βρίσκονται στο κύτταρο αλλά και με τον τόπο δράσης τους, επομένως ταξινομούνται σε *cis* και *trans* lncRNAs.

Ένα ειδικό lncRNA που έχει πρόσφατα συνδεθεί με τον γαστρικό καρκίνο και την εξέλιξή του είναι το HOXA11-AS, το οποίο βρέθηκε ότι προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την μετάστασή τους αλλά και την διήθηση σε γειτονικούς ιστούς, ενώ παράλληλα αναστέλλει την απόπτωση. Ειδικότερα, το lncRNA HOXA11-AS έχει βρεθεί σημαντικά υπερεκφρασμένο σε δείγματα γαστρικού καρκίνου, γεγονός που οφείλεται στην ενεργοποίησή του από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1. Το HOXA11-AS δρα τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, προάγοντας την καρκινογένεση μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Εντός του πυρήνα, λειτουργεί ως «σκελετός» που συγκεντρώνει τις επιγενετικές πρωτεΐνες EZH2, LSD1 και DNMT, οδηγώντας στη σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως τα KLF2 και PRSS8. Στο κυτταρόπλασμα αντιθέτως, δρα ως «σπόγγος» για το miR-1297, απορρυθμίζοντας την έκφραση της EZH2 και ενισχύοντας περαιτέρω την επιθετικότητα των κυττάρων[89].

Αντίστοιχα, το lncRNA SNHG26 έχει συσχετιστεί με πρόωμη λεμφαδενική μετάσταση στον γαστρικό καρκίνο και παρουσιάζει υψηλή έκφραση σε μεταστατικά δείγματα. Σε μοριακό επίπεδο, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη νουκλεολίνη (NCL), ενισχύοντας τη μετάφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Myc. Το αποτέλεσμα είναι η αυξημένη έκφραση του ενζύμου HK2, το οποίο ενισχύει τη γλυκόλυση και δημιουργεί έναν θετικό βρόχο ανάδρασης μεταξύ SNHG26–c-Myc–HK2. Επιπλέον, το SNHG26 ρυθμίζει την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT), ενισχύοντας τη μετανάστευση και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων[90].

Τέλος, το καλά μελετημένο lncRNA H19 επίσης εμφανίζει υπερέκφραση στον γαστρικό καρκίνο και σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Η λειτουργία του βασίζεται στον ρόλο του ως «σπόγγος» του miR-148a-3p, ενός miRNA που φυσιολογικά αναστέλλει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα SOX-12. Με την αναστολή του miR-148a-3p, το H19 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του SOX-12, προάγοντας τη μετάσταση. Επιπλέον, μελέτες *in vivo* έχουν δείξει ότι η καταστολή του H19 μειώνει αισθητά τα μεταστατικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων[91].

Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικά δεδομένα που υποδεικνύουν την χρήση ορισμένων lncRNA ως βιοδείκτες τόσο για την πρόγνωση όσο και τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου. Το lncRNA HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) έχει αναδειχθεί ως σημαντικός διαγνωστικός και προγνωστικός βιοδείκτης. Η υπερέκφρασή του παρατηρείται συστηματικά τόσο σε ιστικά όσο και σε πλάσματικά δείγματα ασθενών και συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο νόσου, παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και μειωμένη συνολική επιβίωση. Αν και ο ακριβής μηχανισμός υπερέκφρασης παραμένει υπό διερεύνηση, είναι πιθανό να σχετίζεται με απορρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών σε καρκινικά κύτταρα. Σε μοριακό επίπεδο, το HOTAIR δρα ως ceRNA (competing endogenous RNA), δεσμεύοντας microRNA όπως το miR-30a και miR-30b, και αναστέλλοντας τη φυσιολογική κατασταλτική τους δράση σε ογκογονίδια, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, επιδρά επιγενετικά μέσω της πρόσδεσής του στο σύμπλοκο PRC2, οδηγώντας στην τριμεθυλίωση της ιστόνης H3K27 και σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Παράλληλα, έχει δείχθει ότι προάγει τη μεθυλίωση του DNA στο γονίδιο PTEN μέσω επαγωγής της DNMT3b, συμβάλλοντας στην αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι το HOTAIR ανιχνεύεται σε κυκλοφορούντα επίπεδα στο πλάσμα, με μελέτες να δείχνουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διαγνωστική χρήση του. Συνεπώς, το HOTAIR όχι μόνο συμμετέχει ενεργά στην παθογένεια του γαστρικού καρκίνου, αλλά παράλληλα αποτελεί και έναν υποσχόμενο βιοδείκτη για τη διάγνωση και την πρόγνωση της νόσου [92, 93].

