

Μελέτη του lincRNA GrACILe2
στον καρκίνο του στομάχου
Study of the lincRNA GrACILe2
in Gastric Cancer

Λάνγκε Μάριος



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής

Ακαδημαϊκό έτος: 2018-2019

Τριμελής επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

1^{ος} συνεπιβλέπων καθηγητής: Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

2^{ος} συνεπιβλέπων καθηγητής: Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περιεχόμενα

Τριμελής επιτροπή.....	1
Περίληψη.....	4
Abstract	5
1.Εισαγωγή.....	6
1.1 Ανατομία του στομάχου	7
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	7
1.1.2 Τα τμήματα του στομάχου.....	8
1.1.3 Η ιστολογία του στομάχου	8
1.2.Ο καρκίνος του στομάχου	9
1.2.1 Γενικά στοιχεία	9
1.2.2 Αίτια εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου.....	12
1.2.2.1 Κληρονομικά χαρακτηριστικά	12
1.2.2.2 Γενετικές τροποποιήσεις σε επίπεδο γονιδιώματος	13
1.2.2.2.1 Μονονουκλεοτιδικές μεταλλάξεις Single nucleotide polymorphisms (SNPs).....	15
1.2.2.2.2 Αστάθεια χρωμοσωμάτων.....	16
1.2.2.2.3 Αστάθεια μικροδορυφόρων	17
1.2.2.2.4 Επιγενετικές τροποποιήσεις	18
1.2.2.2.5 Μεταλλάξεις σε κωδικοποιητικά γονίδια	21
1.2.3 Επιδημιολογικά στοιχεία	23
1.2.4 Προσδόκιμο ζωής των ασθενών.....	24
1.3. Τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα	24
1.3.1 miRNAs	26
1.3.2 Μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα.....	28
1.3.2.1 Ιδιότητες των lncRNAs	28
1.3.2.2 LncRNAs και καρκίνος.....	32
2.Σκοπός της εργασίας.....	37
3.Υλικά και μέθοδοι	39
3.1.Βιοπληροφορική ανάλυση	40
3.1.1 Επιλογή του προς ανάλυση lncRNA.....	40
3.1.2 Ανάλυση του κωδικού δυναμικού του lncRNA	40
3.1.3 Ανάλυση έκφρασης σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς.....	40
3.1.4 Ανάλυση συνταινίας-συνέκφρασης στον ποντικό	40
3.2.Χαρακτηρισμός του μεταγράφου του GrACIL2	40

3.2.1 Επίπεδα έκφρασης του GrACILe2 στα δείγματα κυτταρικών σειρών	40
3.2.2 Μεταγραφική σταθερότητα του GrACILe2	44
3.2.3 Υποκυτταρική τοποθέτηση του μεταγράφου του GrACILe2.....	44
3.3. Δημιουργία των μοριακών εργαλείων για τη μελέτη του GrACILe2.	45
3.3.1 Δημιουργία των pLKO constructs	47
3.3.2 Δημιουργία των pBluescript constructs	49
3.4. Γενετική τροποποίηση κυττάρων MKN45.....	51
4.Αποτελέσματα.....	52
4.1.Βιοπληροφορική ανάλυση.....	53
4.1.1 Μετανάλυση μεταγραφομικής και επιλογή του GrACILe2	53
4.1.2 Ανάλυση του κωδικού δυναμικού του GrACILe2	55
4.1.3 Ανάλυση έκφρασης του GrACILe2 σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς.....	56
4.1.4 Ανάλυση συνταινίας-συνέκφρασης στον ποντικό.....	57
4.2.Χαρακτηρισμός του μεταγράφου του GrACILe2	58
4.2.1 Επίπεδα έκφρασης του GrACILe2 στα δείγματα κυτταρικών σειρών	58
4.2.2 Μεταγραφική σταθερότητα του GrACILe2	59
4.2.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταγράφου του GrACILe2.....	61
4.3. Δημιουργία των εργαλείων για τη μελέτη του GrACILe2.....	62
4.3.1 Δημιουργία των pLKO constructs.....	62
4.3.2 Κλωνοποίηση του ολικού μεταγράφου GrACILe2 στον φορέα pBluescript με σκοπό την υπερέκφραση	63
4.4. Γενετική τροποποίηση κυττάρων MKN45.....	64
5. Συμπεράσματα και συζήτηση	67
6. Παράρτημα	71
6.1Πλασμιαδικός χάρτης του Tet-pLKO-puro	72
6.2Πλασμιαδικός χάρτης του pBluescript.....	72
6.3 Παραγωγή των λεντιών.....	73
7. Βιβλιογραφία.....	74
8.Ευχαριστίες	74

Περίληψη

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας γίνεται διερεύνηση των χαρακτηριστικών ενός μη κωδικοποιητικού μεταγράφου, του GrACILe2, και ο σχεδιασμός των εργαλείων για την μελέτη του. Είναι γεγονός ότι τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα αποτελούν ένα σχετικά ανεξερεύνητο πεδίο έρευνας. Τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα παρουσιάζουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης, ενώ έχουν παράλληλα σημαντικό ρόλο στη κυτταρική λειτουργία, εκτελώντας μια ποικιλία ρόλων μέσα στο κύτταρο, που τα καθιστά πολύτιμους στόχους. Το GrACILe2, λοιπόν, επιλέχθηκε καθώς ανήκει στα αυξορυθμιζόμενα γονίδια σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, ενώ παράλληλα τα επίπεδα έκφρασης του συνδέονται και με την κλινική εικόνα του ασθενή, δίχως όμως να εκφράζεται και σε κάποιον φυσιολογικό ιστό ενήλικου ατόμου. Με βάση αυτό το γεγονός, η μελέτη του συγκεκριμένου μεταγράφου αποκτά εκτός από ερευνητικό ενδιαφέρον και ενδιαφέρον στον υγειονομικό τομέα, ιδιαίτερα από τη στιγμή που ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μια μορφή καρκίνου με υψηλά ποσοστά εμφάνισης, αλλά και θνησιμότητας, εξαιτίας της καθυστερημένης διάγνωσης της ασθένειας. Στα πλαίσια της μελέτης που έγινε, αποδείχθηκε ότι το GrACILe2 εκφράζεται μόνο σε καρκινική σειρά που προέρχεται από πρωτογενές καρκινικό αδενοκαρκίνωμα, τονίζοντας έτσι ένα πιθανό ρόλο στην εμφάνιση του όγκου, και όχι στη διατήρησή του. Ακόμα διαπιστώθηκε ο χρόνος ημιζωής του μεταγράφου, καθώς και η υποκυτταρική του τοποθέτηση, τα οποία είναι δυο κρίσιμα στοιχεία για τον χαρακτηρισμό της λειτουργίας αυτού του μεταγράφου. Τέλος, έγινε ο σχεδιασμός των απαραίτητων εργαλείων για να προχωρήσουν μελλοντικά πειράματα, όπως πειράματα μελέτης αλληλεπιδράσεων του GrACILe2 με πρωτεΐνες, υπολογισμού αριθμού μεταγράφων ανά κύτταρο, και δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών στις οποίες να γίνεται κατά συνθήκη καταστολή της έκφρασης του GrACILe2 μέσω RNAi (η πρώτη φάση του οποίου έχει ήδη πραγματοποιηθεί επιτυχώς).

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος, στομάχι, lncRNA, GrACILe2

Abstract

During the course of this thesis, we focused on the characterization of a long non-coding RNA, called GrACILe2, as well as creating the proper tools for the corresponding study. We chose to study a lncRNA, due to the fact that it currently remains a relatively unexplored field. In addition, lncRNAs present a tissue-specific expression pattern, while also maintaining a critical role in cell function, thus further proving their value as possible targets. GrACILe2 was chosen, because it is an up-regulated gene in cases of gastric cancer, with its expression levels being heavily correlated with the clinical image of the patient, in contrast to normal adult tissues, in which it is not expressed. Based on this fact, the value of research and characterization of this lncRNA is elevated, as it has also possible applications in the field of health care, especially because gastric cancer is a type of cancer with high appearance rates, in addition to high mortality due to lack of sufficient methods for early diagnosis. During our study, we proved that GrACILe2 is solely expressed in a cell line derived from a primary gastric adenocarcinoma, thus leading to a theory that GrACILe2 may have a role in the appearance of the tumor, but it is not required for its progression. We also evaluated the half-life time point for the transcript, as well as its subcellular localization, which are two very important parameters for the characterization of the role of the lncRNA. Last, but not least, we successfully designed the constructs and tools needed for the study of various characteristics of GrACILe2 in future experiments, such as the clarification of the proteins that it may interact with, the estimation of copy-number of the transcript per cell, and the creation of a stable cell line that will enable the circumstantial knock-down of GrACILe2 via RNAi (the first phase of which has already been performed successfully).

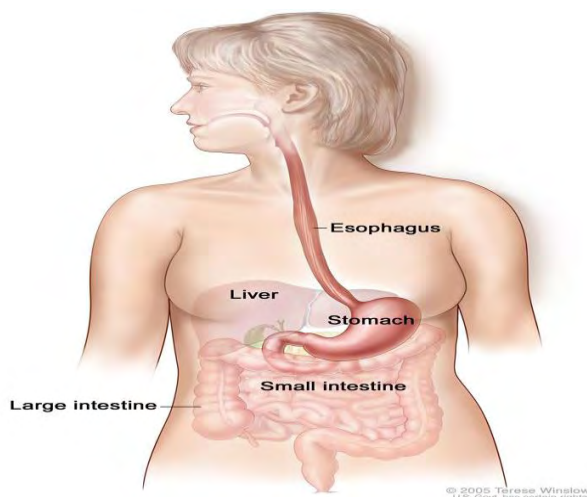
Keywords: Gastric Cancer, lncRNA, GrACILe2.

1.Εισαγωγή

1.1 Ανατομία του στομάχου

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Το στομάχι αποτελεί μέρος του πεπτικού συστήματος (**Εικ. 1.1**). Μάλιστα, αποτελεί το όργανο που επιτελεί την πρώτη χημική πέψη της τροφής, καθώς και την δεύτερη μηχανική επεξεργασία της (μια και η πρώτη συμβαίνει κατά την μάσηση) (Ζίφα Α., 2011). Αυτό συμβαίνει χάρη στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος και πολλών άλλων ουσιών και τη ρυθμική κίνηση (ο ρυθμός της οποίας εξαρτάται από το είδος τροφής και την ποσότητα που καταναλώθηκε), την οποία και επιτελεί κατά την πέψη της τροφής σε αυτό. Παράλληλα αποθηκεύει την τροφή για κάποιο χρονικό διάστημα, προκειμένου να γίνει πλήρης χώνεψη της, πριν αυτή περάσει στο λεπτό έντερο, όπου και θα επεξεργαστεί περαιτέρω (Sherwood, 2013). Ακόμα, στο στομάχι μπορεί να γίνει απορρόφηση των όξινων χημικών ενώσεων. Αυτές με βάση την αρχή του Le Chatelier, και λόγω της υψηλής συγκέντρωσης H^+ στο στομάχι, θα βρίσκονται κυρίως στην μη ιονισμένη μορφή τους, η οποία θα έχει μια αυξημένη ικανότητα να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες. Βέβαια, απορρόφηση αυτών των ενώσεων μπορεί να γίνει και στον εντερικό σωλήνα, όπου γίνεται απορρόφηση κυρίως των βασικών χημικών ενώσεων, αλλά εν μέρει και των όξινων (Gammon, 2013). Αυτό συμβαίνει και πάλι λόγω της αρχής του Le Chatelier, και λόγω του γεγονότος ότι η απορροφητική ικανότητα του λεπτού εντέρου είναι μακράν ανώτερη από ότι του στομάχου, εξαιτίας και του εκτεταμένου συστήματος αιμάτωσης του οργάνου και των λαχνών που σχηματίζει. Αυτή η τελευταία ιδιότητα αξιοποιείται για την μελέτη απορρόφησης πολλών ουσιών από τον οργανισμό, όπως τα φάρμακα (Whalen, 2015).



Εικόνα 1.1 Το πεπτικό σύστημα (πηγή National Cancer Institute)

Επίσης, η υψηλή συγκέντρωση οξέος στο γαστρικό υγρό, που έχει σαν αποτέλεσμα και την μεγάλη πτώση του pH σε αυτό, οδηγεί και σε μεγάλα επίπεδα θνησιμότητας μιας μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών, οι οποίοι εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της τροφής, συμβάλλοντας έτσι και στην άμυνα του οργανισμού (Sherwood, 2013). Όμως, ακριβώς επειδή εκτίθεται και σε μια πληθώρα διαφορετικών μικροοργανισμών, αλλά και σε πολύ υψηλά επίπεδα οξέος, ο στομάχος χαρακτηρίζεται και από πολύ υψηλούς ρυθμούς απόπτωσης και ανανέωσης των κυττάρων του, με 100.000 κύτταρα να υπολογίζεται ότι

κάθε μέρα πεθαίνουν στην εσωτερική κοιλότητα του στομάχου, και άλλα τόσα να δημιουργούνται προκειμένου να αναπληρώσουν τις απώλειες (Grieken, 2003).

1.1.2 Τα τμήματα του στομάχου

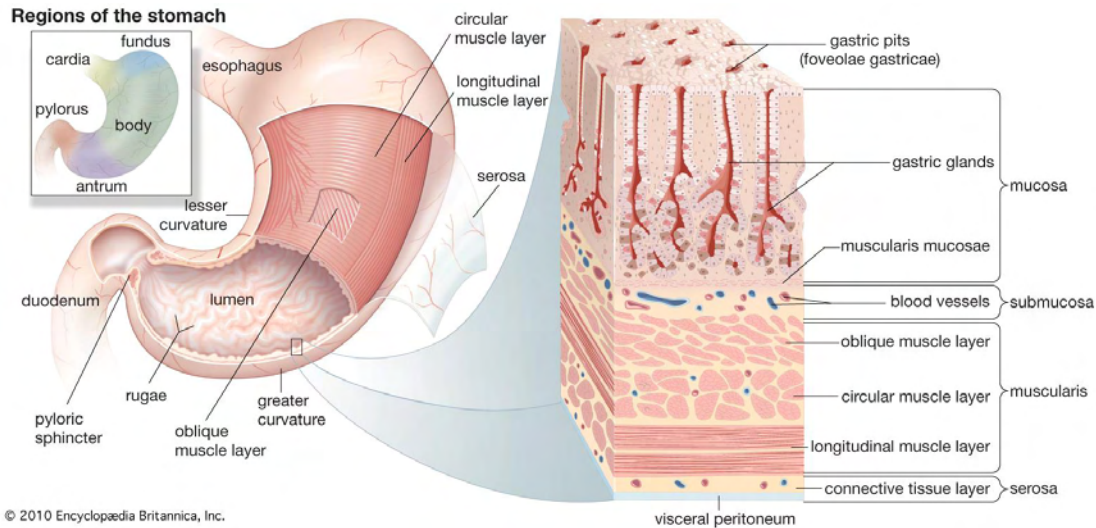
Ο στόμαχος στο επικοινωνεί μέσω του καρδιακού σφιγκτήρα ή στομίου με τον οισοφάγο. Μάλιστα σε αυτόν υπάρχει και μεμβράνη, η οποία δρα ως φράγμα για την διέλευση των περιεχομένων του στομάχου, όπως τα οξέα και τμήματα της επεξεργασμένης τροφής. Έτσι δρα προστατεύοντας τον οισοφάγο από το ακραίο pH του στομάχου, και από την παλινδρόμηση της τροφής (Sherwood, 2013). Αντίστοιχα, στο σημείο επικοινωνίας του με το λεπτό έντερο υπάρχει η περιοχή του πυλωρικού σφιγκτήρα, ο οποίος εμποδίζει την διέλευση της τροφής προς το λεπτό έντερο πριν την πλήρη χώνεψη της, αλλά και εμποδίζει την μεταφορά των περιεχομένων του λεπτού εντέρου (υπολείμματα τροφής και βασικές ουσίες που ρυθμίζουν το αντίστοιχο pH σε αυτό το όργανο) προς το στομάχι (Encyclopedia Britannica). Γύρω και από τις δύο αυτές περιοχές, υπάρχει αντίστοιχα για τον καρδιακό σφιγκτήρα η περιοχή καρδιά (cardia), ενώ για τον πυλωρό το πυλωρικό άντρο. Η περιοχή fundus του στομάχου, ή αλλιώς θόλος, βρίσκεται στο ανώτερο τμήμα του στομάχου, και συνήθως περιέχει μόνο αέρια (Kang, 2013). Το υπόλοιπο μέρος του στομάχου, αποτελεί το σώμα του στομάχου, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί ως προς το τμήμα που αποτελεί το μείζον τόξο, και από το τμήμα που αποτελεί το ελάσσον τόξο, και σε αυτό το τμήμα του στομάχου παρατηρούνται πιο έντονα οι γαστρικές πτυχές (Fox, 2007).

1.1.3 Η ιστολογία του στομάχου

Τα τοιχώματα του στομάχου αποτελούνται από 4 διαφορετικά στρώματα κυττάρων (ή 5 ανάλογα με την ομαδοποίηση των διαφορετικών στρωμάτων κυττάρων που μπορεί να γίνει στο εξωτερικό στρώμα κυττάρων που περικλείει τον στόμαχο), ή αλλιώς και χιτώνες (Εικ. 1.2) (Kang, 2013; Encyclopedia Britannica; Sherwood, 2013; Robert J. Coffey, 2007):

1. Στο εσωτερικό τμήμα του στομάχου βρίσκεται ο βλεννογόνος χιτώνας (mucosa), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έκκριση των ουσιών που απαρτίζουν το γαστρικό υγρό, συμπεριλαμβανομένου και του υδροχλωρικού οξέος, ενώ παράλληλα σχηματίζει και τις πτυχές του στομάχου στη περιοχή του σώματος. Σε αυτόν τον χιτώνα βρίσκονται 3 είδη αδένων: 1) αδένες που εκκρίνουν βλέννα, η οποία δρα προστατευτικά για τον στόμαχο, και βρίσκονται κυρίως στην περιοχή cardia, 2) οι αδένες που εκκρίνουν υδροχλωρικό οξύ και τον παράγοντα GIF (απαραίτητος παράγοντας για την απορρόφηση της βιταμίνης B12 από το λεπτό έντερο), και βρίσκονται κυρίως στον θόλο, και, 3) οι αδένες που εκκρίνουν γαστρίνη, και βρίσκονται κυρίως στο άντρο του πυλωρού.
2. Αμέσως κάτω από τον βλεννογόνο χιτώνα, βρίσκεται ο υποβλεννογόνος χιτώνας (submucosa), ο οποίος αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από συνδετικό ιστό, και έχει σπληνικό και διαχωριστικό ρόλο για τον βλεννογόνο.
3. Αμέσως επόμενος είναι ο μυϊκός χιτώνας (muscularis externa), ο οποίος είναι αρκετά ανεπτυγμένος σε μέγεθος και αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες, και έχει ρόλο στη δημιουργία των ρυθμικών κινήσεων της πέψης.

- Τελευταίος βρίσκεται ο ορογόνο χιτώνας (serosa-ο οποίος μπορεί να διακριθεί σε ορογόνο και υπό-ορογόνο), ο οποίος αποτελείται από στρώματα συνδετικού ιστού, που διαχωρίζει το στομάχι από την υπόλοιπη περιτοναϊκή κοιλότητα.



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

Εικόνα 1.2 Αναλυτική περιγραφή της ιστολογίας του στομάχου σε εγκάρσια τομή.

