



Τίτλος διπλωματικής εργασίας:

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ lncRNA ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ



Σιδέρης Νίκος

Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνης

Λάρισα 2018

Τριμελής επιτροπή:

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

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσουμάνη Κωνσταντίνα: Διδάσκουσα Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αντικείμενο μελέτης της αποτέλεσε η παρασκευή διαγονιδιακών κυτταρικών σειρών επαγόμενης υπερέκφρασης shRNAs έναντι lncRNA στόχων για την μελέτη του ρόλου τους στην καρκινογένεση στο στομάχι.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, τον κ. Αντώνη Γιακουνή για την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και στην βελτίωση του κειμένου, τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για τη φιλοξενία και τις συμβουλές τους κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη των εργαστηρίων Βιοτεχνολογίας Φυτών, Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας και Γενετικής για την παροχή αντιδραστηρίων και εξοπλισμού όποτε ήταν αναγκαίο.

Contents

Περίληψη:.....	6
Abstract:	7
Καρκίνος:	8
Γενικές πληροφορίες:.....	8
1.1.2) (Πρωτο-) Ογκογονίδια:	9
1.1.3) Ογκοκατασταλτικά γονίδια:.....	10
1.1.4) Μονοπάτια:.....	12
1.2) Καρκίνος του στομάχου:.....	13
1.2.1) Το στομάχι:.....	13
1.2.2) Γενικές πληροφορίες καρκίνου του στομάχου:	14
1.2.2) Μοριακό υπόβαθρο καρκίνου στομάχου:.....	16
1.2.3) Καρκίνος στομάχου και μονοπάτια σηματοδότησης:	18
1.3) Μη κωδιοποιητικά μεγαλομοριακά μετάγραφα (Long non coding RNAs-lncRNAs):	20
1.3.1) Ορισμός :.....	20
1.3.2) Κατηγορίες:	21
1.3.3) Λειτουργική σημασία των lncRNAs:.....	25
1.4) Long non coding RNAs και καρκίνος:	27
1.4.1) Long non coding RNAs και καρκίνος του στομάχου:.....	27
Σκοπός	29
2) Υλικά και μέθοδοι:	30
2.1) Υλικά:.....	30
2.1.1) Κυτταρικές σειρές:.....	30
2.1.2) Αντιδραστήρια:.....	30
2.1.3) Πλασμιδιακοί φορείς:.....	31
2.2) Μέθοδοι:	33
2.2.1) Βιοπληροφορική ανάλυση:.....	33
2.2.2) Κυτταροκαλλιέργεια:.....	33
2.2.3) Κλωνοποίηση και εξαγωγή πλασμιδίων:.....	35
2.2.4) Διαγνωστικός έλεγχος πλασμιδίων:	35
2.2.5) RNA extraction:	36

2.2.6) DNase treatment:.....	36
2.2.7) Σύνθεση cDNA:	37
2.2.8) QPCR και ανάλυση:.....	37
2.2.9) Σχεδιασμός εκκινητών:	38
2.2.10) Υποκυτταρική κλασμάτωση:	39
2.2.11) Σχεδιασμός shRNA και κλωνοποίηση:.....	40
3) Αποτελέσματα:	43
3.1) Μετανάλυση δεδομένων μεταγραφομικής:	43
3.2) Δυναμικό κωδικοποίησης:.....	45
3.3) Πρότυπο έκφρασης του GrAC1e1 στον καρκίνο:.....	48
3.4) Μετανάλυση ομολογίας και έκφραση σε φυσιολογικούς ιστούς:.....	49
3.5) Υποκυτταρική κλασμάτωση:.....	51
3.6) Προετοιμασία και επαλήθευση πλασμιδιακών φορέων:	54
3.7) Κλωνοποίηση shRNA:.....	57
3.8) Αποτελέσματα ελέγχου κυτταρικών σειρών για mycoplasma:.....	59
4) Συζήτηση-μελλοντικοί στόχοι:.....	61
Παράρτημα:.....	67
Βιβλιογραφία.....	72

Περίληψη:

Ο καρκίνος του στομάχου (Gastric cancer-GC) αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως λόγω της υψηλής του συχνότητας και θνησιμότητας. Αυτός ο τύπος καρκίνου κατατάσσεται στην τρίτη θέση παγκοσμίως σε θνησιμότητα, με τους ασιατικούς πληθυσμούς να εμφανίζουν υψηλή συχνότητα κρουσμάτων. Το 70% των κρουσμάτων της νόσου αντιστοιχούν σε ανεπτυγμένες χώρες με πάνω από 50% των συνολικών κρουσμάτων στις χώρες της Ασίας. Ο καρκίνος του στομάχου ενοχοποιείται για μεγάλο αριθμό θανάτων λόγω υψηλής θνησιμότητας και έλλειψης διαγνωστικής εργαλειοθήκης και αποτελεσματικών θεραπειών. Παρά το γεγονός ότι τα lncRNA είναι σημαντικοί παράγοντες σε κάθε τύπο καρκίνου, οι λειτουργικές λεπτομέρειες της συμβολής τους στην καρκινογένεση του στομάχου παραμένουν αδιευκρίνιστες ενώ η αξιοποίηση τους ως διαγνωστικούς και θεραπευτικούς στόχους υστερεί. Συνεπώς είναι σημαντικό να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί τους και να αξιολογηθεί πλήρως το δυναμικό τους ως βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους για ένα τέτοιο τύπο καρκίνου. Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε χρήση βιοπληροφορικών μέσων για μεταγονιδιωματικές αναλύσεις lncRNA στον καρκίνο του στομάχου με στόχο την ανίχνευση διαφορικά εκφρασμένων lncRNAs σε καρκινικούς ιστούς. Από τις αναλύσεις αυτές προέκυψε μια πληθώρα lncRNA μεταγράφων τα οποία παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική υπερέκφραση στην καρκινική κατάσταση. Από αυτά επιλέχθηκε ένα μετάγραφο (το οποίο αναφέρεται ως GrACILe1 στο κείμενο) για χαρακτηρισμό και λειτουργική ανάλυση. Η διαφορική έκφραση του GrACILe1 ελέγχθηκε πειραματικά σε κυτταρικές σειρές μέσω qPCR και αποδείχθηκε ότι όντως υπερεκφράζεται σε καρκινικές σειρές στομάχου σε σχέση με κύτταρα φυσιολογικού στομαχικού επιθηλίου. Μέσω πρωτοκόλλων υποκυτταρικής κλασμάτωσης έγινε χαρακτηρισμός του υποκυτταρικού εντοπισμού του GrACILe1, το οποίο φαίνεται να εντοπίζεται κατα κύριο λόγο στην χρωματίνη πυρήνα και δευτερευόντως στο κυτταρόπλασμα. Τέλος σχεδιάστηκαν shRNA oligos τα οποία στοχεύουν το GrACILe1 και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς με απώτερο σκοπό την επαγόμενη καταστολή του GrACILe1 σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές στομάχου.

Abstract:

Stomach cancer (also known as Gastric cancer or GC) is an important health issue around the globe due to its high prevalence and mortality. This type of cancer has the third highest mortality rank worldwide, with especially high occurrence in Asian populations. About 70% of global occurrence is attributed to developed countries, while more than 50% of overall outbreaks occur in Asia. Gastric cancer is the cause of many deaths due to its high mortality, lack of appropriate diagnostic means and lack of therapeutic methods. Long non-coding RNAs play a significant role in all types of cancer, however the functional details of their roles in the cause and progression of stomach cancer remain unclear, while their exploitation as diagnostic or therapeutic targets is underdeveloped. Therefore it is imperative their mechanisms of function be brought to light and their potential as biosensors and therapeutic targets be fully evaluated in diseases such as this. In this thesis bioinformatic tools were used for metagenomic analyses of lncRNAs in stomach cancer aiming towards identification of differentially expressed lncRNAs in tumors. From these analyses, a moderate number of lncRNA transcripts that present statistically significant overexpression in the cancer state have occurred. Of those, transcript GrACILE1 was chosen for characterization and functional analysis. GrACILE1's expression pattern was experimentally evaluated in cancer cell lines through the use of qPCR and it has been shown that overexpression occurs in cell lines of stomach cancer compared to normal epithelial stomach cells. Subcellular fractionation protocols were used in order to characterize GrACILE1's subcellular localization, which yielded evidence of GrACILE1 localizing primarily in chromatin and in a secondary capacity in the cytoplasm. Last but not least, shRNA oligos targeting GrACILE1 were designed and cloned into appropriate plasmid vectors in order to confer induced GrACILE1 expression silencing within human stomach cancer cell lines.

1)Εισαγωγή

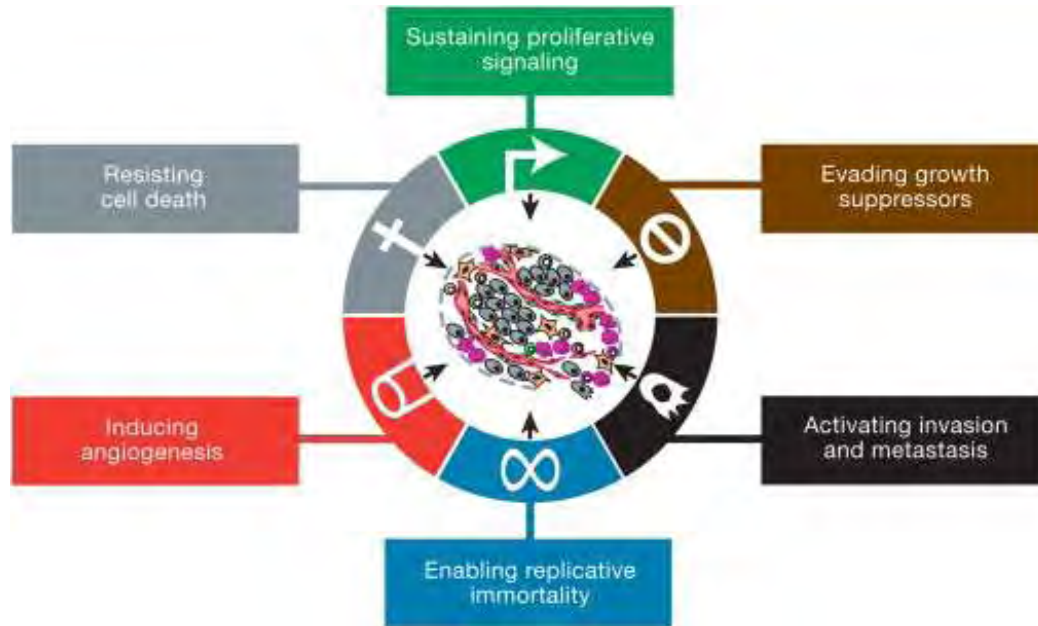
Καρκίνος:

Γενικές πληροφορίες:

Ο καρκίνος ως ασθένεια ήταν γνωστός από την αρχαιότητα όπως διαφαίνεται μέσα από παπύρους των αρχαίων Αιγυπτίων. Ο όρος καρκίνος ωστόσο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ιπποκράτη για να περιγράψει τους όγκους των οποίων οι προεξοχές θύμιζαν τα πόδια του κάβουρα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει επέλθει μία ραγδαία πρόοδος στη διάγνωση, στην πρόγνωση και θεραπεία αυτής της νόσου. Ειδικότερα η ανάπτυξη τεχνολογιών όπως η αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) έχει επιτρέψει την σε βάθος μελέτη της νόσου σε μοριακό επίπεδο και την καλύτερη κατανόηση των βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο καρκινικό κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού τα κύτταρά του εκτίθενται σε πολλούς παράγοντες, που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες-μεταλλάξεις στο γενετικό του υλικό (DNA). Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς μέσω των οποίων μπορούν είτε να διορθώσουν, είτε να αποτρέψουν αυτές τις μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά, δεν είναι πάντα εφικτό να αποτραπεί η συσσώρευση αυτών. Μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων συνεπάγεται απώλεια της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας και αυξημένη πιθανότητα καρκινικού μετασχηματισμού (Futreal et al., 2001). Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (<http://www.who.int>) ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως ενώ περίπου ένας στους έξι θανάτους οφείλεται σε κάποια μορφή καρκίνου.

Ο καρκίνος μπορεί να προκύψει σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρων και ο τύπος των κυττάρων που προσβάλλεται καθορίζει και τον τύπο του καρκίνου. Παράδειγμα αποτελεί η προσβολή επιθηλιακών κυττάρων, που σχετίζονται με καρκινώματα, των μεσεγχυματικών κυττάρων με σαρκώματα, των αιμοποιητικών κυττάρων με τη λευχαιμία και τα λεμφώματα. Ο τύπος του καρκίνου καθορίζει κάθε φορά τη συμπτωματολογία, την αιτιολογία της νόσου, την πρόγνωση καθώς και τα βήματα αντιμετώπισης. Σε όλες όμως τις μορφές καρκίνου υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά, που είναι αναγκαία για την εξέλιξη της νόσου. Ειδικότερα, υπάρχει ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση, αποφυγή της απόπτωσης, μετάσταση, διατήρηση σημάτων πολλαπλασιασμού και αποφυγή καταστολέων ανάπτυξης (Εικόνα 1) (D Hanahan & Weinberg, 2000). Ο καρκίνος προκύπτει ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε κρίσιμα ρυθμιστικά γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό και ελέγχουν κυτταρικές λειτουργίες όπως πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και επιβίωση. Τα γονίδια

αυτά διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια (Vogelstein & Kinzler, 2004).



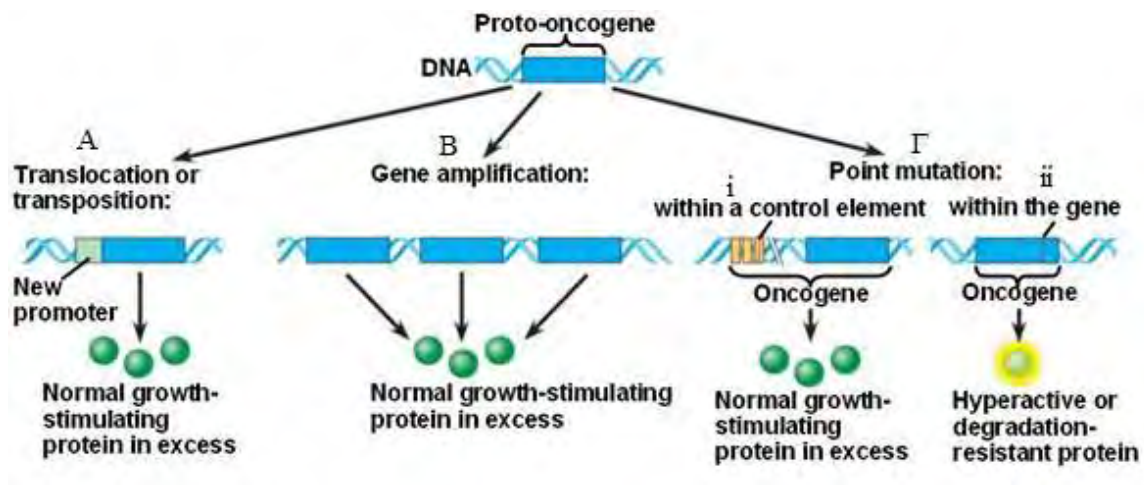
Εικόνα 1: Το εξάπτυχο του καρκίνου (Douglas Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1.2) (Πρωτο-) Ογκογονίδια:

Τα πρωτοογκογονίδια είναι μια ομάδα γονιδίων τα οποία ευθύνονται για τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά όταν επιδέχονται μεταλλάξεις (Weinstein & Joe, 2006). Ως ογκογονίδιο καλείται το μεταλλαγμένο ομόλογο ενός πρωτοογκογονιδίου με την καρκινική μετάλλαξη να είναι τυπικά επικρατής στη φύση. Τα πρωτοογκογονίδια εντοπίστηκαν αρχικά σε ρετροϊούς που είχαν την ιδιότητα να τροποποιούν τη λειτουργία φυσιολογικών κυττάρων και να τα μετασχηματίζουν σε καρκινικά (Cooper & Hausman, 2007). Τα πρωτοογκογονίδια, ανάλογα με τη φυσιολογική τους λειτουργία, μπορούν να χωριστούν σε πέντε κατηγορίες: (1) Παράγοντες πολλαπλασιασμού (growth factors) (2) Υποδοχείς παραγόντων πολλαπλασιασμού (growth factor receptors) (3) Μεταγωγείς σήματος (signal transducers) (4) Μεταγραφικούς παράγοντες (transcription factors) (5) Παράγοντες που επάγουν κυτταρικό θάνατο. Μια νέα κατηγορία που έχει ενταχθεί στα ογκογονίδια περιλαμβάνει τα μη κωδικά μετάγραφα, για τα οποία θα μιλήσουμε σε επόμενη ενότητα.

Όπως ειπώθηκε προηγουμένως τα πρωτοογκογονίδια συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως διαφοροποίηση και ανάπτυξη (Lodish et al., 2000). Η μετάλλαξη στο πρωτοογκογονίδιο συνήθως ευθύνεται για τη μη φυσιολογική υπερλειτουργία του, καθιστώντας το συνεχώς ενεργό σε αντίθεση με το φυσιολογικό γονίδιο (wild-type), γεγονός που επηρεάζει σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα στάδια καρκινογένεσης, αγγειογένεσης και μετάστασης. Συνεπώς οι

μεταλλάξεις αυτού του τύπου, προσδίδουν μια ιδιόσυστατη ενεργότητα στα γονίδια-στόχους ή ενεργότητα σε συνθήκες που φυσιολογικά αυτά δεν θα έπρεπε να είναι ενεργά (Chial, Write, Right, & Education, 2008). Σε άλλη περίπτωση οδηγούν σε ιδιόσυστατη ενεργότητα του γονιδιακού προϊόντος, την πρωτεΐνη, κλειδώνοντάς την σε μία συνεχώς ενεργή διαμόρφωση. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων είναι δυνατόν να προκύψει με διάφορους τρόπους, όπως με σημειακές μεταλλάξεις ή ανασυνδυασμούς ολόκληρων τμημάτων γονιδίων (Εικόνα 2). Για παράδειγμα, η συνηθέστερη μετάλλαξη που προκαλεί ενεργοποίηση του γονιδίου BRAF στον καρκίνο στον άνθρωπο, αποτελεί η αμινοξική αλλαγή βαλίνης από γλουταμινικό οξύ στο κωδικόνιο 599 του γονιδίου BRAF. Η μετάλλαξη αυτή ενεργοποιεί την πρωτεΐνη BRAF ανεξάρτητα από το σήμα ενεργοποίησης, που κανονικά φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 598 και τη σερίνη 601 (Vogelstein & Kinzler, 2004). Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκογονιδίου αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Myc, ο οποίος συμμετέχει σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια των οποίων η απορρύθμιση οδηγεί σε καρκινογένεση (Dang, 2012).



Εικόνα 2: Παραδείγματα τρόπων μετατροπής ενός πρωτοογκογονιδίου σε ογκογονίδιο και επιδράσεις:
 Α) Μετατόπιση γονιδίου και σύντηξή του με νέο υποκινητή -> Μεγαλύτερη παραγωγή αυξητικού παράγοντα
 Β) Γονιδιακός διπλασιασμός -> Μεγαλύτερη παραγωγή αυξητικού παράγοντα
 Γ) i) Σημειακή μετάλλαξη εντός ρυθμιστικού στοιχείου (πχ ενός υποκινητή ή ενός ενισχυτή)-> Μεγαλύτερη παραγωγή αυξητικού παράγοντα
 ii) Σημειακή μετάλλαξη εντός του γονιδίου -> Παραγωγή υπερδραστικής ή ανθεκτικής στην αποικοδόμηση πρωτεΐνης

<https://oncogenesandcancer.wordpress.com/mutations-among-proto-oncogenes-tumor-suppressor-genes/>

1.1.3) Ογκοκατασταλτικά γονίδια:

Η ιδιόσυστατη ενεργοποίηση των ογκογονιδίων αποτελεί μόνον έναν από τους δύο τύπους διακριτών γενετικών αλλαγών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των όγκων. Ο άλλος τύπος πρόκειται για την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά αντιπροσωπεύουν την άλλη όψη του ελέγχου κυτταρικής ανάπτυξης και

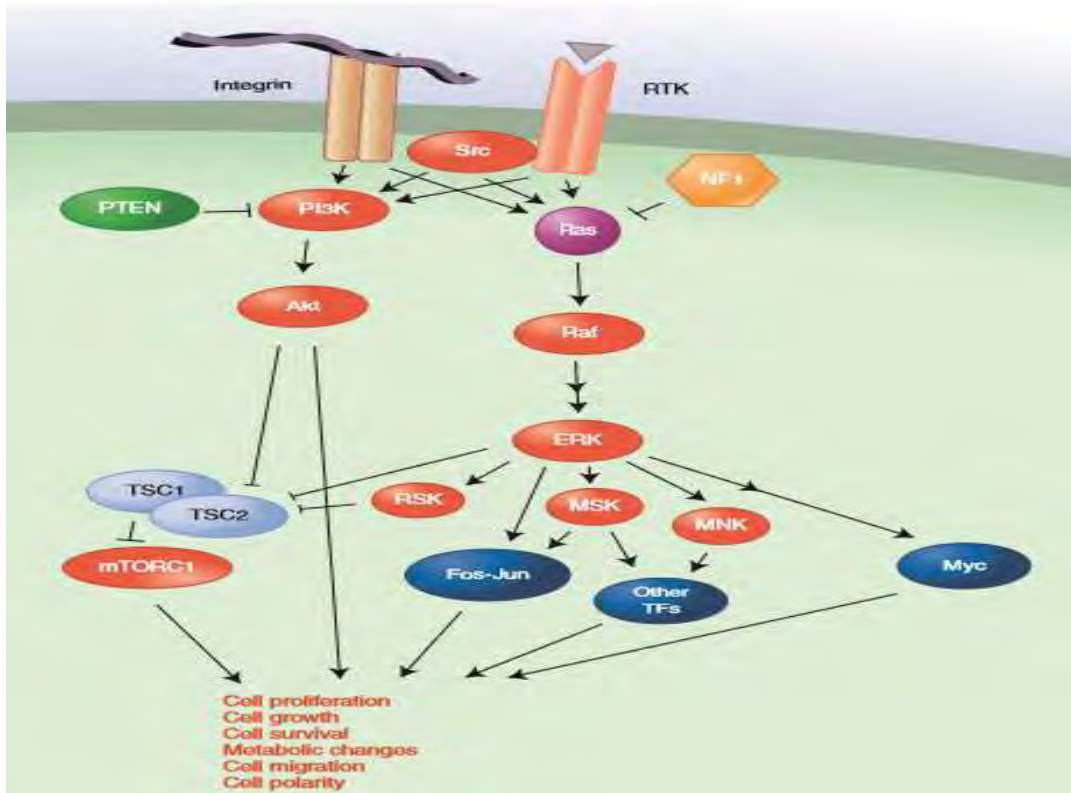
δρουν φυσιολογικά ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εμποδίζοντας την καρκινογένεση. Σε πολλούς καρκίνους απενεργοποιούνται ή χάνονται με αποτέλεσμα την απώλεια των αρνητικών ρυθμιστών της διαίρεσης και κατεπέκταση την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (Cooper & Hausman, 2007). Συνεπώς τα ογκοκατασταλτικά γονίδια στοχεύονται με αντίθετο τρόπο σε σχέση με τα ογκογονίδια, δηλαδή οι μεταλλάξεις μειώνουν την ενεργότητα των γονιδίων ή των προϊόντων τους. Η απενεργοποίηση προέρχεται από μεταλλάξεις σε κατάλοιπα απαραίτητα για την ενεργότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος, μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρωτεΐνες μικρότερο μήκους από το φυσιολογικό, προσθήκες ή ελλείψεις διαφόρων εκτάσεων καθώς και επιγενετική σίγηση των γονιδίων (Vogelstein & Kinzler, 2004). Κάποια ογκοκατασταλτικά γονίδια προσδίδουν ένα πλεονέκτημα επιβίωσης στο κύτταρο όταν μόνο το ένα αλληλόμορφο απενεργοποιείται και το άλλο παραμένει λειτουργικό ένα φαινόμενο που ονομάζεται απλοανεπάρκεια (Santarosa & Ashworth, 2004). Τυπικά βέβαια απαιτούνται μεταλλάξεις που απενεργοποιούν και τα δύο αλληλόμορφα ενός ογκοκαταστολέα προκειμένου να χαθεί η ρύθμιση που ασκεί το γονίδιο αυτό. Αυτές οι συνθήκες συνήθως προκύπτουν μετά από απώλεια του ενός αλληλομόρφου μέσω μιας μεγάλης χρωμοσωμικής αλλαγής, όπως την απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος ή ενός χρωμοσωμικού τμήματος σε συνδυασμό με μια ενδογενή μετάλλαξη ή επιγενετική σίγηση στο άλλο αλληλόμορφο (Knudson, 2002).

Δύο πολύ χαρακτηριστικά παραδείγματα ογκοκαταστολέων αποτελούν τα γονίδια TP53 και APC. Το γονίδιο TP53 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Η πρωτεΐνη ενεργοποιείται ως απόκριση σε διάφορες μορφές κυτταρικού στρες και μπορεί να επάγει την απόπτωση, την ενεργοποίηση επιδιορθωτικών ενζύμων και να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1/S (Garcia&Attardi, 2014). Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι οι πιο συχνές στον καρκίνο. Το TP53 είναι μεταλλαγμένο σε 30%-50% των ανθρώπινων καρκίνων με ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στους καρκίνους των ωοθηκών, πνευμόνων, εντέρου, κεφαλής-λαιμού, παγκρέατος, μαστού και ουροδόχου κύστης (Freed-Pastor & Prives, 2012)(Levine, Momand, & Finlay, 1991). Το APC συμβάλλει στην ρύθμιση της αποικοδόμησης της φωσφορυλιωμένης β-κατενίνης λειτουργώντας ως πρωτεΐνη σκαλωσιά για το σύμπλοκο αποικοδόμησης. Η βιοχημική φύση του APC αρχικά ήταν αινιγματική, ωστόσο μελέτες έδειξαν ότι το APC προστατεύει τη β-κατενίνη από αποφωσφορυλίωση μέσω της PP2A, ενισχύοντας έτσι τη φωσφορυλίωση και αποικοδόμησή της και καταστέλλοντας τη σηματοδότηση. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με την παρατήρηση ότι η υπερέκφραση της αξίνης προκαλεί αποικοδόμηση β-κατενίνης ακόμη και σε κύτταρα που δεν λειτουργεί το APC (BryanT. MacDonald; KeikoTamaiaandXiHe, 2010).Μεταλλάξεις στο γονίδιο του APC οδηγούν σε οικογενείς αδενωματώδεις πολύποδες (FAP) και έχουν βρεθεί και σε περίπου 60% των σποραδικών καρκινωμάτων και αδενωμάτων. Γενετικές μελέτες σε ποντικούς έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο APC γονίδιο ευθύνονται για καρκινογένεση της γαστρικής οδού και απώλεια του γονιδίου προκαλεί διαταραχές της ομοιόστασης σε πολλούς ιστούς. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι το APC είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και απώλεια λειτουργίας του προκαλεί καρκινογένεση (Aoki & Taketo, 2007).

1.1.4) Μονοπάτια:

Είναι σημαντικό να τονιστεί η σχέση της καρκινογένεσης με την απορρύθμιση των διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν τη μοίρα του κυττάρου. Τα μονοπάτια των PI3K-Akt και Ras-ERK είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα μονοπατιών καθώς πολλά από τα γονίδια που υπόκεινται σε μεταλλάξεις στον καρκίνο κωδικοποιούν ρυθμιστές ή στόχους των ενζυμικών αυτών καταρρακτών (Εικόνα 3). Φυσιολογικά, τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται παροδικά ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες ή σηματοδότηση κυτοκινών και ενεργότητα υποδοχέων προκόλλησης ιντεγκρίνης. Ωστόσο γενετικές αλλαγές οδηγούν σε ιδιόσυστατη σηματοδότηση ακόμα και απουσία των αυξητικών παραγόντων. Το μονοπάτι PI3K-Akt μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω διπλασιασμών ή λειτουργικών (gain of function) μεταλλάξεων σε διάφορες πρωτεΐνες του μονοπατιού, όπως την ισομορφή τύπου I της PI3K (PI3KCA-p110a), την Akt και την πρωτεΐνη PIK3R1. Επίσης μέσω μεταλλάξεων έλλειψης ή απενεργοποίησης των φωσφατασών που υδρολύουν τα προϊόντα της PI3K όπως 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδιλινοσιτόλη, και τους ογκοκαταστολείς PTEN και INPP4B. Καθοδικά του μονοπατιού μεταλλάξεις στους ογκοκαταστολείς TSC1 και 2 υπερενεργοποιούν τη σηματοδότηση μέσω του mTOR1, που αποτελεί σημαντικό στόχο του μονοπατιού (Laplane & Sabatini, 2012).

Όμοια το μονοπάτι RAS-ERK ενεργοποιείται μέσω μεταλλάξεων στη RAS ή τον καθοδικό της στόχο τη RAF, γεγονός που οδηγεί σε ιδιόσυστατη ενεργότητα των πρωτεϊνών αυτών ή μέσω απενεργοποίησης των πρωτεϊνών GAPs (GTPase-activating proteins) όπως την NF1, DAB2IP και RASAL2 που διεγείρουν την υδρόλυση του GTP που δεσμεύει η RAS με συνέπεια την απενεργοποίησή της. Ο μεταγραφικός παράγοντας Myc είναι ένας σημαντικός στόχος του μονοπατιού RAS-ERK και άλλων μονοπατιών. Ο παράγοντας υπερεκφράζεται συχνά στον καρκίνο και είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι μπορεί, πέραν του να προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων, να ενισχύει την μεταγραφική επιμήκυνση της PolIII, με αποτέλεσμα την διεύρυνση των ιδιοτήτων του και σε γονίδια που δεν φέρουν θέσεις πρόσδεσης αυτού στους υποκινητές τους. Με τον τρόπο αυτό δρα ως γενικός επαγωγέας εκφραζόμενων γονιδίων και όχι ως απλός μεταγραφικός παράγοντας συγκεκριμένων στόχων. Ογκογόνες μεταλλάξεις, διπλασιασμοί ή γονιδιακή σύντηξη που περιλαμβάνει ανοδικές κινάσες τυροσίνης οδηγούν σε ιδιόσυστατη σηματοδότηση μέσω και των δύο μονοπατιών. RTKs συμπεριλαμβανομένων και των EGFR, ErbB2, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ινοβλαστών FGFR καθώς και αιμοπεταλίων PDGFR ενισχύονται σε πληθώρα καρκίνων (Regad, 2015). Όμοια ογκογόνες μεταλλάξεις σε GPCRs μπορούν να ενεργοποιήσουν τα μονοπάτια αυτά. Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι η ίδια η απορρυθμισμένη σύνθεση των αυξητικών παραγόντων μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βήμα στην καρκινογένεση. Για παράδειγμα η λανθασμένη σύνθεση αυξητικών παραγόντων από κύτταρα που φέρουν τον αντίστοιχο υποδοχέα για τον παράγοντα αυτό μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός αυτοκρινούς ανατροφοδοτικού κύκλου παραγωγής που θα επάγει σηματοδότηση. Αυτό βέβαια μπορεί να επιτευχθεί και με απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων με τη βοήθεια πρωτεασών. Σε κάθε περίπτωση η σηματοδότηση των μονοπατιών ενισχύεται (Sever & Brugge, 2015).