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) έχουν αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως κρίσιμοι ρυθμιστές της καρκινογένεσης, δρώντας μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως η επιγενετική σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ογκογονιδίων και η ρύθμιση της μεταγραφής. Η δυνατότητά τους να επηρεάζουν την κυτταρική συμπεριφορά όπως τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη μετάσταση και την αντίσταση στη θεραπεία καθιστά τα lncRNA ελκυστικούς για διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική αξιοποίηση στόχους.

Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος του lncRNA REAKTn αλλά και των υποψήφιων γονιδίων-στόχων του στον γαστρικό καρκίνο, με στόχο την κατανόηση της έκφρασής του και της πιθανής συμμετοχής του στους μοριακούς μηχανισμούς της νόσου. Τα υποψήφια γονίδια-στόχοι που τα οποία εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα REAKTn_TG1, REAKTn_TG2. Εκτός αυτών, μελετήθηκαν και τα αποτελέσματα της σίγησης και σε γονίδια που συμμετέχουν σε καρκινοειδικές διεργασίες όπως τα E2F8, CDKN1C, Vim, EMP2, DDTI4 και PHLDA.

Το γονίδιο E2F8 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων E2F και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της καρκινογένεσης. Η έκφραση του E2F8 έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένη σε διάφορους τύπους καρκίνου, ωστόσο στον γαστρικό καρκίνο, το E2F8 έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός ρυθμιστής της καρκινικής εξέλιξης. Επιπλέον, το E2F8 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων που προάγουν την κυτταρική διαίρεση. Αξιοσημείωτο είναι ότι το E2F8 μπορεί να λειτουργεί και ως καταστολέας όγκων, αναστέλλοντας την έκφραση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου σε απόκριση σε κυτταρικό στρες ή βλάβη DNA. Αυτή η διττή λειτουργία του E2F8 υποδηλώνει ότι ο ρόλος του στην καρκινογένεση είναι περίπλοκος και εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον και τα στάδια της νόσου [94].

Το γονίδιο CDKN1C (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C), γνωστό και ως p57 Kip2, ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων κινάσων εξαρτώμενων από κυκλίνες (CIP/Kip). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλοντας τη δράση των συμπλόκων κυκλίνης/κινάσων και συμβάλλοντας έτσι στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στον γαστρικό καρκίνο, η έκφραση του CDKN1C είναι συχνά μειωμένη. Η μείωση αυτή οφείλεται σε επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως είναι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου, και συνδέεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων και κακή πρόγνωση. Έχει παρατηρηθεί ότι η απώλεια της έκφρασης του CDKN1C σχετίζεται με την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, την παρεμπόδιση της απόπτωσης και την αύξηση της μεταστατικής ικανότητας των όγκων. Συνολικά, το CDKN1C δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο [95].

Το γονίδιο VIM κωδικοποιεί την πρωτεΐνη βιμεντίνη, ένα ενδιάμεσο ινίδιο τύπου ΙΙΙ που αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταροσκελετού των μεσεγχυματικών κυττάρων. Η βιμεντίνη εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η διατήρηση του σχήματος του κυττάρου, η σταθερότητα, η μετανάστευση και η σηματοδότηση. Στον γαστρικό καρκίνο, η έκφραση της βιμεντίνης έχει συνδεθεί με την επιθετικότητα του όγκου και την κακή πρόγνωση. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της βιμεντίνης σχετίζεται με την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), γεγονός που συμβάλλει στην πρόοδο του καρκίνου. Επιπλέον, η μεθυλίωση του γονιδίου VIM έχει προταθεί ως δυνητικός βιοδείκτης για την ανίχνευση του DNA όγκου στον ορό ασθενών με γαστρικό καρκίνο [96, 97].