1.2. Ο καρκίνος του στομάχου

1.2.1 Γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί έναν τύπο καρκίνου με πολύ υψηλά ποσοστά εμφάνισης στον παγκόσμιο πληθυσμό, σε συνδυασμό με αντίστοιχα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας των ασθενών που πάσχουν από αυτόν (Neugut, 2006). Οι μορφές με τις οποίες εμφανίζεται ο καρκίνος του στομάχου είναι (Jaffer A. Ajani, 2017):

- 1) Το αδενοκαρκίνωμα (GAC: gastric adenocarcinoma), με τα ποσοστά εμφάνισης αυτού του τύπου να αγγίζουν το 95% των περιπτώσεων, το οποίο προέρχεται από κύτταρα της επιθηλιακής γενεαλογίας
- 2) Ο μεσεγγυματικός τύπος, είναι ένα σπάνιος τύπος καρκίνου που σχηματίζει μικρές εστίες, και συνήθως σχετίζεται με μεταλλάξεις ενεργοποίησης (gain-of-function) του *KIT* ή πιο σπάνια του *PDGFRα*. Συνήθως οι μικροί σε μέγεθος όγκοι αυτής της κατηγορίας μπορούν να αντιμετωπισθούν με τη χρήση ενδοσκοπικών μεθόδων ή με χειρουργική αφαίρεση τους, ενώ ακόμα για τους μεγαλύτερους σε μέγεθος όγκους, που μπορεί να είναι και μεταστατικοί, έχει δειχθεί ότι μπορούν αποτελεσματικά να αντιμετωπισθούν με τη χρήση φαρμακευτικών παραγόντων όπως το imatinib.
- 3) Ο λεμφικός (lymphoproliferative) τύπος καρκίνου είναι σπάνιος, και μπορεί, εφόσον είναι και γνωστή η ακριβής του τοποθεσία, να αντιμετωπισθεί αποτελεσματικά με χρήση ραδιοθεραπείας σε συνδυασμό με συστηματική χημειοθεραπεία.
- 4) Νεύρο-ενδοκρινικοί τύποι, οι οποίοι είναι επίσης σπάνιοι, και συνήθως προκαλούνται από χρόνια φλεγμονή, λόγω χρόνιας γαστρίτιδας, που οδηγεί σε

αύξηση της γαστρίνης στον ορό, που δρα ως μιτωγόνος ουσία. Αυτός ο τύπος καρκινώματος χαρακτηρίζεται από μικρή συχνότητα μετάστασης. Ακόμα πιο σπάνια μπορεί να γίνει τυχαία εμφάνιση αυτού του τύπου του καρκινώματος, και σε αυτή τη περίπτωση σχετίζεται με δυσμενή εξέλιξη της ασθένειας. Από τη στιγμή που γίνει μεταστατικός αυτός ο τύπος καρκίνου, η θεραπεία είναι κυρίως εξομαλυντική, και αν μπορεί να εκκρίνει ορμόνες, χορήγηση ανάλογων σωματοστατίνης βελτιώνει την κατάσταση του ασθενή, αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής του.

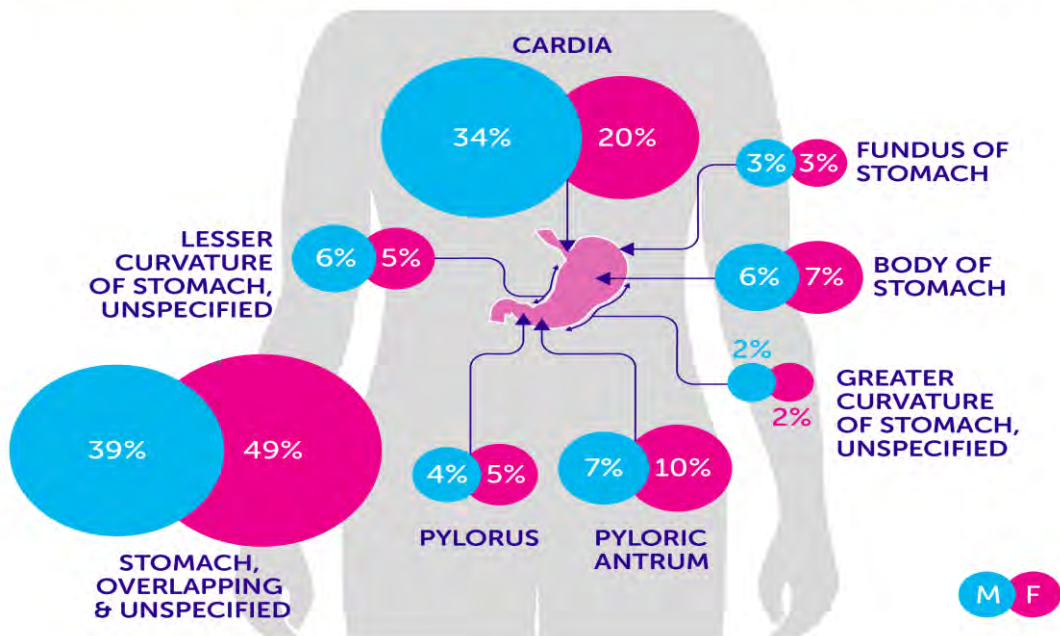
Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας(WHO), το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διακρίνεται περαιτέρω σε tubular, papillary, mucinous και σε poorly cohesive καρκινώματα. Σύμφωνα με το τρόπο κατάταξης κατά Lauren (Jaffer A. Ajani, 2017) (Nisha Padmanabhan, 2017), διακρίνονται τρεις υπότυποι αδενοκαρκινώματος, ήτοι intestinal (δηλαδή εντερικού τύπου 54% ποσοστά εμφάνισης), diffused (δηλαδή διάχυτου τύπου, με 32% ποσοστά εμφάνισης) και στον μεικτό τύπο. Ο τύπος intestinal συνήθως προκύπτει σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, με εμφάνιση κυρίως στους άντρες, ενώ στην πλειοψηφία του εξελίσσεται από προϋπάρχουσα εντερική μεταπλασία του στομάχου. Χαρακτηρίζεται από σχηματισμό δομών σαν αδένες με κυλινδρικό σχήμα και φτωχό stroma (Roopma Wadhwa, 2013). Ο διάχυτος υπότυπος χαρακτηρίζεται από πλούσιο stroma, το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα πάνω στο οποίο θα αναπτυχθεί ο όγκος, σε συνδυασμό με την εμφάνιση ασθενώς συνδεδεμένων καρκινικών κύτταρων. Έχειδειχθεί ότι αυτός ο υπότυπος εμφανίζεται εξαιτίας της απορρύθμισης σηματοδότησης TGFβ και απώλεια μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (Roopma Wadhwa, 2013). Ρόλο σε αυτό φαίνεται να έχει η απώλεια λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου CDH1, που φυσιολογικά δίνει την E-cadherin, η οποία αποτελεί διαμεμβρανική πρωτεΐνη με ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση (Wesley P. Francis, 2007;). Μάλιστα στο ένα τρίτο των κληρονομησιμων τύπων καρκίνου του στομάχου παρατηρούνται μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της πρωτεΐνης E-cadherin, οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο (Wesley P. Francis, 2007; Huiquan Jing, 2014). Τα καρκινικά κύτταρα του διάχυτου υπότυπου παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά αποδιαφοροποίησης, και συνήθως η εμφάνιση αυτού του υπότυπου καρκίνου γίνεται σε νεότερες ηλικίες. Ακόμα, μπορεί να παρατηρηθεί και διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης και ως προς το σημείο στο οποίο θα εμφανιστεί ανατομικά στον στόμαχο η καρκινική εστία (Εικ. 1.3), με τις γυναίκες να εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά εμφάνισης όγκου στο άντρο του πυλωρού, και ελαφρώς περισσότερο από τους άντρες στο σώμα του στομάχου, ενώ παρουσιάζουν και μεγαλύτερα ποσοστά μη επαρκώς προσδιορισμένης εστίας καρκίνου από ότι οι άντρες. Στους άντρες από την αντίθετη, φαίνεται μεγαλύτερο το ποσοστό εμφάνισης εστίας καρκίνου στην περιοχή της καρδιάς, και ελαφρώς περισσότερο από ότι στις γυναίκες στο ελάχιστον τόξο του σώματος, ενώ η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στον θόλο και στο μείζον τόξο φαίνεται ίδια και για τα δυο φύλα(UK cancer research foundation).

Ο καρκίνος του στομάχου, μπορεί ακόμα να κατηγοριοποιηθεί με βάση τη σταδιοποίηση TNM, όπου (Yoon Young Choi, 2016; Lin-Yong Zhao, 2016):

1. με T συμβολίζεται το μέγεθος του όγκου και ο βαθμός διείσδυσης του (όπου με T_{is} (*in situ*) έχουμε την αρχική εστία του όγκου, με T₁ την περίπτωση που ο όγκος έχει

- φτάσει εντός του συνδετικού ιστού-submucosa, με T2 την περίπτωση που έχει διεισδύσει μέχρι τον μυϊκό χιτώνα, με T3 όταν έχει φτάσει σε όλα τα στρώματα του στομάχου, και με T4 όταν αρχίζει και δίνει μεταστάσεις σε παρακείμενους ιστούς-συνήθως η διάγνωση γίνεται στα στάδια 3-4),
2. με N συμβολίζεται ο βαθμός λεμφικής διείσδυσης (δηλαδή, με N0 συμβολίζεται η περίπτωση που δεν έχει γίνει λεμφική διείσδυση, με N1 όταν έχει γίνει διείσδυση σε 1-6 αδένες, με N2 όταν έχει γίνει σε 7-15, και με N3 όταν έχει γίνει διείσδυση σε περισσότερους από 15 λεμφικούς αδένες),
 3. με M δηλώνεται το στάδιο μετάστασης (όπου με M0 είναι η περίπτωση απουσίας μεταστάσεων, και με M1 η παρουσία μεταστάσεων).

STOMACH CANCER CASES: PERCENTAGE DISTRIBUTION BY ANATOMICAL SITE



Εικόνα 1.3 Αναπαράσταση των ποσοστών εμφάνισης καρκινικών εστιών ανά περιοχή του στομάχου και συσχέτιση της με το φύλο του ασθενή (πηγή UK cancer research foundation). Με μπλε φαίνεται το ποσοστό εμφάνισης καρκινικής εστίας ανά περιοχή στους άντρες, ενώ με ροζ στις γυναίκες. Πρώτη θέση φαίνεται να κατέχει η εμφάνιση εστιών με αδιευκρίνιστα όρια και για τα δύο φύλα, ενώ στη δεύτερη θέση έρχονται τα περιστατικά με εμφάνιση εστιών στη περιοχή της καρδιάς. Μάλιστα σε αυτές τις δύο περιπτώσεις φαίνεται και η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα, με τις γυναίκες να δείχνουν ξεκάθαρη υπεροχή στη πρώτη περίπτωση(με 1 στις 2 γυναίκες ασθενείς να εμφανίζουν εστίες αδιευκρίνιστων ορίων), ενώ οι άντρες στην περίπτωση εμφάνισης εστιών στην περιοχή της καρδιάς. Στη τρίτη θέση, με μικρή διαφορά, βρίσκεται η εμφάνιση εστιών στο άντρο του πυλωρού. Σε αυτή και τις υπόλοιπες κατηγορίες όμως δεν φαίνεται κάποια μεγάλη διαφοροποίηση όσον αφορά το φύλο του ασθενή.

Σε κάθε περίπτωση όμως, συνήθως η διάγνωση του καρκίνου του στομάχου γίνεται σε ασθενείς οι οποίοι έχουν ήδη εμφανίσει συμπτώματα της ασθένειας, όπως η απώλεια βάρους, αναιμία και έντονοι πόνοι, και βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της, όπου στην πλειονότητα έχει προηγηθεί και λεμφική διείσδυση (Victor Pasechnikov, 2014). Για να γίνει η διάγνωση και ταυτοποίηση του καρκίνου του στομάχου, πρέπει συνήθως να γίνει ενδοσκοπία, για λήψη δείγματος ιστού (βιοψία) για την ιστολογική ταυτοποίηση του αδενοκαρκινώματος (Kim, 2015). Προκειμένου να γίνει έλεγχος για τις πιθανές μεταστάσεις, γίνεται ένας συνδυασμός μεθόδων όπως η ενδοσκοπία, το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα και ανάλυση CT scan, για να γίνει μια εκτίμηση του βαθμού της τοπικής εισβολής, αλλά και ανίχνευση πιθανής μετάστασης στους περιγαστρικούς λεμφικούς αδένες, μέσω ελέγχου του μεγέθους τους. Μια διαφορετική προσέγγιση για την διάγνωση σε αρχικό στάδιο γίνεται σε χώρες όπως η Κορέα και η Ιαπωνία, όπου γίνεται ραδιογραφία με τη χρήση βαρίου, το οποίο συνδέεται σε τυχόν παραμορφώσεις του γαστρικού επιθηλίου και αυτές οι περιοχές εμφανίζονται λευκές στην ραδιογραφία, αν και αυτή η μεθοδολογία τείνει να αντικατασταθεί από την ενδοσκοπική απεικόνιση (Jun Haeng Lee, 2014).

Οι τρόποι προφύλαξης μέχρι στιγμής έναντι της εμφάνισης καρκίνου του στομάχου εστιάζουν κυρίως στην καταπολέμηση των εξωγενών παραγόντων πρόκλησης του (στους οποίους θα γίνει αναλυτική αναφορά στην αντίστοιχη ενότητα), δηλαδή μέσω καταπολέμησης του *Helicobacter pylori* (Magdalena Chmiela, 2017), μέσω υιοθέτησης ενός πιο υγιεινού προτύπου ζωής, με λήψη χημειοπροφυλακτικών ουσιών και με μείωση της έκθεσης σε καρκινογόνες ουσίες. Μια τέτοια προσέγγιση είναι η λήψη φυσικών και φαρμακευτικών ουσιών οι οποίες να οδηγούν σε μείωση των πιθανοτήτων εμφάνισης καρκίνου του στομάχου, ή έστω καθυστέρηση της εμφάνισης του, με μια από αυτές τις ουσίες να είναι και η ασπιρίνη, καθώς και ουσίες που οδηγούν σε καταπολέμηση του *H. pylori* έχουν αποδειχθεί να δρουν ευεργετικά (Carlos Sostres, 2014; Archimandritis, 2005).

1.2.2 Αίτια εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου

Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί μια ασθένεια με μεγάλη ετερογένεια, και ως προς τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που το χαρακτηρίζουν (φαινότυπος), αλλά και ως προς τα γονοτυπικά χαρακτηριστικά, ενώ ακόμα και τα αίτια εμφάνισης του είναι εξίσου ποικίλα και συνοψίζονται σε :

1.2.2.1 Κληρονομικά χαρακτηριστικά

Σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις καρκίνου, στις οποίες η προδιάθεση μπορεί να κληρονομηθεί από τους γονείς στους απογόνους τους, αυξημένο ρίσκο έχει συσχετισθεί κυρίως με τον διάχυτο υπότυπο, και μάλιστα με:

- a. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας που έχουν προκληθεί στο γονίδιο *CDH1*, το οποίο κωδικοποιεί μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη και μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, την cadherin-1, ή αλλιώς όπως είναι κυρίως γνωστή, E-cadherin (Hansford S, 2015),
- b. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας σε γονίδια όπως το *MLH1*, το οποίο έχει ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, και πιο συγκεκριμένα κατά το mismatch repair (Oliveira C, 2015),

- c. Μεταλλάξεις στο CTNNA, το οποίο κωδικοποιεί την catenin 1α, μια πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης, και σχετίζεται με εμφάνιση κυρίως του διάχυτου υπότυπου (Petronchich I, 2016),
- d. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας των γονιδίων *BRCA*, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA (Mihailidou C, 2017).

Η κληρονομία αυτών των μεταλλάξεων ακολουθεί ένα αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομίας, και το ρίσκο εμφάνισης αδενοκαρκινώματος στους φορείς αυτών των μεταλλάξεων φτάνει έως και το 80%, και μέχρι στιγμής προτείνεται σε αυτούς του φορείς να κάνουν προφυλακτική γαστρεκτομή μόλις ξεπεράσουν τα 20 χρόνια της ηλικίας τους (Strand MS, 2017).

1.2.2.2 Γενετικές τροποποιήσεις σε επίπεδο γονιδιώματος

Είναι γνωστό μέχρι στιγμής ότι το 50% των ασθενών παρουσιάζει μεταλλάξεις που καθιστούν ανενεργή την p53, είτε μέσω αλλαγής της αμινοξικής αλληλουχίας της, είτε λόγω καταστολής της έκφρασης της. Ακόμα παρατηρείται αύξηση στην μεθυλίωση DNA των νησίδων CpG σε περιοχές υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, γεγονός το οποίο σχετίζεται άμεσα με δυσμενή κλινική εικόνα του ασθενή (Network, 2014). Ακόμα, πολλές περιπτώσεις ογκογονιδίων με αυξημένη έκφραση έχουν αναφερθεί, όπως η περίπτωση του CTNNB1 (το οποίο κωδικοποιεί την β-κατενίνη), το HER2 κ.α. , ενώ παράλληλα έχει αναφερθεί και απορρύθμιση πολλών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (στα οποία γίνεται εκτενή αναφορά παρακάτω). Με βάση, τον χαρακτηρισμό των προτύπων γενετικής και επιγενετικής παραλλακτικότητας των όγκων με τη χρήση της βάσης δεδομένων TCGA (the cancer genome atlas), μπορούν να διακριθούν 4 μοριακοί υπότυποι ως προς τις διάφορες περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου (Daniela Cornelia Lazăr M. F., 2018):

- 1) Όγκοι που σχετίζονται με την παρουσία του ιού *Epstein-Barr (EBV+)*, που αποτελούν το 8,8% των περιπτώσεων με καρκίνο του στομάχου.
- 2) Όγκοι που παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), που αποτελούν το 21,7 των κρουσμάτων
- 3) Όγκοι που χαρακτηρίζονται από γενετικά σταθερό γονιδίωμα (genomic stable), που αποτελούν το 19,7 των κρουσμάτων
- 4) Όγκοι με ανισορροπία χρωμοσωμάτων (CIN), οι οποίοι εμφανίζονται σε σχεδόν τους μισούς ασθενείς (49,8 %).

Σε δεύτερη ανάλυση που έγινε με βάση τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής βάσης ACRG που στηρίζεται σε δειγματοληψία όγκων από Ασιατικές χώρες, οι 4 μοριακοί υπότυποι που εμφανίστηκαν ως προς τις μοριακές τροποποιήσεις των γονιδίων είναι (Mihaela Chivu-Economescu, 2018):

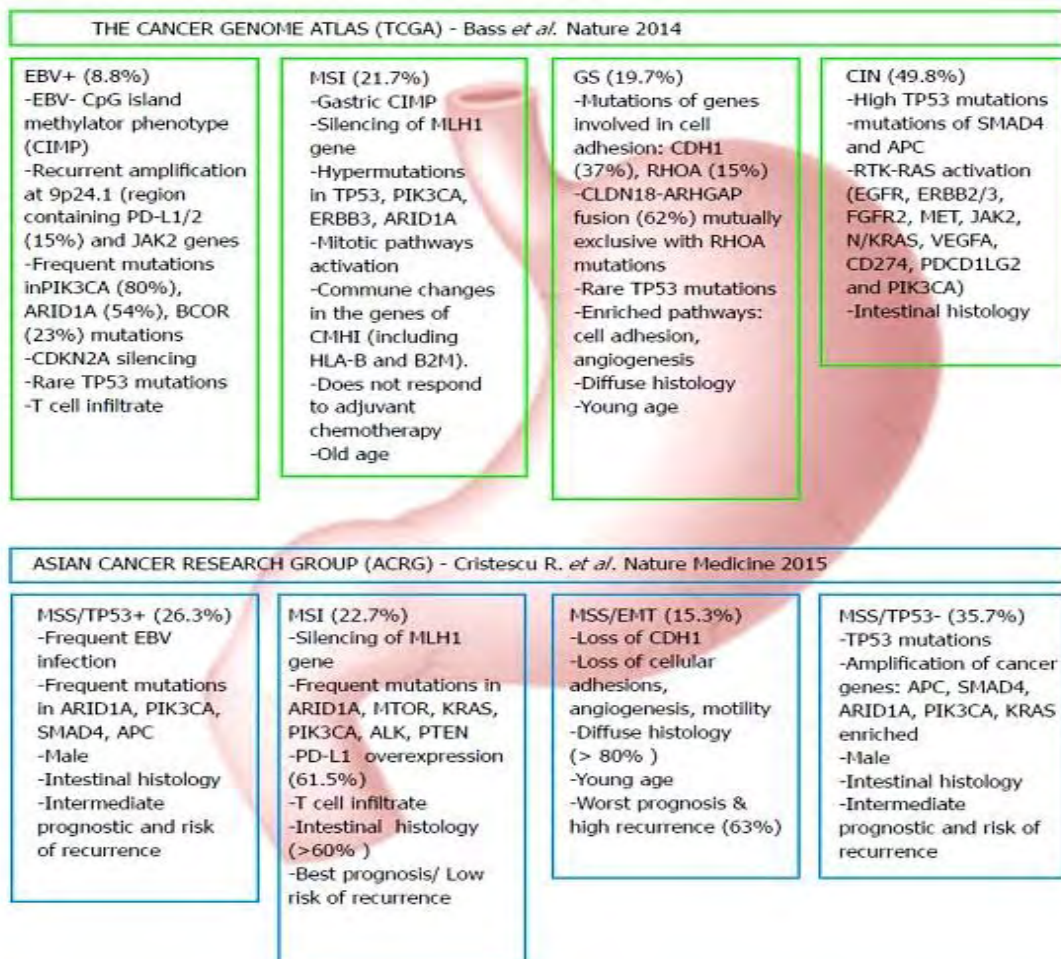
1. Όγκοι που χαρακτηρίζονται από σταθερότητα μικροδορυφόρων και παρουσία λειτουργικής πρωτεΐνης p53 (MSS/TP53+), σε 26,3 % των ασθενών
2. Όγκοι που παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), σε 22,7% των ασθενών
3. Όγκοι που χαρακτηρίζονται από γενετική σταθερότητα μικροδορυφόρων, αλλά παρουσιάζουν ενισχυμένα λειτουργικά αντίγραφα στα γονίδια που ρυθμίζουν τη

μετάβαση από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά κύτταρα (MSS/EMT), σε 15,3% των ασθενών

4. Όγκοι που χαρακτηρίζονται από σταθερότητα μικροδορυφόρων, αλλά δεν έχουν λειτουργική p53 πρωτεΐνη, σε 35,7% των ασθενών.