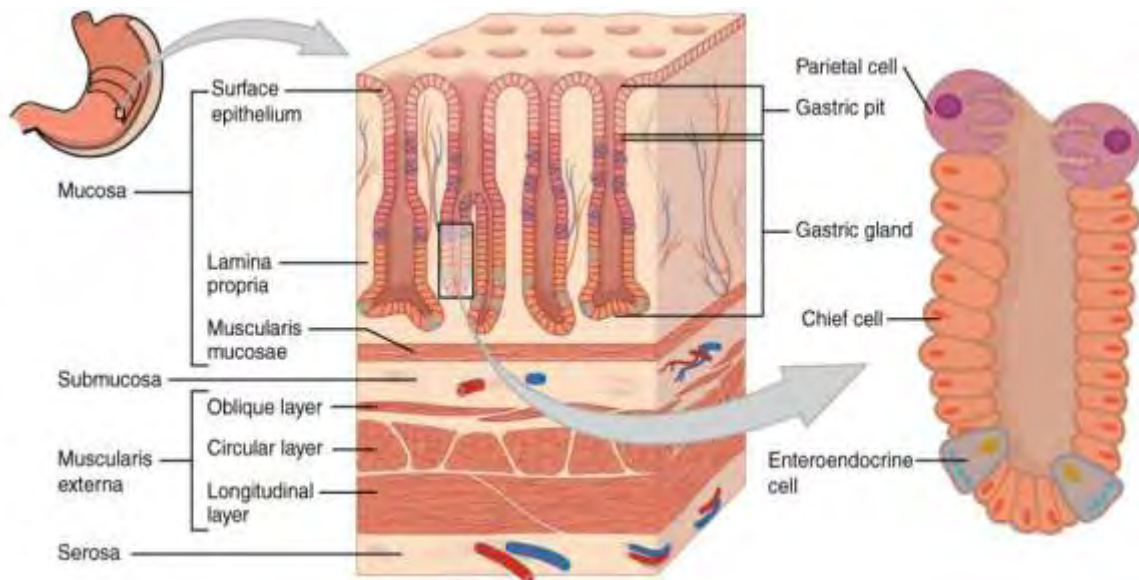


Εικόνα 3: Μονοπάτια σηματοδότησης των PI3K και RTK κινασών (Vogelstein & Kinzler, 2004)

1.2) Καρκίνος του στομάχου:

1.2.1) Το στομάχι:

Το στομάχι είναι ένα κοίλο μώδες όργανο της γαστρικής οδού το οποίο λαμβάνει την τροφή μέσω του οισοφάγου. Η τροφή αναμειγνύεται και διασπάται με το γαστρικό υγρό που εκκρίνεται, το οποίο αποτελείται από ένζυμα και υδροχλωρικό οξύ, και στη συνέχεια περνάει στο δωδεκαδάκτυλο του λεπτού εντέρου. Το στομάχι πέραν του ότι διεξάγει την δεύτερη φάση της χώνευσης αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των μικροβίων και τοξινών της τροφής. Το τοίχωμα του στομάχου αποτελείται από αρκετές στρώσεις βλεννογόνων μεμβρανών (Hunt et al., 2015; Soybel, 2005). Πιο συγκεκριμένα η ενδότερη στοιβάδα ονομάζεται mucosa και σε αυτή παράγονται και εκκρίνονται το HCl και τα ένζυμα της πέψης, ενώ αποτελεί επίσης και το σημείο έναρξης των περισσότερων καρκίνων του στομάχου. Η επόμενη κατά σειρά στοιβάδα ονομάζεται submucosa και έχει υποστηρικτικό ρόλο. Ακολουθεί η muscularispropria, μια παχιά μυική στοιβάδα που κινείται και αναμειγνύει τα περιεχόμενα του στομάχου. Τέλος υπάρχουν οι δύο εξωτερικές στοιβαδες subserosakai serosa που τυλίγουν το στομάχι (Εικόνα 4).

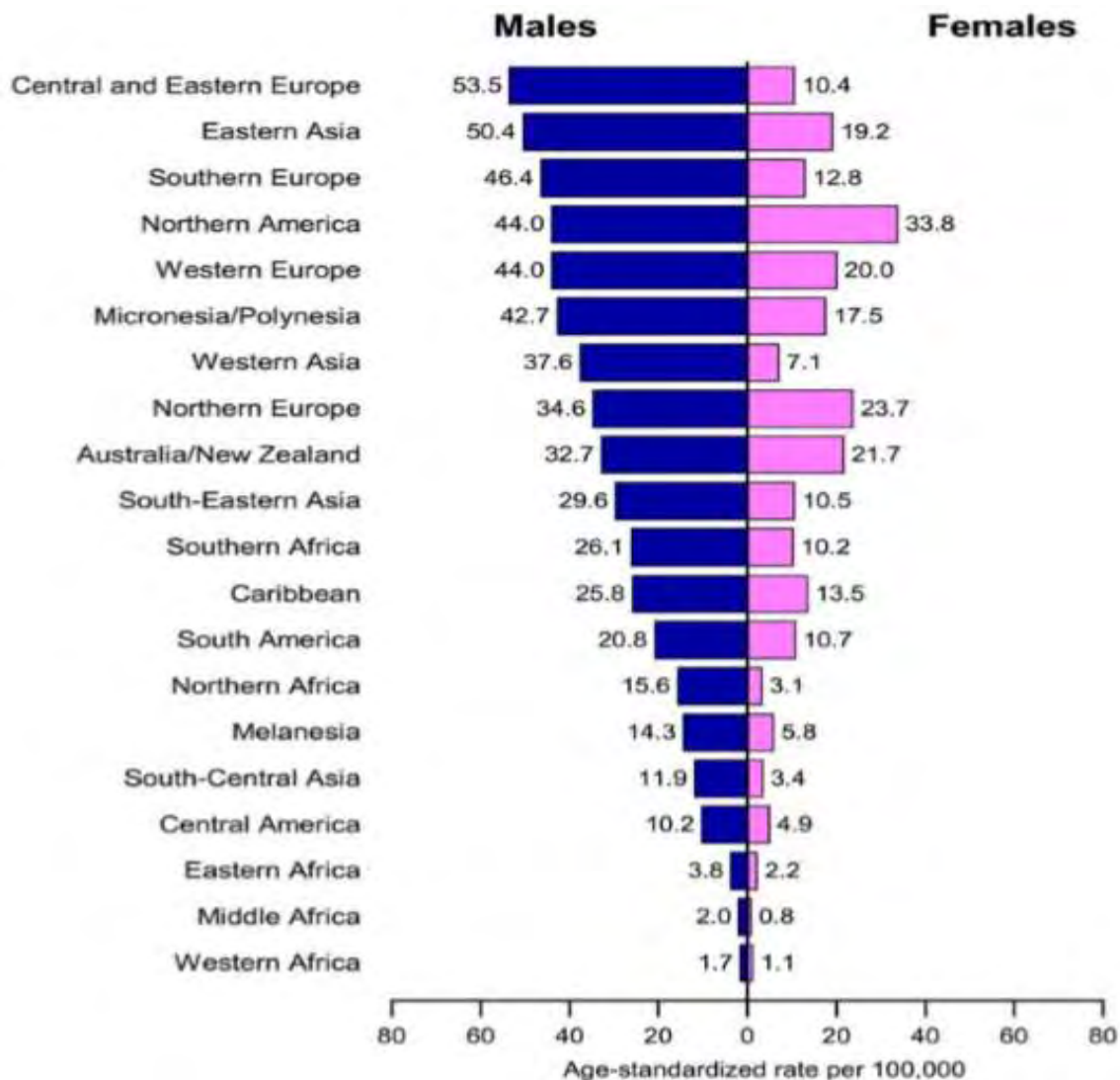


Εικόνα 4: Το τοίχωμα του στομάχου έχει προσαρμοστεί στη λειτουργικότητα του οργάνου. Στην στοιβάδα mucosa οι γαστρικοί αδένες απελευθερώνουν το γαστρικό υγρό στο κοίλωμα του στομάχου. Αριστερά φαίνονται οι στοιβάδες του τοιχώματος του οργάνου και δεξιά φαίνεται σε μεγένθυση ένας γαστρικός αδένας και τα κύτταρα από τα οποία απαρτίζεται. <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/the-stomach>

1.2.2) Γενικές πληροφορίες καρκίνου του στομάχου:

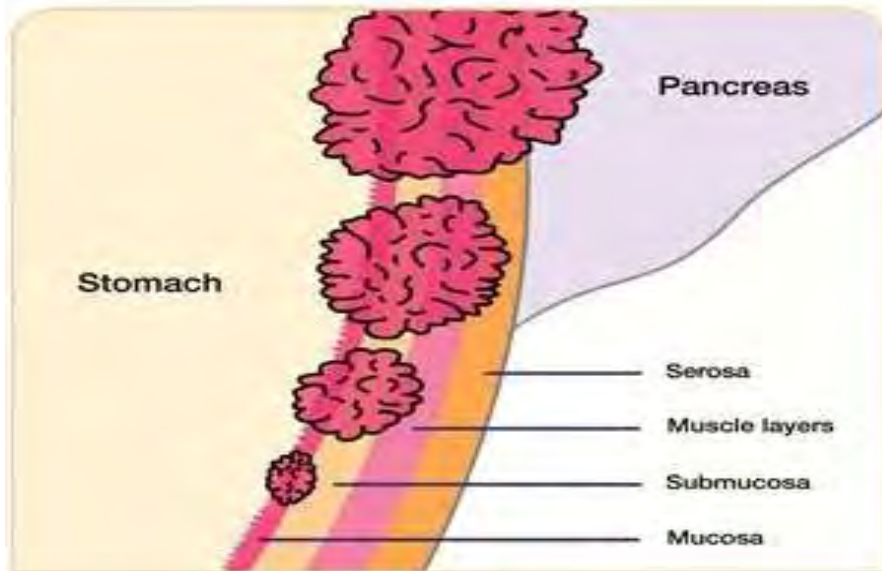
Ο καρκίνος του στομάχου (Gastric cancer-GC) αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως λόγω της υψηλής του συχνότητας και θνησιμότητας. Στις μέρες μας ο καρκίνος αυτός αποτελεί τον 5^ο πιο συχνό τύπο καρκίνου και τον 3^ο παγκοσμίως σε θνησιμότητα. Κάθε χρόνο σχεδόν 1.000.000 άτομα διαγιγνώσκονται και περισσότεροι από 700.000 άνθρωποι υποκύπτουν σε αυτή τη νόσο, καθιστώντας την υπεύθυνη για περίπου το 10% των θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως (Jemal, Bray, & Ferlay, 1999; Torre et al., 2015). Ο καρκίνος του στομάχου όπως και κάθε καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες τόσο περιβαλλοντικοί όσο και γενετικοί που επηρεάζουν την καρκινογένεση στο στομάχι. Σε αυτούς ανήκουν μολυσματικοί παράγοντες όπως ο ιός *Epstein Barr* (EBV) και το βακτήριο *Helicobacter pylori*, συνήθειες διατροφής όπως κατανάλωση μεγάλης ποσότητας άλατος, επεξεργασμένων κρεάτων που περιέχουν νιτρικά παράγωγα και κληρονομικοί παράγοντες (X. Liu & Meltzer, 2017a).

Παρόλο που η νόσος δεν είναι όσο διαδεδομένη ήταν κάποτε τα κρούσματα παραμένουν σε πολύ υψηλά ποσοστά με τα υψηλότερα να εμφανίζονται σε χώρες της Ασίας και σε ασιατικούς πληθυσμούς αντίστοιχα. Το 70% των κρουσμάτων της νόσου αντιστοιχούν σε ανεπτυγμένες χώρες με πάνω από 50% των συνολικών κρουσμάτων στις χώρες της Ασίας (Εικόνα 5), όπου σε συχνότητα είναι ο τρίτος μετά τους καρκίνους του μαστού και πνεύμονα καθώς και ο δεύτερος πιο θνησιγόνος μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (Rahman, Asombang, & Ibdah, 2014; Torre et al., 2015).



Εικόνα 5: Συχνότητα κρουσμάτων καρκίνου στομάχου με βάση φύλο, ηλικία και γεωγραφική περιοχή. (Torre et al., 2015)

Ο καρκίνος του στομάχου ενοχοποιείται για μεγάλο αριθμό θανάτων λόγω υψηλής θνησιμότητας και έλλειψης αποτελεσματικών θεραπειών (W. Chen et al., 2016; Siegel, Miller, & Jemal, 2016). Η υψηλή θνησιμότητα έχει συνδεθεί με την έλλειψη διακριτών συμπτωμάτων στα πρώιμα στάδια της νόσου, την έλλειψη επικυρωμένων προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου καθώς και το γεγονός ότι άτομα που ζουν σε αναπτυσσόμενα κράτη δυσκολεύονται να αποκτήσουν πρόσβαση σε κατάλληλα κέντρα υγείας. Αυτό έχει ως αναπόφευκτο αποτέλεσμα την εξέλιξη της νόσου και τη διάγνωσή της, στις περισσότερες περιπτώσεις, σε πολύ προχωρημένα στάδια όπου έχει ήδη συμβεί λεμφική μετάσταση γεγονός που συνεπάγεται κακή πρόγνωση για τον ασθενή. Παρά την ανάπτυξη νέων χειρουργικών προσεγγίσεων και τεχνικών μοριακής στόχευσης το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με καρκίνο του στομάχου κυμαίνεται στα 5 χρόνια. (Saka, Morita, Fukagawa, & Katai, 2011; Van Cutsem & Ducreux, 2016)



Εικόνα 6: Τα στάδια καρκινογένεσης στο στομάχι από την αρχή μέχρι τη μετάσταση.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν σαφή μοριακά πρότυπα των σταδίων εξέλιξης και μετάστασης του καρκίνου του στομάχου πράγμα που καθιστά αναγκαία την εύρεση κατάλληλων διαγνωστικών δεικτών και εξατομικευμένων θεραπειών που συνάδουν με το στάδιο της νόσου και το κλινικό προφίλ του ασθενή.

1.2.2) Μοριακό υπόβαθρο καρκίνου στομάχου:

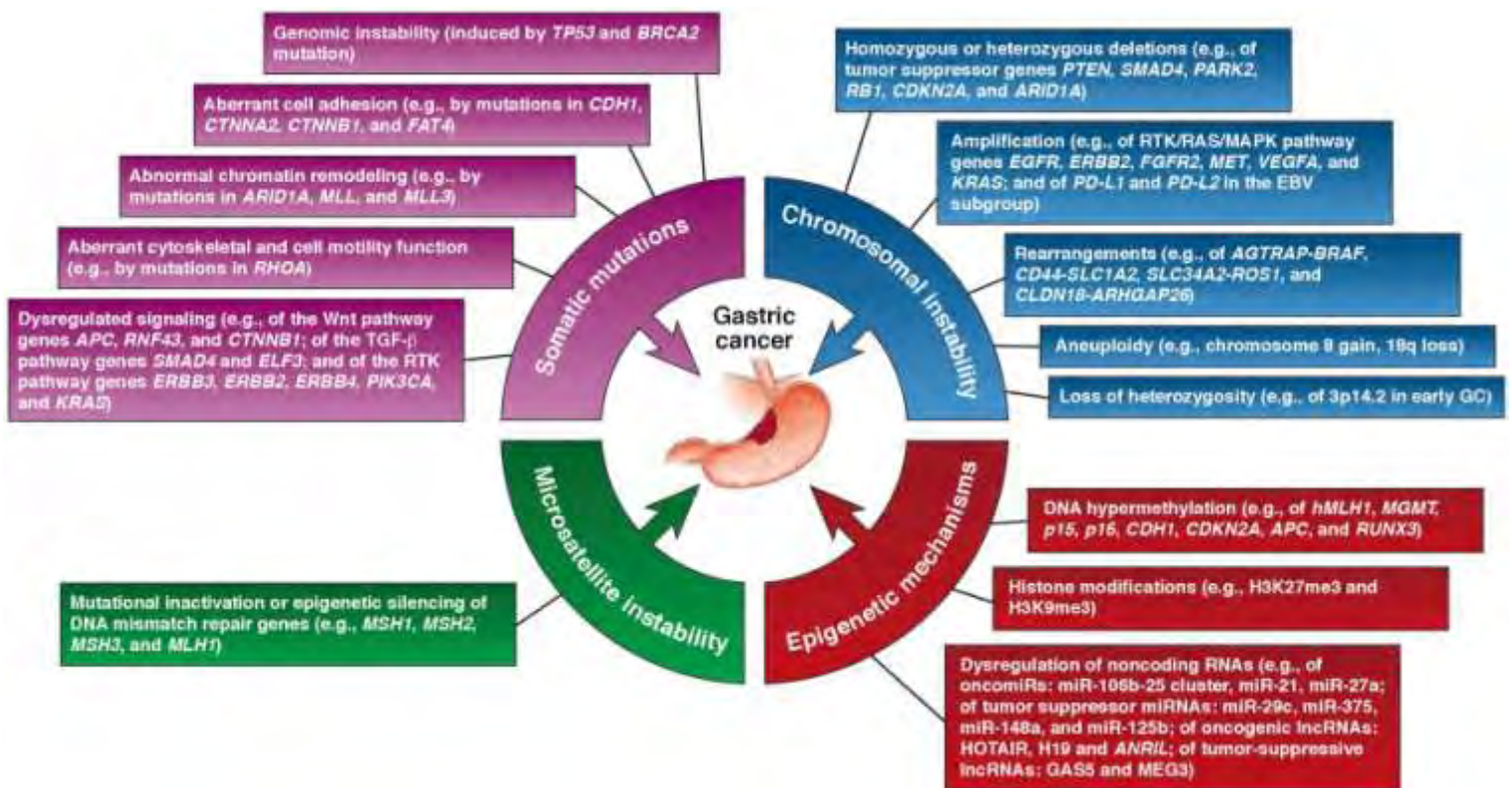
Ο καρκίνος του στομάχου πρόκειται για μια ετερογενή ασθένεια τόσο ιστολογικά όσο και γενετικά, πράγμα το οποίο δυσκολεύει αρκετά την πρόβλεψη της πορείας των ασθενών με τα κλασικά ιστολογικά κριτήρια ταξινόμησης (Lee et al., 2007). Η τωρινή ιστολογική ταξινόμηση είναι ευρέως αποδεκτή και αρκετές μοριακές αναλύσεις έχουν συσχετίσει γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις με την πρόγνωση και διάγνωση ασθενών προχωρημένου σταδίου. Έχοντας αυτό υπόψη, η προγνωστική αξία της τωρινής ιστολογικής και μοριακής ταξινόμησης δεν μπορεί να καθοδηγήσει επαρκώς την θεραπεία-αντιμετώπιση της νόσου, καθιστώντας απαραίτητη την ανάπτυξη ενός νέου (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Η πρόσφατη εξέλιξη των τεχνολογικών μέσων όπως της αλληλούχησης νέας γενιάς καθώς και δεδομένα από μικροσυστοιχίες έχουν επιτρέψει διερεύνηση της μοριακής ταυτότητας του καρκίνου αυτού με επακόλουθο την εύρεση νέων μοριακών δεικτών, ενδογενών σηματοδοτικών μονοπατιών και νέων μοριακών υποτύπων του γαστρικού καρκίνου (X. Liu & Meltzer, 2017b). Τα δεδομένα που έχουν προκύψει έχουν ενισχύσει την λογική των πειραματικών θεραπειών και προσέφεραν νέες προοπτικές αντιμετώπισης που βρίσκονται υπό διερεύνηση, με απώτερο σκοπό την βελτίωση των τωρινών θεραπευτικών προσεγγίσεων και της ποιότητας ζωής των ασθενών (Riquelme et al., 2015).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν αναδειχτεί σε μεγάλο βαθμό ως ρυθμιστές της νόσου και ιδιαίτερα η μεθυλίωση του DNA αλλά και οι τροποποιήσεις των ιστονών. Η βιβλιογραφία αναφέρει πολλές περιπτώσεις επιγενετικής σίγησης ογκοκαταστολέων

μέσω μεθυλίωσης υποκινητών όπως των γονιδίων CDH1 (που σχετίζεται με την κυτταρική προσκόλληση και συνοχή του ιστού) και hMLH1 (κωδικοποιεί ένζυμο που επιδιορθώνει μεταλλάξεις αναντιστοιχίας). Η μεθυλίωση έχει επίσης συνδεθεί με την επιθετικότητα της νόσου και την ικανότητα μετάστασης των όγκων (Tan & Yeoh, 2015). Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η γονιδιακή ρύθμιση μέσω μη κωδικοποιητικών μεταγράφων που υπερ- ή υποεκφράζονται κατά την καρκινογένεση και για τα οποία θα μιλήσουμε σε επόμενη ενότητα.

Το 2014 ο Γονιδιωματικός Άτλαντας του καρκίνου (Cancer Genome Atlas-TCGA) πραγματοποίησε μια μελέτη που οδήγησε στην πρόταση νέων μοριακών υποτύπων του καρκίνου του στομάχου. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη οδήγησε στη διάκριση 4 υποτύπων: (1) τον EBV θετικό (8.8%) , (2) τον υπότυπο ασταθών μικροδορυφόρων (MSI 21,7%), (3) τον γονιδιωματικά σταθερό (19,7%) και (4) τον χρωμοσωμικά ασταθή (CIN 49,8%). Οι περισσότεροι EBV-θετικοί όγκοι προκύπτουν σε αρσενικούς ασθενείς και παρουσιάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό υπερμεθυλίωση του DNA και ενεργές μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA. Επιπλέον ισχυρή σηματοδότηση επαγόμενη από ιντερλευκίνη-12 υποδεικνύει μια δυναμική παρουσία ανοσοποιητικών κυττάρων σε αυτόν τον υπότυπο. Αντίθετα ο υπότυπος MSI εμφανίζεται κυρίως σε θηλυκούς ασθενείς προχωρημένων ηλικιών και χαρακτηρίζεται από αυξημένους ρυθμούς μετάλλαξης, ιδιαίτερα ογκογονιδίων. Ο γονιδιωματικά σταθερός υπότυπος δεν διαθέτει πολλαπλές μοριακές αλλαγές, ωστόσο φέρει μεταλλάξεις και συντήξεις σε γονίδια GTP-ασών της οικογένειας RHO. Η ενεργή μορφή της RHOA που δεσμεύει GTP ενεργοποιεί την STAT3 προς ογκογένεση. Τέλος ο υπότυπος ασταθούς χρωμοσώματος εμφανίζει ανευπολοειδία, ενισχύσεις των RTKs καθώς και μεταλλάξεις του TP53(X. Liu & Meltzer, 2017a).

Το 2015 η ασιατική ομάδα έρευνας καρκίνου πρότεινε ένα νέο σύστημα ταξινόμησης το οποίο σχετίζεται με σαφείς γονιδιωματικές αλλαγές, την πορεία της νόσου και την πρόγνωση βάσει πολλών ομάδων GC. Αναγνωρίστηκαν 4 υπότυποι μέσω NGS, προφίλ γονιδιακής έκφρασης και μικροσυστοιχιών αριθμού αντιγράφων. Οι τύποι αυτοί είναι: (1) MSI, (2) σταθερών μικροδορυφόρων με χαρακτηριστικά μετάβασης από επηλιακό σε μεσεγχυματικό ιστό (MSS/EMT), (3) MSS/TP53 μετάλλαγμα (MSS/TP53+), (4) MSS/TP53 wild-type (MSS/TP53-). Ο τύπος MSI έφερε πολλαπλές μεταλλάξεις, η διάγνωσή του γινόταν στα αρχικά στάδια I-II και είχε την καλύτερη πρόγνωση απ' όλους τους άλλους υπότυπους. Όγκοι MSS/TP53+ συνδέθηκαν με προσβολή από EBV και είχαν τη δεύτερη καλύτερη πρόγνωση ακολουθούμενοι από τους MSS/TP53- όγκους. Οι όγκοι MSS/ EMT εμφανίζονταν σε μικρότερες ηλικίες, ανιχνεύονταν στα στάδια III/IV και έφεραν τη χειρότερη πρόγνωση (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

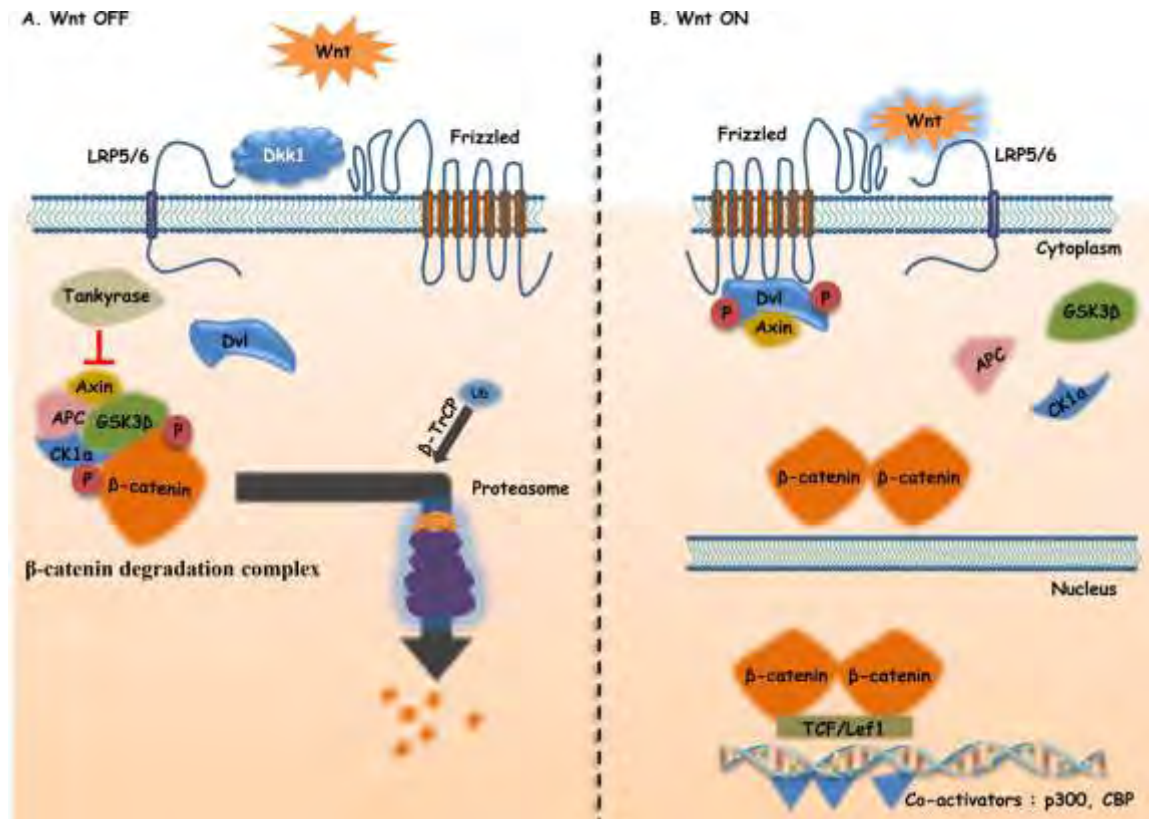


Εικόνα 7: Γενετικά και επιγενετικά χαρακτηριστικά του καρκίνου του στομάχου (X. Liu & Meltzer, 2017a).

1.2.3) Καρκίνος στομάχου και μονοπάτια σηματοδότησης:

Δύο από τα πιο μελετημένα μονοπάτια που απορρυθμίζονται στον καρκίνο του στομάχου είναι αυτά του Wnt και των RTKs. Το Wnt μονοπάτι ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, μορφολογία, μετανάστευση και αυτοανανέωση των βλαστοκυττάρων καθώς και τον καθορισμό της κυτταρικής μοίρας κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Επιπλέον το μονοπάτι αυτό συμβάλλει σημαντικά στην διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών μέσω ρύθμισης των σωματικών βλαστοκυττάρων κατά την ενήλικη ζωή. Το μονοπάτι διακρίνεται σε δύο φυσιολογικές καταστάσεις την ενεργή και την ανενεργή. Στην πρώτη τα Wnt σήματα (εξωκυττάριοι προσδέτες όπως Wnt1, Wnt3) οδηγούν σε σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των συνυποδοχέων Fz και LRP5/6 το οποίο στρατολογεί την πρωτεΐνη Dvl. Αυτό οδηγεί σε φωσφορυλίωση των συνυποδοχέων και στρατολόγηση της αξίνης αναστέλλοντας έτσι την επαγόμενη από αξίνη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης και καταστροφής της από το σύμπλοκο αποικοδόμη. Η β-κατενίνη μεταναστεύει έτσι στον πυρήνα και προκαλεί την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων στόχων του μονοπατιού μέσω αλληλεπίδρασης της ίδιας και μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 8). Επομένως είναι λογικό η παθολογική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt είτε μέσω μεταλλάξεων απενεργοποίησης του συμπλόκου καταστροφής (γονίδιο APC) είτε μέσω ιδιόσυστατης ενεργοποίησης της β-κατενίνης να συνδέεται στενά με την ογκογένεση και κακοήθη πρόοδο σε ευρύ αριθμό καρκίνων, περιλαμβανομένων και των καρκίνων του παχέος εντέρου, στομάχου, πνεύμονα, προστάτη και των ωοθηκών. Με βάση πρόσφατες αναλύσεις μεταγραφώματος βρέθηκε ότι το μονοπάτι απορρυθμίζεται και τα γονίδια που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη διαφορική έκφραση στα καρκινικά δείγματα στομάχου περιλαμβάνει τα WISP1, FZD5 και τον προσδέτη του WNT5, CTBP1 (β-κατενίνη), PTCH, και SFRP4. Επιπλέον

βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του WNT5A που οδηγεί σε σηματοδότηση ανεξάρτητα της παρουσίας β-κατενίνης συνδέεται πιθανώς με την αρνητική κλινική έκβαση στους καρκίνους στομάχου και μελανώματος.



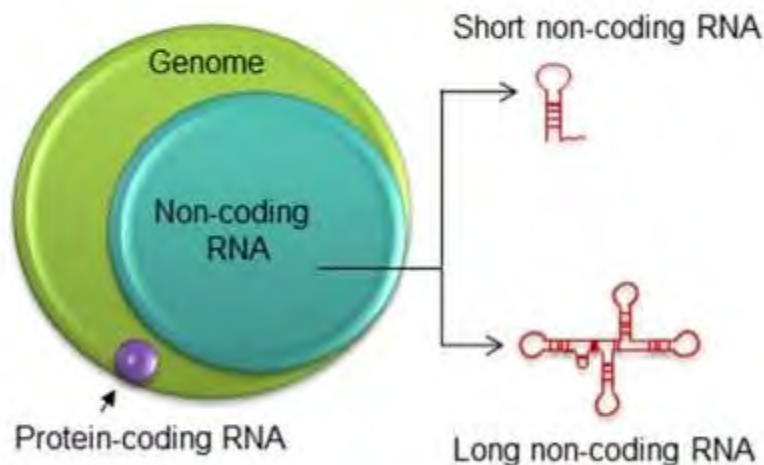
Εικόνα 8: Το Wnt μονοπάτι. Απουσία του Wnt η πρωτεΐνη DKK1 μπλοκάρει τους συνυποδοχείς FZD, LRP και η β-κατενίνη οδηγείται σε αποικοδόμηση από το σύμπλοκο Axin, APC, CK1a, GSK3β. Παρουσία Wnt η β-κατενίνη αλληλεπιδρά με TF στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων (Duchartre, Kim, & Kahn, 2016).