Το γονίδιο EMP2 κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την επιθηλιακή μεμβρανική πρωτεΐνη 2 που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών τύπου PMP22. Το EMP2 παίζει ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και επηρεάζει τη μεταφορά και την επιφανειακή έκφραση πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων υποδοχέων. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Σε καρκινικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου του γαστρικού καρκίνου, η υπερέκφραση του EMP2 έχει συσχετιστεί με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου και χειρότερη πρόγνωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι το EMP2 ενισχύει την αγγειογένεση και την καρκινική διήθηση, ενώ συμβάλλει επίσης στη διατήρηση χαρακτηριστικών βλαστοκυττάρων σε ορισμένα είδη όγκων, όπως στον καρκίνο του μαστού. Συνολικά, το EMP2 φαίνεται να δρα ως ογκογονίδιο σε διάφορα είδη καρκίνου, και η μελέτη της έκφρασής της στον γαστρικό καρκίνο μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογία της νόσου [98, 99].

Το γονίδιο DDIT4 (DNA Damage-Inducible Transcript 4), κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση της οδού mTOR, η οποία είναι κρίσιμη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την απόκριση στο μεταβολικό στρες. Στον γαστρικό καρκίνο, μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του DDIT4 προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη όγκων. Η καταστολή του DDIT4 σε καρκινικά κύτταρα του στομάχου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, την αύξηση της απόπτωσης και την ενίσχυση της ευαισθησίας στη χημειοθεραπεία. Αυτά τα αποτελέσματα σχετίζονται με την ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης p53 και MAPK, υποδεικνύοντας ότι το DDIT4 λειτουργεί ως ογκογονίδιο στον γαστρικό καρκίνο [100-102].

Το γονίδιο PHLDA1 (Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 1) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης, της επιβίωσης και της διαφοροποίησης. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και επηρεάζει διάφορες σηματοδοτικές οδούς. Στον γαστρικό καρκίνο, η έκφραση του PHLDA1 είναι συχνά μειωμένη, γεγονός που σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου και χειρότερη πρόγνωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του PHLDA1 σε κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου οδηγεί σε μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, της μετανάστευσης και της διήθησης, υποδεικνύοντας τον ρόλο του ως ογκοκατασταλτικού γονιδίου[103, 104].

Από την φαινοτυπική ανάλυση μέσω της διαδικασίας Wound Healing, προέκυψε ότι στα κύτταρα AGS έγινε επούλωση της πληγής σχεδόν στο 100%, συγκεκριμένα, το ποσοστό επούλωσης στα δείγματα shSCR (αρνητικός μάρτυρας) ήταν 94% ενώ στα δείγματα shREAKTn ήταν 97%. Στα MKN45 κύτταρα, υπήρχε σημαντική διαφορά στο ποσοστό επούλωσης, καθώς ήταν αρκετά χαμηλό, ακόμα και για τις 7 ημέρες που δόθηκε περιθώριο στα κύτταρα σχετικά με τα AGS που επουλώθηκαν σε 2 ημέρες. Συγκεκριμένα, στα δείγματα shSCR το ποσοστό επούλωσης ήταν 63% ενώ στα shREAKTn ήταν μόλις 47%. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι τα MKN45 κύτταρα, τα οποία είναι από τη φύση τους μεταστατικά, έγιναν λιγότερο επιθετικά όσον αφορά την ικανότητα μετανάστευσης μετά την αποσιώπηση του REAKTn. Βέβαια ένα πιθανό σενάριο είναι η ύπαρξη κυτταρικού στρες σε αυτά τα κύτταρα λόγω διαμόλυνσης με λεντιούς. Αναφορικά με τα υποψήφια γονίδια στόχους που αφορούν τη μετάσταση, δηλαδή το VIM, EMP2 που είναι και τα δύο ογκογονίδια, η αποσιώπηση του REAKTn πιθανόν οδήγησε σε απορρύθμισή τους (αρνητική ρύθμιση) που δικαιολογεί την ελαττωμένη ικανότητα μετανάστευσης – επούλωσης των κυττάρων.