Σε αυτή τη δεύτερη ανάλυση, ασθενείς που ανήκουν στις δύο πρώτες κατηγορίες φαίνεται ότι είχαν καλύτερη κλινική εικόνα, σε σχέση με αυτούς που ανήκουν στις άλλες δύο κατηγορίες, ενώ ακόμα και ο βαθμός επανεμφάνισης του καρκίνου μετά από θεραπεία διαφέρει ανάλογα και με την κατηγορία, με την κατηγορία 2 για παράδειγμα να παρουσιάζει 23% ποσοστό επανεμφάνισης καρκίνου, σε αντίθεση με το 63% της κατηγορίας 3. Τα ποσοστά εμφάνισης της κάθε κατηγορίας, οι πιο συχνές τροποποιήσεις ως προς την έκφραση/λειτουργία γονιδίων, αλλά και η προβλεπόμενη εικόνα του ασθενή όπως αυτή δόθηκε από την δεύτερη ανάλυση, φαίνονται αναλυτικά στην **εικόνα 1.4** (Network, 2014; Sang Cheul Oh, 2018).

Πίσω από κάθε υπότυπο από αυτούς, βρίσκεται μια πληθώρα μεταλλάξεων και τροποποιήσεων και σε επίπεδο αλληλουχίας του DNA, αλλά και σε επίπεδο διάταξης χρωματίνης και επιγενετικών τροποποιήσεων. Μάλιστα, ανάλογα με το ποια γονίδια επηρεάζονται από αυτές τις παρεκκλίσεις από την φυσιολογική λειτουργία, επηρεάζονται και παράγοντες όπως η ηλικία εμφάνισης του όγκου, ο τύπος και το πόσο επιθετική μορφή καρκίνου θα αναπτύξει ο ασθενής. (Bass, 2014)



Εικόνα 1.4 Αναλυτική απεικόνιση των δυο προσεγγίσεων χαρακτηρισμού των υπότυπων καρκίνου του στομάχου, δηλαδή σύμφωνα με το TCGA και το ACRG, με βάση την γενετική και επιγενετική παραλλακτικότητα που εμφανίζουν. Με βάση το TCGA, οι υπότυποι διαχωρίζονται ως προς τη παρουσία μόλυνσης από τον ιό Epstein-Barr, ή από την παρουσία αστάθειας μικροδορυφόρων, ή την αστάθεια χρωμοσωμάτων, ή από παρουσία σταθερού γονιδιώματος σε συνδυασμό με πληθώρα μεταλλάξεων. Σύμφωνα με το ACRG, οι υπότυποι του καρκίνου του στομάχου διαχωρίζονται από την παρουσία σταθερότητας μικροδορυφόρων σε συνδυασμό με φυσιολογική πρωτεΐνη p53, ή από αστάθεια μικροδορυφόρων, ή όγκοι με γενετική σταθερότητα αλλά αύξηση σε επίπεδα γονιδίων που ρυθμίζουν το EMT, ή από όγκους με σταθερότητα μικροδορυφόρων χωρίς όμως την παρουσία λειτουργικής πρωτεΐνης p53. Σε κάθε περίπτωση, και με τους δύο τύπους κατηγοριοποίησης, οι όγκοι χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένο προφίλ και ως προς τους παράγοντες των οποίων η έκφραση επηρεάζεται, αλλά και ως προς χαρακτηριστικά όπως η ιστολογία του όγκου, η ηλικία εμφάνισης και η δυσμενής εικόνα του ασθενή.

1.2.2.2.1 Μονονουκλεοτιδικές μεταλλάξεις Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

Η ιδιάζουσα περίπτωση των μονονουκλεοτιδικών μεταλλάξεων (SNP), προϋποθέτει την ταυτόχρονη ύπαρξη πολυμορφισμών σε επίπεδο ενός νουκλεοτιδίου, σε θέσεις που να επηρεάζουν λειτουργία γονιδίων όπως (Tropp, 2014):

- Γονίδια των οποίων τα προϊόντα τους εμπλέκονται στην άμυνα έναντι προσβολής από το *H. pylori* (IL1B, IL1RN και TNFA) (Hyuna Sung, 2017; Caiyun He, 2015)
- Γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό καρκινογόνων (CYP2E1 και GSTM1) (You WC, 2005)
- Γονίδια που δίνουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι σύνθεσης δεοξυνουκλεοτιδίων (MTHFR και TYMS) (Jiajia Yuan, 2016; Zhao T1, 2015)
- Γονίδια των οποίων τα προϊόντα έχουν ρόλο στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA (MTHFR και XRCC1) (Zhuo Cao, 2014; Zhang X, 2014)
- Ογκοκατασταλτικά γονίδια (TP53 και CDH1) (Lin Y1, 2015; Wang S, 2013)

Βέβαια, ανίχνευση και ταυτοποίηση των πολυμορφικών αυτών θέσεων δεν έχει αξιοποιηθεί ευρέως στην κλινική πράξη, καθώς απαιτείται και περαιτέρω μελέτη για το κατά πόσο αύξηση της παρουσίας διαφόρων SNPs μπορεί να συσχετισθεί με αύξηση στην πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου (Russell, 2006). Μέσω ανάλυσης από τη GWAS (Εικ. 1.5), έγινε έλεγχος σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος, προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση των SNPs που έχουν ρόλο στον καρκίνο του στομάχου. Οι ερευνητές γονοτύπισαν 188 περιπτώσεις καρκινικών δειγμάτων και τα σύγκριναν με 752 ως μάρτυρα, ελέγχοντας συνολικά 85,576 SNPs. Τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα από αυτή την ανάλυση (2,753 SNPs) αναλύθηκαν συγκριτικά εκ νέου, έπειτά από δειγματοληψία 749 περιπτώσεων καρκινικών δειγμάτων και 750 φυσιολογικών (Nan Hu, 2016).

Από αυτά τα SNPs, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσίαζαν αυτά που βρίσκονταν στο γονίδιο που κωδικοποιεί το PSCA (prostate stem-cell antigen), και, πιο συγκεκριμένα, το ιντρονικό SNP rs2976392 ταυτοποιήθηκε ως αυτό που σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου, το οποίο βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με το rs2294008, το οποίο βρίσκεται στο εξόνιο 1. Ο επακριβής ρόλος του PSCA στον καρκίνο

του στομάχου είναι απαραίτητο να μελετηθεί περαιτέρω (Li-Xin Qiu, 2016). Ακόμα κάποια SNPs που φαίνεται να συσχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του στομάχου είναι τα PLCE1 → rs2274223, C20orf54 → rs1304295, το rs13361707 το οποίο εμφανίζεται στην περιοχή ανάμεσα στα γονίδια PTGER4 και PRKAA1, και το ZBTB20 → rs9841504. Μάλιστα το SNP που ανιχνεύεται στο PLCE1 φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου και δυσμενή πρόγνωση για τον ασθενή, κυρίως όμως σε Ασιατικούς πληθυσμούς, και όχι σε Καυκάσιους (Luo D, 2011; Kim YD1, 2014).

Gene (locus)	Identified SNPs	Reference	Validated?
Noncardia gastric cancer			
PSCA (8q24.3)	rs2976392A>G rs2294008	49	Yes ^{48,55,189-192}
PTGER4 or PRKAA1 (5p13.1)	rs13361707T>C	57	Yes ¹⁹⁸
ZBTB20 (3q13.31)	rs9841504C>G	57	No
Diffuse gastric cancer			
PSCA (8q24.3)	rs2294008	49	Yes ^{48,55,189-192}
MUC1 (1q22)	rs2070803G>A	49	Yes ^{56,199}
Cardia and noncardia gastric cancers			
PLCE1 (10q23)	rs2274223A>G	48, 52	Yes ^{50,53,200}
C20orf54 (20p13)	rs1304295	48	No ⁵⁶

Εικόνα 1.5 Παράθεση των SNPs που έχουν ήδη συσχετισθεί με την εμφάνιση καρκίνου του στομάχου, ανά εστία εμφάνισης του όγκου.

1.2.2.2.2 Αστάθεια χρωμοσωμάτων

Η αστάθεια των χρωμοσωμάτων εδώ και καιρό έχει αναγνωριστεί ως ένας βασικός παράγοντας που εμφανίζεται σε περιπτώσεις κακοήθειας, και η εμφάνιση του μπορεί να γίνει τόσο σε αρχικά όσο και σε προηγμένα στάδια της ασθένειας (El-Omar, 2014). Η αστάθεια των χρωμοσωμάτων είναι μια δυναμική διαδικασία με αντιστρεπτές επιπτώσεις ως προς την εμφάνιση της ασθένειας. Η αστάθεια αυτή προκύπτει από ελλείψεις ή διπλασιασμούς γονιδιωματικού DNA, ακόμα και σε επίπεδο ολόκληρων χρωμοσωμάτων, όπου σε αυτή τη περίπτωση κατατάσσονται οι ανευπλοειδίες. Εναλλακτικά, η γενετική αστάθεια μπορεί να αναφέρεται σε περιοχές του χρωμοσώματος, που μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές ως προς την έκφραση γονιδίων, και αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε μιας μετάθεσης, είτε λόγω διπλασιασμού ή έλλειψης κάποιου τμήματος DNA, ή ακόμα και η περίπτωση της απώλειας ετεροζυγωτίας, όπου χάνεται το λειτουργικό αλληλόμορφο (Röcken Christoph, 2017). Τέτοιες αλλαγές παρατηρούνται σε μεγάλο βαθμό στον καρκίνο του στομάχου, και μάλιστα κάποιες από αυτές συνδέονται με συγκεκριμένους υπότυπους της ασθένειας και σχετίζονται άμεσα με την κλινική εικόνα του ασθενή. Πιο συγκεκριμένα, στον εντερικό υπότυπο, έχουν παρατηρηθεί διπλασιασμοί των περιοχών 8q, 17q και 20q, ενώ στον διάχυτο υπότυπο έχει παρατηρηθεί διπλασιασμός των περιοχών 12q και 13q (Röcken, 2017). Αξίζει να σημειωθεί βέβαια, ότι ανάλογα και με τον γεωγραφικό πληθυσμό στον οποίο αναφερόμαστε, παρατηρούνται και διαφορετικά πρότυπα ως προς αυτές τις διαφορετικές τροποποιήσεις, τονίζοντας έτσι και τον σημαντικό ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει και το πληθυσμιακό γενετικό υπόβαθρο (Bo Hwa Sohn, 2017). Μια χαρακτηριστική περίπτωση γονιδίου που έχει μελετηθεί εκτενώς, είναι η περίπτωση του HER2 (το οποίο δίνει έναν υποδοχέα κινάση τυροσίνης, που οδηγεί

σε σηματοδότηση μέσω MAP κινασών). Εξαιτίας των μετατοπίσεων που γίνονται στο γονιδίωμα, το γονίδιο αυτό μεταφέρεται και υπερεκφράζεται σε περίπου 20% των ασθενών. Επειδή ακριβώς σας περίπτωση έχει μελετηθεί εκτενώς, αξιοποιείται θεραπευτικά ως στόχος μονοκλωνικών αντισωμάτων (χρήση του trastuzumab-μονοκλωνικό αντίσωμα). Δυστυχώς, το αποτέλεσμα αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης είναι παροδικό, και παρατηρείται μια αύξηση του προσδόκιμου ζωής της τάξης των 2-3 μηνών, ενώ πάντα μπορεί να εμφανιστεί ανθεκτικότητα έναντι αυτής της θεραπείας (Boku, 2014; Lucas Faria Abrahao-Machado, 2016).

Ακόμη, εξαιτίας των μεταθέσεων, μπορεί να δημιουργηθούν και συντηγμένες αλληλουχίες γονιδίων (γεγονός το οποίο παρατηρείται έντονα σε αιματολογικούς καρκίνους). Στον καρκίνο του στομάχου έχει παρατηρηθεί αυτό το φαινόμενο, προϊόν του οποίου είναι μια χιμαιρική SLC1A2-CD44 πρωτεΐνη. Αυτή η χιμαιρική πρωτεΐνη συνδέεται με ανωμαλίες στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, καθώς και διατάραξη των μεταβολικών μονοπατιών του κυττάρου (Tao J, 2011). Πιο σπάνια, μπορεί να παρατηρηθεί δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών, οι οποίες να αποτελούνται εν μέρει από την ROS1, η οποία είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας κινάση τυροσίνης, με τη δημιουργία αυτής της χιμαιρικής πρωτεΐνης να οδηγεί σε υπερέκφραση του υποδοχέα. Η ταυτοποίηση της ύπαρξης αυτής της χιμαιρικής πρωτεΐνης είναι αρκετά σημαντική, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία κάποιο μόριο που να μπλοκάρει την δραστηριότητα της κινάσης, έστω και σε αυτό το μικρό ποσοστό των ασθενών (<1%) (Kurtis D. Davies, 2013).

Επιπροσθέτως, έχουν παρατηρηθεί 18 γενετικοί τόποι σε 17 χρωμοσώματα που είναι σε μεγάλο βαθμό επιρρεπείς σε φαινόμενα απώλειας ετεροζυγωτίας, ενώ το ποσοστό με το οποίο εμφανίζεται αυτή η απώλεια στους ασθενείς συσχετίζεται με την κλινική τους εικόνα (Seung-Jin Hong, 2010). Τα γονίδια που επηρεάζονται πιο συχνά από την απώλεια ετεροζυγωτίας, είναι το γονίδιο της p53, το APC και το NME, με συχνότητες εμφάνισης στους ασθενείς σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30%, (Souvik Ghatak, 2017).

1.2.2.2.3 Αστάθεια μικροδορυφόρων

Η αστάθεια μικροδορυφόρων μπορεί να ανιχνευτεί σε ~50% των περιπτώσεων σποραδικού καρκίνου του στομάχου και κατά κύριο ρόλο συμβαίνει λόγω επιγενετικών αλλαγών στα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που επιδιορθώνουν αταίριαστες βάσεις στο DNA, όπως στην περίπτωση του *MLH1* και των γονιδίων της ομάδας *MSH*. Πιο συχνή επιγενετική τροποποίηση σε αυτή την περίπτωση είναι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου αυτού, με αποτέλεσμα την δημιουργία πολλαπλών μεταλλάξεων, ειδικά σε περιοχές με μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις (Margherita Ratti i. A., 2018). Τέτοιες μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση πλήθους γονιδίων που βρίσκονται καθοδικά αυτών, οδηγώντας σε σημαντική απορρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική σηματοδότηση, επηρεάζοντας παράλληλα την έκφραση πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Polom K, 2018). Αντίστοιχα οι όγκοι, μπορούν να διακριθούν σε αυτούς που φέρουν υψηλά ή χαμηλά επίπεδα αστάθειας μικροδορυφόρων. Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως σε μοριακό επίπεδο ο ρόλος των μικροδορυφορικών μεταλλάξεων στην καρκινογένεση, αλλά έχει παρατηρηθεί ότι, σε διάφορους γεωγραφικούς πληθυσμούς, οι ασθενείς που χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά αστάθειας μικροδορυφόρων, εμφανίζουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής από

τους ασθενείς που έχουν χαμηλή ή και μηδαμινή συχνότητα εμφάνισης αυτής της αστάθειας (El-Omar, 2014). Αυτή η εικόνα όμως αλλάζει σε χορήγηση των κλασσικών προσεγγίσεων χημειοθεραπείας σε ασθενείς με αυτόν τον υπότυπο, καθώς σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση του ασθενή. Συνεπώς, σε ασθενείς που εμφανίζουν αυτόν τον υπότυπο, μια ανοσολογική θεραπευτική προσέγγιση θεωρείται αυτή τη στιγμή προτιμότερη (Margherita Ratti A., 2018)

1.2.2.2.4 Επιγενετικές τροποποιήσεις

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στον καρκίνο, και δη στη περίπτωση του καρκίνου του στομάχου, διαδραματίζουν άκρως σημαντικό ρόλο, τόσο στην δημιουργία καρκινικών εστιών, όσο και στην μετέπειτα ανάπτυξη του όγκου. (Nisha Padmanabhan, 2017). Έχει παρατηρηθεί ότι σε πρωτογενείς όγκους στο στομάχι, ο πρώτος παράγοντας που αλλάζει δραματικά στους ασθενείς δεν είναι οι μεταλλάξεις στο DNA, αλλά το προφίλ των επιγενετικών τροποποιήσεων (Nisha Padmanabhan, 2017) οι οποίες μπορεί να λάβουν χώρα σε 3 διακριτά επίπεδα:

1. Στην περίπτωση των ιστονών, έχει παρατηρηθεί εκτεταμένη απορρύθμιση ως προς τις διάφορες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις τις οποίες μπορούν να δεχτούν (>100). Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση, ουβικουιλίνωση κ.α. (και οι αντίστοιχες διαδικασίες αφαίρεσης αυτών των τροποποιήσεων) κατέχουν κύρια θέση στο μονοπάτι ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, αλλά και σε διαδικασίες όπως ρύθμιση της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA (FU, 2015). Αυξημένα επίπεδα σε κάποιες ιστονικές τροποποιήσεις έχουν συσχετισθεί με αυξημένες πιθανότητες τοπικής λεμφαδενικής εισβολής, συνεπώς και με δυσμενή κλινική εικόνα. Χαρακτηριστικό παραδείγματα είναι η μεταβολή των επιπέδων H3K27ac (ακετυλίωση της λυσίνης στην θέση 27 της ιστόνης 3), η οποία βρίσκεται κυρίως σε θέσεις ενεργών ενισχυτών. Αντίθετα, τριπλή μεθυλίωση της λυσίνης της ιστόνης 3 (H3K27me3) οδηγεί σε συμπύκνωση της χρωματίνης σε εκείνο το σημείο, γεγονός που οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή (James E. Audia, 2016; Shafqat Ali Khan, 2015). Οι άνωθεν τροποποιήσεις μεταβάλλονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τελικά να ενισχύεται η έκφραση ογκοεπαγωγικών γονιδίων και να μειώνεται η έκφραση ογκοκατασταλετών. Η ακριβής ανάλυση του βαθμού δράσης της κάθε ιστονικής τροποποίησης ξεχωριστά δεν είναι εύκολη διαδικασία, καθώς πολύ συχνά συνοδεύονται και από μεθυλίωση του DNA με το οποίο αλληλεπιδρά η ιστόνη (Yasuto Araki, 2017).
2. Σε επίπεδο DNA, όπου μπορεί να συμβεί προσθήκη μεθυλομάδων, καθώς και αφαίρεση τους. Πιο συνηθισμένες είναι η προσθήκη στη θέση 5 της κυτοσίνης μιας μεθυλομάδας, ή μιας υδρόξυμεθυλομάδας, ή μιας φορμυλομεθυλομάδας, ή μιας καρβοξυλομάδας, με την κάθε τροποποίηση να έχει και διαφορετικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Tomomitsu Tahara, 2015). Η μεθυλίωση του DNA σε περιπτώσεις καρκίνου, κυρίως παρατηρείται αυξημένη σε περιοχές υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, γονιδίων με ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, και γονιδίων που έχουν ρόλο στην αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού Wnt, και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων μεταγραφής (Wang H, 2017). Μάλιστα, η υπερμεθυλίωση δεν παρατηρείται μόνο σε κακοήθειες τελικού

σταδίου, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί εκτενώς και στα αρχικά στάδια της ασθένειας, ενώ ακόμα μπορεί να αποτελεί και μέρος της αιτιολογικής βάσης για τη δημιουργία του πρωταρχικού όγκου (Francesca Pirini, 2017). Επί τούτου, έχει δειχθεί σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, ότι καταστολή της μεθυλίωσης του DNA, σχετίζεται με μείωση των πιθανοτήτων εμφάνισης καρκίνου του στομάχου (Goto K, 2016).