Η οικογένεια ενδοκυτταρικών κινασών PI3K συμβάλλει στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, πολ/σμού, διαφοροποίησης, μετανάστευσης και μεταβολισμού. Πιο συγκεκριμένα η υπομονάδα p110α της PI3K που βρίσκεται καθοδικά των ενεργών RTKs όπως EGFR και ERBB2 ενεργοποιεί την AKT και είναι επίσης τελεστής του μονοπατιού της mTOR (βλ Εικόνα 3). Ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR μπορεί να προκληθεί απο ενεργοποίηση των RTKs, ενεργές μεταλλάξεις και ενίσχυση της PI3KCA, απώλεια λειτουργίας του PTEN καθώς και υπερέκφραση της AKT. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται συχνά στον καρκίνο στομάχου με υπερέκφραση της PI3KCA σε 35-80% των περιπτώσεων, φωσφορυλίωση της AKT σε 40-82% των περιπτώσεων. Η υπερέκφραση της PI3KCA και φωσφορυλίωση της AKT έχουν συνδεθεί και με τη λεμφική μετάσταση του όγκου, ενώ αλλαγές στην PI3KCa έχουν βρεθεί σε 80% στον υπότυπο EBV και 42% στον υπότυπο MSI. (Riquelme et al., 2015)

1.3) Μη κωδικοποιητικά μεγαλομοριακά μετάγραφα (Long non coding RNAs-lncRNAs):

1.3.1) Ορισμός :

Μέχρι πρόσφατα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας μονοπολούσαν οι γονιδιακοί τόποι που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ιστορικά οι περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες θεωρούνταν για αρκετό καιρό άχρηστες, σε βαθμό που ονομάστηκαν junk DNA- (σκουπίδια DNA). Αυτό δεν θα μπορούσε να απέχει περισσότερο από την πραγματικότητα. Την τελευταία δεκαετία η ανάπτυξη του κλάδου της γονιδιοματικής και των νέων τεχνολογιών αυτής όπως του in depth RNA-seq, έχει επιτρέψει την σε βάθος ανάλυση του μη κωδικοποιητικού μέρους του γονιδιώματος σε βαθμό και ποιότητα άνευ προηγουμένου. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι παρόλο που λιγότερο από το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί για πρωτεΐνες, η πλειονότητα των νουκλεοτιδίων μεταγράφονται υπό συνθήκες (Parasramka, Maji, Matsuda, Yan, & Patel, 2016). Τα μετάγραφα που προκύπτουν από τις περιοχές αυτές ονομάζονται μη κωδικοποιητικά ή non coding RNA μόρια και διακρίνονται σε μικρά (<200 nt) και μεγάλα (>200 nt) (Εικόνα 9). (Amaral, Dinger, Mercer, & Mattick, 2008; Kopp & Mendell, 2018). Τα χαρακτηριστικά των lncRNA είναι παραπλήσια με αυτά των mRNA δηλαδή μεταγράφονται από γονίδια μέσω της RNApolIII, έχουν μορφή εξονίων-ιντρονίων και υφίστανται μάτισμα, ενώ τα περισσότερα φέρουν 5' καλύπτρα και πολυαδενυλιωμένη ουρά. Η βασική τους διαφορά πέραν του ότι δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι η εμφάνιση χαμηλής συντήρησης σε ομόλογα είδη (Uchida & Dimmeler, 2015).



Εικόνα 9: Το μεταγράφομα διακρίνεται σε κωδικό και μη κωδικό (small non coding- long non coding (Parasramka, Maji, Matsuda, Yan, & Patel, 2016)

Ως long non coding RNAs καλούνται τα μετάγραφα με περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια που στερούνται ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) ή φέρουν ανοικτό πλαίσιο το οποίο όμως δεν κωδικοποιεί λειτουργική πρωτεΐνη ικανού μεγέθους. Η απρόσμενη ανακάλυψη μεγάλου αριθμού τέτοιων μεταγράφων σε ευκαρυώτες οδήγησε σε αντιπαράθεση για τη λειτουργικότητά τους (Clark et al., 2011; van Bakel, Nislow, Blencowe, & Hughes, 2010). Συγκεκριμένα, επειδή πολλά lncRNA φάνηκε να δείχνουν χαμηλή εξελικτική συντήρηση και πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης, έως και 1-3 μετάγραφα ανά κύτταρο, κάποιοι υπέθεσαν ότι πρόκειται για μεταγραφικό θόρυβο ή πλεονάζοντα μετάγραφα χωρίς βιολογική σημασία. Παρόλα αυτά αρκετά lncRNA παρουσιάζουν ευρύ φάσμα εξελικτικής συντήρησης, από υπερσυντηρημένα έως και αυστηρά ειδιοειδικά (Calin et al., 2007). Υπάρχουν αποδείξεις ότι η έλλειψη συντήρησης πρώιμης αλληλουχίας δεν συνεπάγεται και έλλειψη λειτουργικότητας, πολλά lncRNA παρουσιάζουν συντήρηση τρισδιάστατης δομής απουσία συντήρησης πρωτοταγούς αλληλουχίας (Johnsson, Lipovich, Grandér, & Morris, 2014; Ulitsky, Shkumatava, Jan, Sive, & Bartel, 2011). Οι περιοχές που εκφράζουν τα μετάγραφα αυτά φέρουν όλα τα χαρακτηριστικά ταυτοποιημένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης και συντήρησης υποκινητών, ενδεικτική δομή χρωματίνης, καθώς και ρύθμιση μέσω μεταγραφικών παραγόντων (Clark et al., 2012). Επιπρόσθετα, τα μετάγραφα αυτά βρέθηκε ότι έχουν παρόμοιο εύρος στο χρόνο ημιζωής με τα κωδικά τους ξαδέρφια (Carninci et al., 2006). Αν και τα επίπεδα έκφρασης πολλών lncRNA είναι χαμηλότερα από αυτά των mRNA σε ολικούς ιστούς, παρατηρήθηκε ότι μερικά lncRNA είναι υψηλά εκφρασμένα και εύκολα ανιχνεύσιμα σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Επιπροσθέτως η έκφρασή τους παρουσιάζει κατά μέσο όρο μεγαλύτερη ιστοειδικότητα από την έκφραση κωδικοποιητικών γονιδίων, γεγονός το οποίο συνάδει με τον προτεινόμενο ρόλο τους στη ρύθμιση του μεταγραφικού προφίλ του ιστού. Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι κάθε κύτταρο έχει μια ιδιαίτερη μεταγραφική ταυτότητα ανά κυτταρικό τύπο (Mattick, Taft, & Faulkner, 2010; Mercer, Dinger, Sunken, Mehler, & Mattick, 2008). Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό τους που τα αναδεικνύει ως λειτουργική οντότητα και όχι θόρυβο είναι το γεγονός ότι υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα, δηλαδή παρουσιάζουν στοχευμένη ρύθμιση προς την έκφραση αλλά και τη μετα-μεταγραφική επεξεργασία. Στο σημείο αυτό καλό είναι να ειπωθεί ότι κάποια λειτουργικά επιβεβαιωμένα lncRNA έχουν ισομορφές που κωδικοποιούν πολύ μικρά πεπτίδια και αντίστοιχα κάποια mRNA λειτουργούν *in trans* ως ρυθμιστικά lncRNA. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι τα μη κωδικά μετάγραφα εκφράζονται δυναμικά σε μεγάλο εύρος διακριτών συστημάτων όπως εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, μύες, λεμφοκύτταρα, νευρώνες αλλά και παθολογικές καταστάσεις όπως καρκίνους. Σε ένα βαθμό η έκφραση αυτή ελέγχεται από συμβατικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Morris & Mattick, 2014)

1.3.2) Κατηγορίες:

Τα long non coding RNA αποτελούν μια πολύ ετερογενή ομάδα μορίων και η κατάταξή τους έχει δυσκολέψει την επιστημονική κοινότητα στο παρελθόν. Κάποιες ερευνητικές ομάδες έχουν κατηγοριοποιήσει διάφορα τέτοια μετάγραφα με κριτήρια όπως (α) τη θέση τους στο γονιδίωμα, (β) τον εντοπισμό τους στα υποκυτταρικά κλάσματα, (γ) τους μηχανισμούς δράσης στη χρωματίνη, *in cis* ή *in trans*. Ωστόσο οι διακρίσεις αυτές δεν ανταποκρίνονται κατά 100% στις βιολογικές λειτουργίες καθώς

πολλά lncRNAs ή ισόμορφα αυτών ανήκουν σε περισσότερες από μία κατηγορίες (Moran, Perera, & Khalil, 2012).

A) Θέση στο γονιδίωμα: Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα και πιο συγκεκριμένα με βάση την απόστασή τους από τα κωδικά γονίδια των πρωτεϊνών (Εικόνα 10). Με βάση το κριτήριο αυτό υποδιαιρούνται στις εξής κατηγορίες:

I: Παρεμβάλλοντα μη κωδικά μετάγραφα ή lincRNAs τα οποία όπως δηλώνει το όνομά τους παρεμβάλλονται μεταξύ κωδικών γονιδίων χωρίς να επικαλύπτονται με αυτά και δρουν συνήθως *in cis* ή *in trans* για τροποποίηση της δομής της χρωματίνης.

II: Φυσικά μη νοηματικά μετάγραφα ή NATs (natural antisense transcripts) τα οποία αλληλεπικαλύπτονται με κωδικά γονίδια και μεταγράφονται αντιπαράλληλα με αυτά. Τα μετάγραφα αυτά οδηγούν πολλές φορές σε γονιδιακή σίγηση.

III: Ιντρονικά τα οποία βρίσκονται σε ιντρόνια γονιδίων και η μεταγραφή τους αποκαλύπτει κρυφούς υποκινητές (κρυπτο-υποκινητες) με αποτέλεσμα την παραγωγή ισόμορφων μεταγράφων (Moran et al., 2012).

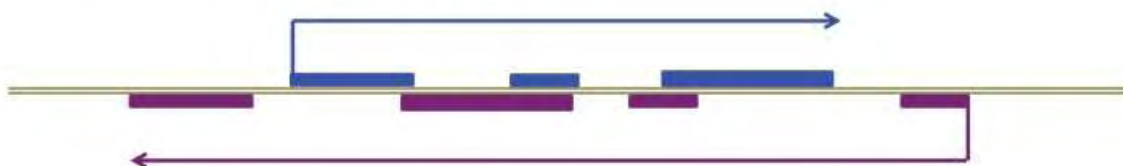
IV: Σχετιζόμενα με ρυθμιστικά στοιχεία μετάγραφα, όπως με εκκινήτες και ενισχυτές, τα οποία είναι σύντομα μετάγραφα που έχει βρεθεί ότι παράγονται από περιοχές έναρξης της μεταγραφής, σε sense και antisense κατευθύνσεις και σχετίζονται με μεταγραφική ρύθμιση (Uchida & Dimmeler, 2015).

V: Έχει επίσης ειπωθεί πως τα ψευδογονίδια τα υπολείμματα δηλαδή των γονιδίων που έχουν χάσει την ικανότητα κωδικοποίησης τους λόγω μετατόπισης του πλαισίου ή λόγω μεταλλάξεων αποτελούν μια κατηγορία γονιδίων που μεταγράφονται σε lncRNA. Έχει βρεθεί ότι ορισμένα ψευδογονίδια ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση με επιγενετικούς ή μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Θεωρείται ότι το Xist έχει εξελιχθεί από το ψευδογονίδιο που ήταν ενσωματωμένο στο γονίδιο Lnx3 (Elisaphenko et al., 2008; Pink et al., 2011).

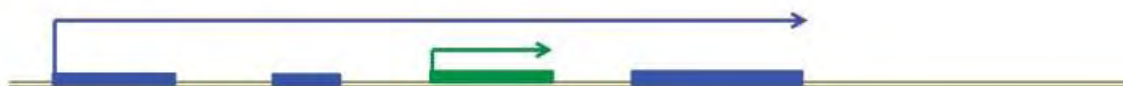
A Intervening lincRNA (lincRNA)



B Natural Antisense Transcript (NAT)



C Intronic lincRNA



D Enhancer RNA



Εικόνα 10: Κατηγορίες lincRNA με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα (Moran et al., 2012; Uchida & Dimmeler, 2015)

B) Υποκυτταρικός εντοπισμός: Τα lincRNA έχουν κυρίως ρυθμιστικό ρόλο και εντοπίζονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα.

Στον πυρήνα: Δρουν επιγενετικά συγκροτώντας σύμπλοκα με πρωτεΐνες όπως μεθυλοτρανσφεράσες για τροποποίησης των ιστονών επιτρέποντας ή εμποδίζοντας τη μεταγραφή. Πιο άμεσα ρυθμίζουν τη μεταγραφή συγκροτώντας σύμπλοκα με μεταγραφικούς παράγοντες ή σχηματίζοντας κατάλληλες δομές στο DNA για να αλληλεπιδράσουν απομακρυσμένα στοιχεία πχ ενισχυτές-υποκινητές.

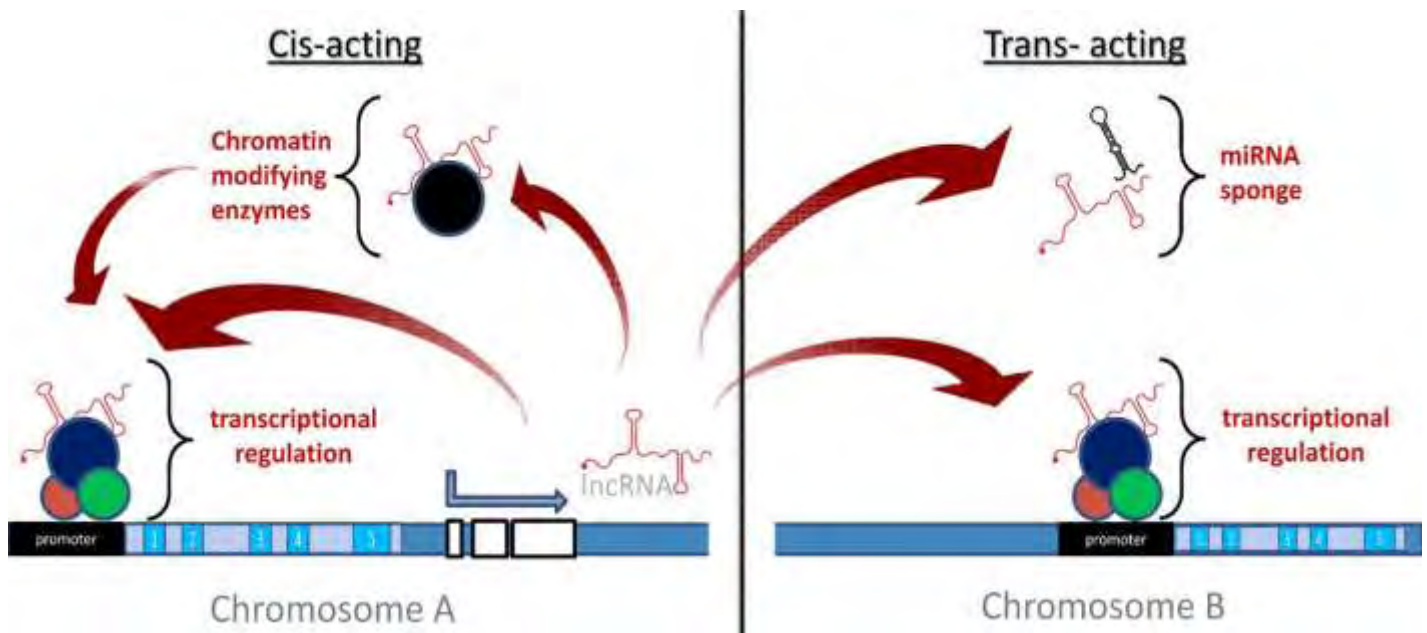
Στο κυτταρόπλασμα: Στο κυτταρόπλασμα δρουν επιτρέποντας ή εμποδίζοντας την απαδενύλιωση των mRNA για ρύθμισης της σταθερότητάς τους, προστασία τους από τα miRNA καθώς και για την παραγωγή πολύ μικρών λειτουργικών πεπτιδικών αλυσίδων. (Βλ. Εικόνα 12)

Γ) Δράσεις in cis και in trans:

Τα lincRNA μπορούν να ταξινομηθούν και βάση της λειτουργικότητάς τους ως *cis* ή *trans* δραστικά μόρια. Τα *trans* δραστικά lincRNA δρουν μακριά από το σημείο σύνθεσής τους ενώ τα *cis* δραστικά δρουν στο σημείο της μεταγραφής τους και επιδρούν στην έκφραση γειτονικών γονιδίων (Εικόνα 11).

Πολλά *cis* δραστικά lncRNA καθοδηγούν επιγενετικούς ρυθμιστές στο σημείο μεταγραφής τους κατά της διάρκεια της μεταγραφής. Έτσι η μεταγραφή τους είναι κρίσιμη και γρήγορα δημιουργεί πρωτεϊνικές άγκυρες για τη συγκρότηση συμπλόκων που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Ο μηχανισμός αυτός έχει τρομερά πλεονεκτήματα καθώς ανταποκρίνεται ταχύτατα μιας και απαιτεί μόνο τη μεταγραφή ενός RNA, είναι πολύ στοχευμένος καθώς δεν περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις DNA-RNA πέραν της μεταγραφής του lncRNA, ενώ χρειάζεται μονάχα ένα μόριο lncRNA για να δράσει. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η επιγενετική ρύθμιση αποτυπωμένων γονιδίων. Η αποτύπωση εξαρτάται από τη γονεϊκή προέλευση των αποτυπωμένων (imprinted) γονιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των θηλαστικών, για το λόγο αυτό υπόκεινται σε πολύ στενή ρύθμιση. Πολλές αποτυπωμένες περιοχές εκφράζουν lncRNA τα οποία ρυθμίζουν γειτονικά γονίδια *in cis*. Για παράδειγμα το lincAIR σιγεί τα γειτονικά αποτυπωμένα γονίδια SLC22A3, SLC22A2 και IGF2R.

Τα *trans* δραστικά lncRNA ρυθμίζουν γονιδιακή έκφραση στο επίπεδο του ολικού γονιδιώματος. Ένα καλό παράδειγμα είναι το HOTAIR το οποίο δεσμεύεται στα σύμπλοκα μετατροπής της χρωματίνης PRC2, LSD1 και CoREST/REST. Η καθοδήγηση τέτοιων συμπλόκων σε συγκεκριμένες περιοχές είναι πιο εύκολο να νοηθεί για τα *cis* δραστικά μεταγράφα. Η στόχευση μέσω transδραστικών μεταγράφων θα απαιτούσε το σχηματισμό μιας τριπλέτας RNA:DNA:DNA η οποία ωστόσο μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιωματική απαμίνωση και ζημιά. Αν λάβουμε υπόψιν και την τρισδιάστατη δομή του DNA ένα lncRNA που δρα *in cis* μπορεί να ελέγχει την έκφραση δύο γειτονικών γονιδίων τα οποία ήρθαν σε κοντινή απόσταση μέσω σχηματισμού χρωμοσωμικών βρόχων (Garitano-Trojaola, Agirre, Prósper, & Fortes, 2013).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση της λειτουργίας *cis* και *trans* δραστικών lncRNA (McMullen & Drew, 2016).

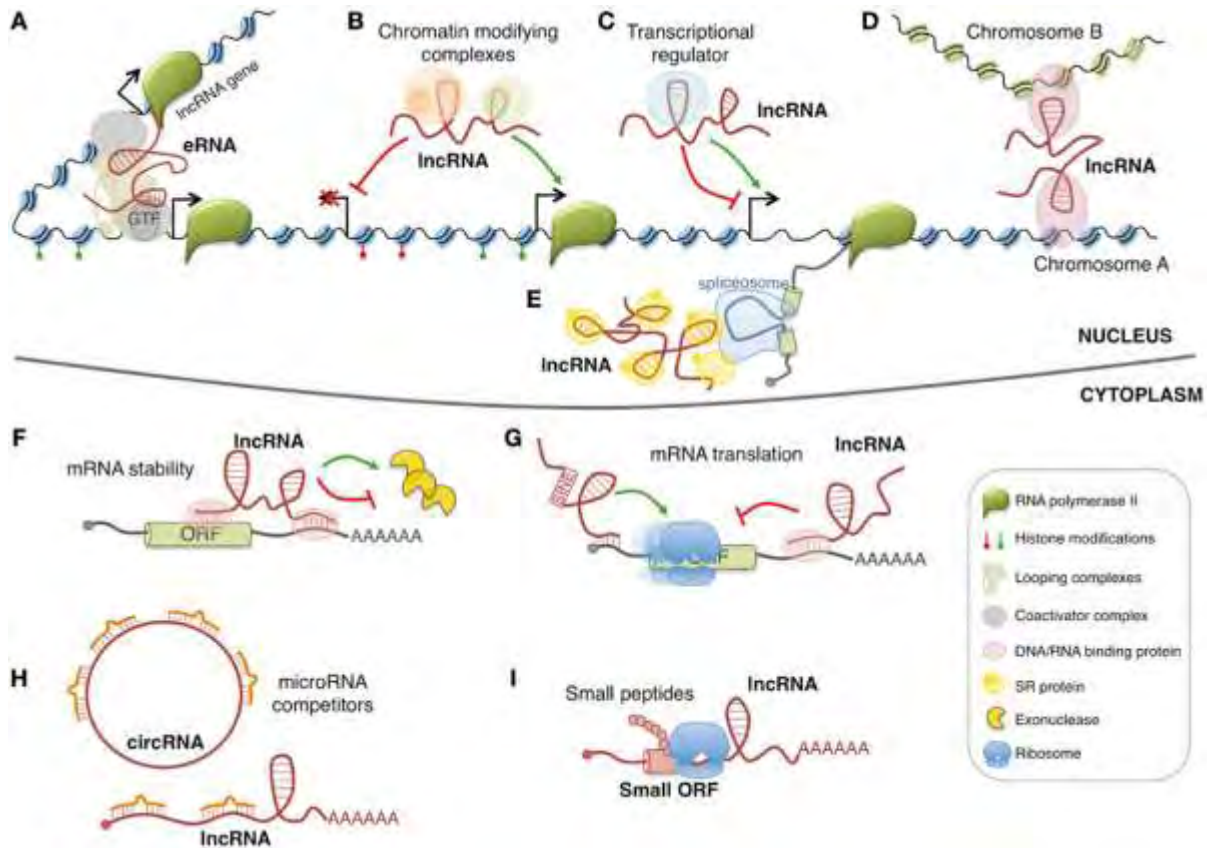
1.3.3) Λειτουργική σημασία των lncRNAs:

Παρά την πρόοδο των τεχνολογιών και τις μελέτες που έχουν γίνει στα lncRNA τα τελευταία χρόνια το μεγαλύτερο μέρος αυτού του παράλληλου κυτταρικού σύμπαντος παραμένει ανεξερεύνητο. Μέχρι σήμερα οι λειτουργίες και μηχανισμοί πολύ λίγων τέτοιων μεταγράφων έχουν διευκρινιστεί. Από τις μέχρι στιγμής μελέτες γνωρίζουμε ότι τα lncRNA αποτελούν καθαρά ρυθμιστικά μόρια τα οποία κάνουν αισθητή την παρουσία τους στην πλειονότητα των διεργασιών του κυττάρου. Ιδιαίτερη σημασία έχει η συμμετοχή τους στις μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές διεργασίες, στην διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, τη συγκρότηση πρωτεϊνικών συμπλόκων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση μεταξύ άλλων (Moran et al., 2012; Ransohoff, Wei, & Khavari, 2018; K. C. Wang & Chang, 2011). Τα μόρια αυτά μπορούν να δράσουν με μια πληθώρα μηχανισμών τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (Εικόνα 12).

Τα πυρηνικά lncRNA έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με επιγενετικούς τροποποιητές ως προς αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Χαρακτηριστική περίπτωση είναι η συγκρότηση συμπλόκων με μεθυλοτρανσφεράσες και μεταφορά τους σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος με αποτέλεσμα τη μεθυλίωση ιστονών ή υποκινητών και κατεπέκταση επιγενετική σίγηση γονιδίων. Τέτοια lncRNA είναι το Xist που ελέγχει την αδρανοποίηση του ενός X χρωμοσώματος στα θηλυκά θηλαστικά και το KCNQ1OT1 που αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο PCR2 και την ιστονική μεθυλοτρανσφεράση G9a (Fang & Fullwood, 2016; Uchida & Dimmeler, 2015). Τα lncRNA μπορούν επίσης να ρυθμίσουν τη μεταγραφή γονιδίων αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες ή και την ίδια την RNApol κατευθύνοντάς τους σε υποκινητές γονιδίων ή απομακρύνοντάς με αποτέλεσμα να επιτρέπουν ή να εμποδίζουν αντίστοιχα τη σύνδεση της RNApol στον υποκινητή. Ένα παράδειγμα είναι το Gas5 το οποίο εμποδίζει τη σύνδεση υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στις αλληλουχίες στόχους με το να συνδέεται αυτό στην πρωτεΐνη (Long, Wang, Youmans, & Cech, 2017; Moran et al., 2012). Τα lncRNA μπορούν επίσης να προκαλέσουν αλλαγές στις δομές του DNA σχηματίζοντας χρωμοσωμικές θηλειές, φέροντας έτσι κοντά ρυθμιστικά στοιχεία όπως ενισχυτές και υποκινητές ή αποκλείοντας την πρόσβαση σε μεταγραφικούς παράγοντες. Ένα παράδειγμα αποτελεί το WtNTRLINC1 το οποίο ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γειτονικού του ASCL2 μέσω σχηματισμού βρόχου και ιστονικών αλλαγών (Giakountis et al., 2016; Moran et al., 2012). Ένα ακόμη τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το lncRNALUNAR το οποίο βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου IGFR1 και μέσω σχηματισμού χρωμοσωμικής θηλειάς ενεργοποιεί την έκφρασή του στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία T-κυττάρων (T-ALL) (Hannon & Dela, 2017; Trimarchi et al., 2014). Από την άλλη κάποια μπορούν να λειτουργήσουν από μόνα τους σαν ενισχυτές όπως το enhancer lncRNACCAT1-L που βρίσκεται ανοδικά του Myc και συμβάλλει στην υπερέκφρασή του σε καρκίνους του παχέος εντέρου (Uchida & Dimmeler, 2015).

Στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο και εντός του πυρήνα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με παράγοντες ματίσματος και να ρυθμίσουν τη δράση τους όπως το MALAT1, ενώ παρόλο που δεν υπάρχουν ακόμα πειραματικές αποδείξεις για κάποιο λειτουργικό ρόλο πολλά snoRNAs και miRNAs έχουν υψηλή ομολογία με αλληλουχίες lncRNAs (Koirala, Zou, & Mo, 2016). Αρκετά lncRNAs δρουν ως πρόδρομα μόρια για τον σχηματισμό μικρότερων μορίων RNA που θα δράσουν στο κυτταρόπλασμα. Η

επίδρασή των lncRNA στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο δεν περιορίζεται στον πυρήνα αλλά επεκτείνεται και στο κυτταρόπλασμα. Τα lncRNA που προκύπτουν ως προϊόντα γονιδιακών διπλασιασμών μπορούν να δράσουν ως μοριακά δολώματα ή σφουγγάρια (miRNA sponges) λόγω της συμπληρωματικότητας που διαθέτουν με τα διάφορα miRNA για την προστασία mRNA-στόχων στο κυτταρόπλασμα, όπως το lnc285194 έναν ογκοκαταστολέα στον καρκίνο του παχέος εντέρου που φέρει δύο περιοχές πρόσδεσης για το ογκογόνο miR-211 (Koirala et al., 2016). Πολλά lncRNA που λειτουργούν στο κυτταρόπλασμα στοχεύουν κωδικά μετάγραφα και ρυθμίζουν τη σταθερότητά και τη διάρκεια ζωής τους επηρεάζοντας θετικά ή αρνητικά την διαδικασία της απαδενύλωσης. Κάποια όπως τα 1/2-sbsRNAs αποσταθεροποιούν τα mRNA και άλλα όπως το BACE1-AS τα διατηρούν σταθερά. Στο επίπεδο της μετάφρασης τα μη κωδικά μετάγραφα μπορούν μέσω ομόλογων ζευγών βάσεων να στοχεύσουν mRNA στα ριβοσώματα και να εμποδίσουν τη μετάφρασή τους, ή μέσω αλληλεπιδράσεων με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες και το ριβοσωμικό RNA να λειτουργήσουν ενισχυτικά (Rashid, Shah, & Shan, 2016).



Εικόνα 12: Οι λειτουργίες των lncRNA είναι διακριτές μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. (Morlando, Ballarino, & Fatica, 2015)

1.4) Long non coding RNAs και καρκίνος:

Με βάση τα παραπάνω, τα lncRNA δρουν ως ρυθμιστικά μόρια τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός φάσματος μηχανισμών, συμμετέχοντας στην ρύθμιση της πλειονότητας κυτταρικών διεργασιών. Απόρροια του κρίσιμου ρυθμιστικού τους ρόλου αποτελεί η διασύνδεση τους με παθολογικές καταστάσεις. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το πρότυπο έκφρασης ή τη δομή των lncRNA μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση κάποιας ασθένειας όπως και στην περίπτωση των mRNA. Και πράγματι τα τελευταία χρόνια πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρύθμιση των μεταγραφικών επιπέδων των lncRNA οδηγεί σε μεγάλο αριθμό παθολογικών φαινοτύπων από απλές έως και πολύ σύνθετες νόσους όπως καρδιοπάθειες, διαβήτες, νευρολογικές διαταραχές και διάφορους τύπους καρκίνου. Από πολλαπλές αναλύσεις πλήρους γονιδιώματος έχει βρεθεί ότι η πλειονότητα των SNPs που σχετίζονται με πολύπλοκες νόσους χαρτογραφούνται εντός μη κωδικών αλληλουχιών. Αναφορικά με τον καρκίνο, πειραματικά δεδομένα έχουν υποδείξει την εξής αξιοπερίεργη ιδιότητα μερικών εκ των μεταγράφων αυτών-σε ορισμένους ιστούς μπορούν και δρουν ως επαγωγείς και σε άλλους ως καταστολείς του καρκίνου. Αρκετές έρευνες εστιάζουν στον λειτουργικό χαρακτηρισμό ρυθμιστικών μηχανισμών για την ανάδειξη του μοριακού υπόβαθρου διαφόρων ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών (Bonetti & Carninci, 2017).

Γενικά τα lncRNA δρουν μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων στόχων σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα τελευταία χρόνια πολλά lncRNA έχουν βρεθεί απορρυθμισμένα στον καρκίνο. Μεταξύ άλλων το LncHIFCAR είναι σε μεγάλο βαθμό υπερεκφρασμένο στον καρκίνο του στόματος και σχετίζεται σημαντικά με δυσμενή πρόγνωση. Καταστολή της έκφρασης του εμποδίζει τον σχηματισμό κυτταρικών σφαιριδίων και το μεταστατικό του δυναμικό *in vitro* και *in vivo* δια μέσου επίδρασης στην καθοδήγηση των συμπαραγόντων HIF-1α και p300 στους υποκινητές στόχους (Shih et al., 2017). Επιπλέον η έκφραση του LINC00673 επάγει πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, μετάσταση, προσβολή και μεταβίβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα μέσω στόχευσης του miR-150-5p (Lu et al., 2017).

1.4.1) Long non coding RNAs και καρκίνος του στομάχου:

Στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου έχουν βρεθεί πολλά σημαντικά lncRNA των οποίων ο κλινικός αντίκτυπος, η βιολογική λειτουργία και ο μηχανισμός έχουν χαρακτηριστεί. Για παράδειγμα το lncRNA HOTAIR προάγει την μετάσταση του καρκίνου του στομάχου μέσω της σύνδεσής του στον επιγενετικό μεταγραφικό ρυθμιστή polycomb repressive complex 2 (PRC2) (Y. W. Liu et al., 2015). Το ίδιο lncRNA ρυθμίζει την αντίσταση στη χημειοθεραπεία με cisplatin δρώντας ως ανταγωνιστής του

miR-126 και μπορεί να δράσει ως πιθανός βιοδείκτης της νόσου (Elsayed, Salem, Darwish, & Fayed, 2018; Yan, Dang, Liu, Zhang, & Zhang, 2016). Ακόμη το lncRNAUCA1 εκφράζεται υψηλά σε καρκινικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές στομάχου, προάγει πολλαπλασιασμό και μεταβίβαση από την φάση G1 στην S μέσω αλληλεπίδρασης με τον EZH2 και προαγωγής έκφρασης κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης D1 (Z. Q. Wang et al., 2017). Επιπλέον τα lncRNAs HOXA11-AS , LINC00673 και ZFAS1 υπερεκφράζονται και επιδεικνύουν ογκογόνες δράσεις στον καρκίνο του στομάχου. Αντίθετα τα GAS5 και MEG3 έχουν ρόλο ογκοκαταστολέα (X. Chen et al., 2018). Το lncRNAAK0961174 επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετάσταση μέσω ρύθμισης της πρωτεΐνης WDR66 (X. Chen et al., 2018). Ένα άλλο παράδειγμα lncRNA που συμμετέχει στην καρκινογένεση στο στομάχι αποτελεί το lincPVT1 το οποίο προάγει την αγγειογένεση των όγκων μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού STAT3/VEGFA στο στομάχι (Zhao et al., 2018), ενώ το lncRNAEGOT προάγει καρκινογένεση μέσω του μονοπατιού Hedgehog (Peng, Wu, Fan, Lu, & Feng, 2017). Το linc01234 αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκοεπαγωγέα στον καρκίνο του στομάχου. Το μετάγραφο αυτό λειτουργεί ως μοριακό δόλωμα για το miR-204-5p, προστατεύοντας έτσι τα μετάγραφα που στοχεύονται από αυτό για ενδογενή σίγηση (X. Chen et al., 2018). Τα lncRNA μπορούν ωστόσο και επάγουν την καρκινογένεση μέσω της σταθεροποίησης των mRNA άλλων ογκογονιδίων όπως στην περίπτωση του GHET1 το οποίο ενισχύει τη σταθερότητα του mRNA του MYC στο στομάχι επάγοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Yang et al., 2014). Από την άλλη τα lncRNA μπορούν να δρουν και έμμεσα στην προαγωγή της νόσου επάγοντας αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα χημειοθεραπείας (Multi Drug Resistance). Το φαινόμενο της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων σε φάρμακα αποτελεί τη βασική αιτία αποτυχίας της χημειοθεραπείας στον καρκίνο του στομάχου. Ένα παράδειγμα μεταγράφου ικανού να προσδώσει ανοχή στη χημειοθεραπεία σε κύτταρα καρκίνου στομάχου αποτελεί το lncRNAMRUL(Y. Wang et al., 2014).