Στην δοκιμασία CFA, που αφορά κατά βάση τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και στις 3 κυτταρικές σειρές η αποσιώπηση του lncRNA REAKTn έφερε ως αποτέλεσμα δραματική μείωση του αριθμού και μεγέθους των αποικιών. Εξάγεται έτσι το συμπέρασμα ότι η γενετική τροποποίηση οδήγησε σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αδυναμία δημιουργίας αποικιών. Από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E2F8, CDKN1C), η συμβολή του E2F8 είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί λόγω του διττού ρόλου του ως ογκογονίδιο και ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ωστόσο το CDKN1C που είναι ογκοκατασταλτικό, δηλαδή λειτουργεί ως «φρένο» για τον καρκίνο μειώνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, φαίνεται να ρυθμίστηκε θετικά, αφού ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ήταν ελαττωμένος.

Επιπρόσθετα, τα φαινοτυπικά αποτελέσματα συμφωνούν σε γενικές γραμμές με τα αποτελέσματα των συγκεντρωτικών qPCR, όπως και οι περισσότερες από τις δοθείσες ερμηνείες σχετικά με την θετική ή αρνητική ρύθμιση των υποψήφιων γονιδίων – στόχων. Αναφορικά με τα δύο υποψήφια γονίδια – στόχους REAKTn_TG1 και REAKTn_TG2, δεν μπορεί να βγει κάποιο ξεκάθαρο συμπέρασμα σχετικά με το αν ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από την σίγηση, καθώς τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα με το κάθε ιδιοσύστατο γονίδιο χωρίς να υπάρχει απόλυτη συνοχή μεταξύ τους.

Τέλος, όσον αφορά την προσπάθεια δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων σταθερών κυτταρικών σειρών με το σύστημα TetR, δεν υπήρχε αποτέλεσμα και δεν αναπτύχθηκαν κλώνοι. Αν και η μέθοδος αυτή είναι ασφαλέστερη από τους λεντιούς καθώς δεν στρεσάρει τόσο τα κύτταρα, δεν δούλεψε είτε γιατί δεν έγινε καλός μετασχηματισμός, είτε γιατί δεν υπήρχε επαρκής ποσότητα γραμμοποιημένου πλασμιδίου.

Αδιαμφισβήτητα, τα γονίδια που επιτελούν λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου, της μετάστασης και της απόπτωσης, τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα, είναι ενδεικτικά για τον γαστρικό καρκίνο. Έτσι, ο βασικός μελλοντικός στόχος για την συνέχιση αυτής της έρευνας, θα ήταν να ολοκληρωθεί το σύστημα της επαγόμενης σίγησης και να αξιοποιηθεί σε πειράματα RNA Sequencing, προκειμένου να εξακριβωθεί ακριβώς ποια γονίδια επηρεάζονται και σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την μετάσταση και την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του γαστρικού καρκίνου. Από εκεί και πέρα, θα μπορέσουν να γίνουν στοχευμένες μοριακές και φαινοτυπικές δοκιμές για αυτά τα συγκεκριμένα γονίδια και να εξακριβωθεί η σχέση μεταξύ τους αλλά και πώς αυτά επηρεάζονται από την εκάστοτε αποσιώπηση ενός εξεταζόμενου lncRNA.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.Catalano, V., et al., *Gastric cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **71**(2): p. 127-64.
- 2.Hartgrink, H.H., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2009. **374**(9688): p. 477-90.
- 3.Cheng, X.J., J.C. Lin, and S.P. Tu, *Etiology and Prevention of Gastric Cancer*. Gastrointest Tumors, 2016. **3**(1): p. 25-36.
- 4.Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.
- 5.Katherine Crew, A.N., *Epidemiology of gastric cancer*. World Journal of Gastroenterology, 2006. **12**(3): p. 354-362.
- 6.Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
- 7.Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
- 8.Lopez, M.J., et al., *Characteristics of gastric cancer around the world*. Crit Rev Oncol Hematol, 2023. **181**: p. 103841.
- 9.Morgan, E., et al., *The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020-40: A population-based modelling study*. EClinicalMedicine, 2022. **47**: p. 101404.
- 10.Lyons, K., et al., *Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review*. Eur J Cancer Prev, 2019. **28**(5): p. 397-412.
- 11.Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
- 12.Yusefi, A.R., et al., *Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(3): p. 591-603.
- 13.Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
- 14.Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
- 15.Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
- 16.Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
- 17.Joshi, S.S. and B.D. Badgwell, *Current treatment and recent progress in gastric cancer*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 264-279.
- 18.Sexton, R.E., et al., *Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies*. Cancer Metastasis Rev, 2020. **39**(4): p. 1179-1203.
- 19.Pekka, L., *The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma*
- 20.Sitarz, R., et al., *Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 239-248.
- 21.Figueiredo, C., et al., *Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **400**: p. 277-304.
- 22.Baccili Cury Megid, T., et al., *Gastric Cancer: Molecular Mechanisms, Novel Targets, and Immunotherapies: From Bench to Clinical Therapeutics*. Cancers (Basel), 2023. **15**(20).
- 23.Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
- 24.Pasechnikov, V., et al., *Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(38): p. 13842-62.
- 25.Takahashi, T., Y. Saikawa, and Y. Kitagawa, *Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment*. Cancers (Basel), 2013. **5**(1): p. 48-63.
- 26.Mithany, R.H., et al., *Gastric Cancer: A Comprehensive Literature Review*. Cureus, 2024. **16**(3): p. e55902.
- 27.Dinescu, V.C., et al., *Uncovering the Impact of Lymphadenectomy in Advanced Gastric Cancer: A Comprehensive Review*. Life (Basel), 2023. **13**(8).