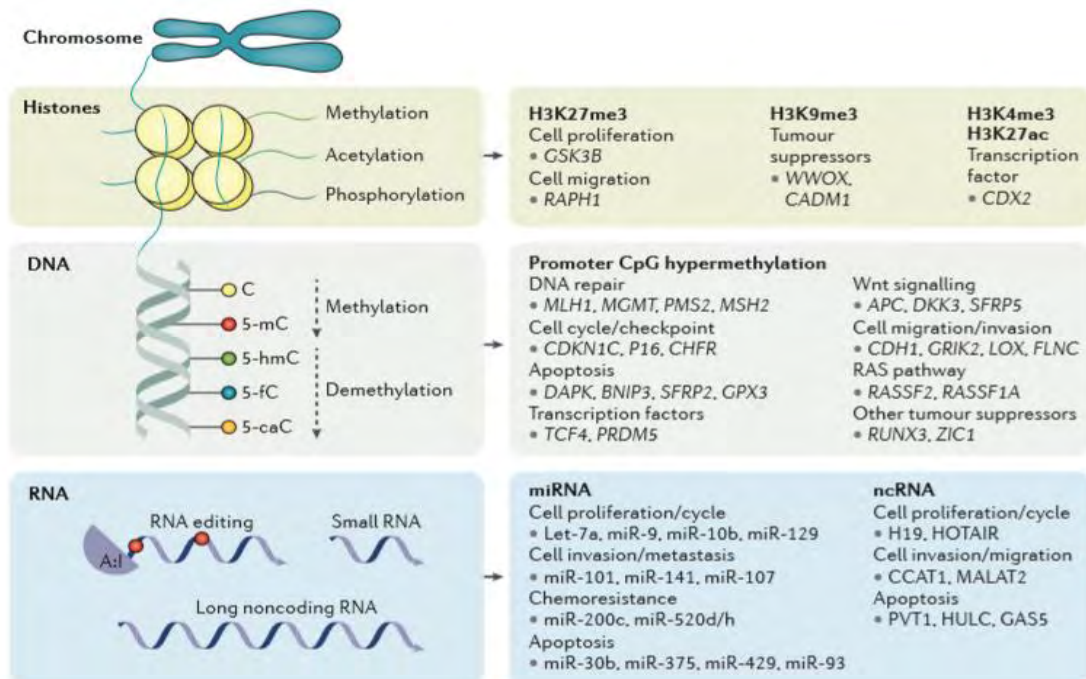
3. Σε επίπεδο RNA, όπου οι διαφορετικές μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις, υπερβαίνουν τις εκατό, ορίζοντας έτσι και το πεδίο της επιμεταγραφομικής (João Lobo, 2018) (Keren L Witkin, 2017). Η κυριότερη τροποποίηση σε ευκαρυωτικά mRNA είναι η N₆-μέθυλαδενοσίνη, μια αναστρέψιμη τροποποίηση η οποία μπορεί να επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση με πολύπλοκους τρόπους. Παρόλο που δεν έχει μελετηθεί ακόμα στον καρκίνο του στομάχου, αυτή η τροποποίηση και οι ρυθμιστές της (METTL3), φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο και σε άλλους τύπους καρκίνου (Ly P. Vu, 2017). Επίσης, σε συνδυασμό με τις άμεσες χημικές τροποποιήσεις που μπορεί να δεχθεί το RNA, μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις σε επίπεδο RNA, με πιο κοινή την απαμίνωση της αδερίνης σε ινοσίνη (το οποίο γίνεται από τα ένζυμα ADAR και ADARB1), η οποία αναγνωρίζεται ως γουανίνη κατά τη μετάφραση (Okugawa Y, 2018). Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές κωδικονίων, αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, ή ακόμα και αλλαγές κατά τη διάρκεια του ματίσματος, το οποίο μπορεί εν τέλει σε περιπτώσεις καρκίνου να επηρεάσει την απόκριση στις θεραπείες. Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι καρκινικοί τύποι οι οποίοι φέρουν υψηλά επίπεδα του ADAR, και παράλληλα χαμηλά επίπεδα του ADARB1 παρουσιάζουν την χειρότερη κλινική εικόνα, ενώ ακόμα έχει παρατηρηθεί δυσλειτουργία στην επιμέλεια του RNA που συνοδεύεται από αύξηση των σφαλμάτων σε θέσεις αναγνώρισης από το ADAR, σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, υπογραμμίζοντας έτσι τον δυνητικά σημαντικό ρόλο της επιμεταγραφομικής στην καρκινογένεση αυτού του ιστού (Chan TH, 2016).

Αναλυτικά οι επιγενετικές τροποποιήσεις και για τα 3 επίπεδα, και τα γονίδια τα οποία επηρεάζονται εμφανίζονται στην **εικόνα 1.6** (Nisha Padmanabhan, 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις, αποτελούν και πολύτιμους διαγνωστικούς δείκτες (Schneider BG, 2015). Μια τέτοια προσέγγιση είναι η μεθοδολογία του DNA-methylation test, για την ανίχνευση μιας ποικιλίας δεικτών, από τμήματα DNA που μπορούν να ανιχνευτούν είτε σε ολικό αίμα, είτε κυρίως σε όρο του αίματος ή πλάσμα (Hu W, 2017). Κάποιοι από αυτούς τους δείκτες φαίνονται στην **εικόνα 1.7**.

Πολύ συχνά σε περιπτώσεις καρκίνου γίνονται μεταλλάξεις σε κωδικοποιητικά γονίδια, των οποίων το πρωτεϊνικό προϊόν επάγει επιγενετικές τροποποιήσεις. Πιο συνηθισμένες στον καρκίνο του στομάχου, είναι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα γονίδια:

- ✚ *ARID1A*, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, απώλεια λειτουργίας του οποίου έχει παρατηρηθεί σε >60% των ασθενών που εμφανίζουν τον διάχυτο τύπο καρκίνου (Dan-dan Wang, 2012),
- ✚ *MLL1-MLL4*, οι οποίες είναι μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών που δρουν ογκοκατασταλτικά, με ποσοστό εμφάνισης σε 38% των ασθενών, και θεωρούνται πιθανοί στόχοι θεραπειών (Changwon Kang, 2014),

- ✦ *DOT1L* (μεταλλάξεις του εμφανίζονται κυρίως στον διάχυτο υπότυπο) και *EZH2*, που δρουν ως μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών, μεταλλάξεις των οποίων είναι σπάνιες, αλλά υπάρχουν φαρμακευτικές ουσίες που μπορούν να τις στοχεύουν (Shamshul Ansari, 2018 ; Lu Gan, 2018).



Εικόνα 1.6 Αναπαράσταση των πιο συχνών επιγενετικών τροποποιήσεων σε επίπεδο ιστονών, DNA και RNA, καθώς και του ρόλου τον οποίο διαδραματίζουν στην λειτουργία του κυττάρου, ανάλογα με το γονίδιο του οποίου την έκφραση ή τη λειτουργία μπορεί να επηρεάζουν, παραθέτοντας και κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα στόχων των οποίων η λειτουργία επηρεάζεται από αυτές τις επιγενετικές τροποποιήσεις.

Hypermethylated marker gene	Parameter	Observed change	Refs
Serum			
RUNX3	Pre-operative vs post-operative	Decreased methylation by 12-fold	159
	Liver metastasis	Increased methylation in 6 of 10 cases	
TIMP3	Cumulative disease-free survival	Increased methylation associated with worse prognosis	168
	Disease stage	Increased methylation in Stage III/IV	
XAF1	Median disease-free survival	Increased methylation associated with worse prognosis	165
	Tumour recurrence	Negative-to-positive transition in methylation status in 10 of 12 cases	
MLH1	Disease stage	Increased methylation in Stage III/IV	162
APC + CDH1	Prognosis	Increased methylation associated with worse prognosis	162
CDH1	3-Year survival rate	Increased methylation associated with poorer survival	169
RASSF1A	Stage	Increased methylation associated with advanced stage, and lymph node positivity	161
APC	Survival	Decreased methylation associated with better survival	161
VAV3	Stage	Increased methylation associated with advanced stage	166
Blood			
MINT2	Median survival time	Increased methylation associated with worse prognosis	170
Plasma			
Panel of 22 genes	Pre-operative vs post-operative	Decreased methylation after tumour resection	133
RASSF1A	Cumulative survival, metastasis	Increased methylation associated with poor survival, histological grading and lymph node metastasis	158
PCDH10	Metastasis	Increased methylation associated with histological grading and lymph node metastasis	158
Blood-cell-surface-bound circulating DNA			
CDKN2B, MGMT or MLH1	Metastasis	Increased methylation associated with distant metastasis	167

Εικόνα 1.7 Καταγραφή γνωστών καρκινικών δεικτών που σχετίζονται με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA που βρίσκεται στον ορό του αίματος, το ολικό αίμα, το πλάσμα, καθώς και σε άμεση αλληλεπίδραση με την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, σε άμεση συσχέτιση των επιπέδων της αλλοίωσης των επιπέδων μεθυλίωσης με την προς εξέταση παράμετρο (πρόγνωση, σταδιοποίηση, εκτίμηση της κατάστασης του ασθενή).

1.2.2.2.5 Μεταλλάξεις σε κωδικοποιητικά γονίδια

Σαφώς, πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της καρκινογένεσης διαδραματίζουν και τροποποιήσεις ως προς τη λειτουργία διαφόρων μορίων τελεστών που έχουν ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα σηματοδοτικών μονοπατιών (Robert I. Nussbaum, 2011). Κάποια εκ των πιο χαρακτηριστικών παραδειγμάτων είναι :

- Τροποποιήσεις στη λειτουργία υποδοχέων με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, οι οποίοι βρίσκονται σε πληθώρα κυττάρων, με σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία τους. Συνεπώς στόχευση και καταστολή αυτών των υποδοχέων μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία τους και σε φυσιολογικά κύτταρα. Αυτές οι τροποποιήσεις είναι αρκετά κοινές στους διάφορους υπότυπους της ασθένειας (και όχι μόνο στον καρκίνο του στομάχου), και μπορούν να δράσουν επάγοντας την ογκογένεση μέσω, για παράδειγμα, ιδιοσυστατης ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών που φυσιολογικά ενεργοποιούνται παρουσία κάποιου αυξητικού παράγοντα (Ζίφα, 2017).
- Τροποποιήσεις σε μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Στα 2/3 των περιπτώσεων καρκινοπαθών, έχει δειχθεί ότι φέρουν μεταλλάξεις σε μόρια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, με πιο κοινές να είναι μεταλλάξεις σε γονίδια όπως η *RB*(κωδικοποιεί την Retinoblastoma associated protein), στο *CCND1*(που κωδικοποιεί την cyclin 1), στα *CDK2,CDK4,CDK6* (τα οποία κωδικοποιούν τις κυκλίνο-εξαρτώμενες κινάσες 2, 4 και 6 αντίστοιχα). Πιο συχνά από όλες τις μεταλλάξεις (23% ποσοστό εμφάνισης στους διάφορους τύπους όγκων με βάση τη TCGA), είναι οι απώλεια της λειτουργίας του *CDKN2A*(λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του), το οποίο κωδικοποιεί τη $p16^{INK4}$, η οποία δρα φυσιολογικά ως αναστολέας της δράσης των *CDK4 & CDK6*, καθώς και αναστέλλοντας την δράση της *RB* (Hua-Si Wu, 2014). Απώλεια λειτουργίας του γονιδίου αυτού έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 να περάσει στην S. Βέβαια, μπορεί το *CDKN2A* να παράγει σαν εναλλακτικό προϊόν και την $p14^{ARF}$, η οποία αλληλοεπιδρά με την *p53*, φυσιολογικά σταθεροποιώντας την, επομένως απώλεια αυτής της πρωτεΐνης οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα της *p53* (Niantao Deng, 2012).

Μια ακόμη χαρακτηριστική κατηγορία τροποποιήσεων λειτουργιών σε σηματοδοτικά μονοπάτια είναι και η περίπτωση μονοπατιών που οδηγούν τα κύτταρα σε αποδιαφοροποίηση και τους δίνουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, προσδίδοντας τους δηλαδή χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων (Xia Ma, 2018). Μεταλλάξεις, που επηρεάζουν την βλαστοκυτταρικότητα των κυττάρων, εντοπίζονται σε μονοπάτια όπως:

- Το μονοπάτι Hippo. Απώλεια λειτουργίας των κινασών που ρυθμίζουν την ενεργότητα του Hippo και του συνεργατικού του μορίου, YAP1, έχουν συσχετισθεί με αύξηση της ογκοεπαγωγικής δραστηριότητας του μονοπατιού, και απώλεια της κυτταρικής τους ταυτότητας, δίνοντας τους έτσι ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, ενώ ακόμα απενεργοποίηση διάφορων πρωτεϊνών του μονοπατιού αυτού έχουν συσχετισθεί με αύξηση του μεγέθους του όγκου, αλλά και του οργάνου. Σε περιπτώσεις καρκίνου, το 71% των πρωτεϊνών του μονοπατιού αυτού φαίνονται ότι έχουν κάποια τροποποίηση στη λειτουργία τους. Επικοινωνία μεταξύ αυτού του μονοπατιού και μεταξύ και άλλων μονοπατιών με ογκογόνο δράση έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας στις χορηγούμενες θεραπείες (Ismael Riquelme, 2015; Wei Kang, 2016).
- Το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε ενίσχυση της λειτουργίας έχουν ανιχνευτεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την β -κατενίνη, ενώ ακόμα έχει παρατηρηθεί και απώλεια της λειτουργίας παραγόντων που ρυθμίζουν αρνητικά αυτό το μονοπάτι (Chiurillo, 2015).
- Σηματοδότηση Hedgehog, η οποία είναι απαραίτητη για την διατήρηση των χαρακτηριστικών βλαστοκυτταρικότητας αυτών των κυττάρων, και μεταλλάξεις ενίσχυσης της λειτουργίας αυτού του μονοπατιού σχετίζονται με πιο επιθετικές μορφές καρκίνου, αλλά και με εμφάνιση ανθεκτικότητας σε χημειοθεραπείες. Κύρια γονίδια στα οποία γίνονται αυτές οι μεταλλάξεις είναι τα *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *SHH*, και μάλιστα πιο συνηθισμένες είναι αυτές που γίνονται στο *GLI3*, και αυτές μπορεί να είναι είτε ενίσχυσης της λειτουργίας, είτε αύξησης των επιπέδων μεταγραφής του (Beiqin Yu, 2017).
- Σηματοδότηση TGF β /SMAD4. Φυσιολογικά αυτό το μονοπάτι έχει ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου. Προκειμένου να γίνει όμως αυτό, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παρουσία της λειτουργικής SMAD4. Απουσία αυτής της πρωτεΐνης, το μονοπάτι μετατρέπεται σε ογκοεπαγωγικό και μάλιστα σε ποντίκια που ήταν ετερόζυγα ως προς τη λειτουργική πρωτεΐνη έχει δείχθει ότι ο αριθμός των πολύποδων στο στομάχι αυξανόταν δραματικά σε σχέση με τα ομόζυγα της φυσιολογικής πρωτεΐνης. Απουσία της φυσιολογικής λειτουργίας αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού έχει συσχετισθεί με δυσμενή κλινική εικόνα του ασθενή, καθώς εμπλέκεται και στην περεταίρω ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης Notch, mTOR, Hippo, VEGF, EGFR και AKT, ενισχύοντας περαιτέρω την επιθετικότητα του καρκίνου (Liduan Zheng, 2016; Jing Shi, 2014).

Μια άλλη κατηγορία γονιδίων των οποίων η έκφραση ή η λειτουργία εμφανίζεται τροποποιημένη σε περιπτώσεις καρκίνου, είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης και τροποποιητές του κυτταροσκελετού. Τέτοιες περιπτώσεις είναι οι πρωτεΐνες:

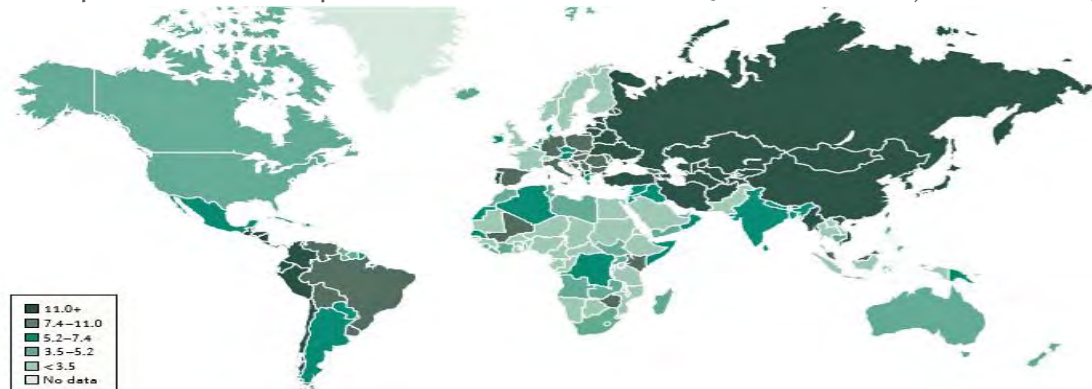
- CDH1(με ποσοστό εμφάνισης σε περίπου 15-32% των περιπτώσεων καρκίνου-διάχυτου υπότυπου),
- τα FAT1-FAT4, τα οποία δρουν ως μόρια ρυθμιστές της κυτταρικής πολικότητας, αλλά και υποβοηθούν την κυτταρική προσκόλληση, ενώ ακόμα έχει παρατηρηθεί

- μια συσχέτιση τους με το μονοπάτι Hippo, δίχως όμως να είναι πλήρως γνωστός ο τρόπος με τον οποίο εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι (Myoung-Hee Kang, 2017),
- η κατενίνη-αι και κατενίνη-α2, που κωδικοποιούνται από τα CTNNA1 και CTNNA2 αντίστοιχα, και έχουν ρόλο στην αλληλεπίδραση της β-κατενίνης με την E-cadherin, και μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας εμφανίζονται σε ~13% των ασθενών, (J Yu, 2000; Yutong Sun, 2014)
 - στη RHOA, κέρδος λειτουργίας της οποίας σχετίζεται με δυσμενή κλινική εικόνα σε ασθενείς με διάχυτο υπότυπο καρκίνου του στομάχου. (Changhwan Yoon, 2016)

Βέβαια, καθώς αυτά τα γονίδια εκφράζονται φυσιολογικά και σε άλλους ιστούς, η χρήση τους ως θεραπευτικούς στόχους μπορεί να είναι αδύνατη, ή να επιφέρει μια πληθώρα παρενεργειών.