Σκοπός

Παρά το γεγονός ότι τα lncRNA είναι σημαντικοί παράγοντες στον καρκίνο του στομάχου, οι λειτουργικές λεπτομέρειες της συμβολής τους στην καρκινογένεση παραμένουν αδιευκρίνιστες ενώ η αξιοποίηση τους ως διαγνωστικούς και θεραπευτικούς στόχους υστερεί. Συνεπώς είναι σημαντικό να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί τους και να αξιολογηθεί πλήρως το δυναμικό τους ως βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους για ένα τύπο καρκίνου με ελλειπή διαγνωστική εργαλειοθήκη.

Χαρακτηριστικά που κάνουν τα lncRNA ιδανικά τόσο για διαγνωστικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς είναι: i) η αυστηρή ειδικότητα της έκφρασής τους σε συγκεκριμένους ιστούς και κυτταρικούς τύπους που συνεπάγεται εξειδίκευση τόσο σε επίπεδο υπότυπου της ασθένειας όσο και σε επίπεδο ασθενούς ii) τα χαμηλά συνήθως επίπεδα έκφρασής τους που επιτρέπουν εύκολη καταστολή μέσω παρεμβολής RNA (Bonetti & Carninci, 2017) iii) η τάση για συσσώρευση και διατήρηση καρκινικών μεταλλάξεων λόγω του μη κωδικοποιητικού χαρακτήρα iv) η λειτουργία μέσω τριασδιάτατης δομής που μπορεί να αποτελέσει στόχο αναστολέων και φαρμάκων και v) η ανίχνευση τους στο κυκλοφορικό σύστημα που μπορεί να οδηγήσει σε διαγνωστικά τεστ μέσω κοινών αιματολογικών εξετάσεων.

Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε χρήση βιοπληροφορικών μέσων για μεταγονιδιωμιακές αναλύσεις lncRNA στον καρκίνο του στομάχου με στόχο την ανίχνευση διαφορικά εκφρασμένων lncRNAs. Από τις αναλύσεις αυτές προέκυψε μια πληθώρα lncRNA μεταγράφων τα οποία παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική υπερέκφραση στην καρκινική κατάσταση. Από αυτά επιλέχθηκε ένα μετάγραφο (το οποίο ονομάστηκε Gastric Cancer Induced lincRNA 1- GrACILe1) με σκοπό την λειτουργική ανάλυση σε καρκινικές σειρές στομάχου. Η διαφορική έκφραση του GrACILe1 ελέγχθηκε πειραματικά σε κυτταρικές σειρές μέσω qPCR και αποδείχθηκε ότι όντως υπερεκφράζεται σε καρκινικές σειρές στομάχου σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης σε κύτταρα φυσιολογικού στομαχικού επιθηλίου. Μέσω πρωτοκόλλων υποκυτταρικής κλασμάτωσης έγινε χαρακτηρισμός του υποκυτταρικού εντοπισμού του GrACILe1, το οποίο φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στην χρωματίνη και δευτερευόντως στο κυτταρόπλασμα. Τέλος σχεδιάστηκαν shRNA oligos τα οποία στοχεύουν το GrACILe1 και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς με απώτερο σκοπό την επαγόμενη καταστολή του GrACILe1 σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές στομάχου.

Μελλοντικός στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι η αξιοποίηση των πλασμιδιακών shRNA φορέων με σκοπό την δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών επαγόμενης καταστολής του GrACILe1 για την μελέτη του ρόλου του στην καρκινογένεση του στομάχου.

2) Υλικά και μέθοδοι:

2.1) Υλικά:

2.1.1) Κυτταρικές σειρές:

Κ. Σειρές	Τύπος σειράς	Ιστοπαθολογία	Φαινότυπος	Προέλευση	Πρωτεύοντα κύτταρα	Μορφολογία
HFE	Φυσιολογική στομάχου	Φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου				επιθηλιακά
KATO	Καρκινική στομάχου	signet ring cell carcinoma		Pleural effusion (στομάχι) μεταστατικό		σφαιρικά
MKN45	Καρκινική στομάχου	poorly diff. adenocarcinoma	adherent	Lymph node (στομάχι)	ναι	πολυγονικά
NUGC4	Καρκινική στομάχου	poorly diff. adenocarcinoma				σφαιρικά
MCF7	Καρκινική μαστού	poorly diff. adenocarcinoma	adherent	Pleural effusion (μαστός)		επιθηλιακά
SKBR3	Καρκινική μαστού	Poorly diff. adenocarcinoma	adherent	Pleural effusion (μαστικός αδένας)	οχι	επιθηλιακά
HT29	Καρκινική παχέος εντέρου	Moderately diff. adenocarcinoma	adherent	Colon	οχι	επιθηλιακά
HCT116	Καρκινική παχέος εντέρου		adherent	Lymph node (colon)	οχι	επιθηλιακά

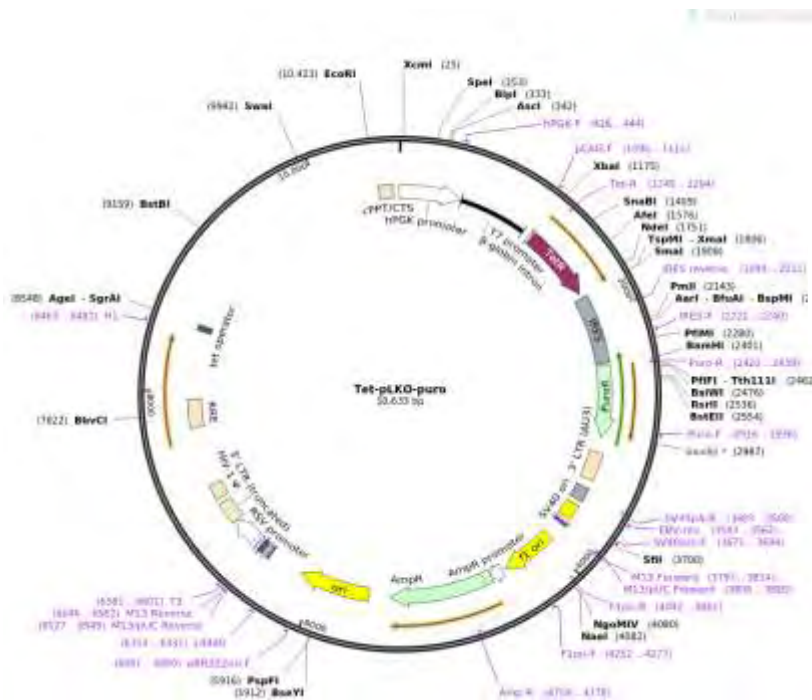
2.1.2) Αντιδραστήρια:

LBbroth, LBagar, agarose, Ethanol 70%/100%, Isopropanol, EcoRI/KpnI/XhoI/CSPA1, NEBresdigenzymebuffers, T4 ligase, KTaqpolymerase, Ampicillin, Puromycin, WFI, TBE, EtBr, Trizole, CHCl₃, OligodTs, DNTPs, DMEM, RPMI, FBS, Gentamycin, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin, PBS 1+10X, Trypsin, EDTA, NaCl, KCl, MgCl₂, NaOH, KOH, HEPES, NP40, Glycerol 40-50%, BufferA+ BufferNLB800, TrypanBlue, Glycogen, RNaseout, DNAladder 1-10Kb, Loadingdyeblue 6X. Tris, SDS 10%.

2.1.3) Πλασμιδιακοί φορείς:

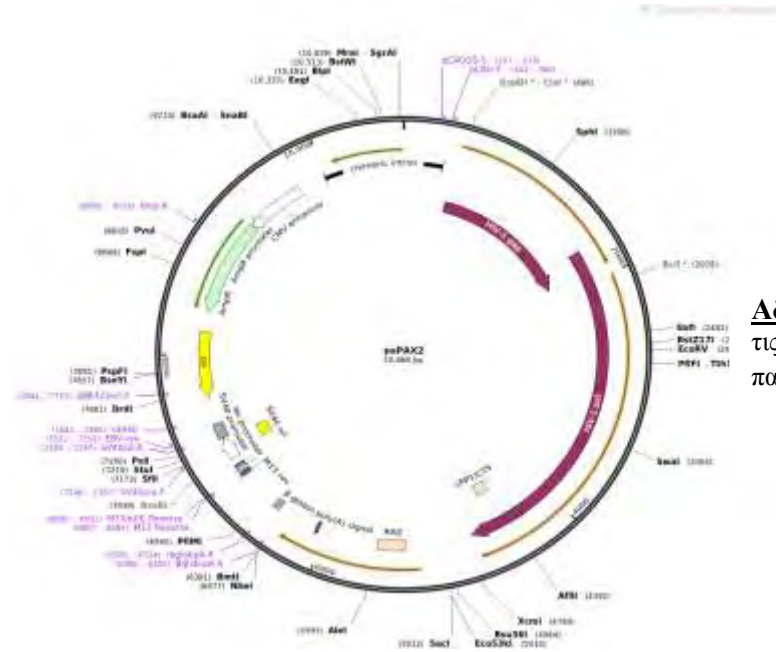
2.1.3.1) Tet-pLKO-puro:

Η βασική πειραματική προσέγγιση λειτουργικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στηρίζεται στην δημιουργία γενετικά τροποποιημένων καρκινικών κυτταρικών σειρών που φέρουν το σύστημα tet. Το πλασμίδιο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PLKO-tetR-Puro το οποίο φέρει τα εξής στοιχεία: Α) H1/TO ιδιοσύστατο υποκινητή με σκοπό τον έλεγχο της έκφρασης του ενθέματος (των oligos shRNA εδώ), Β) Στοιχεία TRE δηλαδή αλληλουχία που αναγνωρίζει και προσδένεται ο καταστολέας. Γ) Stuffer: Αλληλουχία 2000 βάσεων που απομακρύνεται με περιοριστική πέψη με σκοπό την ένθεση της αλληλουχίας που θα δώσει τα επιθυμητά shRNA μόρια. Εκατέρωθεν της αλληλουχίας αυτής υπάρχει σημείο αναγνώρισης από AgeI (5') και EcoRI (3') αντίστοιχα. Δ) hPGK: Ισχυρός ιδιοσύστατος υποκινητής της ανθρώπινης κινάσης του φωσφογλυκερικού με σκοπό τον έλεγχο της έκφρασης του καταστολέα. Ε) TetR: Γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη καταστολέα. Στ) Pur: Γονίδιο ανθεκτικότητας στην puromycin (αντιβιοτικό έναντι κυττάρων θηλαστικών). Η) IRES: internal ribosome entry site, εξασφαλίζει ταυτόχρονη έκφραση TetR και Pur από τον ίδιο υποκινητή. Το πλασμίδιο φέρει επίσης γονίδιο επιλογής σε βακτήρια (γονίδιο αντίστασης σε ampicillin) καθώς και όλα τα απαραίτητα στοιχεία για ενσωμάτωση του ενθέματος στο γονιδίωμα των κυττάρων με χρήση λεντιών.



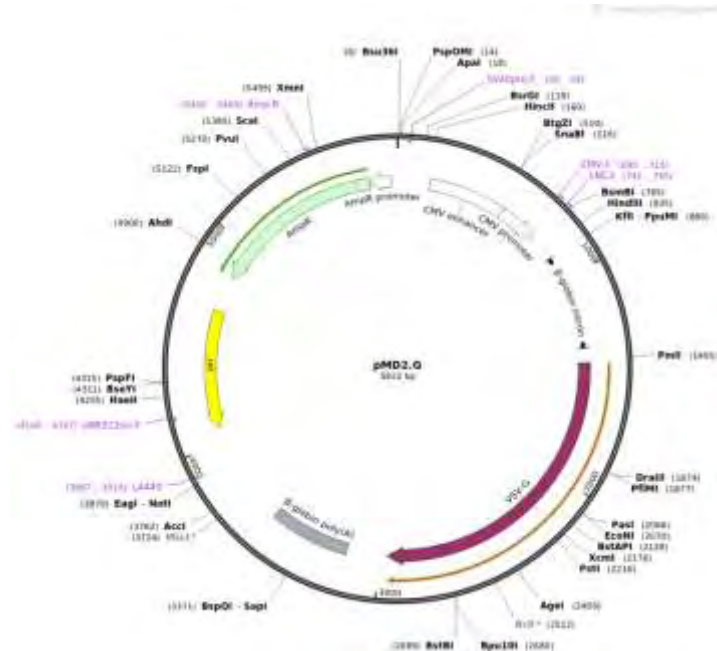
Αδρός φυσικός χάρτης του Tet-Plko-puro (addgene): Περιέχει τις αλληλουχίες των γονιδίων που χρειάζονται για τον έλεγχο και τη λειτουργικότητα του ενθέματος καθώς και για την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.

2.1.3.2) psPAX:



Αδρός φυσικός γάρτης psPAX (addgene): Περιέχει τις αλληλουχίες των γονιδίων που χρειάζονται για το πακετάρισμα του γενετικού υλικού στο καψίδιο του ιού.

2.1.3.3) pMD2.G:



Αδρός φυσικός γάρτης του pMD2.G (addgene): Περιέχει τις αλληλουχίες των γονιδίων που χρειάζονται για την παραγωγή των πρωτεϊνών του καψιδίου του ιού.

2.2) Μέθοδοι:

2.2.1) Βιοπληροφορική ανάλυση:

Από δεδομένα RNAseq καρκινικών-φυσιολογικών σειρών και βιοψιών φυσιολογικού και κακοήθι ιστού πραγματοποιήθηκε γονιδιωματική μετανάλυση στο πρόγραμμα Perseus προς σχηματισμό volcano plots που παρατίθενται στα αποτελέσματα. Από αυτά επιλέχθηκαν lncRNA στόχοι βάση στατιστικής σημαντικότητας και λειτουργικού ρόλου με σκοπό την μεταγραφική σίγηση. Η αρχή έγινε από κανονικοποιημένα δεδομένα RPKM, τα οποία λογαριθμοποιήθηκαν και μετασχηματίστηκαν σε αποκλίσεις z (z-score) με σκοπό την απεικόνιση τους σε θερμικούς χάρτες. Παράλληλα υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα των βιολογικών επαναλήψεων καθώς και το εύρος απόκλισης από τον μάρτυρα (φυσιολογικός ιστός) με σκοπό την απεικόνιση σε volcano plots. Τέλος έγινε χρήση των γονιδιωματικών φυλλομετρητών UCSC και WASHU για τη μελέτη της αλληλουχίας των επιλεγμένων μεταγράφων και για πραγματοποίηση ανάλυσης ομολογίας.

Χρησιμοποιήθηκε ακόμη το πρόγραμμα CPC2 (<http://cpc2.cbi.pku.edu.cn/index.php>) για τον προσδιορισμό της κωδικοποιητικής ικανότητας των μεταγράφων που προέκυψαν από την ανάλυση με το Perseus. Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης ύστερα από την QPCR χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CFX.

Για τον σχεδιασμό shRNA με σκοπό τη σίγηση της έκφρασης έγινε χρήση του προγράμματος siDESIGN Center της εταιρείας Dharmacon (<http://dharmacon.horizondiscovery.com/design-center/>).

2.2.2) Κυτταροκαλλιέργεια:

Η καλλιέργεια ευκαρυωτικών (στην περίπτωση μας ανθρώπινων καρκινικών) κυττάρων πραγματοποιείται υπό αυστηρά ελεγχόμενες και ασηπτικές συνθήκες σε ειδικά δωμάτια αποκλειστικά αφιερωμένα για το σκοπό αυτό. Οι πειραματικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε μηχανήμα καθέτου νηματικής ροής για επιπλέον ασφάλεια έναντι μόλυνσης των καλλιεργειών. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κλιβάνους-επωαστήρες στους 37°C (θερμοκρασία ανθρώπινου σώματος) και σε επίπεδα CO₂ 5%. Το αέριο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρη του pH όπως και στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα κύτταρα παρατηρούνται για μορφολογικές αλλοιώσεις ή γενικότερες μελέτες με οπτικό μικροσκόπιο. Νεκρά κύτταρα μπορούν παρατηρηθούν ύστερα από χρώση με Trypan blue. Κάθε κυτταρική σειρά έχει τις δικές τις ανάγκες σε θρεπτικά υλικά συνεπώς η χρήση θρεπτικού διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Η αλλαγή της σύστασης του

θρεπτικού λόγω παραπροϊόντων της καλλιέργειας ή έλλειψης θρεπτικών γίνεται αντιληπτή με την αλλαγή του pH και κατεπέκταση του χρώματος του θρεπτικού και συνεπάγεται αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέσα σε ειδικές αποστειρωμένες φλάσκες 25 ή 75cm² σε αντίστοιχα προτεινόμενους όγκους που επιτρέπουν οξυγόνωση και χώρο στα αναπτυσσόμενα κύτταρα. Η βασική όμως ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων είναι ο ασύστολος πολλαπλασιασμός συνεπώς αν αφεθούν θα καλύψουν όλη την επιφάνεια της φλάσκας, θα δημιουργήσουν συσσωματώματα και πολλά θα οδηγηθούν σε απόπτωση. Ακόμη τα σήματα μεταξύ κυττάρων μπορεί να οδηγήσουν σε διαφοροποίηση των κυττάρων και αλλοίωση της σύστασης της κυτταρικής σειράς. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια ανά τακτά χρονικά διαστήματα όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το περίπου 80% της διαθέσιμης επιφάνειας. Ο χρόνος αυτός διαφέρει ανά κυτταρική σειρά καθώς καθεμιά έχει το δικό της χρόνο αναδιπλασιασμού και ρυθμό ανάπτυξης. Συνήθως η ανακαλλιέργεια λαμβάνει χώρα ανά 5-7 ημέρες. Για την πραγματοποίηση της ανακαλλιέργειας απομακρύνεται το παλιό θρεπτικό μέσο, αλλά πρέπει τα κύτταρα να αποκολληθούν από την επιφάνεια που αναπτύσσονται. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω θρυψινοποίησης, δηλαδή χορήγηση της πρωτεάσης θρυψίνης στο δείγμα. Αφού τα κύτταρα αποκολληθούν και διαλυθούν με πιπετάρισμα τα συσσωματώματά τους μεταφέρονται στις νέες φλάσκες όπου προστίθεται ίση με την θρυψίνη που προστέθηκε ποσότητα θρεπτικό υγρού με 10 % ορό FBS ώστε να καταστήσει το ένζυμο ανενεργό. Στη συνέχεια μπορούν πραγματοποιηθούν πειράματα στα κύτταρα ή να διατηρηθούν σε υγρό άζωτο (-196 βαθμούς) για χρόνια. Η κρυοδιατήρηση ωστόσο επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής μείωσης της θερμοκρασίας με τη βοήθεια του κρυοπροστατευτικού DMSO για αποφυγή θραύσης των κυττάρων από σχηματιζόμενους κρυστάλλους υγρού. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι το DMSO είναι ανασταλτικό-τοξικό για την ανάπτυξη των κυττάρων και για το λόγο αυτό κατά την επανακαλλιέργεια ύστερα από κρυοδιατήρηση αραιώνεται στο 10% του τελικού όγκου καλλιέργειας και απομακρύνεται. Όσον αφορά τη μόλυνση των κυττάρων από ιούς ή μυκόπλασμα η μικροσκοπική παρατήρηση είναι ενδεικτική μόνο όταν τα κύτταρα έχουν λυθεί. Για το λόγο αυτό η διάγνωση μόλυνσης γίνεται μέσω PCR με κατάλληλους primer. Στην πειραματική πορεία καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες 75cm² οι καρκινικές σειρές KATO-III και MKN45 οι οποίες αναπτύσσονται βέλτιστα σε θρεπτικό RPMI. Τα κύτταρα μεγαλώνουν σε RPMI + 10 % FBS παρουσία αντιβιοτικών για αποφυγή μόλυνσης. Το μείγμα αντιβιοτικών περιλαμβάνει διάλυμα πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης 1/100 και γενταμυκίνης 1/1000 για αποφυγή μόλυνσης από βακτήρια, αμφοτερουκίνη 1/1000 για αποφυγή ανάπτυξης μυκήτων. Αρχικά σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας έγινε πλύση με θρυψίνη 2,5 ml και απομάκρυνση του θρεπτικού, στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 ml κόμα θρυψίνης για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε επωστήρα στους 37 βαθμούς. Στο πέρας των 5 λεπτών προστέθηκαν 2,5 ml θρεπτικού RPMI για απενεργοποίηση της θρυψίνης και με

πιπετάροντας με στριπέτα έγινε σπάσιμο των κυτταρικών συσσωματωμάτων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1500 rpm στους 4 βαθμούς.

2.2.3) Κλωνοποίηση και εξαγωγή πλασμιδίων:

Για την κλωνοποίηση των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα E.coli XL1 blue. Αρχικά τα βακτηριακά κύτταρα μεταφέρθηκαν από τους -80 °C σε πάγο για να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια προστέθηκε στο εναιώρημα ποσότητα (10 ng) του πλασμιδιακού DNA και τα βακτήρια τοποθετήθηκαν για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε μεταφορά σε υδατόλουτρο για θερμικό shock στους 42°C για 50'' ώστε οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν διαπερατές και να εισέλθει το πλασμίδιο στα κύτταρα. Αμέσως μετά το θερμικό shock τα βακτήρια μεταφέρθηκαν για 2 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml θρεπτικού μέσου LB και μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα στους 37 °C για 1 ώρα ώστε να ανακάμψουν από την υψηλή θερμοκρασία και να αντιγραφούν το πολύ μία φορά (recovery). Ακολούθησε επίστρωση ποσότητας της καλλιέργειας σε τρυβλία με LB-agar παρουσία 100 ug/ml Amp για την επιλογή των κλώνων που φέρουν το πλασμίδιο. Τα βακτήρια αφήθηκαν ολονύκτια στους 37 °C και συλλέχθηκε την επόμενη μέρα μοναδιαία αποικία για επανακαλλιέργεια αρχικά σε 2 ml LB για 10 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια διαμόλυνση και ολονύκτια επανακαλλιέργεια σε 100 ml υγρής καλλιέργειας LB. Την επόμενη μέρα τα βακτήρια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε θ.δ. στις 3000 rpm. Η εξαγωγή των πλασμιδίων έγινε με το kit απομόνωσης Macherey Nagel Xtra Plasmid purification kit MIDI protocol σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.4) Διαγνωστικός έλεγχος πλασμιδίων:

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση περιοριστικής πέψης ως διαγνωστικός έλεγχος των αλληλουχιών των τριών πλασμιδίων με τη χρήση των ενζύμων EcoRI, KpnI και XhoI για το πλασμίδιο plko.

Αντιδραστήρια	Πέψεις ανά πλασμίδιο με		
	EcoRI	KpnI	XhoI
10x buffer	2,5 μl	2,5 μl	2 μl
enzyme	2 μl	2 μl	2 μl
plasmid	2 μl	2 μl	1 μl
H ₂ O	18,5 μl	18,5 μl	15 μl
Final vol	25 μl	25 μl	20μl

2.2.5) RNA extraction:

Αρχικά πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1000μl TRI, κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και μεταφορά των δειγμάτων σε eppendorf. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL χλωροφορμίου στα δείγματα και ακολούθησε vortex για 30". Τα δείγματα αφήθηκαν για 5' σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε tubes όπου και προστέθηκε ίση ποσότητα ισοπροπανόλης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10 λεπτά και μετά φυγοκεντρήθηκαν για 15' στα 14.000 rpm στους 4°C. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μL 70% αιθανόλη, ακολούθησε vortex για την έκπλυση του ιζήματος και φυγοκεντρηση στα 14.000 rpm για 5'. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την φυγοκέντρηση λήφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αφήθηκε να στεγνώσει για 15 λεπτά. Μετά προστέθηκαν 50μl RNase free H₂O σε κάθε δείγμα, επαναδιάλυση του ιζήματος στους 65°C για 5 λεπτά, vortex και τέλος κρυοδιατήρηση στους -80°.

2.2.6) DNase treatment:

Η διαδικασία λαμβάνει μέρος ώστε να καταστραφούν όλα τα μόρια γονιδιωματικού DNA που μπορεί να υπάρχουν στο RNA extraction που έχει γίνει. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δράσης μιας δεσοξυριβονουκλεάσης, ενός ενζύμου που υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στα μόρια του DNA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C. Η αντίδραση περιλαμβάνει 10x buffer & DNase, ddH₂O, RNA. Αφού μπήκαν τα ένζυμα, έγινε vortex για 3" και μια πολύ σύντομη φυγοκέντρηση (λόγω του ότι περιέχουν γλυκερόλη μέσα, να αναμιχθεί με το νερό). Μετά από αυτό τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο waterbath στους 37° για 1 h. Μετά το waterbath τοποθετήθηκαν στον πάγο και προστέθηκαν 40 μl sodium Acetate RNA grade 3M pH 5.6 και 310 μl ddH₂O (Water For Injection). Ακολούθησε προσθήκη 400 μl phenol/chloroform σε κάθε δείγμα και vortex για 30"-1', μετά φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm, 5 min 4 °C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν 400μl υπερκειμένου με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η μεσόφαση και μεταφέρθηκαν σε νέο tube. Μετά από αυτό προστέθηκαν 1000 μl 100 % ice cold EtOH, ανακινήθηκαν 4-5 φορές και τοποθετήθηκαν στους - 80 °C για 1 ώρα προκειμένου να καθιζάνει το δείγμα. Στο πέρας της ώρας έγινε φυγοκέντρηση στα δείγματα για 30 min, 14.000 rpm, 4 C και αφαιρέθηκε με πολύ προσοχή όλο το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Ακολούθησε προσθήκη 500 μl 70 % ice cold EtOH (παρασκευασμένη με WFI) και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, 5 min, 4 C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο αρχικά με 1000αρα πιπέτα και μετά με την 200αρα ώστε να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν περισσότερο υγρό. Τα δείγματα αφήθηκαν με ανοιχτό το καπάκι στον πάγο για να στεγνώσουν για 10 λεπτά. Όταν στεγνώσαν πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του δείγματος σε WFI και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 5'. Τέλος έγινε έντονο vortex για 1 min, spin και ξανά vortex. Έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA μέσω nanodrop. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν μετά στους - 80 °C.

2.2.7) Σύνθεση cDNA:

Από κάθε δείγμα υπολογίζεται 1 ug RNA και διαλύεται σε 10 ul WFI όπου το ελάχιστο επιθυμητό είναι 100 ng/μl ανά αντίδραση ή 1000 ng συνολικά. Έτσι αν έχουμε 500 ng/μl τότε βάζουμε 2 μl RNA και προσθέτουμε 8 μl WFI. Σε κάθε αραιωμένο δείγμα προστέθηκε 1 μl από 20 mM oligoDTs. Επίσης προστέθηκε 1 μl από 10 mM dNTPs και μεταφέρθηκαν στους 65 ° C για 5 min ώστε να σπάσουν οι δευτεροταγείς δομές των μορίων RNA και να κολλήσουν τα oligoDTs. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν αμέσως σε πάγο. Παράλληλα ετοιμάστηκε για κάθε δείγμα mix αντίδρασης RT με 5x buffer : 4 μl, 100 mM DTT : 2 μl, Rnase out : 1 μl, MMLV : 1 μl. Πραγματοποιήθηκε vortex, προσθήκη 8μl από το mix σε κάθε δείγμα και μεταφορά στους 37 ° C για 2 ώρες. Μετά τις 2 ώρες προστέθηκαν 180 μl ddH₂O και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20.

	HFE	KATOIII	MKN45	NUGC4	HT29	SKBR3	HCT116	MCF7	NRT (HFE)
RNA (ng/μl)	525	825	1000	825					
RNA μl(αντίδραση)	2	1,5	1	1,5	5	5	5	5	5
WFI μl(αντίδραση)	8	8,5	9	8,5	5	5	5	5	5
Mix μl	8	8	8	8	8	8	8	8	8

2.2.8) QPCR και ανάλυση:

Η ποσοτική PCR (qPCR) χρησιμοποιεί φθορισμό πραγματικού χρόνου για τη μέτρηση ποσότητας DNA που υπάρχει ανά κύκλο αντίδρασης. Η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη και υπάρχουν πολλές προσεγγίσεις για την παραγωγή σήματος. Στην παρούσα διατριβή έγινε χρήση της χρωστικής SYBR green που προσδένεται στο δίκλωνο DNA. Το σημείο στο οποίο η μέθοδος ανιχνεύει το φθορίζον σήμα πάνω από το θόρυβο υπόβαθρου καλείται κύκλος ποσοτικοποίησης ή τιμή C_q. Η τιμή αυτή μας επιτρέπει να αξιολογήσουμε την σχετική ποσότητα στόχου μεταξύ δειγμάτων ή για ακριβή ποσοτικοποίηση με χρήση κατάλληλης πρότυπης καμπύλης από σειριακές αραιώσεις γνωστής ποσότητας DNA. Χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην μέτρηση γονιδιακής έκφρασης και διαφορές στον αριθμό αντιγράφων. Για την QPCR και ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CFX, οι συνθήκες φαίνονται παρακάτω.

Αντιδραστήρια	Αντιδράσεις
2xBuffer K	7.5 μl
Forward primer + 10 mM dNTPs	1 μl
Reverse primer + 10 mM dNTPs	1 μl
H ₂ O	1,5 μl
cDNA (1/200x)	4 μl
Final volume	15 μl

2.2.9) Σχεδιασμός εκκινητών:

Με τη βοήθεια του προγράμματος Primerquest σχεδιάστηκαν primers έναντι των γονιδίων των επιλεγμένων από τη μετανάλυση lncRNA, οι οποίοι ελέγχθηκαν για την μοναδικότητα στόχευσης και λειτουργικότητας μέσω του εργαλείου *in silico* PCR του UCSC genome browser.

Primers	Αλληλουχίες
GRACILE11_F1	CAGTGGAGGTTGACAGGAATATC
GRACILE11_R1	CTTCAGTTACAACAGGCCATCT
GAPDH_F1	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG
GAPDH_R1	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA
RPLP1_F1	AAGCAGCCGGTGTAAATGTTGAGC
RPLP1_R1	CATTGCAGATGAGGCTCCCAATGT

GrACILE1 : GAstric Cancer Induced LincRNA 1

Όμοια σχεδιάστηκαν εκκινητές για διάγνωση μόλυνσης από μυκόπλασμα και πραγματοποιήθηκε έλεγχος μέσω PCR. Οι εκκινητές φαίνονται παρακάτω.

Primers	Αλληλουχίες
Actin F1:	CATCCTGCGTCTGGACCT
Actin R1:	TGATGACCTGGCCGTCAG
MYCO F1:	CCRTGCACCAAYCTGTCWHHHHBGWWAACCTC
MYCO R1:	GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATACCCT

Για τη διάγνωση μυκοπλάσματος χρησιμοποιήθηκε μία φιάλη από τα παγωμένα stock των κυττάρων MKN45 και KATO-III ύστερα από απόψυξη. Από τα κύτταρα αυτά έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA όπως περιγράφεται παρακάτω. Αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε tubes όπου προστέθηκε σε αυτά ποσότητα 200 μl buffer T1. Ακολούθησε vortex και προσθήκη 25μl πρωτεΐνης K και

200 µl buffer B3 και ξανά vortex. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 70°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 210 µl αιθανόλης και έγινε vortex. Ακολούθησε μεταφορά σε στήλη και φυγοκέντρηση στις 11.000g. Το waste της στήλης απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500µl buffer BW και συνεχίστηκε η φυγοκέντρηση. Το waste απομακρύνθηκε ξανά και προστέθηκαν 500 µl buffer B5 ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση και απόρριψη του waste. Στη συνέχεια για να ξεραθεί η στήλη και να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση. Μετά προστέθηκαν 25µl elution buffer και έγινε επώαση 3 λεπτών σε πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν μια τελευταία φορά και ακολούθησε PCR με τους εκκινητές. Οι συνθήκες φαίνονται παρακάτω.