- 28.Nico, R., et al., *Optimal lymph node dissection for gastric cancer: a narrative review*. World J Surg Oncol, 2024. **22**(1): p. 108.
- 29.Ilson, D.H., *Advances in the treatment of gastric cancer: 2019*. Curr Opin Gastroenterol, 2019. **35**(6): p. 551-554.
- 30.Sato, Y., et al., *Overview of Chemotherapy for Gastric Cancer*. J Clin Med, 2023. **12**(4).
- 31.Tokunaga, M., et al., *Perioperative chemotherapy for locally advanced gastric cancer in Japan: current and future perspectives*. Surg Today, 2020. **50**(1): p. 30-37.
- 32.NIH, N.C.I. *Drugs Approved for Stomach (Gastric) Cancer 2024*; Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/stomach>.
- 33.Guan, W.L., Y. He, and R.H. Xu, *Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives*. J Hematol Oncol, 2023. **16**(1): p. 57.
- 34.Orditura, M., et al., *Treatment of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(7): p. 1635-49.
- 35.Javier Sastre, J.A.G.-S., Eduardo Díaz-Rubio, *Chemotherapy for gastric cancer*. World Journal of Gastroenterology, 2006. **12**: p. 204-213.
- 36.Angelicone, I., et al., *Radiotherapy in gastric cancer: does it still play a significant role?* Digestive Medicine Research, 2023. **6**: p. 25-25.
- 37.Yang, G., X. Lu, and L. Yuan, *LncRNA: a link between RNA and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(11): p. 1097-109.
- 38.Robinson, E.K., S. Covarrubias, and S. Carpenter, *The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2020. **1863**(4): p. 194419.
- 39.Khorkova, O., J. Hsiao, and C. Wahlestedt, *Basic biology and therapeutic implications of lncRNA*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 15-24.
- 40.Cao, J., *The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics*. Biological Procedures Online, 2014. **16**.
- 41.Blythe, A.J., A.H. Fox, and C.S. Bond, *The ins and outs of lncRNA structure: How, why and what comes next?* Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 46-58.
- 42.Fernandes, J.C.R., et al., *Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease*. Noncoding RNA, 2019. **5**(1).
- 43.Zhang, X., et al., *Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
- 44.Mattick, J.S., et al., *Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023. **24**(6): p. 430-447.
- 45.Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 96-118.
- 46.Yao, R.W., Y. Wang, and L.L. Chen, *Cellular functions of long noncoding RNAs*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(5): p. 542-551.
- 47.Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.
- 48.Li, C.H. and Y. Chen, *Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(8): p. 1895-910.
- 49.Hauptman, N. and D. Glavac, *Long non-coding RNA in cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(3): p. 4655-69.
- 50.Jiang, N., et al., *Progress in understanding the role of lncRNA in programmed cell death*. Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 30.
- 51.Beylerli, O., et al., *Long noncoding RNAs as promising biomarkers in cancer*. Noncoding RNA Res, 2022. **7**(2): p. 66-70.
- 52.Jiang, C., et al., *Long non-coding RNAs: potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 62.
- 53.Liu, Y., et al., *Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression*. Cancer Cell, 2024. **42**(6): p. 946-967.
- 54.Shiekhattar, R., *PINTing for p53*. Genome Biology, 2013.