1.2.3 Επιδημιολογικά στοιχεία

Η εξάπλωση αυτού του τύπου καρκίνου φαίνεται ότι έχει φτάσει ένα πλατό τα τελευταία 50 χρόνια, με τα ποσοστά εμφάνισης στον παγκόσμιο πληθυσμό να μειώνονται, αν και σε απόλυτο αριθμό ο αριθμός των κρουσμάτων παραμένει σταθερός, ή και αυξάνεται. Αυτό το γεγονός οφείλεται βέβαια στην αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, σε συνδυασμό με την αύξηση και του προσδόκιμου ζωής. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ειδικά σε κάποιες περιοχές, όπως στην Κορέα, στην Ιαπωνία και στην Κίνα, οι οποίες είναι ενδημικές περιοχές ως προς την εμφάνιση αυτού του τύπου καρκίνου. Τα ποσοστά εμφάνισης είναι τόσο υψηλά, ώστε να τοποθετούν τον καρκίνο του στομάχου στην 5^η θέση ως προς την συχνότητα εμφάνισης παγκοσμίως (πίσω μόνο από τον καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του παχέος εντέρου και τον καρκίνο του προστάτη), ενώ παράλληλα κατέχει την 2^η θέση σε θνησιμότητα στους Ασιατικούς πληθυσμούς, και στην 3^η θέση σε παγκόσμιο επίπεδο (source: Cancer Today). Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι το ποσοστό εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου στους άντρες είναι διπλάσιος σε σχέση με τα ποσοστά εμφάνισης του στις γυναίκες. Η τυπική ηλικία διάγνωσης της ασθένειας είναι περίπου στα 60 χρόνια της ηλικίας, αλλά τα τελευταία χρόνια αυξάνονται και οι περιπτώσεις στις οποίες γίνεται διάγνωση του καρκίνου του στομάχου και από τις ηλικίες των 40-50 ετών (Bernard W. Stewart, 2014). Στατιστικές μελέτες για το 2012 έδειξαν ότι ο αριθμός των νέων περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου άγγιξε τις 951.000, ενώ ο αριθμός των θανάτων ασθενών με αυτή τη μορφή καρκίνου έφτασε τις 723.000 παγκοσμίως (Cancer Research UK). Τα στατιστικά στοιχεία ως προς τη συχνότητα εμφάνισης κρουσμάτων καρκίνου του στομάχου ανά χώρα στον κόσμο (ανά 100.00 άτομα του πληθυσμού της κάθε χώρας) αναπαρίστανται στην **εικόνα 1.8** (Jaffer A. Ajani, 2017).



Εικόνα 1.8 Κατανομή των ετήσιων νέων κρουσμάτων καρκίνου του στομάχου ανά τις χώρες

του κόσμου. Ως προς τα ποσοστά εμφάνισης μέσα στον πληθυσμό, η Ιαπωνία και η Κορέα κατέχουν την πρώτη θέση, αλλά, ως απόλυτο αριθμό, τα περισσότερα κρούσματα εμφανίζονται στην Κίνα, από την οποία προέρχονται περίπου το 40% των νέων περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου κάθε χρόνο. Στον αντίποδα, σε χώρες όπως ο Καναδάς, οι ΗΠΑ, η Ινδία και κάποιες από τις χώρες της Μέσης Ανατολής, η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου είναι πολύ χαμηλή.

1.2.4 Προσδόκιμο ζωής των ασθενών

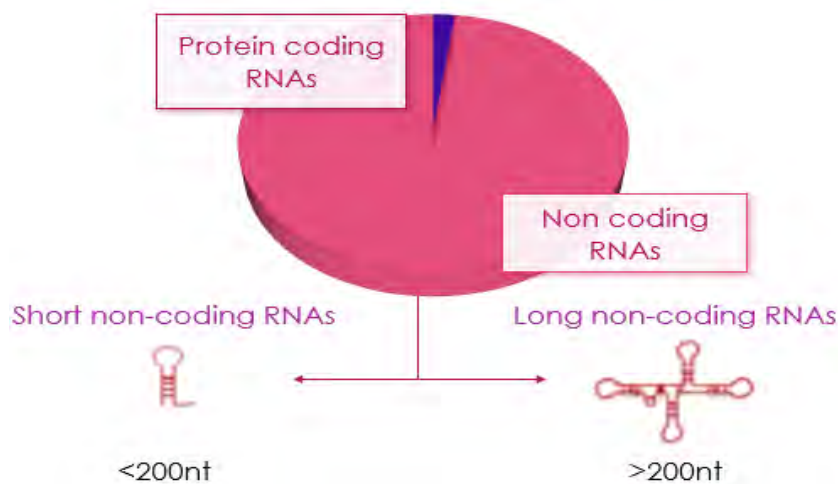
Όπως προαναφέρθηκε, ο καρκίνος του στομάχου αυτή τη στιγμή κατέχει την 2^η θέση σε θνησιμότητα στους Ασιατικούς πληθυσμούς, και στην 3^η θέση σε παγκόσμιο επίπεδο (source: Cancer Today). Παρά τις όποιες εξελίξεις στις ενδοσκοπικές, χειρουργικές και συστηματικές μεθοδολογίες περίθαλψης των ασθενών, η ικανότητα επιβίωσης μέχρι τα 5 χρόνια στις περισσότερες χώρες βρίσκεται ακόμα σε ποσοστό ~25-30%, με εξαίρεση να αποτελεί η Κορέα και η Ιαπωνία, στις οποίες >50% των ασθενών καταφέρνει να επιβιώσει πέρα από τον όριο των 5 ετών μετά τη διάγνωση (World Health Organization). Σαφώς, αυτή η διαφορά σε αυτές τις χώρες οφείλεται και στον τακτικό έλεγχο για την ανίχνευση του καρκίνου σε αρχικά στάδια, στα οποία είναι και πιο εύκολα σχετικά αντιμετωπίσιμος, αλλά παράλληλα και η διαδικασία αυτή αποδεικνύεται εξαιρετικά δαπανηρή, και σε πολλές περιπτώσεις μη εφαρμόσιμη εύκολα στον γενικό πληθυσμό (τονίζοντας έτσι και την ανάγκη για εύρεση νέων διαγνωστικών μοριακών μεθόδων) (K S Choi, 2015; Li K, 2018). Αξίζει να σημειωθεί, ότι διάγνωση στο στάδιο του πρωτογενούς αδενοκαρκινώματος (Τι σταδίου) συνδέεται με ~95% ικανότητα επιβίωσης του ασθενούς μέχρι τα 5 έτη μετά τη διάγνωση. Εάν η διάγνωση γίνει σε προχωρημένο στάδιο (σε σημείο που και η χειρουργική επέμβαση δεν θεωρείται επαρκής λύση, καθώς σε αυτά τα στάδια συνήθως έχει προηγηθεί και μετάσταση σε άλλους ιστούς), το προσδόκιμο ζωής αυτών των ασθενών μειώνεται περίπου στους 9-10 μήνες (American Cancer Society). Έτσι τονίζεται περαιτέρω η ανάγκη για την εύρεση τεχνικών και πιθανούς στόχους που να οδηγούν σε διάγνωση ευρείας κλίμακας σε πρώιμα στάδια της ασθένειας, κάτι το οποίο δεν είναι εφικτό σε μεγάλο βαθμό με τις υπάρχουσες συμβατικές τεχνικές. (WEI-YING CHEN, 2013)

1.3. Τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα

Όπως αναφέρθηκε και στη παραπάνω ενότητα, διαφορές ως προς τις επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν τον πρωταρχικό ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου, ενώ παράλληλα και αλλαγές στην έκφραση κωδικοποιητικών γονιδίων, ή τροποποίηση της λειτουργίας των προϊόντων αυτών λόγω μεταλλάξεων, μπορούν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας. Η μελέτη σε επίπεδο γονιδιώματος, ή μεταγραφώματος μπορεί να αναδείξει μια εξίσου μεγάλη ποικιλία μη κωδικοποιητικών στοιχείων του γονιδιώματος, τα οποία διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στην εμφάνιση και εξάπλωση του καρκίνου του στομάχου (Juan Cui, 2015; Pei-Fei Li, 2014).

Τα κωδικοποιητικά γονίδια, δηλαδή αυτά που μεταφράζονται δίνοντας κάποια πρωτεΐνη (protein coding genes), έχουν μελετηθεί εκτενώς, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Ειδικά στον καρκίνο, η μελέτη μέχρι πρότινος εστίαζε στην εύρεση πιθανών μεταλλάξεων που οδηγούσαν στην παραγωγή μιας διαφορετικής

πρωτεΐνης (ανενεργής ή υπέρ-ενεργής, ανάλογα με την περίπτωση), ή που επηρέαζαν την σταθερότητα της (Min Zhao, 2016). Ωστόσο συμπραξίες μεταγραφομικής, όπως τα προγράμματα ENCODE και NONCODE αποκάλυψαν ότι στο ανθρώπινο μεταγράψωμα, το οποίο σχεδόν ταυτίζεται με το γονιδίωμα, οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις κωδικές περιοχές των κωδικοποιητικών mRNA αποτελούν περίπου το 1,5-2% του συνόλου του μεταγραφώματος (Roadmap Epigenomics Consortium, 2015; Liu C, 2005; Marcel E. Dinger, 2009). Το υπόλοιπο ~98% του μεταγραφώματος απαρτίζεται από μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (non-coding RNAs, ncRNAs), με το μεγαλύτερο ποσοτικά (αλλά όχι νουκλεοτιδικά) μέρος αυτών να αντιστοιχεί σε ιδιοσύστατα ncRNAs όπως τα rRNAs ακολουθούμενα από tRNAs, snRNAs, αλλά και ρυθμιστικά ncRNAs όπως τα miRNAs και τα lncRNAs (Eleni Anastasiadou, 2018). Η διάκριση των ρυθμιστικών ncRNAs μπορεί να γίνει και ως προς το μήκος τους, βάση του οποίου διακρίνονται σε short non-coding RNAs, τα οποία έχουν μήκος ώριμου μεταγράφου μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια και σε lncRNAs τα οποία έχουν μήκος ώριμου μεταγράφου μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια (Εικ. 1.9) (Sheetal A. Mitra, 2012).



Εικόνα 1.9 Αναπαράσταση του ποσοστού κωδικοποιητικών μεταγράφων που παράγονται από το γονιδίωμα (<2%), και μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (~98%). Τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα διαχωρίζονται περαιτέρω σε μετάγραφα των οποίων το μήκος φτάνει έως 200 νουκλεοτίδια, και αποτελούν τα μικρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, και σε μετάγραφα μήκους μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία αποτελούν τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (lncRNAs).

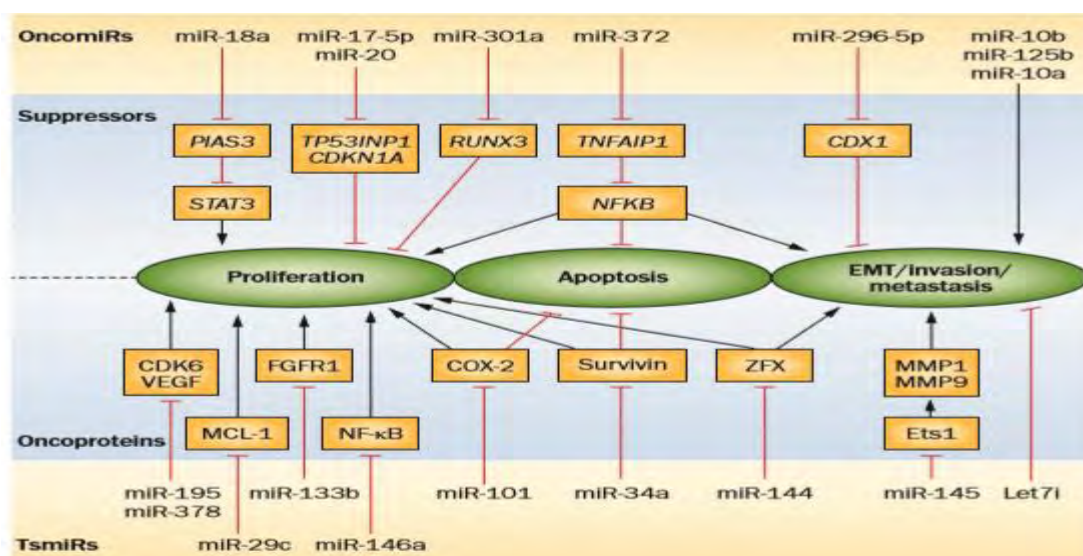
Τα λειτουργικά ncRNAs ασκούν ρυθμιστικό ρόλο σε μια πληθώρα κρίσιμων κυτταρικών λειτουργιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και αύξηση, η κυτταρική διαφοροποίηση, η απόπτωση ελέγχοντας έτσι την ομοιόσταση των ιστών. Ο κρίσιμος λειτουργικός τους ρόλος, συνδυαστικά και με την συχνή μεταγραφική απορρύθμιση τους σε πληθώρα καρκινικών βιοψιών τα έχει τοποθετήσει ψηλά στο ενδιαφέρον της βιοιατρικής έρευνας, συσχετίζοντας την έκφραση τους με την επαγωγή, εξέλιξη, διαφοροποίηση και μετάσταση του όγκου (Esteller, 2011).

1.3.1 miRNAs

Τα miRNA αφορούν μικρά ncRNAs (<200 nt), τα οποία μεταγράφονται από MIR γονίδια. Για την σύνθεση τους:

- Το pri-miRNA, το οποίο είναι και το άμεσο προϊόν της μεταγραφής των MIR γονιδίων από την πολυμεράση του RNA II, έχει μήκος αρχικά κάποιων εκατοντάδων νουκλεοτιδίων.
- Αυτό το pri-miRNA, αναγνωρίζεται από το ένζυμο Drosha, το οποίο χάρη στη δραστικότητα ενδονουκλεάσης, μπορεί να αναγνωρίσει και να επεξεργαστεί το pri-miRNA, δημιουργώντας το pre-miRNA, το οποίο σχηματίζει μια χαρακτηριστική δομή στελέχους-θηλιάς .
- Το pre-miRNA, το οποίο έχει ένα μήκος περίπου 70 νουκλεοτιδίων, βρίσκεται ακόμα στον πυρήνα, από τον οποίο εξέρχεται χάρη στην εξπορτίνη-5 (Exportin 5).
- Στην συνέχεια αναγνωρίζεται από την κυταροπλασματική πρωτεΐνη Dicer, η οποία θα το επεξεργαστεί εκ νέου, αφαιρώντας το τμήμα που σχημάτιζε την δομή θηλιάς, αφήνοντας πίσω το δίκλωνο ώριμο miRNA, μήκους 21-22 nt. (Pei-Fei Li, Non-coding RNAs and gastric cancer, 2014 ; Sandra L Romero-Cordoba, 2014; Gracjan Michlewski, 2019; Kasey C. VICKERS, 2014).
- Ο ένας κλώνος του ώριμου RNA είναι συμπληρωματικός έναντι άλλων μεταγράφων (κωδικοποιητικών και μη) τα οποία δύναται να στοχεύσει και να καταστείλει είτε μεταγραφικά (επαγωγή επιγενετικών τροποποιήσεων-το σύστημα αυτό εφαρμόζεται εκτενώς σε φυτικούς οργανισμούς) είτε μεταφραστικά με την βοήθεια του συμπλόκου AGO και στόχευση του μεταγράφου, και αποικοδόμηση του.

Εξαιτίας αυτής της καταστολής, που συχνά επηρεάζει λειτουργίες όπως η κυτταρική διαίρεση και η απόπτωση, τα miRNA διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο στην καρκινογένεση και την μετάσταση και για αυτό το λόγο αποτελούν διαγνωστικούς και θεραπευτικούς στόχους. Ανάλογα με τους στόχους τους, τα miRNAs κατηγοριοποιούνται σε δύο τύπους (Εικ. 1.10) , (Roopma Wadhwa, 2013; Gianpiero Di Leva, 2014;; Riccardo Spizzo, 2009; Massimo Negrini, 2009):



Εικόνα 1.10 Απεικόνιση γνωστών ογκοεπαγωγικών και ογκοκατασταλτικών miRNAs, σε συνδυασμό με το ρόλο τους ως προς την επαγωγή ή καταστολή της αύξησης, της απόπτωσης, του EMT και της μετάστασης.

1. Ογκοεπαγωγικά miRNAs(ονcomiRs), τα οποία βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα σε περιπτώσεις καρκίνου, και έχουν ως ρόλο την στόχευση και καταστολή της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οδηγώντας συχνά στην κυτταρική αύξηση. ή στην επαυξημένη ικανότητα τοπικής λεμφαδενικής διείσδυσης και κατ' επέκταση μετάστασης (Esquela-Kerscher A, 2006). Ένα τέτοιο παράδειγμα για τον καρκίνο του στομάχου αποτελεί το miR-296-5p, το οποίο στοχεύει το μετάγραφο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *CDX1*, το οποίο έχει ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης και καταστολή του EMT (Lee H, 2017). Ένα ακόμα παράδειγμα είναι το miR-301a, το οποίο στοχεύει το μετάγραφο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RUNX3*, ενώ το miR-17-5p/20a στοχεύει το μετάγραφο της επαγόμενης από την p53 πρωτεΐνης 1(*TP53INP1*) (Xu XD, 2013; Yanjun Qu, 2016). Σημαντικό μέλος αυτής της κατηγορίας είναι και το miR-18a, το οποίο στοχεύει το μετάγραφο του *PIAS3*, η πρωτεΐνη του οποίου δρα αναστέλλοντας την δράση της *STAT3*, η οποία φυσιολογικά επάγει την κυτταρική αύξηση, ενώ εξίσου σημαντικό είναι και το miRNA-372, το οποίο στοχεύει τη πρωτεΐνη *TNFAIP1*, ρυθμίζοντας αρνητικά την αύξηση των κυττάρων, την αποφυγή της απόπτωσης και εν τέλει την τοπική λεμφαδενική εισβολή και τη μετάσταση (Shen, 2016; Lu-Qin Wang, 2018).
2. Ογκοκατασταλτικά miRNAs(tsmiRs), των οποίων τα επίπεδα μειώνονται στον καρκίνο, ενώ σε φυσιολογικούς ιστούς στοχεύουν ογκογονιδίων, μειώνοντας έτσι το ρυθμό κυτταρικής αύξησης, την απόπτωση, αλλά συχνά και την μετάσταση. Παραδείγματα ογκοκατασταλτικών miRNA στον καρκίνο του στομάχου είναι τα miR-195 και miR-378, τα οποία στοχεύουν τα μετάγραφα των *CDK6* και *VEGF* αντίστοιχα (Wang J, 2017). Ένα ακόμα σημαντικό μετάγραφο είναι αυτό του γονιδίου *FGFR1*, το οποίο υπερεκφράζεται κυρίως στον διάχυτο τύπο καρκίνου του στομάχου, και στοχεύεται από το miR-133b. Ακόμη, το miR-29c μπορεί να στοχεύει το μετάγραφο του *Mcl-1*, το οποίο επάγει την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό, ενώ παράλληλα, το miR-34a έχει ως ρόλο την καταστολή της έκφρασης της *Survivin*, η οποία δρα αναστέλλοντας την απόπτωση και επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Yang B, 2016). Το miR-145 καταστέλλει την έκφραση του *Ets-1*, το οποίο δρα επάγοντας την δράση μεταλλοπρωτεασών *MMP1* & *MMP9*, οι οποίες δρουν καταστρέφοντας τη σύνδεση μεταξύ των κυττάρων, και έτσι αποτελούν θετικούς ρυθμιστές της τοπικής διείσδυσης και μετάστασης (Liu, 2014). Εξίσου σημαντικό ρόλο στην καταστολή της μετάστασης έχει και το *Let-7i*, το οποίο αποτελεί δείκτη λεμφικής διείσδυσης και συσχετίζεται με δυσμενή διάγνωση για τον ασθενή. Επιπροσθέτως το miR-144 στοχεύει το μετάγραφο του *ZFX*, το οποίο φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των καρκινικών βλαστοκυττάρων (Butian Li, 2017). Τέλος, το miR-101 και το miRNA-146a έχουν ως στόχους τους τα μετάγραφα των *COX2* και τα *CARD10* και *COPS8* (τα οποία έχουν ρόλο στην θετική ρύθμιση της δράσης του NF-κB), αντίστοιχα (Ma C, 2016; Rau CS, 2014).

Το χαρακτηριστικό που κάνει τα miRNAs ιδανικούς βιοδείκτες, είναι η ανέπαφη παρουσία τους στον ορό και το πλάσμα του αίματος, αλλά και σε άλλα σωματικά υγρά γενικότερα (Petty, 2009). Για παράδειγμα τα επίπεδα των miR-21, miR-106a, miR-421 εμφανίζονται αυξημένα στο γαστρικό υγρό ($P < 0.001$), οδηγώντας σε διάγνωση του καρκίνου σε αρχικά στάδια σε σχέση με τους υπάρχοντες διαγνωστικούς δείκτες (Tsukamoto M, 2017; Ali HEA, 2019; Zhou H, 2012). Ομοίως, ανίχνευση των αυξημένων επιπέδων των miR-106b, του miR-20a, miR-200c και του miR-221 στο πλάσμα ασθενών συγκριτικά με τα επίπεδα των αντίστοιχων miRNAs στο πλάσμα υγείων ατόμων ($P < 0.05$), οδήγησε σε έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας, συγκριτικά (Ali HEA, 2019; Abdel-Rahman N. Zekri, 2016; Francesca Fornari, 2015). Επίσης, αυξημένα επίπεδα του miRNA-19a-3p στο πλάσμα, σχετίζονται με μεταστατικό καρκίνο, ακόμα και πέρα από το στάδιο της λεμφικής μετάστασης (Jingru Zhang, 2015). Τέλος, υψηλά επίπεδα των miR-17-5p και miR-20a στην κυκλοφορία του αίματος, έχουν συσχετισθεί με το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών, καθώς και με την πιθανότητα επανεμφάνισης της ασθένειας μετά από χειρουργική επέμβαση ή κάποια άλλη θεραπευτική προσέγγιση (Moridikia A, 2018).