MYCOPLASMA		ACTIN	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	1 REACTION	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	1 REACTION
10 X buffer (+15 mM MgCl₂) (Καπα)	2,5 µl	10 X buffer (+15 mM MgCl ₂) (Καπα)	2 µl
MgCl₂ (25 mM)	0,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)	0,4 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	dNTPs (10 mM)	0,8 µl
MYCO FOR (50 pmole/µl)	1 µl	Actin F1 (50 pmole/µl)	1 µl
MYCO REV (50 pmole/µl)	1 µl	Actin R1 (50 pmole/µl)	1 µl
Καπα Taq (5 units/µl)	0,2 µl	Καπα Taq (5 units/µl)	0,2 µl
DNA Template	it depends	DNA Template	it depends
ddH₂O	it depends	ddH ₂ O	it depends
Total volume	25 µl	Total volume	20 µl

2.2.10) Υποκυτταρική κλασμάτωση:

Το πρωτόκολλο αυτό έχει ως σκοπό το διαχωρισμό του κυττάρου σε κλάσματα για τον προσδιορισμό του υποκυτταρικού εντοπισμού του μεταγράφου GrACILe1, καθώς μπορεί να έχει αντίκτυπο στη λειτουργική δράση του. Για την κλασμάτωση έγινε χρήση της καρκινικής σειράς στομάχου KATOIII. Ετοιμάστηκαν 2 σειρές tubes Supernatant1, Supernatant2, Ίζημα (Pellet) . Μετά τη θρυψίνη έγινε επαναδιάλυση του

κυτταρικού ιζήματος σε 1 ml κρούου PBS 1x και μεταφέρθηκαν στα tube P. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000 rpm και σε επόμενη φάση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε στο lysis buffer A (βλ πίνακα). Ακολούθησε έλεγχος της λύσης με ανάμειξη 20 µl κυττάρων με ίδιο όγκο Trypan blue (0,4%) σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ήπια μηχανική κατεργασία (dounce) και ξαναελέγχθηκε με τον ίδιο τρόπο η λύση των κυττάρων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, λήψη του υπερκείμενου και μεταφορά στα tube S2 όπου προστέθηκε τριζόλη και αποθήκευση στους -30°C. Στο ίζημα (tube P) προστέθηκε buffer A και buffer NLB800 σε αναλογία 1:1 και ακολούθησε μεταφορά σε ρότορα για μισή ώρα, 4C. Μετά το χρόνο αυτό έγινε φυγοκέντρηση σε max speed για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στο tube S3, προστέθηκε τριζόλη ίδιου όγκου, ομοίως στο tube P. Ακολούθως ποσότητα των δειγμάτων έτρεξαν σε RNA gel 1% agarose για προσδιορισμό της ποιότητας του RNA. Μετά την κλασμάτωση στο S1 έχουμε το κυτταρόπλασμα, στο S2 το πυρηνόπλασμα και διαλυτό γονιδιωματικό υλικό, ενώ στο P θα έχουμε αδιάλυτη χρωματίνη. Η ποσότητα και καθαρότητα του RNA προσδιορίστηκε με nanodrop.

Για cDNA σύνθεση					
	RNA (ng/µl)	260/280	260/230	µl RNA	µl WFI
KATO S2	218	2.05	1.87	2.75	7.25
KATO S2 *	308	2.06	1.87	1.94	8.06
KATO S3	137	1.85	1.65	4.3	5.7
KATO S3*	464	2.01	1.88	1.29	8.71
KATO P	63	1.66	1.40	10	-
KATO P*	91	1.97	1.65	6.5	3.5

2.2.11) Σχεδιασμός shRNA και κλωνοποίηση:

Για τον σχεδιασμό των αλληλουχιών των shRNA έγινε χρήση του προγράμματος si DESIGN Center της εταιρείας Dharmacon. Επειδή ο πλασμιδιακός φορέας PLKO-Tet-Puro φέρει μόνο μία θέση κλωνοποίησης, ανάμεσα σε δύο θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες AgeI και EcoRI αντίστοιχα, οι αλληλουχίες των shRNA μορίων έχουν σχεδιαστεί να φέρουν τα αντίστοιχα κολλώδη άκρα ώστε να ενσωματωθούν στο φορέα ύστερα από κοπή με τα κατάλληλα ένζυμα και τη χρήση λιγάσης (φαίνονται με μοβ). Τα oligos είναι σχεδιασμένα ώστε στο τελικό construct τα άκρα να είναι μεταλλαγμένα ώστε να αποφευχθεί τυχαία κοπή και μετακίνηση της αλληλουχίας (φαίνεται με κόκκινο). Τα oligos φέρουν επίσης αλληλουχία που θα σχηματίσει την αναδίπλωση του μορίου (φαίνεται με πορτοκαλί).

GRACILE11sh1sense	5' CCGGTGACCATTACAGAGGATA ACTCGAGTTATCCTCTGTAATCCTCA TTTT 3'
GRACILE11sh1antisense	5' AATTAAAAATGACCATTACAGAGGATAA CTCGAGTTATCCTCTGTAATCCTCA 3'

Αρχικά επαναδιαλύθηκαν τα δύο ολιγονουκλεοτίδια (sense/antisense) με κατάλληλη ποσότητα ddH₂O έως τα 0.1 nmol/μl. Στη συνέχεια 11.25 ul από κάθε oligo αναμειχθηκαν με 2.5 ul 10X annealing buffer (1M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH=7.4) και συνενώθηκαν. Μετά την ανάμειξή τους τα oligos μεταφέρθηκαν σε beaker που περιείχε βραστό νερό στους 95 °C για να σπάσουν οι δευτεροταγείς δομές τους και αφέθηκαν να κρυσώσουν ως τους 30 βαθμούς σε waterbath (περίπου 2:30 ώρες) προκειμένου τα sense και antisense oligos να συνδεθούν μεταξύ τους. Για διατήρηση στους -30C τα oligos αραιώθηκαν σε 0,5X annealing buffer (1 μl + 399 μl 0.5X buffer) σε αναλογία 1:400.

Για την προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα ακολούθησε διπλή (ταυτόχρονη) πέψη με CspAI (ισοσχιζομερές του AgeI της Minotech που έχει το ίδιο restriction site) και EcoRI και οι συνθήκες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Ο φορέας ήταν σε συγκέντρωση 1500 ng/μl.

Αντιδραστήρια	Αντιδράσεις (1x)
10X Buffer	10 μl
Plasmid (2μg)	1,5 μl
CSPA1	3 μl
EcoRI	3 μl
H₂O	82.5 μl
Final volume	100 μl

Ο συνολικός χρόνος πέψης διήρκεσε 5 ώρες, ωστόσο στις 3 ώρες λήφθηκαν 5μl αντίδρασης τα οποία έτρεξαν σε gel 2% αγαρόζης προκειμένου να ελεγχθεί ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σωστά (5μl αντίδρασης + 3μl χρωστικής + 10 μl νερό). Στα κομμένα πλασμίδια αναμένονται δύο ζώνες 1 κοντά στις 8kb και 1 στις 1.8kb. Συμπληρώθηκαν 1μl από κάθε ένζυμο στην αντίδραση για αποφυγή κορεσμού. Στο πέρας των 5 ωρών το δείγμα χωρίστηκε σε 2 tubes καθένα με 50 μl αντίδρασης στα οποία προστέθηκαν 12μl χρωστικής και μεταφέρθηκαν σε gel 0,9% αγαρόζης για διαχωρισμό των δύο ζωνών ακολουθούμενη από gel extraction της ζώνης στις 8kb (backbone). Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αγαρόζη του gel καθώς και ο διαχωρισμός της αντίδρασης σε 2 tubes των 50 μl εξυπηρετεί σε διευκόλυνση της λήψης του πλασμιδίου από το gel καθώς η αγαρόζη αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα. Η εξαγωγή του πλασμιδίου από το gel έγινε με χρήση του Macherey-Nagel Nucleospin Gel and PCR cleanup Gel extraction kit με βάση τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης του φορέα με Qubit με βάση τις οδηγίες του kit. Η τελική συγκέντρωση του κομμένου και καθαρισμένου πλασμιδίου ήταν 62,8ng/μl. Για να γίνει ενσωμάτωση της αλληλουχίας των oligos στο φορέα πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης με το ένζυμο λιγάση T4, οι συνθήκες της οποίας φαίνονται παρακάτω

Reagents	Reaction 1x
10X Buffer	2 μl
T4 ligase	2μl
Oligos (diluted)	2μl
Vector (1500 ng/μl)	1μl
H ₂ O	13μl
Final Volume	20 μl

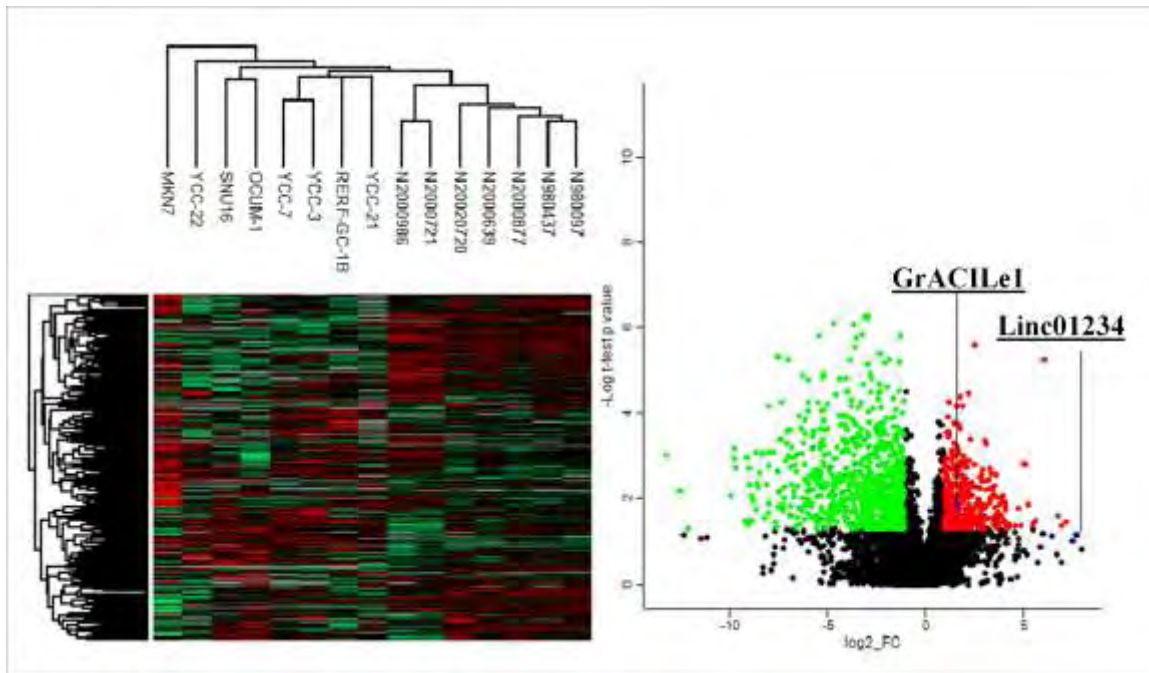
Για την κλωνοποίηση του transfer vector (shRNA sequence+ Vector backbone) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Ecoli X11 blue. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν δύο κλωνοποιήσεις. Σε ένα tube αναμείχθηκαν 30μl βακτηρίων με 20 μl transfer vector, ενώ σε άλλο 30 μl βακτηρίων με 20 μl πλασμιδίου χωρίς το ένθεμα (empty vector) το οποίο λειτούργησε ως μάρτυρας της αντίδρασης λιγάσης. Η διαδικασία έγινε με heat shock όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα 2.2.3. Από το στάδιο επιλογής στα τρυβλία προέκυψαν πολλές αποικίες πέντε εκ των οποίων μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 1ml θρεπτικού LBamp για ολονύκτια καλλιέργεια ακολουθούμενη από εξαγωγή με mini prep μέσω αλκαλικής λύσης. Όσον αφορά το mini prep ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα. Αρχικά το μείγμα της καλλιέργειας από κάθε falcon μεταφέρθηκε σε tube 2 ml, φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στους 4 βαθμούς και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Στα βακτήρια προστέθηκε κρύο buffer I (resuspension buffer 50 mM Tris, 10 mM, 100 ug/μl RNase A) όγκου 100μl και έγινε vortex. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl φρέσκου bufferII (lysis buffer 1% SDS, 0,2M NaOH), το μείγμα αναδεύτηκε ήπια και αφέθηκε σε θ.δ. για 5 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 150 μl κρύου buffer III (equilibrium buffer 3M KoAC pH 6) και το μείγμα αφέθηκε στν πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση 15 λεπτών σε μέγιστη ταχύτητα, στους 4°C, λήφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε σε αυτό 1ml EtOH. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στους -20 για 20 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση 20 λεπτών στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο στη συνέχεια απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν 500 μl 70% EtOH. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια τα ιζήματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και επαναδιαλύθηκαν σε 70 μl WFI. Για καθέναν από τους 5 κλώνους έγινε διαγνωστική πέψη με το ένζυμο XhoI (Wee et al., 2008; Wiederschain et al., 2009) με σκοπό την εύρεση θετικών κλώνων αναφορικά με την κλωνοποίηση του ενθέματος.

Reagents	Reaction 1x
10X Buffer	2 μl
XhoI	2μl
Transfer Vector	5μl
H ₂ O	11μl
Final Volume	20 μl

3) Αποτελέσματα:

3.1) Μετανάλυση δεδομένων μεταγραφομικής:

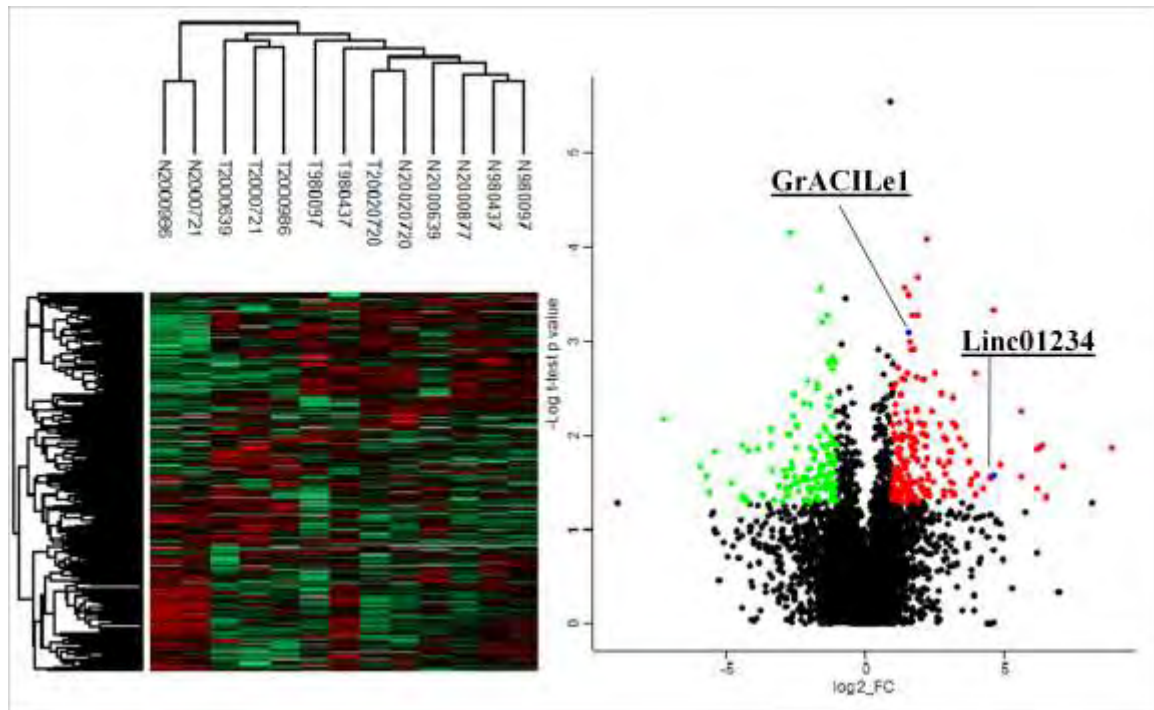
Προκειμένου ένα γονίδιο να χαρακτηριστεί ως επαγωγέας ή καταστολέας μιας παθολογικής κατάστασης πρέπει να πληρεί ορισμένα κριτήρια. Ένα βασικό κριτήριο είναι να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ της φυσιολογικής και της παθολογικής κατάστασης. Στην περίπτωση του καρκίνου υπάρχει πληθώρα δεδομένων αλληλούχησης νέας γενιάς μεταγραφώματος (RNAseq) σε καρκινικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές που υποδεικνύουν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων στον καρκίνο του στομάχου. Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα RNAseq καρκινικών σειρών και φυσιολογικών δειγμάτων τα οποία μεταναλύθηκαν με το πρόγραμμα Perseus με σκοπό τον εντοπισμό διαφορικά εκφρασμένων μεταγράφων μέσω της δημιουργίας θερμικών χαρτών και γραφήματος volcano. Στο διάγραμμα της εικόνας 3.1, στο οποίο αναπαριστάται η διαφορική ρύθμιση γονιδίων (μη κωδικών) από την σύγκριση φυσιολογικών και καρκινικών σειρών. Στον κάθετο άξονα έχουμε τροποποιημένα για θετικές τιμές P values που υποδεικνύουν στατιστική σημαντικότητα ενώ στον οριζόντιο άξονα βλέπουμε το πρότυπο ρύθμισης με πρασινο -, κοκκινο +.



Εικόνα 3.1: Heat map και volcano plot που προέκυψαν από δεδομένα RNAseq σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στο κόκκινο αντιστοιχούν γονίδια που υπερεκφράζονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο, με πράσινο αυτά που υποεκφράζονται, με μπλε τα μετάγραφα GrACILe1 και Linc01234.

Αν και τα αποτελέσματα αυτά μας δίνουν πληροφορίες για τη διαφορική μεταγραφική ρύθμιση μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού δείγματος, στηρίζονται σε

ένα *in vitro* μοντέλο που πιθανόν να αποκλίνει από το *in vivo*. Για το λόγο αυτό μεταναλύθηκαν παράλληλα και δεδομένα μεταγραφομικής αλληλούχησης νέας γενεάς από βιοψίες ασθενών με σκοπό την σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών ιστών ώστε να υπάρξει επιβεβαίωση των *in vitro* αποτελεσμάτων και από *in vivo* δεδομένα (Εικ 3.2).



Εικόνα 3.2: Heat map και volcano plot που προέκυψαν από δεδομένα RNAseq σε φυσιολογικές και καρκινικές βιοψίες ασθενών. Με κόκκινο αντιστοιχούν γονίδια που υπερεκφράζονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο, με πράσινο αυτά που υποεκφράζονται, με μπλε τα μετάγραφα GrACILE και Linc01234.

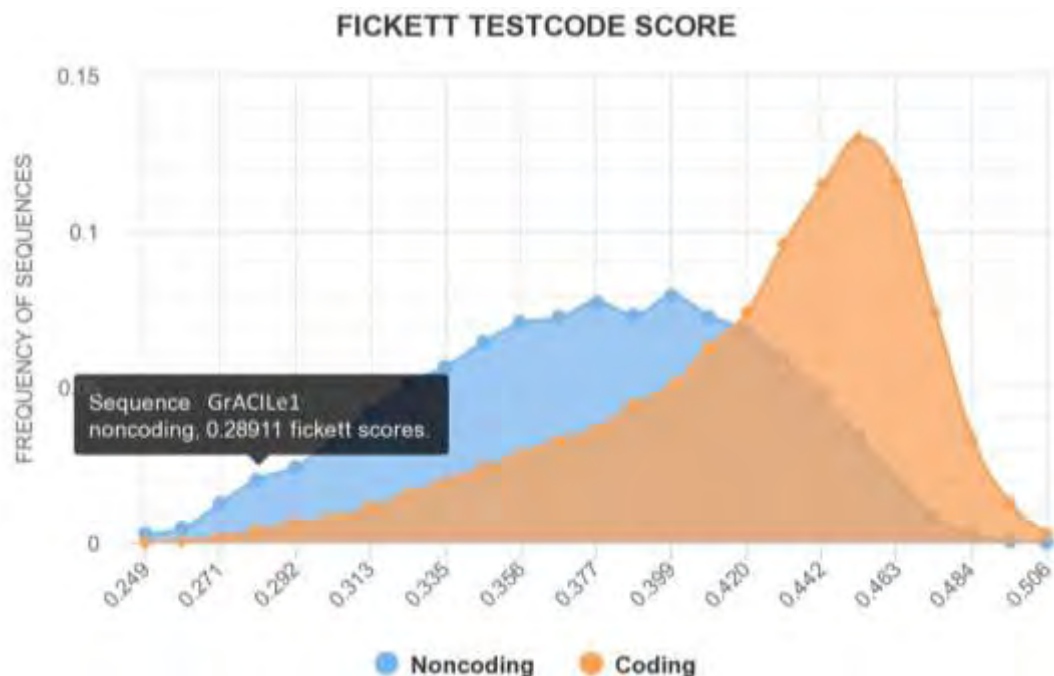
Οι διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων είναι εμφανείς. Κάτι που γίνεται άμεσα αισθητό είναι η διαφορά στην ομαδοποίηση των δειγμάτων στην περίπτωση των *in vitro* και *in vivo* δεδομένων. Στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών παρατηρούμε ότι η ομαδοποίηση φέρνει πιο κοντά τις κυτταρικές σειρές μεταξύ τους, όμοια τα φυσιολογικά δείγματα ομαδοποιούνται ως επί το πλείστον μεταξύ τους. Αντίθετα στην περίπτωση των ιστών βλέπουμε ότι τα δείγματα των καρκινικών ιστών ομαδοποιούνται ως επί το πλείστον πιο κοντά στο φυσιολογικό ιστό ζεύγος τους, δηλαδή το αντίστοιχο φυσιολογικό δείγμα του ίδιου ασθενή.

Στη συγκεκριμένη διατριβή θα εστιάσουμε σε πιθανούς ογκοεπαγωγείς, δηλαδή μη κωδικοποιητικά μετάγραφα τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στην παθολογική κατάσταση με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Από τα volcano plots προέκυψε μια πληθώρα διαφορετικά εκφρασμένων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (>100) από τα οποία τελικά επιλέχθηκαν 20 μετάγραφα τα οποία παρουσίαζαν μεγάλο εύρος αλλαγής της έκφρασής τους μεταξύ των δύο καταστάσεων με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Από

την ομάδα αυτή επιλέχτηκε ένα μετάγραφο το οποίο από εδώ και στο εξής θα αποκαλούμε GrACILe1 (Gastric Cancer Induced LincRNA 1) και στο οποίο εστιάζεται το πειραματικό κομμάτι της παρούσας πτυχιακής. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί πως το μετάγραφο Linc01234 (βλ εισαγωγή) (X. Chen et al., 2018) , το οποίο φαίνεται και στα γραφήματα volcano, πρόκειται για ένα πρόσφατα δημοσιευμένο μετάγραφο το οποίο προέκυψε μεταξύ άλλων στη λίστα των 20 μεταγράφων που επιλέχθηκαν. Στην παρούσα διατριβή το μετάγραφο αυτό αξιοποιείται για αντιπαραβολή δεδομένων με το GrACILe1.

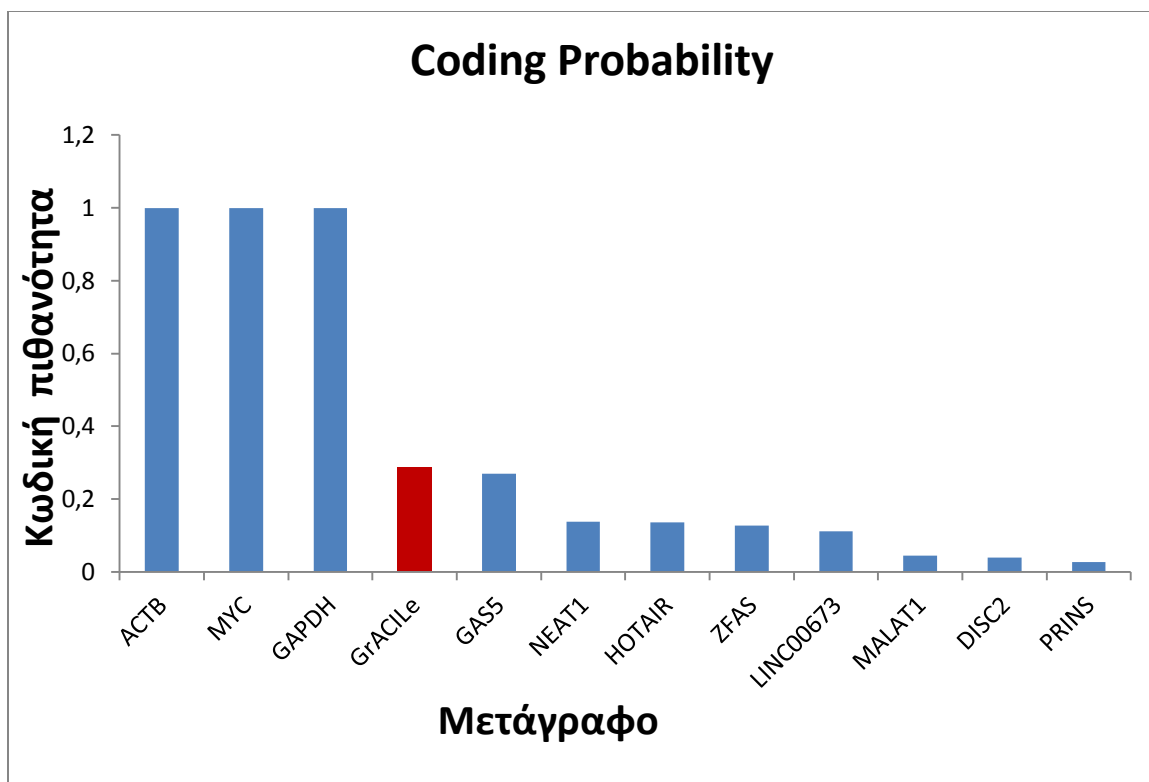
3.2) Δυναμικό κωδικοποίησης:

Στην εισαγωγή πραγματοποιήθηκε περιγραφή των λειτουργιών και χαρακτηριστικών των μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (lncRNA). Το βασικότερο χαρακτηριστικό τους είναι το γεγονός πως δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ωστόσο παρουσιάζουν παραπλήσια χαρακτηριστικά με τα mRNA δηλαδή μεταγράφονται από γονίδια μέσω της RNApol-II, έχουν μορφή εξονίων-ιντρονίων και υφίστανται μάτισμα ενώ τα περισσότερα φέρουν 5' καλύπτρα και πολυαδενυλιωμένη ουρά. Προκειμένου να χαρακτηριστεί ένα μετάγραφο κωδικό χρησιμοποιούνται ειδικά βιοπληροφορικά εργαλεία πρόβλεψης. Τα εργαλεία αυτά στηρίζονται σε στατιστικά μοντέλα τα οποία λαμβάνουν υπόψη διάφορα χαρακτηριστικά αλληλουχιών όπως είναι το μήκος ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) σε σχέση με την ολική αλληλουχία και η προτίμηση κωδικονίων (Fickett score) (Kang et al., 2017). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το GrACILe1 ανήκει στα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα έγινε χρήση του προγράμματος CPC2 (<http://cpc2.cbi.pku.edu.cn/index.php>) με σκοπό την ανάλυση του δυναμικού κωδικοποίησης και της σύγκρισης του έναντι όλου του ανθρώπινου μεταγραφώματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το GrACILe1 προκύπτει να έχει μη κωδικοποιητικό δυναμικό με τιμή που εμπίπτει στον μέσο όρο όλων των ανθρώπινων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων, και άρα ελάχιστες πιθανότητες να κωδικοποιεί κάποια λειτουργική πρωτεΐνη (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Διάκριση μεταξύ κωδικών και μη κωδικών μεταγράφων με βάση το μήκος προβλεπόμενης πιθανής πρωτεΐνης και τη συχνότητα των αλληλουχιών. Με μπλε εμφανίζεται το μη κωδικό πλαίσιο και με πορτοκαλί το κωδικό. Στο σχήμα στηνμπλε περιοχή το μαύρο πλαίσιο αντιστοιχεί στην αλληλουχία του GrACILe1 το οποίο βρίσκεται στο κατώτατο όριο τιμών όλων των ανθρώπινων ncRNAs.

Όπως ειπώθηκε όμως παραπάνω το πρόγραμμα στηρίζεται σε στατιστικά μοντέλα ανάλυσης αλληλουχιών, δηλαδή προβλέπει μια τιμή βάση της αλληλουχίας. Για το λόγο αυτό το δυναμικό κωδικοποίησης του GrACILe1 συγκρίθηκε με το δυναμικό χαρακτηρισμένων (*bona fide*) κωδικών και μη κωδικών μεταγράφων. Στο πρόγραμμα ενσωματώθηκαν οι αλληλουχίες προβλεπόμενων mRNA σε FASTA από τον φυλλομετρητή UCSC του GrACILe1, των κωδικών ACTB, MYC, GAPDH και των μη κωδικών GAS5, NEAT1, HOTAIR, ZFA5, LINCOO673, MALAT1, DISC2, PRINS. Με βάση το αποτέλεσμα της ανάλυσης κατασκευάστηκε διάγραμμα κωδικής πιθανότητας (Εικόνα 3.4).

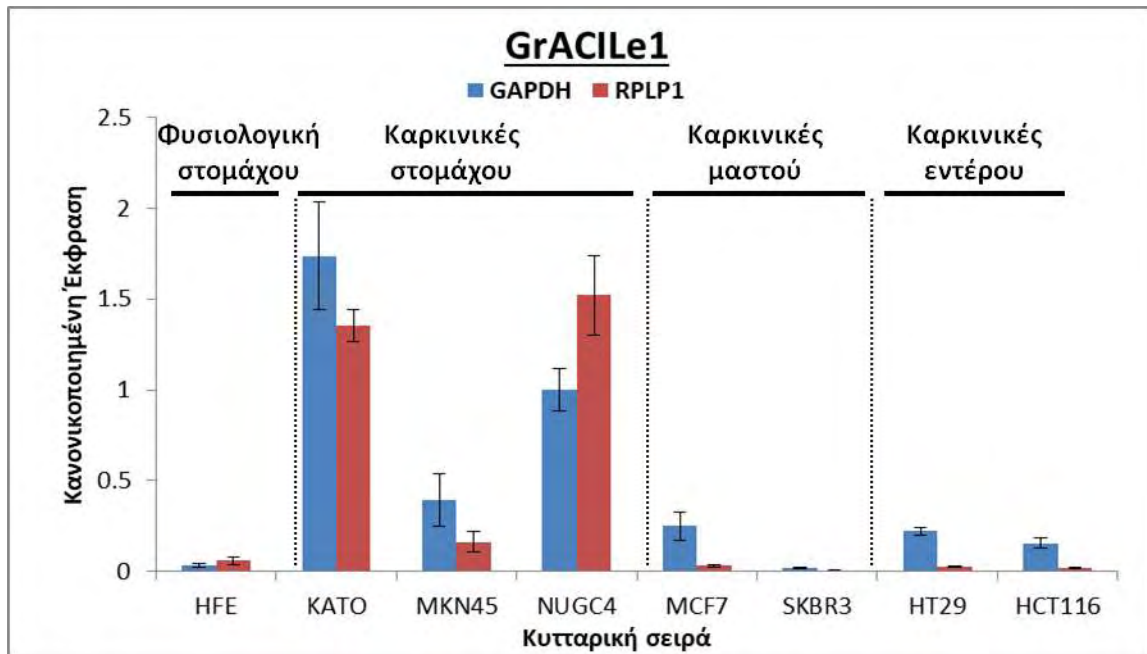


Εικόνα 3.4: Στο διάγραμμα εμφανίζεται σε κλίμακα από 0 έως 1 η πιθανότητα κωδικοποίησης των προβλεπόμενων mRNA για τα γονίδια: *bona fide* κωδικά ACTB, MYC, GAPDH και *bonafide* μη κωδικά GAS5, NEAT1, HOTAIR, ZFA5, LINC00673, MALAT1, DISC2, PRINS με μπλε και με κόκκινο το GrACILe1.