55. Zhang, S., et al., *Advanced Strategies for Therapeutic Targeting of Wild-Type and Mutant p53 in Cancer*. Biomolecules, 2022. **12**(4).
56. Wang, Y., et al., *A pan-cancer analysis of homeobox family: expression characteristics and latent significance in prognosis and immune microenvironment*. Front Oncol, 2025. **15**: p. 1521652.
57. Guo, Y., Y. Xie, and Y. Luo, *The Role of Long Non-Coding RNAs in the Tumor Immune Microenvironment*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 851004.
58. Xin, W., et al., *The role of long noncoding RNA H19 in gynecological pathologies: Insights into gene regulation and immune modulation (Review)*. Int J Mol Med, 2023. **52**(2).
59. Zhang, Y., Q. Liu, and Q. Liao, *Long noncoding RNA: a dazzling dancer in tumor immune microenvironment*. J Exp Clin Cancer Res, 2020. **39**(1): p. 231.
60. Brabletz, T., et al., *EMT in cancer*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(2): p. 128-134.
61. Goncalves, B.O.P., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition markers are differentially expressed in epithelial cancer cell lines after everolimus treatment*. Oncol Lett, 2020. **20**(5): p. 158.
62. Nieto, M.A., et al., *Emt: 2016*. Cell, 2016. **166**(1): p. 21-45.
63. Santos Ramos, F., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: An overview*. Integrative Cancer Science and Therapeutics, 2017. **4**(3).
64. Qi, P., X.Y. Zhou, and X. Du, *Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 39.
65. Kopec, K., et al., *The HOX Gene Family's Role as Prognostic and Diagnostic Biomarkers in Hematological and Solid Tumors*. Cancers (Basel), 2025. **17**(2).
66. Li, B., Q. Huang, and G.H. Wei, *The Role of HOX Transcription Factors in Cancer Predisposition and Progression*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
67. Feng, Y., et al., *Homeobox Genes in Cancers: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic Intervention*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 770428.
68. Zhang, J., et al., *HOXC12 promotes the invasion and migration of gastric cancer cells by upregulating SALL4 and activating Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Discov Oncol, 2024. **15**(1): p. 620.
69. Bhatlekar, S., J.Z. Fields, and B.M. Boman, *Role of HOX Genes in Stem Cell Differentiation and Cancer*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 3569493.
70. Jin, X., et al., *Homeobox proteins are potential biomarkers and therapeutic targets in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 866.
71. Brotto, D.B., et al., *Contributions of HOX genes to cancer hallmarks: Enrichment pathway analysis and review*. Tumour Biol, 2020. **42**(5): p. 1010428320918050.
72. Shah, N. and S. Sukumar, *The Hox genes and their roles in oncogenesis*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(5): p. 361-71.
73. Guo, C., et al., *HOXC10 up-regulation promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis through MAPK pathway*. Chin J Cancer Res, 2017. **29**(6): p. 572-580.
74. Joo, M.K., J.J. Park, and H.J. Chun, *Impact of homeobox genes in gastrointestinal cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(37): p. 8247-8256.
75. Yang, C., L. Qiu, and Z. Xu, *Specific gene silencing using RNAi in cell culture*. Methods Mol Biol, 2011. **793**: p. 457-77.
76. Scientific, T. *DH5α Competent Cells*. Available from: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html>.
77. Agilent. *XL1-Blue Competent Cells*. Available from: <https://www.agilent.com/en/product/mutagenesis-cloning/competent-cells-competent-cell-supplies/competent-cells-for-routine-cloning/xl1-blue-competent-cells-233099>.
78. Cyton. *AGS Cells*. Available from: <https://www.cytion.com/AGS-Cells/300408>.
79. Accegen. *NUGC-4*. Available from: <https://www.accegen.com/product/nugc-4-abc-tc0862/>.
80. Cyton. *KATO-III Cells*. Available from: <https://www.cytion.com/KATO-III-Cells/300381>.
81. Cyton. *MKN-45 Cells*. Available from: <https://www.cytion.com/MKN-45-Cells/300489>.