1.3.2 Μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα

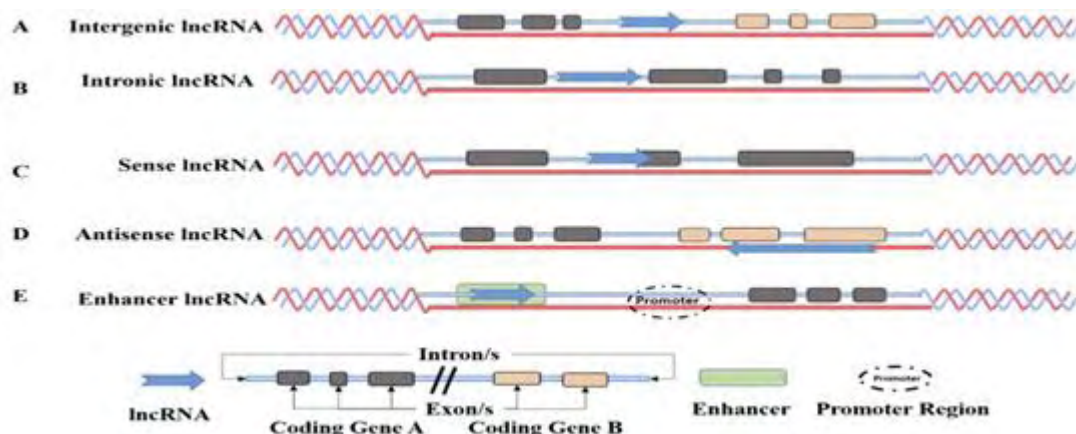
Τα lncRNAs αφορούν μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα τα οποία έχουν μήκος ώριμου μεταγράφου μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια, και εμπλέκονται σε μια ποικιλία ρυθμιστικών διεργασιών όπως επιγενετική ρύθμιση, ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων σε επίπεδο μεταγραφής αλλά και σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο (R Spizzo, 2012). Μια υποκατηγορία lncRNAs αφορούν μετάγραφα ψευδογονιδίων που χαρακτηρίζονται από ημιτελές πλαίσιο ανάγνωσης, αλλά μπορούν να μεταγράφονται από την πολυμεράση του RNA II, να φέρουν 5' καλύπτρα και πολυ-αδενυλιωμένη ουρά και να υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα (Jeffrey J. Quinn, 2016). Ο μη κωδικοποιητικός χαρακτήρας των lncRNA συνεπάγεται και χαμηλή συντήρηση της πρωτοταγούς αλληλουχίας τους μεταξύ των ειδών, λόγω της χαμηλής εξελικτικής πίεσης την οποία υφίστανται, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα κωδικοποιητικά γονίδια (Marcel E. Dinger, 2009). Παρόλο που, τα lncRNAs δεν μοιράζονται ομοιότητα ως προς την αλληλουχία μεταξύ ειδών, η δευτεροταγής δομή η οποία σχηματίζουν δύναται να ομοιάζει εξελικτικά, με αποτέλεσμα lncRNA με διαφορετικές πρωτοταγείς αλληλουχίες να δρουν με παρόμοιο τρόπο μεταξύ οργανισμών (Damon S. Perez, 2008).

1.3.2.1 Ιδιότητες των lncRNAs

Ως προς την γονιδιωματική τους θέση, τα lncRNAs μπορεί να μεταγράφονται από πληθώρα γενετικών τόπων η σχετική θέση των οποίων σε σχέση με κωδικοποιητικά γονίδια δύναται να καθορίσει περαιτέρω τον μηχανισμό δράσης τους. Έτσι, πολλά lncRNAs δρουν *in cis* περιορίζοντας τον ρυθμιστικό τους ρόλο μόνο σε αλληλουχίες διπλανών κωδικοποιητικών γονιδίων. Μια άλλη κατηγορία lncRNA δρα *in trans* δηλαδή ασκεί ρύθμιση σε γενετικούς τόπους μακριά από την θέση μεταγραφής, ακόμα και σε άλλα χρωμοσώματα (Lina Ma 1. A., 2015). Ανεξάρτητα από τους ρυθμιστικούς τους στόχους, τα lncRNAs μεταγράφονται από ποικίλες θέσεις (Εικ. 1.11) μερικές από τις οποίες αφορούν (Abril Marcela Herrera-Solorio, 2017; Manuela Lanzafame, 2018; Lina Ma, 2013):

1. Μεσογονιδιακές θέσεις, δηλαδή θέση μεταγραφής μεταξύ γονιδίων (\rightarrow lincRNAs \rightarrow long intergenic non coding RNAs),

2. από ιντρόνια κωδικοποιητικών γονιδίων
3. μπορεί να προκύπτουν ως προϊόντα εναλλακτικών θέσεων έναρξης της μεταγραφής κωδικοποιητικών γονιδίων με ομόρροπη προς αυτό φορά μεταγραφής (αλλά να μην διατηρούν ανέπαφο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου)
4. μπορεί να προκύπτουν από αντινοσηματική μεταγραφή ενός κωδικοποιητικού γονιδίου
5. από ενισχυτές γονιδίων που συχνά χαρακτηρίζονται από αμφίδρομη μεταγραφή ειδικών lncRNA που ονομάζονται eRNAs. (Eichhorn, 2018)



Εικόνα 1.11 Αναπαράσταση των θέσεων στο γονιδίωμα από τις οποίες μπορεί να μεταγράφονται τα lncRNAs.

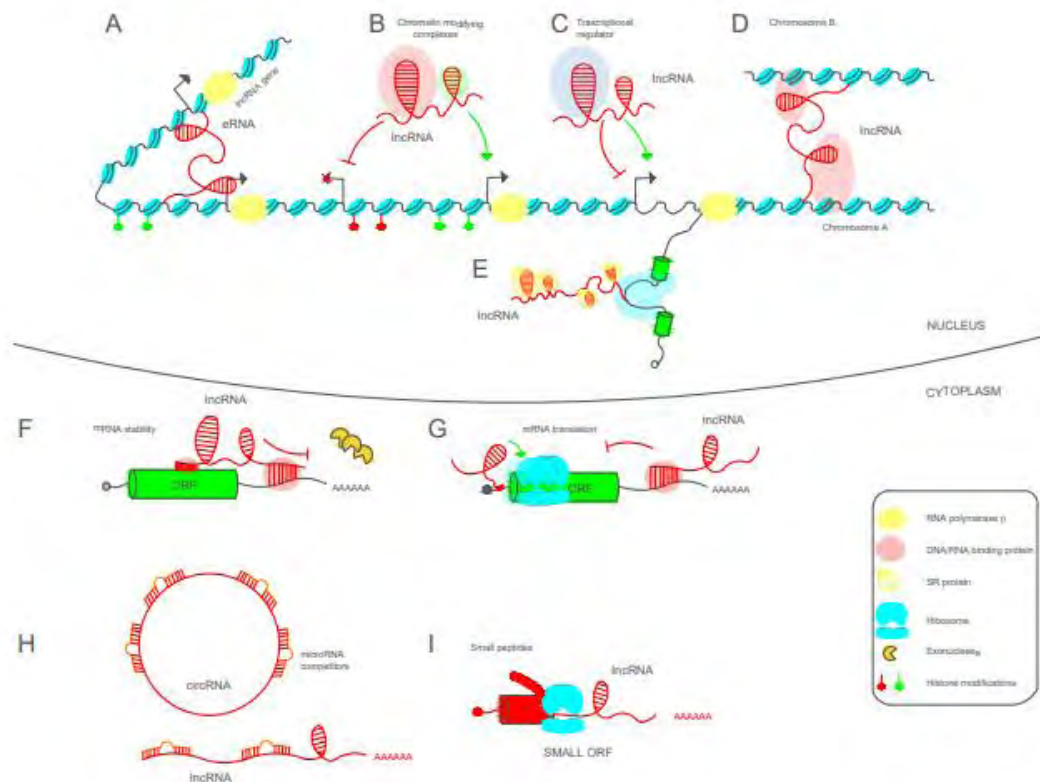
Ως προς την υποκυτταρική τους θέση, που καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό και τον λειτουργικό τους ρόλο, τα lncRNA διακρίνονται σε δυο κατηγορίες (Εικ. 1.12) (Magdalena Losko J. K., 2016; John R. Prensner, 2011):

- 1) Πυρηνικά που ασκούν ρυθμιστικό ρόλο μέσω :
 - a) Αλληλεπίδρασης με ένζυμα, τα οποία έχουν ρόλο επιγενετικών τροποποιητών (είτε αυτές είναι σε επίπεδο ιστονών, είτε είναι σε επίπεδο DNA). Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να ρυθμίζει την δράση των ενζύμων είτε:
 - (1) θετικά, δηλαδή να αλλάζει η διαμόρφωση των ενζύμων έτσι ώστε να λαμβάνουν την ενεργή τους μορφή, ή να δρουν προσελκύνοντας τα ένζυμα σε αυτά σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα,
 - (2) μπορεί να δρουν αλλάζοντας την διαμόρφωση των ενζύμων αυτών, αναστέλλοντας τη δράση τους (π.χ. με αλλοστερική σύνδεση που οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να μη μπορεί να αναγνωρίσει πλέον τους στόχους της),
 - (3) μπορεί να δρουν μην επιτρέποντας την τοποθέτηση αυτών των πρωτεϊνών στις θέσεις στόχους τους (Yu Zhao, 2016). Και οι δύο αυτές προσεγγίσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την μεταγραφική αναστολή ή την μεταγραφική επαγωγή, ανάλογα με το με ποια ένζυμα τροποποιητές της χρωματίνης αλληλοεπιδρούν με τα lncRNAs, και με ποιόν συγκεκριμένο τρόπο (καθώς διαφορετικά lncRNAs μπορεί να συνδέονται σε

- διαφορετικές επικράτειες της ίδιας πρωτεΐνης, και το καθένα να επηρεάζει και διαφορετικά την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης) (Zhen Wang, 2018).
- b) Αλληλεπιδράσεων με την RNA πολυμεράση, καθώς και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.. Αυτή η αλληλεπίδραση, , μπορεί να οδηγήσει σε μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων-στόχων μέσω αύξησης, μείωσης ή εξειδίκευσης της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων με το DNA (Xiaoxing Huang, 2017)..
 - c) Είναι γνωστό ότι οι ενισχυτές διαφόρων γονιδίων μπορεί να βρίσκονται ακόμα και χιλιάδες βάσεις μακριά από τη θέση του υποκινητή του γονιδίου, είτε ανοδικά, είτε καθοδικά. Μερικά lncRNAs μπορούν να δρουν μέσω σταθεροποίησης ή αποσταθεροποίησης των τρισδιάστατων αλληλεπιδράσεων της χρωματίνης ενισχυτών και υποκινητών ρυθμίζοντας ανάλογα τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων-στόχων (Debina Sarkar, 2015).
 - d) Αντίστοιχα με την ικανότητα προσέλκυσης διαφορετικών περιοχών επάνω στο ίδιο χρωμόσωμα, το οποίο αναφέρθηκε στην προηγούμενη περίπτωση, υπάρχει περίπτωση τα lncRNAs να υποβοηθούν την αλληλεπίδραση ρυθμιστικών περιοχών μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων (Felipe C. Beckedorff, 2013)
 - e) Μια ακόμα ρυθμιστική δράση των πυρηνικών lncRNA είναι η συμμετοχή τους στη δημιουργία του συμπλόκου ματίσματος και κατ' επέκταση στο εναλλακτικό μάτισμα και στην δημιουργία ισόμορφων μεταγράφων με δυνητικά παθογόνο λειτουργία (Daniel Dominguez, 2016; Zixuan Peng, 2018)
- 2) Κυτταροπλασματικά lncRNA που ασκούν τον ρυθμιστικό τους ρόλο κυρίως μέσω :
- a) Δέσμευσης miRNA. . Δηλαδή τα lncRNA φέρουν τις ίδιες θέσεις αναγνώρισης από miRNAs, με τον κωδικοποιητικό στόχο του miRNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα miRNA να μην μπορούν να στοχεύσουν αποτελεσματικά τα μετάγραφα των κωδικοποιητικών γονιδίων, καθώς αναγνωρίζουν τα lncRNAs (συχνά με απόλυτη συμπληρωματικότητα), οδηγώντας έτσι σε αύξηση του χρόνου ημιζωής του κωδικοποιητικού μεταγράφου και εν τέλει σε αύξηση της παραγόμενης πρωτεΐνης (Hirotaka Yoshioka, 2017). Σε περιπτώσεις καρκίνου, λοιπόν, μπορεί να παρουσιαστεί μείωση των επιπέδων έκφρασης lncRNAs που να μοιράζονται κοινές θέσεις αναγνώρισης miRNA με κάποιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο (άρα, θα παρατηρηθεί πτώση των επιπέδων του μεταγράφου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου, λόγω πιο αποτελεσματικής στόχευσης από το miRNA, που θα οδηγήσει στην αποικοδόμηση του). Αντίστοιχα, αν το lncRNA μοιράζεται κοινές θέσεις αναγνώρισης από miRNA με κάποιο ογκογονίδιο, τότε σε περιπτώσεις καρκίνου έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του lncRNA, και συνεπώς μη αποδοτική στόχευση του μεταγράφου του ογκογονιδίου, και αύξηση του πρωτεϊνικού προϊόντος του (Zhenzi Peng, 2016).
 - b) Ελέγχου της σταθερότητας των mRNA. Αυτό μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:
 - i) Το lncRNA δύναται να αλληλεπιδρά με το mRNA άμεσα (δηλαδή να είναι συμπληρωματικό με το mRNA και να υβριδίζει σε αυτό). Αν αυτή η αλληλεπίδραση γίνει στο σημείο αναγνώρισης ενός miRNA, τότε το mRNA δεν μπορεί να στοχευθεί προς αποικοδόμηση χωρίς να χρειαστεί το lncRNA να αλληλεπιδρά με το miRNA (Shan-Shan Xie, 2016).

- ii) Το lncRNA μπορεί να σχηματίσει σε κάποιο μέρος του μια δομή φουρκέτας, η οποία να μπορεί να αναγνωριστεί από την Drosha, παράγοντας έτσι miRNAs και στοχεύοντας mRNA-στόχους για αποικοδόμηση (Bijan K. Dey, 2014).
- iii) Μπορεί το lncRNA να έχει την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με πρωτεϊνικά σύμπλοκα ελέγχου και αποικοδόμησης mRNA σταθεροποιώντας τα ή εξειδικεύοντας την στόχευση συγκεκριμένων mRNA (Miao Sun, 2015).
- c) Άμεσου ελέγχου της μετάφρασης του mRNA. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων των lncRNA με το ριβόσωμα, στο οποίο μπορεί να έχουν είτε θετική, είτε αρνητική δράση (δηλαδή ή ενίσχυση της σύνδεσης των ριβοσωμάτων στο mRNA, ή και απομάκρυνση τους), ανάλογα πάντα με το ποιο lncRNA συνδέεται και σε ποια περιοχή (M. Joaquina Delás, 2017). Ακόμα, τα lncRNAs μπορούν να επηρεάζουν την μετάφραση μέσω αλληλεπίδρασης με το mRNA, και ανάλογα με την περιοχή στην οποία συνδέονται να βοηθούν στην πρόσδεση του ριβοσώματος (κυρίως με σύνδεση τους στην 5' αμετάφραστη περιοχή), ή να οδηγούν στην απομάκρυνση του ριβοσώματος λόγω παρεμπόδισης της σύνδεσης ή της κίνησης του κατά μήκος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Magdalena Losko J. K., 2016).
- d) Κάποια lncRNAs διατηρούν μικρά (<20 aa) ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης παράγοντας μικρά πεπτίδια με δυνητικές σηματοδοτικές λειτουργίες (Jorge Ruiz-Orgera, 2014).

Τόσο πυρηνικά, όσο και κυτταροπλασματικά lncRNA μπορούν να αλληλοεπιδρούν με πρωτεΐνες, επηρεάζοντας την σταθερότητα τους, ή την ικανότητα σχηματισμού άλλων πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων (Jijun Yan, 2018).



Εικόνα 1.12 Σχηματική αναπαράσταση των ρόλων των lncRNAs σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι ρυθμιστικοί ρόλοι των lncRNAs χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ποικιλομορφία. Παράλληλα, και η ρύθμιση των lncRNAs είναι εξαιρετικά ακριβής ενώ χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφής συγκριτικά με τα επίπεδα των κωδικοποιητικών γονιδίων.. Μια χαρακτηριστική ιδιότητα των lncRNA που συναντάται σε πληθώρα οργανισμών, αφορά το αυστηρά ιστό-ειδικό πρότυπο έκφρασης, ή την χρονική εξειδίκευση της μεταγραφής τους σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια της ζωής του οργανισμού.

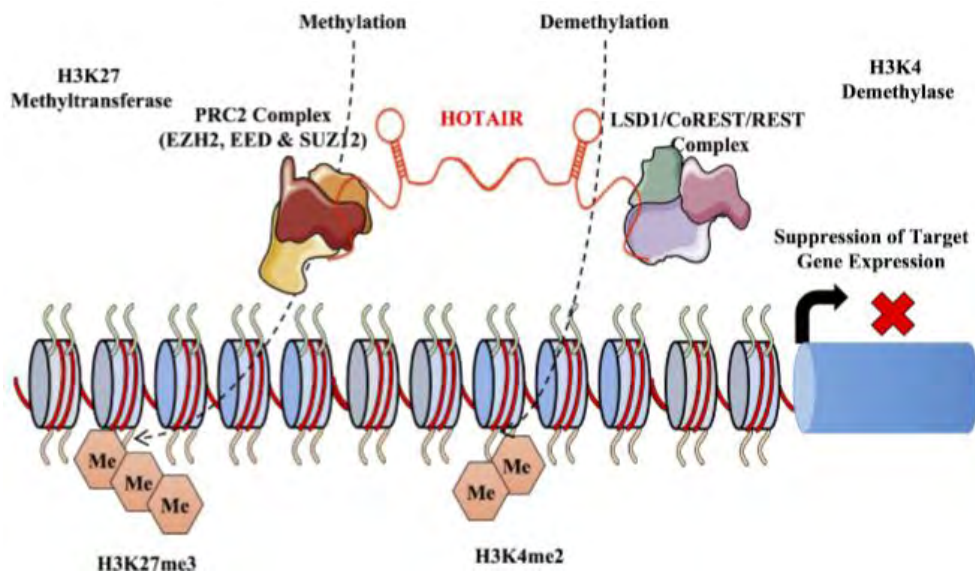
1.3.2.2 lncRNAs και καρκίνος

Πολλά lncRNA εμφανίζουν διαφορική έκφραση σε παθολογικές καταστάσεις έναντι φυσιολογικών. Ειδικότερα στον καρκίνο η έκφραση πολλών lncRNA απορυθμίζεται, όπως άλλωστε και αυτή κωδικοποιητικών γονιδίων οδηγώντας σε αυξημένα, μειωμένα και ακόμα και εκτοπικά (δηλαδή καρκινική έκφραση σε ιστό που φυσιολογικά δεν το εκφράζει) επίπεδα μεταγραφής. Ακόμα περισσότερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι για κάποια lncRNAs η έκφραση τους μεταβάλλεται σε συγκεκριμένα στάδια κατά την εξέλιξη της ασθένειας (π.χ. έκφραση μόνο σε αρχικά στάδια ή μόνο σε μεταστατικούς ιστούς). (Huarte, 2015; Ana C Tahira, 2011). Συνεπώς, τα lncRNAs αναδεικνύονται σε πολύ σημαντικά εργαλεία μελέτης, τόσο για την κατανόηση του μηχανισμού εμφάνισης και εξέλιξης του καρκίνου, αλλά και ως μόρια με διαγνωστικό ενδιαφέρον. Παράλληλα η αλληλεπίδραση με κωδικοποιητικούς ογκοεπαγωγείς ή ογκοκαταστολείς αλλά και το γεγονός ότι τα lncRNA εκφράζονται καν σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς παρά μόνο σε μερικούς καρκινικούς τύπους (σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλοεπιδρούν), τα καθιστά ιδανικούς στόχους τόσο για διαγνωστικές όσο και για θεραπευτικές προσεγγίσεις (Nonthaphat Kent Wong, 2018; Roshan Fatima, 2015; Eduardo M. Reis, 2012).