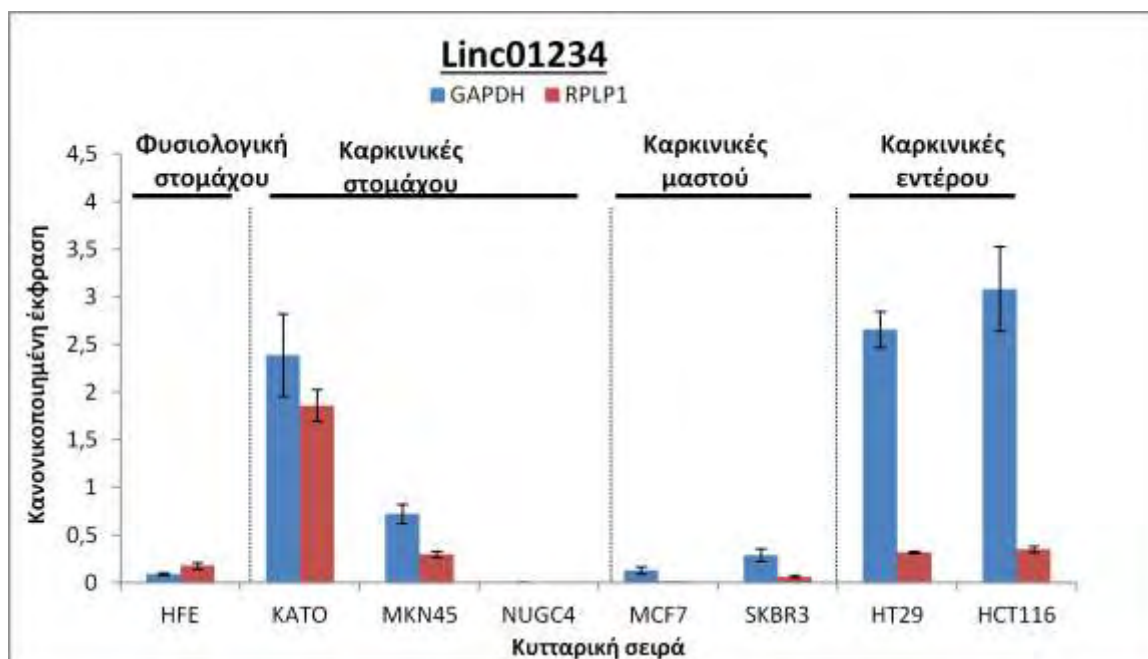
Συγκρίνοντας τις πιθανότητες κωδικοποίησης των προβλεπόμενων mRNA των γονιδίων αυτών μπορούμε να πούμε με ασφάλεια ότι το μετάγραφο GrACILe1 ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των μη κωδικών μεταγράφων, με πιθανότητα κωδικοποίησης συγκρίσιμη με πειραματικά αποδεδειγμένα lncRNAs.

3.3) Πρότυπο έκφρασης του GrACILe1 στον καρκίνο:

Μετά την επιλογή του προς μελέτη μεταγράφου το επόμενο βήμα ήταν ο προσδιορισμός του προφίλ έκφρασής του σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε QPCR και ανάλυση των αποτελεσμάτων έκφρασης σε 8 κυτταρικές σειρές, που αποτελούνται από μια φυσιολογική σειρά στομαχικού επιθηλίου, τρεις καρκινικές σειρές στομάχου, δύο καρκινικές σειρές μαστού και δύο καρκινικές σειρές εντέρου. Εδώ να σημειωθεί ότι προηγήθηκε εξαγωγή RNA σε κάθε κυτταρική σειρά και μετατροπή των μεταγράφων σε cDNA όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Από τις σειρές αυτές η σειρά HFE αντιστοιχεί σε φυσιολογική σειρά επιθηλίου στομάχου, οι σειρές KATO, MKN45 και NUGC4 αντιστοιχούν σε καρκινικές σειρές στομάχου, οι σειρές MCF7 και SKBR3 σε καρκινικές σειρές μαστού, οι σειρές HT29 και HCT116 σε καρκινικές σειρές παχέος εντέρου. Τα δεδομένα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση των GAPDH και RPLP1 όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα. Η έκφραση των housekeeping γονιδίων παρατηρήθηκε ήδη από τους 16 κύκλους, ενώ η έκφραση του GrACILe1 παρατηρήθηκε στους 24-28 κάτι κοινό μεταξύ των περισσότερων γονιδίων που μεταγράφονται σε lncRNA. Δεν παρατηρήθηκαν επιμολύνσεις στα NTC και NRT control, ενώ από το melt curve δεν υπήρχε ένδειξη για διμερή εκκινητών.



Εικόνα 3.5: Προφίλ έκφρασης του GrACILe1 ύστερα από qPCR σε 8 κυτταρικές σειρές, εκ των οποίων μία φυσιολογική και 7 καρκινικές. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς GAPDH (μπλε) και RPLP1 (κόκκινο).



Εικόνα 3.6: Προφίλ έκφρασης του Linc01234 ύστερα από qPCR σε 8 κυτταρικές σειρές, εκ των οποίων μία φυσιολογική και 7 καρκινικές. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς GAPDH (μπλε) και RPLP1(κόκκινο).

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 3.5) βλέπουμε ότι στη φυσιολογική σειρά το GrACILe1 δεν παρουσιάζει καθόλου έκφραση, ενώ αντίθετα στις τρεις καρκινικές σειρές του στομάχου παρουσιάζει σημαντική υπερέκφραση. Γίνεται αντιληπτό ότι εκφράζεται λιγότερο στη σειρά MKN45 σε σχέση με τις άλλες δύο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικό υπότυπο καρκίνου στον οποίο ανήκει η συγκεκριμένη σειρά σε σχέση με τις άλλες δύο. Οι υπόλοιπες σειρές που αντιστοιχούν σε μαστό και παχύ έντερο δεν φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντική έκφραση για το συγκεκριμένο γονίδιο. Με τον τρόπο αυτό υποδεικνύεται και η ιστοειδικότητα της έκφρασης του μεταγράφου στον καρκίνο του στομάχου. Τα δεδομένα αυτά επαληθεύονται και από τα δεδομένα RNAseq στα οποία παρατηρείται έκφραση του μεταγράφου μόνο σε καρκινικούς ιστούς στομάχου. Εφόσον παρατηρείται έκφραση μόνο στις καρκινικές σειρές του στομάχου και όχι στη φυσιολογική σειρά μπορούμε να πούμε πως το GrACILe1 αποτελεί έναν εν δυνάμει ογκοεπαγωγέα.

3.4) Μετανάλυση ομολογίας και έκφραση σε φυσιολογικούς

ιστούς:

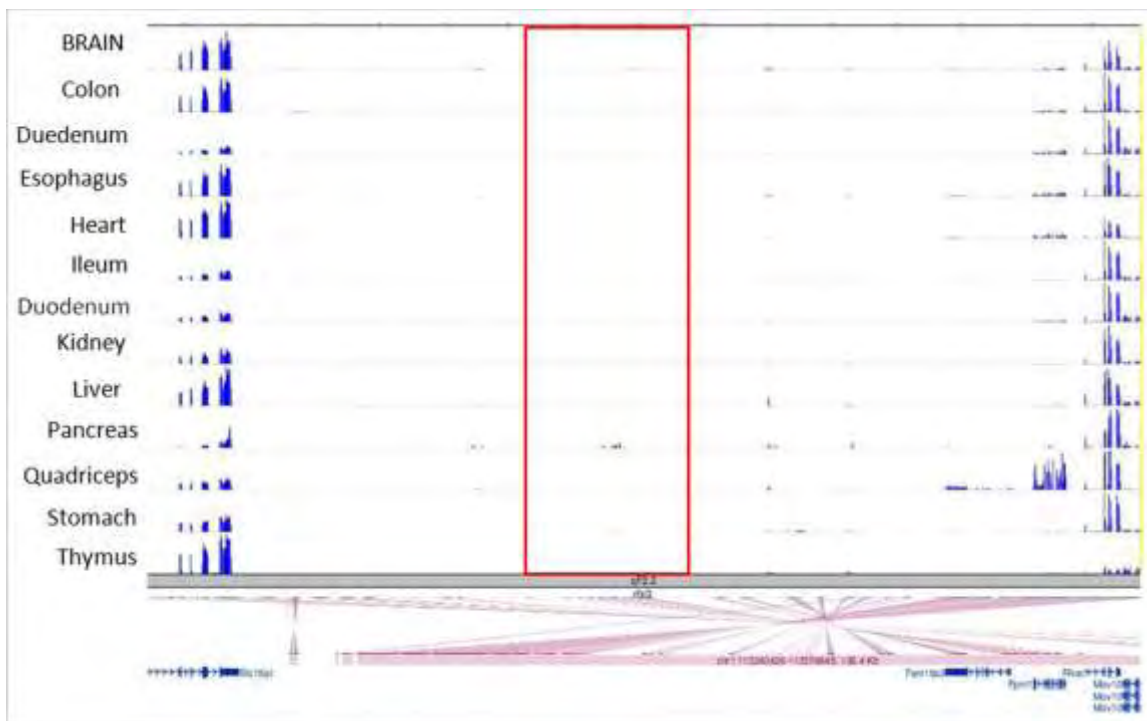
Με τη βοήθεια του γονιδιωματικού φυλλομετρητή UCSC προσδιορίστηκε η αλληλουχία του γονιδίου και η θέση του στο γονιδίωμα, πιο συγκεκριμένα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1. Φορτώνοντας στον φυλλομετρητή δεδομένα RNAseq από φυσιολογικά δείγματα ανθρώπινων ιστών (συμπραξία GTEX) μπορούμε να δούμε το προφίλ

έκφρασης του γονιδίου στον άνθρωπο υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι το GrACILe1 δεν εκφράζεται καθόλου στο στομάχι ή σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Γονιδιωματική θέση του GrACILe1 στο ανθρώπινο γονιδίωμα και δεδομένα RNAseq με σκοπό τον προσδιορισμό του προφίλ έκφρασής του. Το μετάγραφο δεν εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς.

Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν και τα αποτελέσματα της QPCR. Όπως ειπώθηκε παραπάνω οι κυτταρικές σειρές αποτελούν ένα *in vitro* σύστημα και μπορεί να αποκλίνουν από το επίπεδο ιστού ή οργανισμού. Για την καλύτερη μελέτη της λειτουργίας και του ρόλου του μεταγράφου του GrACILe1, καθώς και για κάθε μετάγραφο είναι αναγκαία η μελέτη της λειτουργίας του στο επίπεδο οργανισμού. Ο οργανισμός που χρησιμοποιείται ιδανικά σε τέτοιες περιπτώσεις είναι ο ποντικός. Αν είναι να μελετηθεί όμως η δράση του μεταγράφου στον ποντικό είναι απαραίτητο σε πρώτη φάση να δούμε αν ο ποντικός φέρει στο γονιδίωμά του κάποιο ομόλογο του GrACILe1, κάτι το οποίο είναι γενικά σπάνιο για τα lncRNAs σε αντίθεση με τα κωδικά γονίδια που είναι συντηρημένα σε μεγάλο βαθμό.

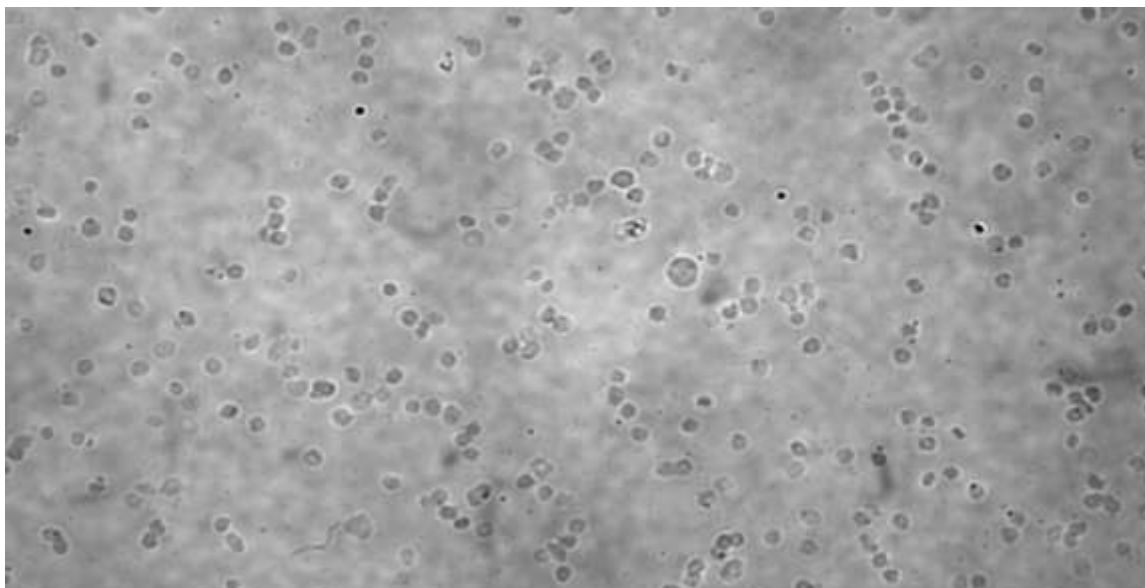


Εικόνα 3.8: Αποτέλεσμα ανάλυσης ομολογίας στο ποντίκι με χρήση του φυλλομετρητή WASHU. Δεν παρατηρείται μεταγραφή στο αντίστοιχο σημείο που θα βρισκόταν το γονίδιο του GrACILe1 σε δείγματα υγιών ποντικών.

Το αποτέλεσμα την ανάλυσης συνταινίας-έκφρασης σε φυσιολογικούς ιστούς ποντικών ήταν ότι δεν παρατηρείται μεταγραφή ενδιάμεσα των γονιδίων γειτόνων του GrACILe1 (Εικόνα 3.8). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι στο ποντίκι δεν υπάρχει κάποιο ομόλογο για το γονίδιο που μελετάμε. Καθότι ούτε στους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς παρατηρείται έκφραση του και εφόσον δεν διαθέτουμε δεδομένα για καρκίνο στομάχου στο ποντίκι σε αυτή τη φάση του πειράματος, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός της ύπαρξης ομολόγου στον ποντικό, το οποίο εκφράζεται αποκλειστικά σε καρκινικούς ιστούς στομάχου.

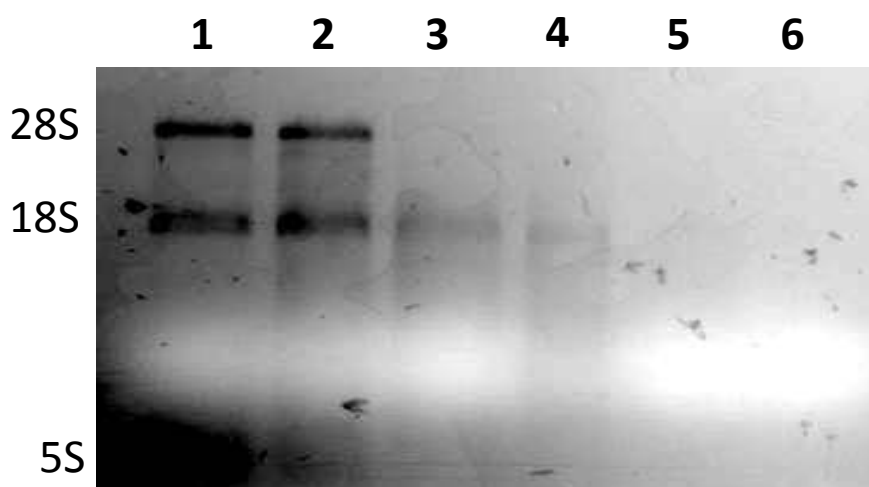
3.5) Υποκυτταρική κλασμάτωση:

Το επόμενο βήμα για τη μελέτη του GrACILe1 αποτέλεσε ο προσδιορισμός του υποκυτταρικού εντοπισμού του, το οποίο και επετεύχθη μετά από υποκυτταρική κλασμάτωση κυττάρων της σειράς KATOIII. Η σειρά αυτή παρουσίαζε την υψηλότερη έκφραση του μεταγράφου. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός στην περίπτωση των lncRNA μεταγράφων είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το λειτουργικό τους ρόλο στο κύτταρο, καθώς έχουν διακριτούς ρόλους στα διάφορα διαμερίσματα του κυττάρου όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή. Στους πυρήνες έγινε χρώση με Trypan blue ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία των κυτταρικών μεμβρανών (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9: Κύτταρα της σειράς KATO ύστερα από χρώση με Trypan blue στο στάδιο πριν τη λύση των μεμβρανών.

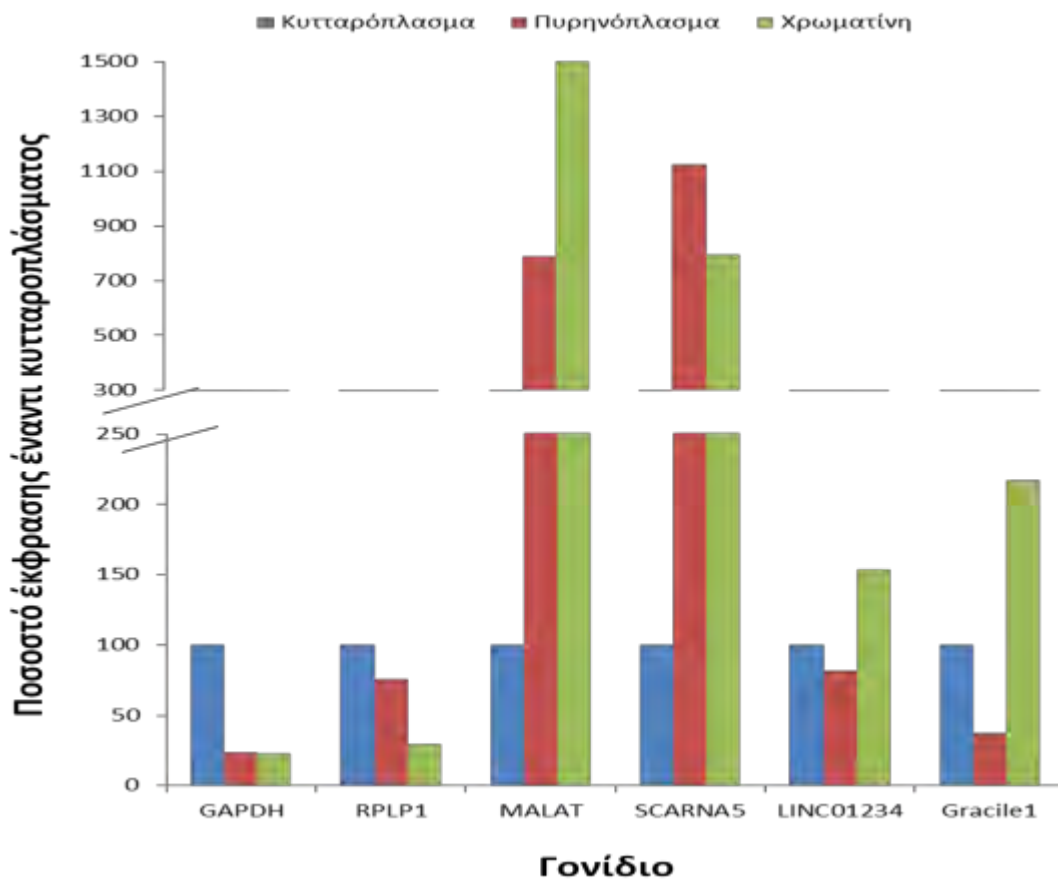
Ο διαχωρισμός οδήγησε σε τρία υποκυτταρικά κλάσματα: το πρώτο στο οποίο βρίσκονταν τα στοιχεία του κυτταροπλάσματος, το δεύτερο στο οποίο βρίσκονταν στοιχεία του πυρηνοπλάσματος και μέρος της υδατοδιαλυτής χρωματίνης και στο τρίτο το οποίο έφερε την αδιάλυτη χρωματίνη. Για τα δείγματα αυτά ακολούθησε εξαγωγή του RNA. Για να βεβαιωθούμε ότι δεν υπήρξε αποικοδόμηση του RNA δείγματα από κάθε κλάσμα έτρεξαν σε RNA gel TBE 1% (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Gel TBE 1% στο οποίο έτρεξαν δείγματα ύστερα από την εξαγωγή RNA από κάθε υποκυτταρικό κλάσμα. Για κάθε κλάσμα φορτώθηκαν δύο πηγάδια-δείγματα.

Φορτώθηκαν συνολικά έξι πηγάδια, δύο για κάθε υποκυτταρικό κλάσμα όπου τα πρώτα δύο πηγάδια αντιστοιχούν σε κυτταροπλασματικό κλάσμα, τα πηγάδια 3 και 4 στο

κλάσμα του πυρηνικού φακέλου και διαλυτού DNA, τα πηγάδια 5 και 6 στο κλάσμα της αδιάλυτης χρωματίνης. Στην παραπάνω Εικόνα φαίνονται τρεις διακριτές ζώνες που αντιστοιχούν με σειρά από πάνω προς τα κάτω στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και τέλος στην 5S και τα tRNAs. Στο κλάσμα της αδιάλυτης χρωματίνης δεν παρατηρείται καθόλου RNA το οποίο είναι φυσικό καθώς δεν υπάρχουν ριβοσώματα στον πυρήνα, πράγμα που υποδηλώνει και επιτυχία της κλασμάτωσης. Το γεγονός ότι παρατηρούνται και οι τρεις διακριτές ζώνες μας πληροφορεί πως το RNA των δειγμάτων είναι καλής ποιότητας, όχι αποικοδομημένο και συνεπώς μπορούμε να προχωρήσουμε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής προς σχηματισμό cDNA και στη συνέχεια QPCR για κάθε κλάσμα. Στο παρακάτω διάγραμμα παρατίθενται τα αποτελέσματα της qPCR.



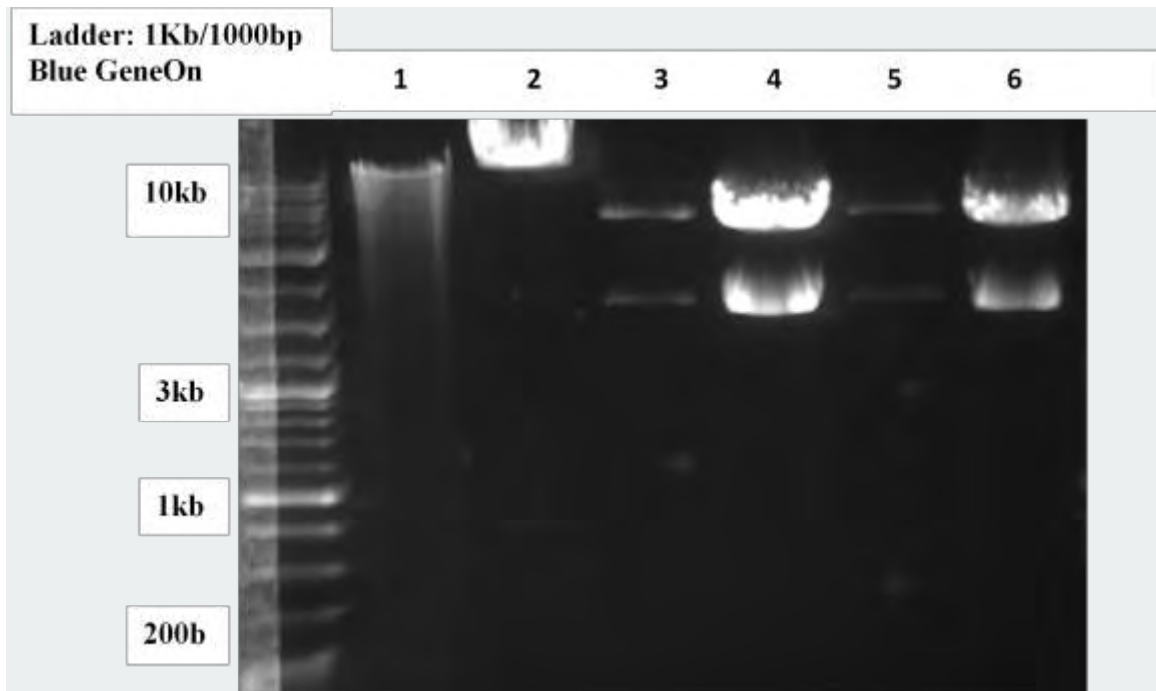
Εικόνα 3.11: Αποτελέσματα qPCR με σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό του μεταγράφου. Τα αποτελέσματα παρατίθενται ως επί τοις εκατό ποσοστό της έκφρασης στο κλάσμα του κυτταροπλάσματος.

Στο διάγραμμα (Εικόνα 3.11) βλέπουμε ότι το μετάγραφο που μελετούμε βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στο κλάσμα της αδιάλυτης χρωματίνης σε αναλογία περίπου 1-1.

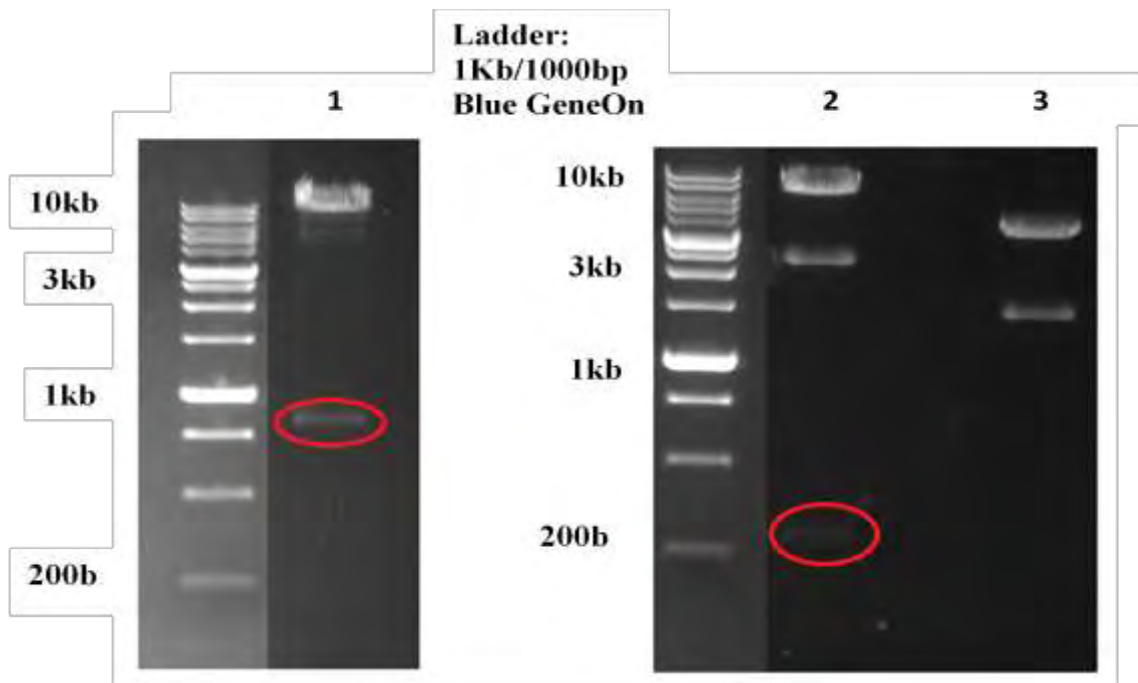
3.6) Προετοιμασία και επαλήθευση πλασμιδιακών φορέων:

Στις προηγούμενες ενότητες έχει αναφερθεί ότι το μετάγραφο GrACILe1 είναι ένας δυνητικός επαγωγέας της καρκινογένεσης στο στομάχι καθώς η έκφρασή του αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Προκειμένου να ελεγχθεί ο ρόλος του στην καρκινογένεση σχεδιάστηκε η επαγόμενη καταστολή της έκφρασής του μέσω παρεμβολής RNA (RNAi). Για την επίτευξη της καταστολής σχεδιάστηκαν μόρια shRNA, τα οποία περιγράφονται στην ενότητα των υλικών και μεθόδων. Η χορήγηση και επαγόμενη υπερέκφραση των μορίων αυτών σε επιλεγμένες κυτταρικές σειρές προϋποθέτει την κλωνοποίηση σε πλασμιδικούς φορείς, πιο συγκεκριμένα τον φορέα Tet-Plko-puro της εταιρείας Addgene. Το πλασμίδιο αυτό ανήκει σε μια ομάδα πλασμιδίων τα οποία χρησιμοποιούν ως φορείς λεντιούς (βλ. παράρτημα) τόσο για την είσοδο στο κύτταρο όσο και για την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα των κυττάρων. Για τον μετασχηματισμό απαιτούνται δύο ακόμα πλασμίδια τα psPAX και pMD2.G τα οποία φέρουν τα απαραίτητα στοιχεία για το πακετάρισμα του construct μετασχηματισμού και τα το σχηματισμό των ιικού καψιδίου αντίστοιχα. Τα πλασμίδια αρχικά κλωνοποιήθηκαν με κύτταρα *E.coli* XL1blue και στη συνέχεια απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν μέσω του midi prep kit Macherey Nagel Xtra Plasmid purification kit MIDI protocol. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη με περιοριστικά ένζυμα προκειμένου να επαληθευτεί η ορθότητα και ακεραιότητα των πλασμιδίων.

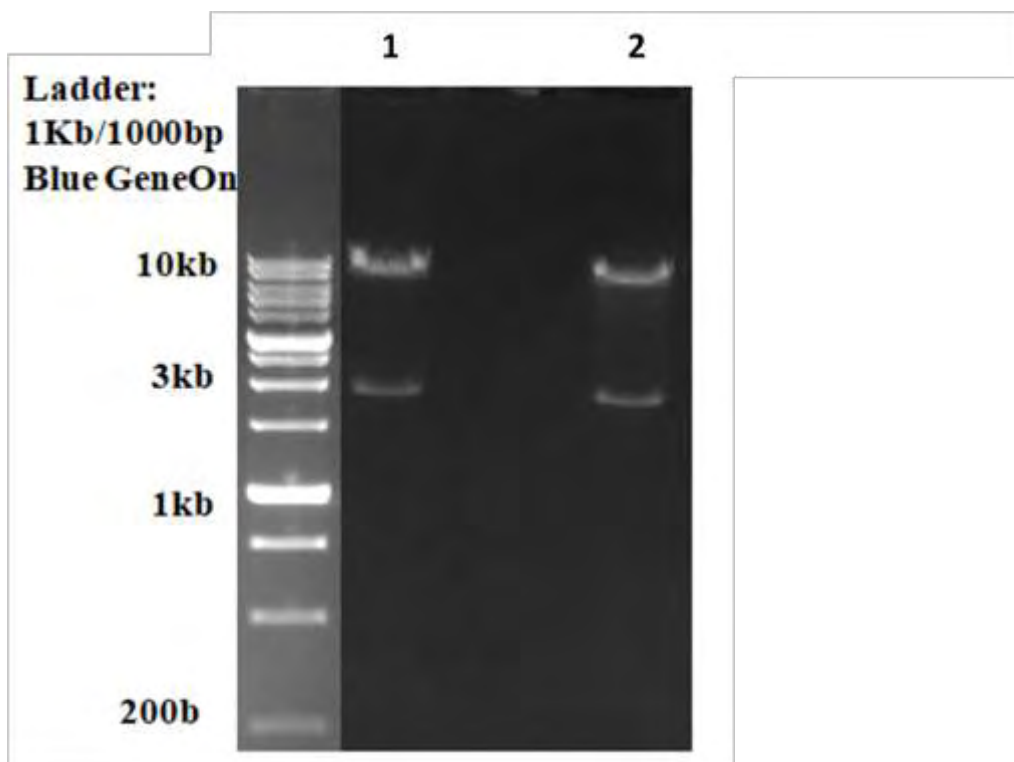
Για το σκοπό αυτό οι αλληλουχίες κάθε πλασμιδίου φορτώθηκαν στο πρόγραμμα Serial cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) και επιλέχθηκαν με βάση αυτό τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε κοπή των πλασμιδίων με το ένζυμο EcoRI (της εταιρείας NEB) το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-G/AATTC-3' και την συμπληρωματική της 3'-CTTAA/G-5' και κόβει αμέσως μετά και πριν από τη γουανίνη. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε όμοια διαγνωστική πέψη με το ένζυμο KpnI (της NEB) το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GGTAC/C-3' και την συμπληρωματική της αλυσίδα 3'-C/CTAGG-5' και κόβει μεταξύ των δύο κυτοσινών. Στο πρώτο πείραμα έτρεξαν σε gel αγαρόζης δύο δείγματα για κάθε πέψη, ενώ στο δεύτερο από ένα (εικόνες 3.12 και 3.13 αντίστοιχα). Με βάση το πρόγραμμα προβλέπεται ότι από το ένζυμο EcoRI προκύπτουν για το Plko1 ζώνη στις 10,633 bp, για το psPAX2 2 ζώνες μία στις 6,298 bp και μία στις 4,370 bp, για το pMD2.G2 ζώνες μία στις 4.154 bp και μία στις 1.668 bp. Από το ένζυμο KpnI προκύπτουν για το Plko 2 ζώνες μία στις 9.825 bp και μία στις 808 bp, για το psPAX23 ζώνες μία στις 7.784 bp μία στις 2,556 bp και μία στις 328 bp, για το pMD2.G 2 ζώνες μία στις 4.233 bp και μία στις 1.589 bp. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε πέψη του Plko με το ένζυμο XhoI για περαιτέρω επαλήθευση της ακεραιότητας του βασικού εργαλείου μετασχηματισμού. Η πέψη με το ένζυμο αυτό δίνει τρεις ζώνες μια στις 8.447bp μια στις 1.996 bp και μια στις 190 bp (Εικόνα 3.14). Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών πέψεων είναι τα αναμενόμενα και ότι έτσι επαληθεύεται η ορθότητα των όλων πλασμιδίων.