- 82.Dymond, J.S., *Explanatory chapter: quantitative PCR*. Methods Enzymol, 2013. **529**: p. 279-89.
- 83.Adams, G., *A beginner's guide to RT- PCR, qPCR and RT-qPCR*. Biochem, 2020. **42**(3): p. 48-53.
- 84.Mazurek, M., et al., *Gastric Cancer: An Up-to-Date Review with New Insights into Early-Onset Gastric Cancer*. Cancers (Basel), 2024. **16**(18).
- 85.Inoue, M., *Epidemiology of Gastric Cancer-Changing Trends and Global Disparities*. Cancers (Basel), 2024. **16**(17).
- 86.Zhang, T., Y. Zhang, and X. Leng, *Global, regional, and national trends in gastric cancer burden: 1990-2021 and projections to 2040*. Front Oncol, 2024. **14**: p. 1468488.
- 87.Elimam, H., et al., *Unraveling the influence of LncRNA in gastric cancer pathogenesis: a comprehensive review focus on signaling pathways interplay*. Med Oncol, 2024. **41**(9): p. 218.
- 88.Liu, W. and W. Wang, *LncRNA in gastric cancer drug resistance: deciphering the therapeutic strategies*. Front Oncol, 2025. **15**: p. 1552773.
- 89.Sun, M., et al., *LncRNA HOXA11-AS Promotes Proliferation and Invasion of Gastric Cancer by Scaffolding the Chromatin Modification Factors PRC2, LSD1, and DNMT1*. Cancer Res, 2016. **76**(21): p. 6299-6310.
- 90.Wu, Z.H., et al., *LncRNA SNHG26 promotes gastric cancer progression and metastasis by inducing c-Myc protein translation and an energy metabolism positive feedback loop*. Cell Death Dis, 2024. **15**(3): p. 236.
- 91.Zhang, X., et al., *LncRNA H19 Promotes Gastric Cancer Metastasis via miR-148-3p/SOX-12 Axis*. Anal Cell Pathol (Amst), 2024. **2024**: p. 6217134.
- 92.Nazari, M., et al., *HOTAIR in cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic perspectives*. Cancer Cell Int, 2024. **24**(1): p. 415.
- 93.Zhang, J., et al., *HOTAIR contributes to the carcinogenesis of gastric cancer via modulating cellular and exosomal miRNAs level*. Cell Death Dis, 2020. **11**(9): p. 780.
- 94.Zheng, J., et al., *Transcription factor E2F8 is a therapeutic target in the basal-like subtype of breast cancer*. Front Oncol, 2023. **13**: p. 1038787.
- 95.Stampone, E., et al., *Genetic and Epigenetic Control of CDKN1C Expression: Importance in Cell Commitment and Differentiation, Tissue Homeostasis and Human Diseases*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
- 96.Blatkiewicz, M., et al., *Exploring vimentin expression and its protein interactors across diverse cancer types via the cancer genome atlas datasets: a comprehensive analysis*. Rep Pract Oncol Radiother, 2025. **30**(1): p. 88-99.
- 97.Ding, Y., et al., *Vimentin loss promotes cancer proliferation through up-regulating Rictor/AKT/beta-catenin signaling pathway*. Exp Cell Res, 2021. **405**(1): p. 112666.
- 98.Ahmat Amin, M.K.B., A. Shimizu, and H. Ogita, *The Pivotal Roles of the Epithelial Membrane Protein Family in Cancer Invasiveness and Metastasis*. Cancers (Basel), 2019. **11**(11).
- 99.Dillard, C., et al., *EMP2 Is a Novel Regulator of Stemness in Breast Cancer Cells*. Mol Cancer Ther, 2020. **19**(8): p. 1682-1695.
- 100.Du, F., et al., *DDIT4 promotes gastric cancer proliferation and tumorigenesis through the p53 and MAPK pathways*. Cancer Commun (Lond), 2018. **38**(1): p. 45.
- 101.Fattahi, F., et al., *High expression of DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) is associated with advanced pathological features in the patients with colorectal cancer*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 13626.
- 102.Tajik, F., et al., *Nuclear overexpression of DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) is associated with aggressive tumor behavior in patients with pancreatic tumors*. Scientific Reports, 2023. **13**(1).
- 103.Wang, L., J. Shen, and Y. Jiang, *Circ_0027599/PHDLA1 suppresses gastric cancer progression by sponging miR-101-3p*. 1. Cell & Bioscience, 2018. **8**(1).
- 104.Yousof, T., et al., *Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 1 (PHLDA1): A Multifaceted Cell Survival Factor that Drives Metabolic Disease*. Engineering, 2023. **20**: p. 9-18.