Κάποια παραδείγματα ήδη μελετημένων lncRNAs, με τους αντίστοιχους ρόλους τους είναι τα εξής:

- ✚ HOTAIR (HOX transcript antisense intergenic RNA): αποτελεί ένα από τα καλύτερα μελετημένα lncRNAs, και εμφανίζει κύριο ρόλο στη παθογένεση και εξάπλωση πολλών ειδών καρκίνου, με τον καρκίνο του στομάχου να είναι ένας εξ αυτών. Στον καρκίνο του στομάχου υπερεκφράζεται, με το SNP rs4759314 που εμφανίζεται σε αυτό να έχει συσχετισθεί το αλληλόμορφο που φέρει το G να φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο σε αυτό, και μάλιστα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδεχομένως και ως προγνωστικός δείκτης (Juan Li, 2018). Το HOTAIR, αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο PRC2, κατευθύνοντας το σε διάφορους γενετικούς τόπους γονιδιώματος. Μια εναλλακτική δράση του HOTAIR αφορά την αλληλεπίδραση με τον παράγοντα LSD1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μόνο-μεθυλίωση (και διμεθυλίωση) της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4me1 & H3K4me2), η οποία ανιχνεύεται σε ενεργούς υποκινητές (οι αλληλεπιδράσεις αυτές φαίνονται στην **εικόνα 1.13**). Η αλληλεπίδραση του HOTAIR με αυτή τη πρωτεΐνη οδηγεί σε καταστολή της και πτώση των επιπέδων της συγκεκριμένης ιστονικής

τροποποίησης σε σημεία του γονιδιώματος (Rajnish A. Gupta, 2010). Το PRC2 οδηγεί σε μεθυλίωση των ιστονών, και πιο συγκεκριμένα μπορεί να επάγει την τριπλή μεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27me3), το οποίο σχετίζεται με ανενεργούς ενισχυτές. Επειδή ακριβώς φαίνεται να έχει έναν τόσο σημαντικό ρόλο, σε περιπτώσεις καρκίνου τα επίπεδα του εμφανίζονται αυξημένα, και συσχετίζονται σημαντικά με την ικανότητα λεμφικής διήθησης & μετάστασης και κατ' επέκταση με το συνολικό προσδόκιμο ζωής του ασθενή (Hiroyuki Endo, 2013). Ακόμα, το HOTAIR δρα και ως miRNA sponge σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, καθώς μπορεί να αναγνωριστεί από το miR-331-3p, το οποίο φυσιολογικά στοχεύει το μετάγραφο του ογκογονιδίου *HER2* (Mulong Du, 2015; Xiang-hua Liu, 2014)



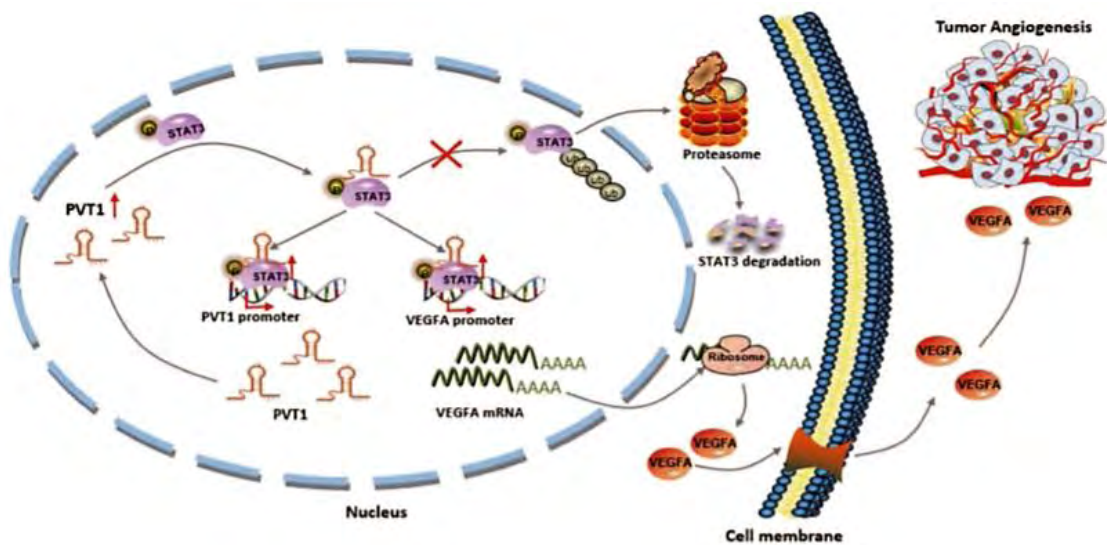
Εικόνα 1.13 Οι ρόλοι του HOTAIR (Eichhorn, 2018)

- ✚ GAS5 (growth arrest specific transcript 5): αυτό το lncRNA δρα ογκοκατασταλτικά σε διάφορα ήδη καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού καρκίνου με συχνά μειορρυθμισμένα επίπεδα έκφρασης. Πτώση των μεταγραφικών επιπέδων αυτού του lncRNA σχετίζεται με δυσμενή κλινική εικόνα του ασθενή, ενώ παράλληλα αποτελεί διαγνωστικό, ή και δυνητικά θεραπευτικό στόχο, μέσω γονιδιακής θεραπείας για αύξηση των επιπέδων έκφρασης του (Ming Sun, 2014). Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του GAS5 σχετίζονται με μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, αυξημένη πιθανότητα μετάστασης προς τον λεμφικό κόμβο, μεγαλύτερο βάθος τοπικής εισβολής και μικρότερο προσδόκιμο ζωής (Tianwen Li, 2016). Πίσω από αυτά τα ευρήματα, κρύβεται ο ρόλος του GAS5, ο οποίος σχετίζεται με επαγωγή της απόπτωσης μέσω της κασπάσης-3, ενώ έχει δείχθει ότι μπορεί να μιμείται το GRE (glucocorticoid response element), αλληλοεπιδρώντας με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και οδηγώντας σε καταστολή της έκφρασης γονιδίων που επάγονται από γλυκοκορτικοειδή (Shounan Lu, 2019). Κάποια από τα γονίδια που στοχεύονται κατ' αυτό τον τρόπο είναι οι ογκοεπαγωγείς E2F1 και η κυκλίνη D1 ενώ ρυθμίζει θετικά τον ογκοκαταστολέα p21. Επίσης το GAS5 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα YBX1, οδηγώντας στην σταθεροποίηση της πρωτεΐνης αυτής (χωρίς να έχει κάποια επίδραση στο μετάγραφο του γονιδίου), ενώ απουσία του GAS5

παρατηρείται μια πτώση των επιπέδων του YBX1 (το οποίο δρα φυσιολογικά ενεργοποιώντας την p21) (Jing Zhao Y. L., 2015; Williams, 2015)

- ✚ ANRIL(CDKN2B-AS1): Το lncRNA ANRIL μεταγράφεται αντιπαράλληλα από τη συστοιχία INK4B-ARF-INK4A, και δρα μέσω σύνδεσης του με το PRC2 (με λειτουργία παρόμοια με αυτή του HOTAIR), και σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του αυξάνονται και σχετίζονται με μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου και με μείωση του προσδόκιμου ζωής (Er-bao Zhang, 2014). Μάλιστα, φαίνεται ότι η έκφραση του μπορεί να επαχθεί από το E2F1, ενώ η δράση του στοχεύει στην επιγενετική σίγηση της έκφρασης των miR-99a/miR-449a *in trans*, τα οποία είναι αρνητικοί ρυθμιστές του μονοπατιού mTOR & CDK6/E2F1 (επάγοντας έτσι και την μετάβαση από την φάση G1 στη φάση S). Έτσι δημιουργεί έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης, οδηγώντας σε αύξηση του όγκου. Για αυτό το λόγο, αποτελεί έναν υποσχόμενο στόχο για εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας του καρκίνου (Er-bao Zhang, 2014).
- ✚ lncRNA H19: αυτό το lncRNA παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να εκφραστεί από πατρικώς εντυπωμένα γονίδια, και φαίνεται ότι τα νουκλεοτίδια 1014–1036 μπορούν να αποκοπούν και να δώσουν το miR-675, ενώ το υπόλοιπο lncRNA μπορεί να δράσει αυτόνομα, ρυθμίζοντας διαφορετικό μονοπάτι από ότι το miRNA-675 (Yan J, 2017). Το γεγονός ότι αυτό το lncRNA εκφράζεται φυσιολογικά στις έξω-εμβρυϊκές στοιβάδες, και σε ιστούς του εμβρύου κατά την κύηση, αλλά μετά την γέννηση του ατόμου τα επίπεδα έκφρασης του μειώνονται δραματικά, το καθιστούν έναν ιδανικό θεραπευτικό στόχο, καθώς η έκφραση του θα υπάρχει μόνο στα καρκινικά κύτταρα (με ανάγκη σαφώς για περαιτέρω μελέτες και εξακριβώσεις) (Hao Li B. Y., 2014). Το miR-675 καταστέλλοντας την έκφραση του CALN1, και έχει δειχθεί ότι φυσιολογικά αυτός ο ρόλος είναι σημαντικός στους τροφοβλάστες του πλακούντα, ενώ μπορεί ακόμα να στοχεύει και το μετάγραφο του *RUNX1*, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι της AKT και του mTOR(αν και για αυτό το παράδειγμα οι απόψεις δίστανται, καθώς η μια εργασία επιβεβαιώνει ότι μπορεί όντως να γίνει στόχευση αυτού του μεταγράφου από το miRNA-675, ενώ η άλλη εργασία αναγνωρίζει το ότι υπάρχει η θέση αναγνώρισης από το miRNA-675 στο μετάγραφο του *RUNX1*, αλλά σε δοκιμασία έκφρασης λουσιφεράσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου σε περίπτωση υπερέκφρασης του miRNA-675) (Gao Liu, 2016) . Το υπόλοιπο μετάγραφο του H19 μπορεί να αλληλοεπιδράσει με την πρωτεΐνη ISM1, της οποίας μάλιστα μπορεί το H19 να ρυθμίσει και τα ποσοστά της έκφρασης της. Υπερέκφραση του H19 (και συνεπώς και του miRNA) μπορούν αν οδηγήσουν σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, σε αυξημένη ικανότητα τοπικής εισβολής και μετάστασης, και κατά συνέπεια και σε μικρότερο προσδόκιμο ζωής των ασθενών (Hao Li B. Y., 2014).
- ✚ PVT1: Το lncRNA PVT1 έχει την δυνατότητα να επάγει την αγγειογένεση, μέσω της αλληλεπίδρασης του με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3, στην φωσφορυλιωμένη του μορφή, όταν αυτός βρίσκεται στον πυρήνα, και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγούσε σε σταθεροποίηση του STAT3, και μείωση της ικανότητας ουβικουιτίνωσης του, που θα τον οδηγούσε στην αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα (Εικ.1.14). Αυτή η αλληλεπίδραση, οδηγούσε λοιπόν σε περαιτέρω

ενεργοποίηση του μονοπατιού της STAT3, μέσω προσέλκυσης της STAT3 στις θέσεις αναγνώρισης της στο γονιδιωματικό DNA, έχοντας μεταξύ άλλων σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του παράγοντα VEGFA, ο οποίος έχει την δυνατότητα επαγωγής αγγειογένεσης, με αυτόν τον ρόλο να φαίνεται να ισχύει και για την περίπτωση του καρκίνου του στομάχου, αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου (Tianwen Li, 2016). Συνδυασμός αυξημένων επιπέδων PVT1 & VEGFA συσχετίζονται με μικρότερο προσδόκιμο ζωής του ασθενή, και με πιο δυσμενή κλινική εικόνα, εξαιτίας πιο επιθετικής μορφής καρκίνου. Ακόμα, το PVT1 αποτελεί και έναν από τους μεταγραφικούς στόχους του STAT3, και, συνεπώς, με την σταθεροποίηση αυτού του παράγοντα από το PVT1, δημιουργείται ένας κύκλος θετικής ανατροφοδότησης ο οποίος οδηγεί σε περαιτέρω ενίσχυση αυτής της ογκοεπαγωγικής δραστηριότητας. Μάλιστα, εκτίμηση των επιπέδων του PVT1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα εργαλείο εκτίμησης της ικανότητας επιβίωσης του ασθενή σε επίπεδο διάγνωσης (λόγω της άμεσης συσχέτισης των επιπέδων του με τα επίπεδα της ενεργής STAT3 και του VEGFA), καθώς και για την παρακολούθηση του ασθενή, με υψηλότερα επίπεδα του PVT1 να σχετίζονται με πιο δυσμενή διάγνωση για τον ασθενή. Αναλυτικά αυτά φαίνονται στην εικόνα 1.15. (Jing Zhao P. D., 2018)



Εικόνα 1.14 Ο ρόλος του PVT1 στην επαγωγή αγγειογένεσης.

- ✚ LUNAR1: Το lncRNA LUNAR1 μελετήθηκε πρώτη φορά σε περιπτώσεις οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας οφειλόμενη σε T-κύτταρα του ανοσοποιητικού. Ο γονιδιακός του τόπος βρίσκεται παρακείμενα ως προς το γονίδιο *IGF1R* (το οποίο κωδικοποιεί τον insulin-like growth factor receptor 1, ο οποίος έχει γνωστή ογκοεπαγωγική δράση σε διάφορα είδη καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του στομάχου), του οποίο μάλιστα ρυθμίζει *in cis* θετικά και την έκφραση του. Μάλιστα, ιδιαιτερότητα αυτού του lncRNA είναι το γεγονός ότι μπορεί να δράσει μόνο παρακρινώς από τη θέση από την οποία μεταγράφεται, και συγκεκριμένα σε περιπτώσεις καρκίνου φαίνεται ότι τα αυξημένα επίπεδα αυτού του lncRNA, οδηγούν σε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του

IGF1R, ενώ σε περιπτώσεις καταστολής του lncRNA αυτού, φαίνεται αντίστοιχη πτώση και των επιπέδων του υποδοχέα, δείχνοντας έτσι την άμεση συσχέτιση μεταξύ των δυο αυτών παραγόντων (Peng W, 2016). Αυτή την αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα μπορεί να την επιτελέσει μέσω πρόσδεσης του στον ιντρονικό ενισχυτή του *IGF1R*, και έτσι προσελκύει τους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται σε αυτόν τον ενισχυτή, δίνοντας τα πλήρη επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτό, σε συνδυασμό με το ότι το *LUNAR1* επάγεται φυσιολογικά από σηματοδότηση Notch (και συνεπώς σε περίπτωση καταστολής του *LUNAR1*, όχι μόνο μειώνονται τα επίπεδα του *IGF1R*, αλλά και απομακρύνεται ένας από τους τελικούς στόχους του μονοπατιού Notch), δίνουν το έναυσμα για την πιθανή χρήση του *LUNAR1* ως πιθανό θεραπευτικό στόχο. (Gayatri Arun, 2018)

✚ MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1): Έχοντας αρχικά ανιχνευτεί τα υψηλά του επίπεδα σε περιπτώσεις πνευμονικού αδενοκαρκινώματος, και μάλιστα με υψηλή συσχέτιση με την ικανότητα δημιουργίας μεταστάσεων, το MALAT1 στην συνέχεια αποδείχθηκε ότι βρίσκεται αυξορυθμισμένο και σε μια πληθώρα άλλων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του στομάχου (Ewan A. Gibb, 2011). Φυσιολογικά, το MALAT1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, και από το μετάγραφο του προκύπτουν τελικά δυο μόρια RNA:

1. Ένα μικρό RNA με δομή που να παρομοιάζει τη δομή ενός tRNA
2. Το υπόλοιπο από το μετάγραφο μήκους 6,7kb, το υπόλοιπο παραμένει στον πυρήνα.

Σε γενικές γραμμές, έχουν προταθεί διάφοροι ρόλοι για αυτό το lncRNA, με επικρατέστερη θεωρία να είναι το ότι συμμετέχει στον μηχανισμό ματίσματος των mRNA, και μάλιστα σε περιπτώσεις καταστολής του φαίνεται αύξηση της καθήλωσης των κυττάρων στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (Gibb EA, 2011). Μάλιστα, παρόλο που εκφράζεται και σε φυσιολογικούς ιστούς, έχει δειχθεί ότι καταστολή της έκφρασης του σε αυτούς δεν οδηγεί σε κάποια διαφορά ως προς την ικανότητα επιβίωσης των κυττάρων (το οποίο δεν ισχύει για την περίπτωση καταστολής του σε καρκινικά κύτταρα), πιθανώς λόγω του πλεονεκτικού ρόλου που μπορεί να διαδραματίζει στα φυσιολογικά κύτταρα. Συνεπώς, παρόλο που όντως εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, η χρήση του ως θεραπευτικός στόχος παραμένει πιθανή, με ανάγκη πάντα για περαιτέρω επιβεβαιώσεις. (Gayatri Arun, 2018)

Συνεπώς θεωρείται επιτακτική η μελέτη των μη κωδικοποιητικών RNA στο καρκίνο, ενώ σε συνδυασμό με τις ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν, τα αναδεικνύουν παράλληλα σε καινοτόμους διαγνωστικούς ή/και θεραπευτικούς στόχους. (Pei-Fei Li, Non-coding RNAs and gastric cancer, 2014)

2.Σκοπός της εργασίας

Σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών μεταγραφικών στόχων για τον καρκίνο του στομάχου. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιείται βιοπληροφορικός και πειραματικός χαρακτηρισμός ενός μη μελετημένου μέχρι στιγμής lncRNA, του GrACILe2 (Gastric cancer induced lincRNA 2). Το μεταγράφο αυτού του γονιδίου εμφανίζεται υπερεκφρασμένο στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Μάλιστα, αυτή η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του συνδέεται και με δυσμενή κλινική εικόνα του ασθενή. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης αυτού του μεταγράφου, παρουσιάζουν μικρότερο προσδόκιμο ζωής μετά από τη στιγμή της διάγνωσης τους με καρκίνο του στομάχου, από ότι ασθενείς που παρουσιάζουν συγκριτικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Ακόμη, συσχέτιση των υψηλών επιπέδων έκφρασης αυτού του μεταγράφου συνδέεται και με την αυξημένη ικανότητα τοπικής διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και με αυξημένη πιθανότητα επανεμφάνισης της ασθένειας, μετά από χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση του όγκου. Η παρούσα διατριβή αποσκοπεί:

- a. Στην ταυτοποίηση μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης του προφίλ έκφρασης του μεταγράφου, αφού γίνει πιστοποίηση ότι όντως πρόκειται για ένα lncRNA, σε δείγματα καρκινικών κυτταρικών σειρών και βιοψιών, έναντι του φυσιολογικού ιστού στομάχου, αλλά και σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ιστούς ενήλικων ατόμων. Επιπροσθέτως, θα γίνει μια προσπάθεια ανίχνευσης του ορθόλογου γονιδίου στον ποντικό (εάν και εφόσον αυτό υπάρχει), και παρατήρηση των επιπέδων έκφρασης του GrACILe2 στους ιστούς του ενήλικου ατόμου του ποντικού.
- b. στην εκτίμηση των μοριακών χαρακτηριστικών του lncRNA, όπως ο χρόνος ημιζωής του μεταγράφου και η υποκυτταρική του τοποθεσία, καθώς και στην δημιουργία μοριακών κατασκευών επαγόμενης καταστολής και υπερέκφρασης του σε καρκινικά κύτταρα.

Απώτερος στόχος της μελέτης είναι η αξιοποίηση αυτών των εργαλείων στην εκτίμηση της αναγκαιότητας του εν λόγω μεταγράφου για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Συνδυαστικά τα παραπάνω δεδομένα, αποτελούν την βάση για πιθανή αξιοποίηση του συγκεκριμένου lncRNA ως διαγνωστικό ή και θεραπευτικό στόχο για τον καρκίνο του στομάχου.