Εικόνα 3.12: Gel αγαρόζης της διαγνωστικής πέψης με EcoRI. Στα πηγάδια 1,2 έτρεξε το πλασμίδο P1ko, στα πηγάδια 3,4 το psPAX2 και στα 5,6 το pMD2.g. Παρατηρείται ότι το P1ko και το psPAX2 εμφανίζουν τις προβλεπόμενες από το πρόγραμμα ζώνες.



Εικόνα 3.13: Gel αγαρόζης της διαγνωστικής πένης με KpnI. Στο πηγάδι 1 έτρεξε το πλασμίδο Plko, στο πηγάδι 2 το psPAX2 και στο 3 το pMD2.g. Παρατηρείται ότι όλα τα πλασμίδια εμφανίζουν τις προβλεπόμενες από το πρόγραμμα ζώνες.

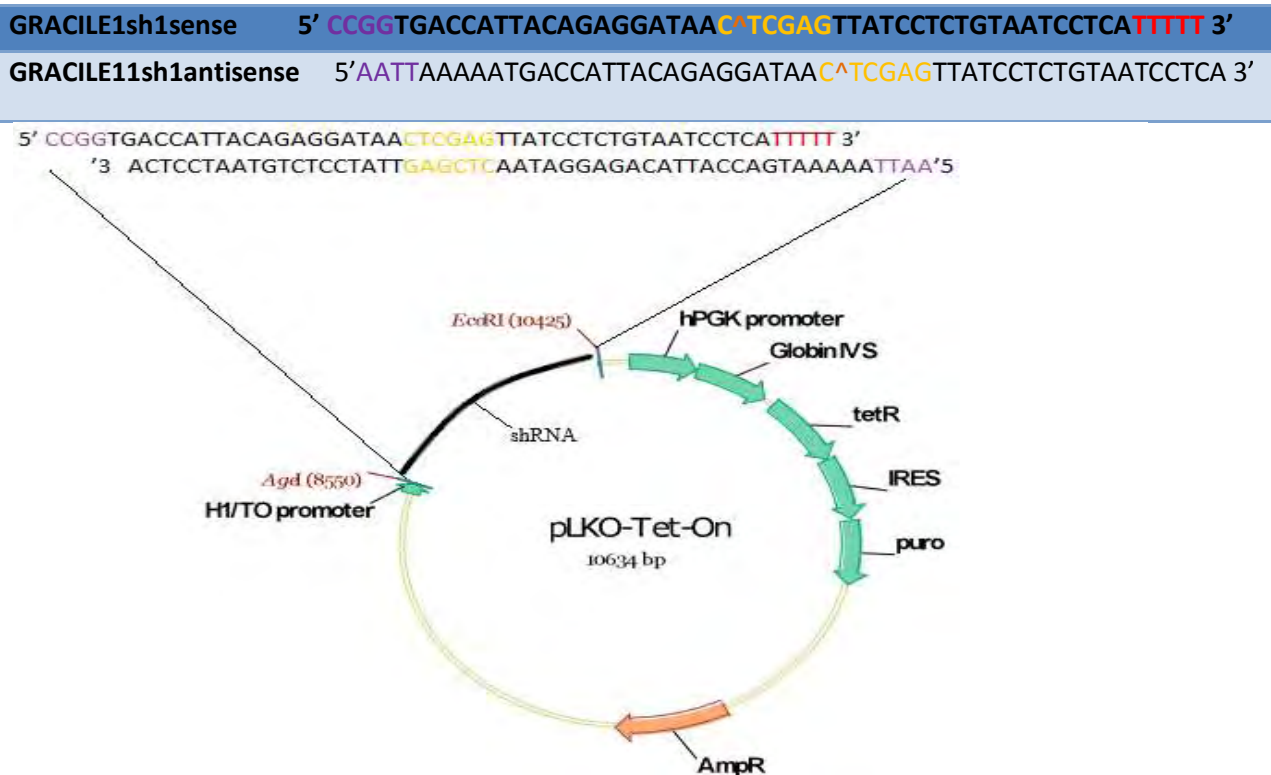


Εικόνα 3.14: Gel αγαρόζης της διαγνωστικής πένης με XhoI, και στα δύο πηγάδια έτρεξαν δείγματα πένης του Plko με το ένζυμο.

3.7) Κλωνοποίηση shRNA:

Όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.13 έγινε χρήση του προγράμματος siDESIGNCenter της εταιρείας Dharmacon για τον σχεδιασμό των αλληλουχιών των shRNA. Ο πλασμιδιακός φορέας PLKO-Tet-Puro φέρει μία θέση κλωνοποίησης εσωτερικά των θέσεων αναγνώρισης των ενδονουκλεασών AgeI και EcoRI. Οι αλληλουχίες των shRNA μορίων (Εικόνα 3.15) έχουν σχεδιαστεί να φέρουν τα αντίστοιχα κολλώδη άκρα ώστε να ενσωματωθούν στο φορέα ύστερα από κοπή με τα κατάλληλα ένζυμα και τη χρήση λιγάσης. Πέραν των ειδικά σχεδιασμένων άκρων (μωβ) οι sense και antisense αλληλουχίες φέρουν επίσης αλληλουχία που θα σχηματίσει την αναδίπλωση του μορίου. Εντός της αλληλουχίας αυτή υπάρχει θέση στην οποία κόβει το ένζυμο XhoI.

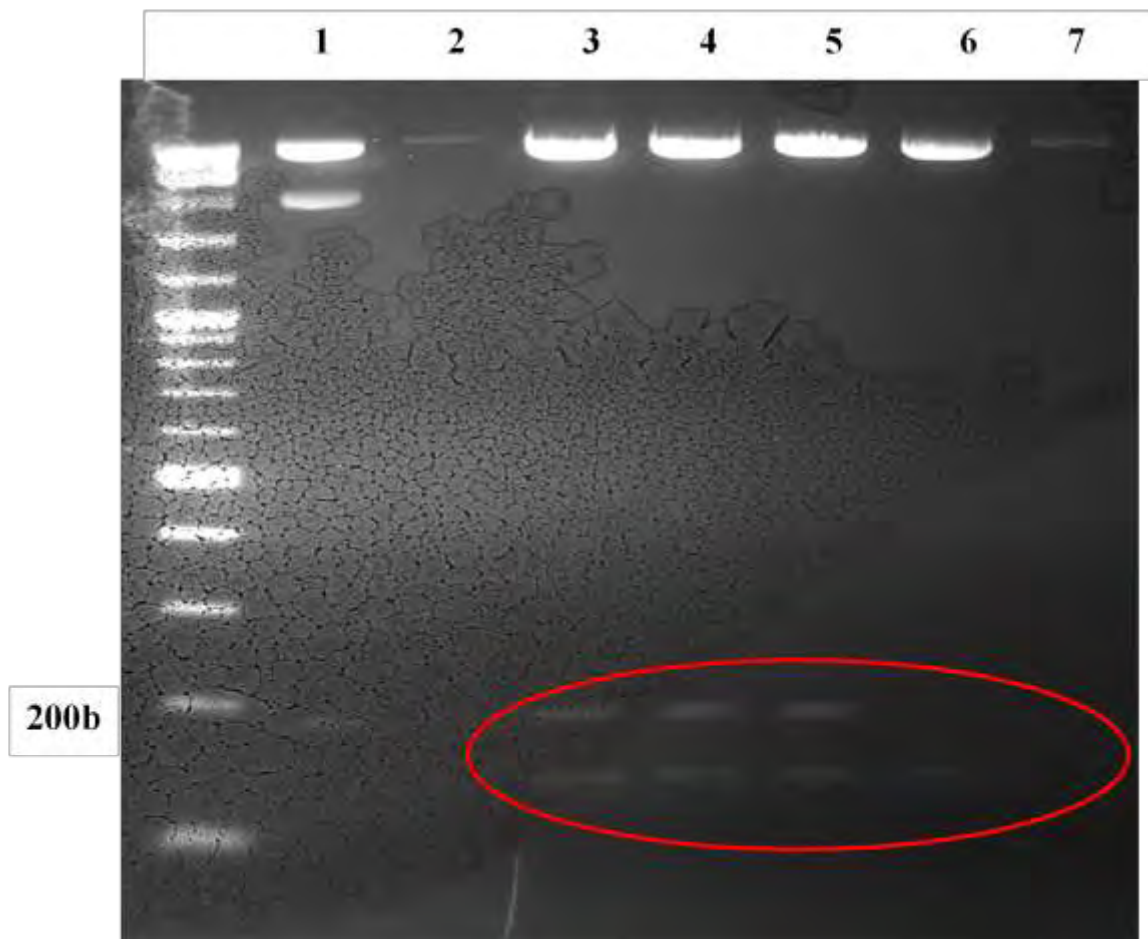
Για την κλωνοποίηση του transfer vector (shRNA sequence+ Vector backbone) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *Ecoli* XII blue τα οποία μετασηματίστηκαν με θερμικό σοκ. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια κύτταρα τα οποία μετασηματίστηκαν με τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα απουσία ενθέματος (self ligation). Από τις αποικίες που προέκυψαν επιλέχθηκαν πέντε οι οποίες μεταφέρθηκαν για ανακαλλιέργεια και αργότερα εξαγωγή των πλασμιδίων με miniprep μέσω αλκαλικής λύσης με σκοπό την ταυτοποίηση των θετικών κλώνων.



Εικόνα 3.15: Αλληλουχίες από τις οποίες προκύπτουν τα μόρια shRNA. Φαίνονται τα ειδικά σχεδιασμένα κολλώδη άκρα με μωβ, η τροποποίηση που αποτρέπει την κοπή του μετά την ενσωμάτωση στο φορέα με

κόκκινο και με κίτρινο η αλληλουχία αναδίπλωσης. Στην αλληλουχία αυτή το πορτοκαλί βελάκι δηλώνει το σημείο κοπής από το XhoI. Φαίνεται και το σημείο στο οποίο εντίθεται η αλληλουχία για τα μόρια sh. (Wiederschain & Ph, 2009)

Για την ταυτοποίηση των θετικών κλώνων πραγματοποιήθηκε πέψη στα καθαρισμένα πλασμίδια από τις 5 αποικίες με το ένζυμο XhoI. Δείγματα από τις πέψεις καθώς και από τον φορέα χωρίς ενθεματικό DNA έτρεξαν σε gel TBE αγαρόζης 2% για ταυτοποίηση πλασμιδίων που φέρουν την αλληλουχία για το shRNA που στοχεύει το GrACILe1. Οι θετικοί κλώνοι, που φέρουν τα shRNA oligos, θα δώσουν ύστερα από πέψη 2 ζώνες που κινούνται πολύ κοντά μεταξύ τους λίγο χαμηλότερα από τις 200bp (Εικόνα 3.16). Με βάση την παρακάτω εικόνα βλέπουμε ότι και οι 5 κλώνοι είναι θετικοί.

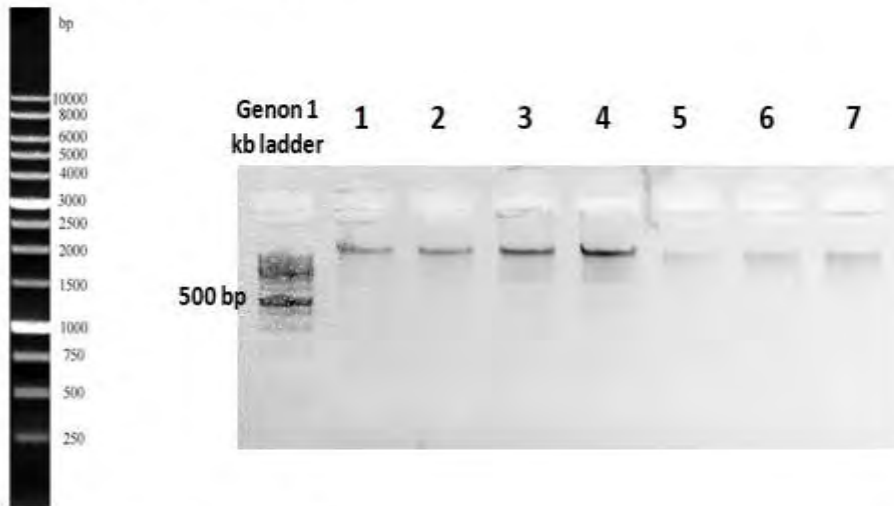


Εικόνα 3.16: Στην Εικόνα φαίνονται οι διαδρομές των πλασμιδίων μετά την πέψη. Στα πηγάδια 1,2 βρίσκονται τα self ligation control, στα πηγάδια 3 εως 7 τα πλασμίδια που λήφθηκαν από τις αποικίες. Στα control όπως και αναμένεται δεν εμφανίζονται ζώνες των oligos. Στα δείγματα όλων των αποικιών παρατηρούνται λίγο πιο κάτω από τις 200 bp οι ζώνες των oligos (πολύ αχνά στο πηγάδι 7), συνεπώς και οι 5 είναι θετικοί. Οι ζώνες που εμφανίζονται ψηλότερα αντιστοιχούν στο backbone.

3.8) Αποτελέσματα ελέγχου κυτταρικών σειρών για *mycoplasma*:

Πριν ωστόσο χρησιμοποιηθούν οι κυτταρικές σειρές στην πειραματική διαδικασία ήταν αναγκαίος ο έλεγχος για μυκόπλασμα, έναν παρασιτικό μικροοργανισμό των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ο οργανισμός αυτός μπορεί να ανιχνευτεί με μικροσκόπιο μόνο στα τελευταία στάδια της μόλυνσης όπου και προκαλεί λύση των κυττάρων και καταστροφή της καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό η διάγνωσή του γίνεται μέσω PCR με κατάλληλους εκκινητές. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα θετικό σε μυκόπλασμα, ενώ απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από τις σειρές KATOIII και MKN45 για έλεγχο. Μετά την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA έτρεξαν σε gel τα δείγματα σε σειριακές αραιώσεις προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίησή του. Επιλέχθηκε για την PCR η ζώνη που εμφάνιζε την πλησιέστερη ένταση με το δείγμα μάρτυρα. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην (Εικόνα 3.17).

DNA Marker BLUE 1000 bp



1. 1 ul Positive control
2. 1 ul Kato III
3. 2 ul Kato III
4. 3 ul Kato III
5. 1 ul MKN45
6. 2 ul MKN45
7. 3 ul MKN45

PCR with
1 ul Positive control DNA
1 ul Kato III
2 ul MKN45

Εικόνα 3.17: Gel αгарόζης για ποσοτικοποίηση του γονιδιωματικού DNA των δειγμάτων από τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν για την παρουσία μυκοπλάσματος.

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τους εκκινητές για το μυκόπλασμα και την ακτίνη που περιγράφηκαν στην ενότητα υλικών και μεθόδων, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην παρακάτω Εικόνα.



Εικόνα 3.18: Gel αγαρόζης στο οποίο έτρεξαν οι PCR για το mycotest αριστερά και για την ακτίνη δεξιά. Τα πηγάδια 1 αντιστοιχούν στο θετικό control, τα πηγάδια 2 στο αρνητικό control το οποίο δεν φέρει DNA, τα πηγάδια 3 αντιστοιχούν στα δείγματα της σειράς KATO-III και τα πηγάδια 4 αντιστοιχούν στα δείγματα της σειράς MKN45.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω gel που έτρεξαν τα δείγματα, οι κυτταρικές σειρές είναι ελεύθερες μυκοπλάσματος.

4) Συζήτηση-μελλοντικοί στόχοι:

Η κατανόηση του μέχρι προσφάτως κρυφού και απρόσμενου κόσμου των μη κωδικοποιητικών RNA έχει διευρυνθεί σε μεγάλο βαθμό τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Η επιστημονική κοινότητα φαίνεται να είχε υποτιμήσει τη φύση της γενετικής ρύθμισης στους πολύπλοκους οργανισμούς λόγω της αντίληψης ότι η πλειονότητα της κυτταρικής λειτουργίας διεκπεραιώνεται από πρωτεΐνες. Η αντίληψη αυτή μπορεί να υφίσταται σε ένα βαθμό στους απλούστερους οργανισμούς, ωστόσο φαίνεται να καταρρίπτεται στους πολυπλοκότερους οργανισμούς το γονιδίωμα των οποίων φαίνεται να κυριαρχείται από ρυθμιστικά μετάγραφα, τα οποία οργανώνουν τις ρυθμιστικές και επιγενετικές πορείες της διαφοροποίησης και ανάπτυξης. Η εικόνα που σχηματίζεται, απαρτίζεται από εξαιρετικά πολύπλοκα μεταγραφομικά δίκτυα. Τα δίκτυα αυτά φαίνεται να περιλαμβάνουν αλληλοεπικαλυπτόμενα, ιντρονικά, μικρά και μεγάλα μόρια RNA τα οποία έχουν διαφορικούς υποκινητές, μεταγράφονται και από τις δύο αλυσίδες του DNA, διαθέτουν πρότυπα εναλλακτικής συρραφής, υπόκεινται σε πολυαδενυλίωση και εμφανίζουν σημεία εντοπισμού σε διαφορετικά κύτταρα και στάδια ανάπτυξης (Gingeras, 2007; Mattick & Makunin, 2006).

Έχει γίνει φανερό πως τα mRNA μπορούν να κατέχουν πολλαπλές λειτουργίες αλλά και ότι τα lncRNA συμμετέχουν στην οργάνωση της δυναμικής τρισδιάστατης δομής της χρωματίνης κατά τα στάδια της διαφοροποίησης και ανάπτυξης (Mattick et al., 2010; Mercer et al., 2011). Αυτό με τη σειρά του μπορεί να εξηγήσει το συχνά παρατηρούμενο κυτταροειδικό προφίλ έκφρασής τους. Πιθανότατα υπάρχει μια αρκετά περίπλοκη λειτουργική και εξελικτική αλληλεπίδραση μεταξύ των κωδικών και των ρυθμιστικών λειτουργιών των μορίων RNA. Ακόμη τα lncRNA μπορεί να έχουν εξελιχθεί εν μέρη από πρωτεϊνικά γονίδια, όπως στην περίπτωση του XIST, μέσω διπλασιασμών ή σχηματισμού ψευδογονιδίων (Duret, Chureau, Samain, Weissanbach, & Avner, 2006). Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός και οι ποικιλία των μορίων RNA σε συνδυασμό με τους εξαιρετικά πολύπλοκους μηχανισμούς δράσης τους, όπως η ρύθμιση επιγενετικών διαδικασιών, υποκυτταρικών οργανιδίων, μεταγραφής κωδικών και μη κωδικών γονιδίων, μετάφρασης, οργάνωσης και διατήρησης χρωμοσωμικής δομής υποδεικνύουν ότι απέχουμε πολύ από την κατανόηση της δομής και των λειτουργιών ενός πραγματικά υψηλά διασυνδεδεμένου συστήματος. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη δεκάδων χιλιάδων μη κωδικών μεταγράφων των οποίων ο ρόλος στη βιολογία και ισορροπία του κυτταρικού περιβάλλοντος περιμένει να διευκρινιστεί. Η λειτουργία των περισσότερων από αυτά τα ρυθμιστικά RNAs στους ανώτερους οργανισμούς δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί. Η ταυτοποίησή τους απαιτεί τη

χρήση στοχευμένης αλληλούχησης μεγάλου βάθους σε μικρά και μεγάλα RNA τα οποία προέρχονται από διαφορετικές γονιδιωματικές περιοχές σε πληθώρα κυτταρικών τύπων.

Το RNA, αν και σε πολλές περιπτώσεις παρατίθεται έτσι, δεν είναι ένα αμιγώς γραμμικό μόριο. Μπορεί και λαμβάνει τις δικές του μοναδικές τρισδιάστατες δομές στο χώρο μέσω των οποίων μπορεί να αλληλεπιδρά με δραστικές πρωτεΐνες καθοδηγώντας τις προς σχηματισμό συμπλόκων με άλλα μόρια RNA και DNA με σχηματισμό διμερών και τριμερών κατά έναν τρόπο εξαρτώμενο από τις αλληλουχίες τους. Σημαντικό θέμα παραμένει ο προσδιορισμός των λειτουργικών περιοχών των lncRNA και των πρωτεϊνικών συνοδών τους, προκειμένου να γίνει πρόβλεψη και εξήγηση των λειτουργικών αλληλεπιδράσεών τους με παρόμοιο τρόπο με τη μελέτη αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών.(Morris & Mattick, 2014) Πρόσφατα ολοένα και περισσότερα δεδομένα προκύπτουν που υποστηρίζουν τον στενά συνδεδεμένο ρόλο των lncRNA στις ανθρώπινες ασθένειες και την κυτταρική λειτουργία. Απορρύθμιση των μορίων αυτών έχει δειχθεί να οδηγεί σε προοδευτική και ανεξέλεγκτη καρκινογένεση (X. Chen et al., 2018).

Ο καρκίνος του στομάχου (Gastric cancer-GC) αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως λόγω της υψηλής του συχνότητας και θνησιμότητας. Στις μέρες μας ο καρκίνος αυτός αποτελεί τον 5^ο πιο συχνό τύπο καρκίνου και τον 3^ο παγκοσμίως σε θνησιμότητα. Κάθε χρόνο σχεδόν 1.000.000 άτομα διαγιγνώσκονται και περισσότεροι από 700.000 άνθρωποι υποκύπτουν σε αυτή τη νόσο, καθιστώντας την υπεύθυνη για περίπου το 10% των θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως(Jemal et al., 1999; Torre et al., 2015). Ο καρκίνος του στομάχου όπως και κάθε καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες τόσο περιβαλλοντικοί όσο και γενετικοί που επηρεάζουν την καρκινογένεση στο στομάχι. Η νόσος δεν είναι όσο διαδεδομένη ήταν κάποτε, ωστόσο εμφανίζεται αρκετά υψηλός αριθμός κρουσμάτων, ιδιαίτερα σε χώρες της Ασίας και τους ασιατικούς πληθυσμούς όπου είναι ο τρίτος πιο συχνός και ο δεύτερος πιο θνησιγόνος (Rahman et al., 2014; Torre et al., 2015).

Ο καρκίνος του στομάχου ευθύνεται για τόσο μεγάλο αριθμό θανάτων λόγω της επιθετικότητάς του και της έλλειψης αποτελεσματικών θεραπειών (W. Chen et al., 2016; Siegel et al., 2016). Η νόσος αυτή δεν εμφανίζει διακριτά συμπτώματα και σε πολλές περιπτώσεις τα συμπτώματα αποδίδονται σε απλούστερες νόσους της γαστρικής οδού. Για το λόγο αυτό ο καρκίνος του στομάχου διαγιγνώσκεται σε πολύ προχωρημένα στάδια, ύστερα πλέον από τη μετάστασή του στους λεμφαδένες. Στο στάδιο αυτό υπάρχει χαμηλή πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών. Για τους λόγους αυτούς είναι αναγκαίο να βρεθούν νέοι βιοδείκτες και στόχοι θεραπευτικών φαρμάκων.

Χαρακτηριστικά που κάνουν τα lncRNA ιδανικά τόσο για διαγνωστικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς είναι i) η αυστηρή ειδικότητα της έκφρασής τους σε συγκεκριμένους ιστούς και κυτταρικούς τύπους που συνεπάγεται εξειδίκευση τόσο σε

επίπεδο υπότυπου της ασθένειας όσο και σε επίπεδου ασθενούς ii) τα χαμηλά συνήθως επίπεδα έκφρασής τους που επιτρέπουν εύκολη καταστολή μέσω παρεμβολής RNA (Bonetti & Carninci, 2017) iii) η τάση για συσώρευση και διατήρηση καρκινικών μεταλλάξεων λόγω του μη κωδικοποιητικού χαρακτήρα iv) η λειτουργία μέσω τριασδιάτατης δομής που μπορεί να αποτελέσει στόχο αναστολέων και φαρμάκων και v) η ανίχνευση τους στο κυκλοφορικό σύστημα που μπορεί να οδηγήσει σε διαγνωστικά τεστ μέσω κοινών αιματολογικών εξετάσεων.

Στην παρούσα διατριβή στόχος ήταν η ανίχνευση και μελέτη lincRNA τα οποία παρουσιάζουν υπερέκφραση στον καρκίνο του στομάχου, δηλαδή που δρουν δυνητικά ως ογκοεπαγωγείς. Από τις βιοπληροφορικές αναλύσεις που διεξήχθησαν στα πλαίσια αυτής της διατριβής προέκυψε μια ομάδα lincRNA τα οποία εμφάνιζαν υπερέκφραση στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά control κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ιδιαίτερα υποσχόμενο παρουσιάστηκε το μετάγραφο το οποίο ονομάστηκε GrACILe1 του οποίου η μελέτη αποτέλεσε το επίκεντρο της πτυχιακής εργασίας. Μία ένδειξη ότι η ανάλυση βρίσκεται στο σωστό δρόμο αποτελεί η παρουσία του linc01234 μεταξύ άλλων στη λίστα των μεταγράφων που προέκυψαν από τα διαγράμματα volcano. Το μετάγραφο αυτό όπως περιγράφεται στην εισαγωγή λειτουργεί ως μοριακό δόλωμα για το miR-204-5p, προστατεύοντας έτσι τα μετάγραφα που στοχεύονται από αυτό για ενδογενή σίγηση στον καρκίνο του στομάχου. Σύμφωνα με τα δεδομένα της ερευνητικής ομάδας που το μελέτησε το μετάγραφο αυτό παρουσιάζεται σημαντικά υπερεκφρασμένο στην παθολογική κατάσταση και προσδίδει κακή πρόγνωση στους ασθενείς (X. Chen et al., 2018). Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι στους θερμικούς χάρτες που κατασκευάστηκαν κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση υπήρχαν αισθητές διαφορές στην ομαδοποίηση μεταξύ των ζευγών καρκινικών σειρών-φυσιολογικών και καρκινικών βιοψιών-φυσιολογικών. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση των σειρών τα δείγματα των καρκινικών σειρών ομαδοποιούνταν πιο κοντά μεταξύ τους απ' ότι με τα φυσιολογικά, ενώ αντίθετα στην περίπτωση των βιοψιών οι καρκινικές βιοψίες ομαδοποιούνταν κοντινότερα στη φυσιολογική βιοψία του ασθενή από τον οποίο προήλθαν. Αυτό είναι λογική απόρροια του αυστηρού προφίλ έκφρασης των lincRNAs σε συνδυασμό με την γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των ασθενών και το γεγονός ότι οι ασθενείς δεν βρίσκονται στο ίδιο στάδιο της ασθένειας.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του GrACILe1 πραγματοποιήθηκε RT-qPCR ύστερα από εξαγωγή RNA από καρκινικές σειρές στομάχου, μαστού και παχέος εντέρου. Προέκυψε ότι το μετάγραφο ήταν παρόν και υπερεκφρασμένο σημαντικά σε όλες τις καρκινικές σειρές στομάχου και καθόλου στις σειρές άλλων καρκινικών ιστών. Μηδαμινή έκφραση παρατηρήθηκε και στο δείγμα φυσιολογικής σειράς επιθηλίου στομάχου γεγονός που συνάδει με τα δεδομένα RNAseq. Η ειδικότητα της έκφρασης συνάδει με την ιστοειδικότητα των lincRNAs. Η έκφραση εντοπίζεται σε καρκινικές σειρές στομάχου και όχι μαστού ή εντέρου άρα είναι εξειδικευμένη για στομάχι και όχι άλλους καρκίνους ούτε καν γαστροεντερικής προελεύσεως. Αντίθετα, για

το Linc01234 παρατηρείται αυξημένη έκφραση και στις καρκινικές σειρές εντερικής προέλευσης. Το γεγονός αυτό είναι κρίσιμο καθώς αυστηρά ιστοειδικά μετάγραφα μπορούν χρησιμοποιηθούν ως ευαίσθητοι βιοδείκτες για τη διάγνωση της νόσου.

Για τον προσδιορισμό του υποκυτταρικού εντοπισμού του πραγματοποιήθηκε υποκυτταρική κλασμάτωση, ακολουθούμενη από εξαγωγή RNA και RT-qPCR σε κάθε κλάσμα. Πριν από την RT-qPCR των κλασμάτων προηγήθηκε έλεγχος της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή RNA όπως φαίνεται στα αποτελέσματα. Με βάση τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, στην οποία παρατηρήθηκαν οι τρεις διακριτές ζώνες (μεγάλη/μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και 5S), το RNA ήταν καλής ποιότητας και η απουσία ριβοσωμικού RNA στα κλάσματα πυρηνοπλάσματος και χρωματίνης είναι ισχυρή ένδειξη ότι η κλασμάτωση ήταν επιτυχής. Αυτό που υποδηλώνει το αποτέλεσμα της RT-qPCR που ακολούθησε είναι πως το μετάγραφο GrACILe1 αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη ωστόσο μεταναστεύει και στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση του Linc01234 βλέπουμε, όπως ήταν αναμενόμενο, παρουσία κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους το μετάγραφο GrACILe1 μπορεί πιθανόν να λειτουργεί τόσο στη χρωματίνη όσο και στο κυτταρόπλασμα έχουν αναφερθεί στο κεφάλαιο της εισαγωγής. Στο σημείο αυτό της πειραματικής διαδικασίας δεν μπορούμε να γνωρίζουμε την ακριβή λειτουργία του μεταγράφου, καθώς πρέπει να πραγματοποιηθούν επιμέρους λειτουργικές μελέτες οι οποίες δεν είναι στα πλαίσια αυτής της διατριβής. Αξίζει να σημειωθεί ότι στον καρκίνο του στομάχου ένας πολύ διαδεδομένος μηχανισμός των κυτταροπλασματικών lncRNA, που έχουν μέχρι στιγμής χαρακτηριστεί ως ογκοεπαγωγείς, λειτουργούν ως μοριακά δολώματα για miRNAs. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πέραν του Linc01234 αποτελούν: το lincRNA-RPMP που λειτουργεί ως μοριακό δόλωμα για το miR206 (Shao et al., 2016), το BC032469 που λειτουργεί ως μοριακό δόλωμα για το miR-1207-5p (Lü et al., 2016), το SNGH12 που λειτουργεί ως μοριακό δόλωμα για το miR-320 (Zhang & Lu, 2018).

Προκειμένου να αποδειχθεί η σύνδεση της έκφρασης του μεταγράφου με την καρκινογένεση η βασική ιδέα ήταν η κατασκευή ενός συστήματος ελεγχόμενης καταστολής έκφρασης μέσω παρεμβολής RNA. Το βασικό λειτουργικό εργαλείο που κατασκευάστηκε για το σκοπό αυτό ήταν ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει αλληλουχίες shRNA έναντι του GrACILe1 υπό τον έλεγχο του καταστολέα tetR (Plko-tet-puro-sh oligos), ενώ το βήμα της σίγησης δεν πραγματοποιήθηκε και αποτελεί μελλοντικό πειραματικό στόχο. Η λειτουργικότητα του φορέα μπορεί να εξεταστεί μετά από μετασχηματισμό καρκινικών σειρών στομάχου που παρουσιάζουν υπερέκφραση του GrACILe1. Για το σκοπό αυτό ενδείκνυται η χρήση RT-qPCR. Ο λόγος που προτιμάται το σύστημα επαγόμενης σίγησης είναι πως αν το μετάγραφο λειτουργεί ως ογκοεπαγωγέας, η καταστολή του μπορεί να αποδώσει φαινότυπο απόπτωσης ή καταστολής της ανάπτυξης- κυτταροδιαίρεσης. Έτσι σε ένα ιδιόσυστατο σύστημα θα

υπήρχε αναπόφευκτη απώλεια ολόκληρης της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ τα επαγόμενα συστήματα επιτρέπουν αυστηρό έλεγχο και πειραματική ευελιξία.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σχολιαστεί η στρατηγική μετασχηματισμού. Η αρχική προσέγγιση ήταν να χρησιμοποιηθεί μια παραλλαγή αυτού του pLKO συστήματος όπου σε πρώτη φάση θα γινόταν εισαγωγή και ένας πρώτος μετασχηματισμός των καρκινικών κυττάρων με ένα πλασμίδιο που φέρει μόνο τον tet καταστολέα υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού ιδιοσυστάτου υποκινητή, απουσία shRNAs, με σκοπό την παραγωγή θυγατρικών σειρών που θα εμφάνιζαν συνεχή υπερέκφραση του καταστολέα σε υψηλά επίπεδα. Σε δεύτερο στάδιο και αφού γινόταν επιλογή θετικών κλώνων που υπερεκφράζουν σταθερά και σε υψηλά επίπεδα τον καταστολέα, θα γινόταν εισαγωγή και μετασχηματισμός των tet-θετικών θυγατρικών κυττάρων με ένα δεύτερο πλασμίδιο που θα περιελάμβανε ένα οπερόνιο με θέσεις δέσμησης του καταστολέα tet (Tet Response Elements) και καθοδικά αυτού έναν ισχυρό υποκινητή και μια θέση κλωνοποίησης για το shRNA ένθεμα. Η στρατηγική μετασχηματισμού αυτή όμως έχει δύο σημαντικά μειονεκτήματα. Αρχικά να τονιστεί ότι καθένα από τα δύο πλασμίδια θα έπρεπε φέρει ένα γονίδιο αντίστασης σε διαφορετικό αντιβιοτικό. Αυτό διότι πρέπει να γίνουν δύο επιλογές κυττάρων : μια για να εξεταστεί αν έγινε μετασχηματισμός με το ένθεμα του καταστολέα Tet και μια δεύτερη για να εξεταστεί ότι μπήκε και το ένθεμα με τα shRNAs. Το πρόβλημα είναι ότι κάθε γύρος επιλογής θετικών κλώνων απαιτεί αρκετούς μήνες, τα τελικά κύτταρα θα έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης κυτταρικού στρες λόγω της διπλής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, ενώ τα ίδια τα αντιβιοτικά έναντι των κυττάρων θηλαστικών είναι αρκετά ακριβά. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση της νέας στρατηγικής η οποία έχει ως επίκεντρο τον φορέα Plko-tet-puro και η οποία εξασφαλίζει συμπίεση του κόστους και επιτάχυνση του χρόνου παραγωγής των τελικών σειρών αφού με αυτό το σύστημα γίνεται ταυτόχρονος μετασχηματισμός των κυττάρων τόσο με τον καταστολέα Tet (έλεγχος της επαγωγής) όσο και με τα shRNAs (παρεμβολή RNA).

Στην περίπτωση που το GrACILe1 αποτελεί όντως έναν δυναμικό ογκοεπαγωγέα η καταστολή της έκφρασης του αναμένεται να αποδώσει φαινότυπο αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή/και απόπτωσης στην καρκινική σειρά. Το αμέσως επόμενο βήμα αποτελεί η αλληλούχηση του μεταγραφώματος των κυττάρων που υπέστησαν σίγηση με σκοπό τον προσδιορισμό των γονιδίων τα οποία υπέστησαν αλλαγή στην έκφραση λόγω της καταστολής του GrACILe1. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ξεκινήσει εκτενέστερη μελέτη του ρόλου του μεταγράφου αυτού στην καρκινογένεση και να ανακαλυφθεί ο μηχανισμός με τον οποίο οδηγεί, το κύτταρο σε καρκινικό μετασχηματισμό. Η ανακάλυψη αυτού του μηχανισμού μπορεί να αποκαλύψει συνεργατικά μόρια (πρωτεΐνες, άλλα μόρια RNA) και να ανοίξει το δρόμο για την καλύτερη διάγνωση και θεραπεία της νόσου. Αυτό καθώς τα lncRNA λόγω της ιστοειδικότητας και ακόμη της κυτταροειδικότητας της έκφρασής τους μπορούν να

χρησιμοποιηθούν για καλύτερο χαρακτηρισμό υποτύπων ασθενειών, αλλά και πιο στοχευμένα μέσα θεραπειών και διάγνωσης στα πλαίσια της ατομικής θεραπείας (φαρμακογονιδιωματική).

Πριν όμως μπορέσει να υπάρξει κάποια μελέτη στον άνθρωπο είναι απαραίτητη η μελέτη της δράσης του μεταγράφου σε άλλα *in vivo* συστήματα, όπως στον ποντικό. Όπως φάνηκε από την μελέτη οντολογίας σε φυσιολογικούς ιστού ποντικού δεν παρατηρείται ύπαρξη του GrACILe1. Για μεγαλύτερη ακρίβεια ωστόσο απαιτούνται και καρκινικά δείγματα στομάχου από ποντίκια. Στην περίπτωση που το μετάγραφο δεν είναι παρόν ούτε σε καρκινικά δείγματα ποντικού ιδιαίτερα πληροφοριακή είναι η μελέτη μέσω ξενογραφιών. Οι ξενογραφίες όπως υποδυκνύει το όνομα είναι μεταμοσχεύσεις ανθρωπίνων κυττάρων-ιστών σε άλλους οργανισμού. Οπότε για μια αναπαράσταση της δράσης του μεταγράφου στο ανθρώπινο *in vivo* περιβάλλον, ανθρώπινα καρκινικά δείγματα στομάχου μπορούν να μεταφερθούν σε ποντίκια.

Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος μια ευρύτερης μελέτης του εργαστηρίου για προσδιορισμό πιθανών βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων για τη νόσο του καρκίνου του στομάχου.

Παράρτημα:

Αντιδραστήρια:

LB broth: Αποτελεί το πιο κοινό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας βακτηρίων. Περιέχει πεπτίδια, πεπτόνες κασεΐνης, ιχνοστοιχεία, μεταλλικά ιόντα και βιταμίνες.

LB agar: LBbroth+ αγαρ.

Ethanol 70%/100%, Isopropanol : Οι καθαρές αλκοόλες βοηθούν στη καθίζηση των νουκλεϊκών οξέων καθώς τα ανταγωνίζονται για αλληλεπίδραση με το νερό (έχουν μεγαλύτερη συγγένεια). Συνήθως χρησιμοποιούνται με άλας το οποίο αλληλεπιδρά με νουκλεϊκά προς ακύρωση των απωστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Οι λιγότερο καθαρές όπως 70% δ/ματα με νερό βοηθούν στον καθαρισμό.

EcoRI: Περιοριστική ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' GAATTC 3' και κόβει μετά την πρώτη αδενίνη.

KpnI: Περιοριστική ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' GGTACC 3' και κόβει πριν την τελευταία κυτοσίνη.

XhoI: Περιοριστική ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' CTCGAG 3' και κόβει μετά την πρώτη κυτοσίνη.

CSPA1 : Περιοριστική ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' ACCGGT 3' και κόβει μετά την πρώτη αδενίνη.

T4 ligase: Ένζυμο που καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ γειτονικών 3'υδροξυλομάδων και 5'φωσφορικών άκρων στη διπλή έλικα του DNA. Συνδέει μονές και διπλές ρίζεις στην αλυσίδα του DNA.

K Taq polymerase

TBE: Buffer το οποίο περιέχει Tris, boric acid, EDTA, χρησιμοποιείται για την παρασκευή gel ηλεκτροφόρησης.

EtBr: Χρωστική που φθορίζει στο υπεριώδες. Χρησιμοποιείται στην εμφάνιση gel νουκλεϊκών καθώς μπορεί και προσδένεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και τις δευτεροταγείς δομές του RNA. Αποτελεί μεταλλαξιγόνο παράγοντα.

Trizole: Διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται σε πρωτόκολλα για την εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων.

CHCl_3 : Οργανικός διαλύτης, χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για την απομάκρυνση τριζόλης από δείγματα νουκλεϊκών κατά της διάρκεια πρωτοκόλλων εξαγωγής.

DMEM : Θρεπτικό μέσο ιδανικό για καλλιέργεια κυτταρικών σειρών θηλαστικών

RPMI: Θρεπτικό μέσο ιδανικό για καλλιέργεια κυτταρικών σειρών θηλαστικών FBS: Ορός από έμβρυα βοοειδών, χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα σε θρεπτικά υλικά κυτταρικών σειρών θηλαστικών λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά στοιχεία και αυξητικούς παράγοντες.

PBS (phosphate buffered saline): Ισορροπημένο διάλυμα άλατος που χρησιμοποιείται σε κυτταροκαλλιέργειες, κυρίως για πλύση κυττάρων πριν από την μεταφορά σε νέα φλάσκα και για την αραίωση και προετοιμασία αντιδραστηρίων.

HEPES: Οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται σε κυτταροκαλλιέργειες για τη διατήρηση του pH.

NP40: Απορρυπαντική ουσία που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε διαλύματα λύσης για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.

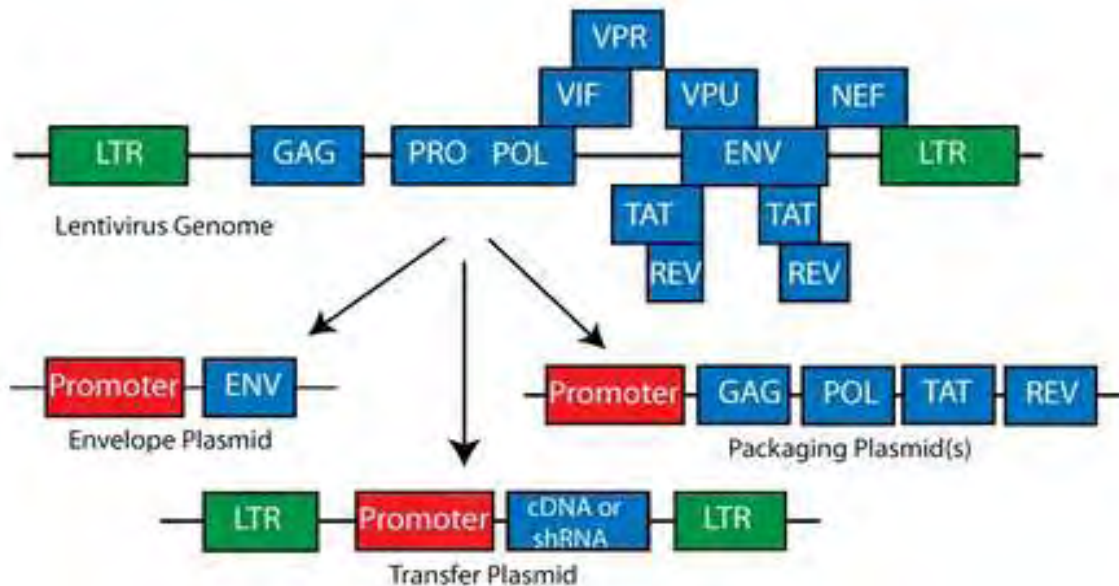
RNAseout: Αναστολέας RNAσών

Tris: Οργανική βάση που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην επιστήμη για τη ρύθμιση του pH σε ρυθμιστικά διαλύματα.

SDS: Απορρυπαντική ουσία που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε διαλύματα λύσης για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών, ή για την αποδιάταξη των μεμβρανών λόγω της ικανότητας του να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σπάζοντας τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς που σχηματίζουν.

Λεντιοί:

Οι λεντιοί πήραν το όνομά τους από τη λατινική ρίζα *lente*- που σημαίνει αργός, λόγω της μακρόχρονης λανθάνουσας φάσης τους ύστερα από την αρχική μόλυνση. Πρόκειται για μια κατηγορία ρετροϊών, δηλαδή ιών RNA, που προσβάλλουν σπονδυλωτά και διακρίνονται σε 5 υποομάδες ανάλογα με το σπονδυλωτό που προσβάλλουν: βοοειδών, αλόγων, αιλουροειδών, προβατοδών και ανθρωποειδών. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί ο ιός HIV που προκαλεί τη νόσο του AIDS (Durand & Cimarelli, 2011). Οι λεντιοί είναι ικανοί να μεταφέρουν τεράστια κομμάτια (εως 8 kb) γενετικού υλικού στο γονιδίωμα στόχο και μπορούν να ενσωματωθούν τόσο σε κύτταρα που διαιρούνται όσο και σε κύτταρα που δεν διαιρούνται. Το ικό γονιδίωμα μπορεί να ενσωματωθεί μόνιμα στο γονιδίωμα του ξενιστή και περνά στα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν κατά τη μίτωση. Το γεγονός αυτό καθιστά τους λεντιούς ένα από τα πιο δυναμικά συστήματα γενετικού μετασχηματισμού σήμερα. Για το λόγο αυτό τροποποιημένες μορφές αυτών των ιών, στην πλειονότητα τους HIV, χρησιμοποιούνται στην έρευνα ασθενειών και σε μελέτες γονιδιακής θεραπείας (Connolly, 2002; Kay, Glorioso, & Naldini, 2001). Τα συστήματα μεταφοράς με λεντιούς βασίζονται στο ίδιο τους το γονιδίωμα.



Εικόνα 1: Σχματική αποκόνιση ικού γονιδιώματος και διαχωρισμός του σε επιμέρους κατασκευές μετασχηματισμού. (<https://www.addgene.org/viral-vectors/lentivirus/lenti-guide/>)

Αποτελείται από 9.749 bp. Εκτός από τα γονίδια *gag*, *pol*, *env* τα οποία είναι κοινά μεταξύ όλων των ρετροϊών ο HIV φέρει και δύο ρυθμιστικά γονίδια, τα *tat* και *rev*. Τα γονίδια αυτά είναι αναγκαία για την αντιγραφή του γενετικού υλικού των ιών αυτών. Επιπλέον φέρει και 4 συνοδά γονίδια τα *vif*, *vpr*, *vpu* και *nef* τα οποία αν και δεν είναι απαραίτητα για την *in vitro* ιική ανάπτυξη, είναι αναγκαία για την *in vivo* αντιγραφή και

παθογένεια. Ο ρόλος κάθε γονιδίου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Durand & Cimarelli, 2011).

Αναγκαία γονίδια ρυθμιστικά στοιχεία	και	Γονίδια	Πρόδρομες πρωτεΐνες- προϊόντα
		Gag	Group-specific antigen Gag-> MA,CA,SP1,NC,SP2,P6
		Pol	polymerase Pol-> RT,RNase H, IN, PR
		Env	envelope Gp160-> g-120,gp41
		Tat	HIV Θετικός ρυθμιστής μεταγραφής transactivator
		Rev	Regulator of expression of virion proteins Σημαντικό για σύνθεση μεγάλων πρωτεϊνών και για αντιγραφή γενετικού υλικού
Συνοδά γονίδια		Vif	Viral infectivity Αναγκαίο για μολυσματικότητα σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους
		Vpr	Virus protein r Πυρηνική μεταφορά του συμπλόκου ενσωμάτωσης και στάση κυτταρικού κύκλου
		Vpu	Virus protein u Πρωτεασωμική αποικοδόμηση CD44 και λύση κυττάρων
		Nef	Negative factor Ρόλος στην απόπτωση και ενίσχυση μολυσματικότητας

Μετασηματισμός με λεντιούς:

Ο μετασηματισμός γίνεται με λεντιούς οι οποίοι κατασκευάζονται με 3 πλασμίδια: 1) το transfer vector που φέρει τις αλληλουχίες του ενθεματικού DNA (π.χ τα shRNA μόρια για τον φορέα PLKO-tet-ON), 2) το envelop vector που φέρει τα στοιχεία για κατασκευή των ιικών σωματίων (pMD2.G), 3) το packaging vector που φέρει τα στοιχεία που θα πακετάρουν πλασμίδιο μέσα στα ιικά σωματίδια και ενεργοποιούν τα στοιχεία του transfer vector για ένθεση (psPAX2). Αρχικά πραγματοποιείται μετασηματισμός δεκτικής κυτταρικής σειράς (HEK) ταυτόχρονα και με τα τρία πλασμίδια. Μετά των σχηματισμό των ιοσωματίων και τη λύση των κυττάρων λαμβάνεται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται τιτλοδότηση για προσδιορισμό του ιικού φορτίου. Οι ιοί τιτλοδοτούνται στο υπερκείμενο και συλλέγονται για χρήση στην επιθυμητή σειρά. Πιο αναλυτικά την πρώτη μέρα επιστρώνονται 4×10^6 κύτταρα σειράς HEK σε πιάτα καλλιέργειας 10 cm επιστρωμένων με κολλαγόνο I και 15 ml θρεπτικού (DMEM/10% FBS). Τη δεύτερη μέρα γίνεται αλλαγή του μέσου σε 6 ml DMEM /10% FBS 1 ώρα πριν τη χορήγηση των πλασμιδίων. Ακολουθεί προετοιμασία του μείγματος μετασηματισμού (πλασμιδιακό DNA + Fugene transfection reagent Roche) με βάση οδηγίες παρασκευαστή σε αναλογία 1:3 DNA προς Fugene. Προστίθενται 36 ul

Fugeneσε 600 µl OptiMEM και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θ.δ. Στη συνέχεια προστίθενται 4 µg pLKO-Tet-OnGrACILe1 shRNA, 3 µg psPAX και 3 µg pMD2.G σε 50 µl OptiMEM και μεταφέρονται στο αραιωμένο Fugene. Το μείγμα χορηγείται στα κύτταρα. Την τρίτη μέρα γίνεται αλλαγή θρεπτικού σε 6 ml DMEM 20% FBS και ακολουθεί επώαση στους 37 βαθμούς για 48 ώρες προς σχηματισμό των ισοματίων. Την τέταρτη μέρα συλλέγεται το υπερκείμενο, πραγματοποιείται καταβύθιση 10 λεπτών και μεταφέρεται στους -80 βαθμούς.

Για την τιτλοδότηση των ισοματίων επιστρώνονται 100,000 κύτταρα HEK/well σε 6-well plate. Μετά από 24ώρες το θρεπτικό αντικαθίσταται από μέσο συμπληρωμένο με 10 µg/ml polybrene (1 ml media/well). Ακολουθεί προσθήκη 50, 100, 200, 500 µl ικού υπερκειμένου διαδοχικά σε κάθε πηγάδι. Ως control προστίθενται στα τελευταία δύο πηγάδια 500 µl μέσου και ικού υπερκειμένου απουσία κυττάρων και μέσου απουσία ιών παρουσία κυττάρων αντίστοιχα. Πραγματοποιείται ολονύκτια επώαση και μετά αλλαγή θρεπτικού σε θρεπτικό με πουρομυκίνη (1-3 µg/ml) σε κάθε πηγάδι εκτός του control χωρίς ιούς. Ακολουθεί η θανάτωση των μη μετασχηματισμένων κυττάρων μέσω πουρομυκίνης. Μετά επιλογή των θετικών κλώνων σε μορφή κυτταρικών αποικιών.

Βιβλιογραφία

- Amaral, P. P., Dinger, M. E., Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2008). The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1155472>
- Aoki, K., & Taketo, M. M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science*, *120*(19), 3327–3335. <https://doi.org/10.1242/jcs.03485>
- Bonetti, A., & Carninci, P. (2017). From bench to bedside: The long journey of long non-coding RNAs. *Current Opinion in Systems Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.04.016>
- Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. (2010). NIH Public Access. *Developmental Biology*, *17*(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016> Wnt/
- Calin, G. A., Liu, C. gong, Ferracin, M., Hyslop, T., Spizzo, R., Sevignani, C., ... Croce, C. M. (2007). Ultraconserved Regions Encoding ncRNAs Are Altered in Human Leukemias and Carcinomas. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.027>
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., ... Hayashizaki, Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1789>
- Chen, W., Zheng, R., Baade, P. D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F., ... He, J. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- Chen, X., Chen, Z., Yu, S., Nie, F., Yan, S., Ma, P., ... Wang, Z. (2018). Long noncoding RNA LINC01234 functions as a competing endogenous RNA to regulate CBFβ expression by sponging miR-204-5p in gastric cancer. *Clinical Cancer Research*, *24*(8), 2002–2014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2376>
- Chial, B. H., Write, P. D., Right, S., & Education, N. (2008). Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. <https://doi.org/10.1038/315758a0>
- Clark, M. B., Amaral, P. P., Schlesinger, F. J., Dinger, M. E., Taft, R. J., Rinn, J. L., ... Mattick, J. S. (2011). The reality of pervasive transcription. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000625>
- Clark, M. B., Johnston, R. L., Inostroza-Ponta, M., Fox, A. H., Fortini, E., Moscato, P., ... Mattick, J. S. (2012). Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.131037.111>
- Connolly, J. B. (2002). Lentiviruses in gene therapy clinical research. *Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301893>
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*. Sinauer Associates. <https://doi.org/NBK9839>
- Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>
- Duchartre, Y., Kim, Y.-M., & Kahn, M. (2016). The Wnt signaling pathway in cancer. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.005>
- Durand, S., & Cimarelli, A. (2011). The Inside out of Lentiviral Vectors. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v3020132>
- Duret, L., Chureau, C., Samain, S., Weissanbach, J., & Avner, P. (2006). The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1126316>
- Elisaphenko, E. A., Kolesnikov, N. N., Shevchenko, A. I., Rogozin, I. B., Nesterova, T. B., Brockdorff, N., & Zakian, S. M. (2008). A dual origin of the Xist gene from a protein-coding gene and a set of transposable elements. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002521>
- Elsayed, E. T., Salem, P. E., Darwish, A. M., & Fayed, H. M. (2018). Plasma long non-coding RNA HOTAIR as a potential biomarker for gastric cancer. *The International Journal of Biological Markers*, *172460081876024*. <https://doi.org/10.1177/1724600818760244>
- Fang, Y., & Fullwood, M. J. (2016). Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.09.006>
- Freed-Pastor, W. A., & Prives, C. (2012). Mutant p53: One name, many proteins. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>

- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., & Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature*, *409*(6822), 850–852. <https://doi.org/10.1038/35057046>
- Garcia, P. B., & Attardi, L. D. (2014). Illuminating p53 function in cancer with genetically engineered mouse models. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.12.014>
- Garitano-Trojaola, A., Agirre, X., Prósper, F., & Fortes, P. (2013). Long non-coding RNAs in haematological malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms140815386>
- Giakountis, A., Moulos, P., Zarkou, V., Oikonomou, C., Harokopos, V., Hatzigeorgiou, A. G., ... Hatzis, P. (2016). A Positive Regulatory Loop between a Wnt-Regulated Non-coding RNA and ASCL2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.038>
- Gingeras, T. R. (2007). Origin of phenotypes: Genes and transcripts. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.6525007>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hannon, G. J., & Dela, M. J. (2017). lncRNAs in development and disease : from functions to mechanisms non-coding RNAs : cause or, 1–10. <https://doi.org/10.1098/rsob.170121>
- Hunt, R. H., Camilleri, M., Crowe, S. E., El-Omar, E. M., Fox, J. G., Kuipers, E. J., ... Tack, J. (2015). The stomach in health and disease. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307595>
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (1999). Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin*. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>. Available
- Johnsson, P., Lipovich, L., Grandér, D., & Morris, K. V. (2014). Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochimica et Biophysica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.035>
- Kang, Y. J., Yang, D. C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: A fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx428>
- Kay, M. A., Glorioso, J. C., & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/83324>
- Knudson, A. G. (2002). Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10320>
- Koirala, P., Zou, D.-H., & Mo, Y.-Y. (2016). Long non-coding RNAs as key regulators of cancer metastasis. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment; Vol 2, No 1 (2016)*.
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011593>
- Lee, H. S., Cho, S.-B., Lee, H. E., Kim, M. a, Kim, J. H., Park, D. J., ... Kim, W. H. (2007). Protein expression profiling and molecular classification of gastric cancer by the tissue array method. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0173>
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/351453a0>
- Liu, X., & Meltzer, S. J. (2017a). Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. *Cmgh*, *3*(3), 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.02.003>
- Liu, X., & Meltzer, S. J. (2017b). Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. *CMGH*. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.02.003>
- Liu, Y. W., Sun, M., Xia, R., Zhang, E. B., Liu, X. H., Zhang, Z. H., ... Wang, Z. X. (2015). LincHOTAIR epigenetically silences miR34a by binding to PRC2 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in human gastric cancer. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.150>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Long, Y., Wang, X., Youmans, D. T., & Cech, T. R. (2017). How do lncRNAs regulate transcription? *Science Advances*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao2110>

- Lü, M. H., Tang, B., Zeng, S., Hu, C. J., Xie, R., Wu, Y. Y., ... Yang, S. M. (2016). Long noncoding RNA BC032469, a novel competing endogenous RNA, upregulates hTERT expression by sponging MIR-1207-5p and promotes proliferation in gastric cancer. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.413>
- Lu, W., Zhang, H., Niu, Y., Wu, Y., Sun, W., Li, H., ... Wu, Y. (2017). Long non-coding RNA linc00673 regulated non-small cell lung cancer proliferation, migration, invasion and epithelial mesenchymal transition by sponging miR-150-5p. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0685-9>
- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
- Mattick, J. S., Taft, R. J., & Faulkner, G. J. (2010). A global view of genomic information - moving beyond the gene and the master regulator. *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.11.002>
- McMullen, J. R., & Drew, B. G. (2016). Long non-coding RNAs (lncRNAs) in skeletal and cardiac muscle: potential therapeutic and diagnostic targets? *Clinical Science*. <https://doi.org/10.1042/CS20160244>
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., Sunken, S. M., Mehler, M. F., & Mattick, J. S. (2008). Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706729105>
- Mercer, T. R., Gerhardt, D. J., Dinger, M. E., Crawford, J., Trapnell, C., Jeddelloh, J. A., ... Rinn, J. L. (2011). Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.2024>
- Moran, V. A., Perera, R. J., & Khalil, A. M. (2012). Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks296>
- Morlando, M., Ballarino, M., & Fatica, A. (2015). Long Non-Coding RNAs: New Players in Hematopoiesis and Leukemia. *Frontiers in Medicine*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00023>
- Morris, K. V., & Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics*, 15(6), 423–437. <https://doi.org/10.1038/nrg3722>
- Parasramka, M. A., Maji, S., Matsuda, A., Yan, I. K., & Patel, T. (2016). Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma. *Pharmacology & Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.004>
- Peng, W., Wu, J., Fan, H., Lu, J., & Feng, J. (2017). LncRNA EGOT Promotes Tumorigenesis Via Hedgehog Pathway in Gastric Cancer. *Pathology and Oncology Research*. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0367-3>
- Pink, R. C., Wicks, K., Caley, D. P., Punch, E. K., Jacobs, L., & Carter, D. R. F. (2011). Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.2658311>
- Rahman, R., Asombang, A. W., & Ibdah, J. A. (2014). Characteristics of gastric cancer in Asia. *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i16.4483>
- Ransohoff, J. D., Wei, Y., & Khavari, P. A. (2018). The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 143–157. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.104>
- Rashid, F., Shah, A., & Shan, G. (2016). Long Non-coding RNAs in the Cytoplasm. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.005>
- Regad, T. (2015). Targeting RTK signaling pathways in cancer. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers7030860>
- Riquelme, I., Saavedra, K., Espinoza, J. A., Weber, H., García, P., Nervi, B., ... Bizama, C. (2015). Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4990>
- Saka, M., Morita, S., Fukagawa, T., & Katai, H. (2011). Present and future status of gastric cancer surgery. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyq240>
- Santarosa, M., & Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: When you don't need to go all the way. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.01.001>
- Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>
- Shao, Y., Ye, M., Li, Q., Sun, W., Ye, G., Zhang, X., ... Yongfu Shao, M. Y. Q. L. W. S. G. Y. X. Z. Y. Y. B. X. J. G. (2016). LncRNA-RMRP promotes carcinogenesis by acting as a miR-206 sponge and is used as a novel biomarker for gastric cancer. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9336>
- Shih, J. W., Chiang, W. F., Wu, A. T. H., Wu, M. H., Wang, L. Y., Yu, Y. L., ... Kung, H. J. (2017). Long

- noncoding RNA LncHIFCAR/MIR31HG is a HIF-1 α co-activator driving oral cancer progression. *Nature Communications*, 8(May), 1–16. <https://doi.org/10.1038/ncomms15874>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>.
- Soybel, D. I. (2005). Anatomy and physiology of the stomach. *Surgical Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2005.05.009>
- Tan, P., & Yeoh, K.-G. (2015). Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.059>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Trimarchi, T., Bilal, E., Ntziachristos, P., Fabbri, G., Dalla-Favera, R., Tsirogos, A., & Aifantis, I. (2014). Genome-wide mapping and characterization of notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.049>
- Uchida, S., & Dimmeler, S. (2015). Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.302521>
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Sive, H., & Bartel, D. P. (2011). Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.055>
- van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B. J., & Hughes, T. R. (2010). Most “dark matter” transcripts are associated with known genes. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000371>
- Van Cutsem, E., & Ducreux, M. (2016). Colorectal and gastric cancer in 2015: The development of new agents and molecular classifications. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.217>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>
- Wang, Y., Zhang, D., Wu, K., Zhao, Q., Nie, Y., & Fan, D. (2014). Long Noncoding RNA MRUL Promotes ABCB1 Expression in Multidrug-Resistant Gastric Cancer Cell Sublines. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.01580-13>
- Wang, Z. Q., Cai, Q., Hu, L., He, C. Y., Li, J. F., Quan, Z. W., ... Zhu, Z. G. (2017). Long noncoding RNA UCA1 induced by SP1 promotes cell proliferation via recruiting EZH2 and activating AKT pathway in gastric cancer. *Cell Death & Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.143>
- Wee, S., Wiederschain, D., Maira, S.-M., Loo, A., Miller, C., deBeaumont, R., ... Lengauer, C. (2008). PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802655105>
- Weinstein, I. B., & Joe, A. K. (2006). Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nclonc0558>
- Wiederschain, D., & Ph, D. (2009). The “all-in-one” system for the inducible expression of shRNA. *Addgene Protocols*. <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7701>
- Wiederschain, D., Wee, S., Chen, L., Loo, A., Yang, G., Huang, A., ... Benson, J. D. (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7701>
- Yan, J., Dang, Y., Liu, S., Zhang, Y., & Zhang, G. (2016). LncRNA HOTAIR promotes cisplatin resistance in gastric cancer by targeting miR-126 to activate the PI3K/AKT/MRP1 genes. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5448-5>
- Yang, F., Xue, X., Zheng, L., Bi, J., Zhou, Y., Zhi, K., ... Fang, G. (2014). Long non-coding RNA GHET1 promotes gastric carcinoma cell proliferation by increasing c-Myc mRNA stability. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.12625>
- Zhang, H., & Lu, W. (2018). LncRNA SNHG12 regulates gastric cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-320. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8143>
- Zhao, J., Du, P., Cui, P., Qin, Y., Hu, C., Wu, J., ... Huang, G. (2018). LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0250-z>