3.Υλικά και μέθοδοι

3.1. Βιοπληροφορική ανάλυση

3.1.1 Επιλογή του προς ανάλυση lncRNA

Προκειμένου να γίνει η επιλογή του lncRNA στο οποίο θα γίνει εστίαση κατά την διάρκεια αυτής της πτυχιακής εργασίας, σε πρώτη φάση έγινε ανάλυση RPKM δεδομένων (στα οποία είχε προηγηθεί λογαρίθμιση και ο υπολογισμός των αποκλίσεων Z). Τα δεδομένα αυτά προέρχονται από:

- 7 ζεύγη δειγμάτων που προέρχονται από βιοψίες καρκινικών όγκων του στομάχου και από τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό των καρκινοπαθών
- 8 καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες μάλιστα προέρχονται και από δείγματα από καρκίνο του στομάχου, αλλά και από άλλους συγγενείς τύπους καρκίνου.

Με την χρήση του προγράμματος Perseus, έγινε ανάλυση αυτών των δεδομένων, αποσκοπώντας στην τελική απεικόνιση των δεδομένων αυτών σε volcano plots, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς στην ενότητα *Αποτελέσματα*.

3.1.2 Ανάλυση του κωδικού δυναμικού του lncRNA

Για την ανάλυση του κωδικού δυναμικού, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CPC2, στο οποίο έγινε προσθήκη της αλληλουχίας των ώριμων μεταγράφων γνωστών κωδικοποιητικών και μη γονιδίων, καθώς και η αλληλουχία των GrACILe1 & GrACILe2. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των γονιδίων ACTB, MYC, GAPDH, CDX2 όσον αφορά τα κωδικοποιητικά μετάγραφα, και των GAS5, HOTAIR, NEAT1, ZFAS, LINC00673, MALAT1, DISC2 & PRINS, ως εκπρόσωποι των lncRNAs.

3.1.3 Ανάλυση έκφρασης σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς

Για την ανάλυση έκφρασης σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς, αξιοποιήθηκαν ο φυλλομετρητής UCSC Genome Browser στον οποίο μεταφορτώθηκαν τα δεδομένα της συμπραξίας GTEx.

3.1.4 Ανάλυση συνταίνιας-συνέκφρασης στον ποντικό

Για την ανάλυση συνταίνιας έκφρασης, αξιοποιήθηκε το εργαλείο γονιδιωματικής στοίχισης του γονιδιωματικού φυλλομετρητή του πανεπιστημίου της Ουάσιγκτον, σε συνδυασμό με δεδομένα ιστοειδικής μεταγραφομικής για τον ποντικό που βρίσκονται στη διάθεση μας.

3.2. Χαρακτηρισμός του μεταγράφου του GrACILe2

3.2.1 Επίπεδα έκφρασης του GrACILe2 στα δείγματα κυτταρικών σειρών

Προκειμένου να διαπιστωθεί το ποια κυτταρική σειρά είναι η κατάλληλη για την μελέτη της λειτουργίας του GrACILe2, πρέπει να γίνει η ανάλυση του προφίλ έκφρασης αυτού του lncRNA στις διάφορες κυτταρικές σειρές που βρίσκονται στη διάθεση μας:

Κυτταρική σειρά	Ιστός προέλευσης
HFE	Φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο
MKN45	Καρκίνος του στομάχου, που έχει δώσει μετάσταση στο ήπαρ
NUGC4	Καρκίνος του στομάχου(Signet cell ring gastric adenocarcinoma), που δίνει μεταστάσεις στους λεμφικούς αδένες.
KATOIII	Μεταστατικός καρκίνος του στομάχου(signet ring cell gastric adenocarcinoma), με μεταστάσεις στα πλευρά(από όπου και έγινε η απομόνωση).
HCT116	Colon carcinoma
MCF7	Μεταστατικός καρκίνος του μαστού, με μεταστάσεις στα πλευρά
SKBR3	Αδενοκαρκίνωμα μαστού
HEK	Human embryonic kidney

Πίνακας 3.1 Κυτταρικές σειρές στις οποίες έγινε έλεγχος για έκφραση του GrACILe2

Προκειμένου να γίνει η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του GrACILe2 σε αυτές τις κυτταρικές σειρές έπρεπε πρώτα να γίνει RNA extraction από αυτές, με το εξής πρωτόκολλο:

1. Λήψη των δειγμάτων από την κάθε κυτταρική σειρά σε tube του 1,5ml και προσθήκη 1000μL TRI, και αφού αφεθούν σε αυτή τη κατάσταση για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρονται στον πάγο.
2. Ακολουθεί προσθήκη 200μl χλωροφόρμιο, έντονο vortex για περίπου μισό λεπτό και φυγοκέντριση των δειγμάτων, με τη φυγόκεντρο ρυθμισμένη στους 4 °C, στις 14000 στροφές, για 5 λεπτά, μέχρι να διαχωριστούν οι δύο φάσεις του δείγματος, με το RNA να βρίσκεται στο υπερκείμενο-υδατική φάση.
3. Γίνεται λήψη του υπερκείμενου(~550 μl), και μεταφορά του σε δεύτερο tube
4. Ακολουθεί προσθήκη 500 μl 100% ισοπροπανόλης (η οποία αναφέρεται και ως 2-προπανόλη), και αφού ανακινήσουμε ελαφρώς το δείγμα, αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά
5. Αμέσως μετά γίνεται φυγοκέντριση του δείγματος, για 15 λεπτά, στις 14000 στροφές, με την φυγόκεντρο να ψύχεται στους 4 °C.
6. Απορρίπτεται το υπερκείμενο-δηλαδή η περίσσεια ισοπροπανόλης-και γίνεται προσθήκη 500 μl ψυχρής 70% αιθανόλης, γίνεται καλό vortex, και ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά, στους 4 °C, στις 14000 στροφές.
7. Ακολουθεί πλήρης απομάκρυνση της ποσότητας αιθανόλης, δίχως να διαταραχθεί το ίζημα που έχει δημιουργηθεί μετά από την φυγοκέντριση, στο οποίο βρίσκεται και η ποσότητα του RNA. Η απομάκρυνση γίνεται με διαδοχικές χρήσεις πιπέτας για απομάκρυνση του υγρού στοιχείου, και το δείγμα αφήνεται στον πάγο ανοιχτό για 10-15 λεπτά, έως ότου στεγνώσει παντελώς το ίζημα, σε σημείο να μην είναι πια διακριτό με το μάτι.
8. Γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος με τη προσθήκη 50 μL RNase free water και θέρμανση του δείγματος στους 65 °C για 5 λεπτά.

Σε αυτό το στάδιο μπορεί να γίνει αποθήκευση του δείγματος στους -80°C .

Για απομάκρυνση των τυχόν υπολειμμάτων DNA στο δείγμα, ακολουθεί DNase treatment, δηλαδή εκμεταλλευόμαστε την δυνατότητα του ενζύμου της DNάσης να κατακερματίζει το DNA στο δείγμα, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη παραμονή ανέπαφου μονάχα του RNA.

Για την αντίδραση γίνεται προσθήκη για κάθε δείγμα(με όγκο 50μl όπως αναφέρθηκε προηγουμένως) των εξής:

10X DNase Buffer	6 μl
DNase	2μl
RNase-out	1μl
RNase free water	1μl

Πίνακας 3.2 Mix αντίδρασης DNάσης ανά δείγμα

Η προσθήκη του RNase-out γίνεται για καταστολή της δράσης ενζύμων που διασπούν το RNA. Η αντίδραση αυτή διαρκεί μια ώρα, και πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C . Μετά το πέρας της μίας ώρας, γίνεται προσθήκη 40μl Sodium Acetate, 3M, pH 5,6 και προσθήκη 310μl RNase free water. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 400μl μείγματος φαινόλης-χλωροφόρμιου σε κάθε δείγμα, vortex αυτών και φυγοκέντριση στις 14000 στροφές, για 5 λεπτά, στους 4°C . Μετά γίνεται λήψη του υπερκειμένου (υδατική φάση), μεταφορά σε νέο tube και προσθήκη σε αυτό 1ml παγωμένης 100% αιθανόλης, ανακινώ και τα δείγματα μεταφέρονται στους -80 για τουλάχιστον μια ώρα.

Για να γίνει η καταβύθιση του RNA μετά από αυτό το σημείο, γίνεται:

1. φυγοκέντριση στους 4°C , 14000 στροφές, για μισή ώρα, αμέσως μόλις τα δείγματα βγουν από τους -80 , και
2. στην συνέχεια αφαιρείται όλο το υπερκείμενο,
3. γίνεται προσθήκη παγωμένης 70% αιθανόλης,
4. εκ νέου φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις ίδιες συνθήκες στροφών και θερμοκρασίας με παραπάνω,
5. αφαίρεση του συνόλου της αιθανόλης με χρήση πιπέτας και αφήνεται το δείγμα ανοιχτό στον πάγκο να στεγνώσει το ίζημα(→ RNA), και τέλος,
6. επαναδιάλυση με χρήση RNase free water, 20-30 μl και τοποθέτηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 65°C . Μετά από τα 5 λεπτά, γίνεται έντονο vortex, spin και τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν και πάλι στους -80 .

Επόμενο βήμα στην διαδικασία είναι το cDNA synthesis. Υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις από το κάθε δείγμα, και δημιουργούνται οι κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε σε όγκο 10μl να υπάρχει 1μg RNA. Για την διαδικασία αυτή λοιπόν θα χρειαστούν 2mix.

Mix 1

Όγκος αντιδραστηρίου(μl) ανά
δείγμα/αντίδραση

Αραιωμένο δείγμα RNA	10
Primer (oligo dT ή gene specific ή random hexamers)	1(για τον oligo dT)
dNTPs	1

Πίνακας 3.3 Σύσταση του mix 1 της αντίδρασης σύνθεσης του cDNA ανά δείγμα

Το mix 1 τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμασμένο στους 65°C για 5 λεπτά, και αμέσως μετά γίνεται τοποθέτηση του mix στον πάγο. Αυτό γίνεται προκειμένου να γίνει η αποδιάταξη των RNA από τις πιθανές δευτεροταγείς δομές που σχηματίζουν, και να υβριδιστεί ο εκκινητής επάνω στην συμπληρωματική προς αυτόν αλληλουχία στα RNA μόρια του δείγματος, αλλά και για να παραμείνουν σε μια ανοιχτή διαμόρφωση.

Mix 2	Όγκος αντιδραστήριου(μl) ανά δείγμα/αντίδραση
5x MMLV buffer	4
100mM DDT	2
RNase-out	1
MMLV (αντίστροφη μεταγραφάση)	1

Πίνακας 3.4 Σύσταση του mix 2 για τη διαδικασία σύνθεσης του cDNA ανά δείγμα

Μετά από ανάμιξη αυτών των ποσοτήτων και δημιουργία μιας αντίδρασης τελικού όγκου 20 μl για κάθε δείγμα, τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 2 ώρες, ρυθμισμένο στους 37°C.

Στο τέλος της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής, γίνεται προσθήκη 380 μl RNase free water, έτσι ώστε να γίνει αραιώση των αλάτων της αντίδρασης που προηγήθηκε, προκειμένου να μην γίνει αναστολή των μετέπειτα αντιδράσεων στις οποίες θα χρησιμοποιηθούν αυτά τα δείγματα.

Προκειμένου να γίνει και η τελική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του GrAC1Le2, θα γίνει μια qPCR. Η σύσταση αυτής της αντίδρασης ανά δείγμα είναι η εξής:

2x SYBR-green mix	10 μl
Primer mix	2μl
Template	4μl
PCR water	4μl

Πίνακας 3.5 Σύσταση της αντίδρασης qPCR ανά δείγμα

Το SYBR-green mix περιέχει το buffer της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται στην αντίδραση, την πολυμεράση, τη SYBR green, και τα dNTPs. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιούνται σε ειδικά plates ή strips σχεδιασμένα για την qPCR, προκειμένου να μπορεί να γίνει η μέτρηση της έντασης φθορισμού της SYBR green από το μηχάνημα στο τέλος κάθε κύκλου. Αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι η SYBR green έχει το χαρακτηριστικό ότι ως φθορίζουσα που μπορεί να βρίσκεται είτε ελεύθερη σε ένα δείγμα, είτε να παρεμβάλλεται ανάμεσα στη δίκλωνη έλικα του DNA (άρα και στο προϊόν που ενισχύεται), η ένταση του φθορισμού που εκπέμπει να είναι 200 φορές μεγαλύτερη όταν παρεμβάλλεται στην δίκλωνη έλικα του DNA, από ότι είναι όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα.

3.2.2 Μεταγραφική σταθερότητα του GrACILe2

Για την ανάλυση της μεταγραφικής σταθερότητας αξιοποιήθηκαν κύτταρα MKN45 τα οποία εκτέθηκαν σε 1 ug/ml Actinomycin-D. Τα χρονικά διαστήματα που επιλέχθηκαν είναι η χρονική στιγμή ο(μάρτυρας χωρίς ακτινομυκίνη), και οι 0.5 ώρα, 1 ώρα, 2 ώρες, 4 ώρες, 6 ώρες, 8 ώρες και 24 ώρες μετά από την έκθεση σε ακτινομυκίνη D. Σε κάθε δειγματοληψία αντιστοιχούσαν 250.000-300.000 κύτταρα. Ακολούθησε εξαγωγή RNA και κατασκευή cDNA όπως περιεγράφηκε παραπάνω. .

Σαν μάρτυρες γνωστού χρόνου ημιζωής, χρησιμοποιήθηκαν τα μετάγραφα MYC και GATAD1, τα οποία έχουν χρόνο ημιζωής κάτω από μια ώρα, και περίπου 8 ώρες αντίστοιχα.

3.2.3 Υποκυτταρική τοποθέτηση του μεταγράφου του GrACILe2.

Ο έλεγχος για την εμφάνιση του μεταγράφου, λοιπόν, εστιάζει στην υποκυτταρική κλασμάτωση δείγματος κυττάρων MKN45, και πιο συγκεκριμένα στα κλάσματα του/της:

- Κυτταροπλάσματος
- Πυρηνοπλάσματος
- Χρωματίνης

Για αυτή τη πειραματική διαδικασία:

1. Πρώτα γίνεται επεξεργασία των κυττάρων που βρίσκονται στην φλάσκα με θρυψίνη, η οποία είναι μια πρωτεάση που κόβει τις εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, προκειμένου να χαθεί η επαφή μεταξύ του κυττάρου και της επιφάνειας της φλάσκας. Η προσθήκη θρυψίνης γίνεται μετά από αφαίρεση του θρεπτικού που βρίσκεται στην φλάσκα, προσθήκη 2,5ml θρυψίνης για ξέπλυμα του ορού, αφαίρεση του υγρού στοιχείου(θρυψίνη + υπολείμματα θρεπτικού), και εκ νέου προσθήκη 2,5ml θρυψίνης, στην οποία και παραμένουν τα κύτταρα για 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 2,5 ml RPMI, ελαφρά ανάδευση και μοίρασμα των κυττάρων σε tubes.
2. Γίνεται μια πρώτη φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 3000 στροφές, στους 4°C
3. Πετάμε το υπερκείμενο

4. Γίνεται προσθήκη του buffer λύσης των κυττάρων σε αναλογία 1/10 σε σχέση με την ποσότητα του ιζήματος κυττάρων που έχει δημιουργηθεί.
5. Γίνεται μηχανική ρήξη των κυττάρων με τη χρήση ομογενοποιητή, σε ήπιες συνθήκες προκειμένου να μην γίνει ρήξη της πυρηνικής μεμβράνης.
6. Γίνεται φυγοκέντριση στις 3000 στροφές, για 5 λεπτά, στους 4 °C
7. Το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε δεύτερο tube, σημασμένο ως S2(supernatant 2), και αντιστοιχεί στο κυτταροπλασματικό κλάσμα
8. Προσθέτουμε τριζόλη σε αναλογία 1:1 στο S2 δείγμα.
9. Προσθέτουμε το buffer NLB800 στο ίζημα που περιέχει του πυρήνες.
10. Το δείγμα τοποθετείται στον ρότορα "luna park" μέσα σε ένα ψυγείο ρυθμισμένο στους 4 °C για μισή ώρα
11. Γίνεται φυγοκέντριση του δείγματος στους 4 °C, για 15 λεπτά, στις 14000 στροφές
12. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο που φέρει το πυρηνόπλασμα σε τρίτο tube, σημασμένο ως S3(supernatant 3)
13. Γίνεται προσθήκη 300μl τριζόλης στο ίζημα(P3-χρωματίνη) και στο S3, και όλα τα δείγματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη(-30 °C).

Στη συνέχεια σε αυτά τα δείγματα ακολουθεί RNA extraction,cDNA synthesis & qPCR.

3.3. Δημιουργία των μοριακών εργαλείων για τη μελέτη του GrACILe2.

Παράλληλα με τα πειράματα χαρακτηρισμού του μεταγράφου, σχεδιάστηκαν και κάποια πειράματα, τα οποία αποσκοπούσαν στην δημιουργία πλασμιδίων που θα υπερεκφράζουν:

- shRNA, το οποίο θα εκφράζεται στα κύτταρα της σειράς MKN45, και θα χρησιμοποιηθεί για την καταστολή του GrACILe2 σε μετέπειτα στάδια,
- την ώριμη αλληλουχία του GrACILe2 μεταγράφου, προκειμένου να γίνει *in vitro* μεταγραφή του, για τον προσδιορισμό της ακριβούς ποσότητας μεταγράφων του γονιδίου ανά κύτταρο, καθώς και για αξιοποίηση σε μελλοντικά πειράματα RNA pull-down.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν, μαζί με τα αντίστοιχα ενθέματα είναι τα εξής:

1. Tet-pLKO-puro, με shRNA έναντι του GrACILe2
2. pBluescript, με το full-length μετάγραφο του GrACILe2

και ο πολλαπλασιασμός τους έγινε σε βακτήρια *E. coli* έπειτα από μετασχηματισμό με θερμικό-shock δεκτικών ως προς αυτόν τον τύπο βακτηρίων. Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. DH5α, τα οποία είναι το πλέον κοινό στέλεχος βακτηρίων δεκτικών ως προς αυτό το τύπο μετασχηματισμού.
2. Xlblue, τα οποία είναι στέλεχος βακτηρίων στα οποία έχουν γίνει οι κατάλληλες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα τους, ώστε να είναι απενεργοποιημένοι οι μηχανισμοί

του ομόλογου ανασυνδυασμού σε αυτά(γεγονός που μας βοηθάει στον σχεδιασμό πειραμάτων με πλασμίδια τα οποία είναι εύκολο να ανασυνδυαστούν με περιοχές του βακτηριακού γονιδιώματος, όπως ο pLKO, ο οποίος όπως θα δούμε και στη συνέχεια αποτελεί ένα πλασμίδιο βασισμένο στο σύστημα των λεντιών)

Τα βακτήρια αυτών των στελεχών φυλάσσονται σε κλάσματα των 200μl στους -80°C , ενώ βρίσκονται ήδη μέσα στο διάλυμα μετασχηματισμού, δηλαδή το διάλυμα που περιέχει όλα τα απαραίτητα άλατα προκειμένου να είναι εφικτός ο χημικός μετασχηματισμός μέσω θερμικού σοκ. Τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι:

- 1) Βγάζουμε τα δείγματα από τους -80°C και τα αφήνουμε στον πάγο, μέχρι να ξεπαγώσουν
- 2) Γίνεται μοίρασμα της ποσότητας των βακτηρίων, και αντίστοιχη προσθήκη ποσότητας πλασμιδίου, ανάλογη με το στόχο που έχουμε σαν μετέπειτα πείραμα:
 - a) Αν σκοπεύουμε να δουλέψουμε με προϊόν αντίδρασης λιγάσης, γίνεται προσθήκη 10μl από το προϊόν της αντίδρασης σε 200μl βακτηρίων
 - b) Αν σκοπεύουμε να κάνουμε απομόνωση πλασμιδίου γνωστής αρχικής συγκέντρωσης, και θέλουμε να ελέγξουμε για θετικούς κλώνους, συνήθως χρησιμοποιούνται 100μl από τα δεκτικά προς μετασχηματισμό βακτήρια, στα οποία γίνεται προσθήκη 20-40 ng πλασμιδίου(συνήθως αραιωμένο στο 1 μl)
 - c) Αν θέλουμε να περάσουμε για midi-prep(ανάλυση του οποίου θα γίνει αργότερα) ή για την λήψη glycerol-stocks, τότε αρκεί και η προσθήκη 20 ng πλασμιδίου σε 50μl από το δείγμα βακτηρίων.
- 3) Αφήνουμε στον πάγο για 20 λεπτά, προκειμένου να δοθεί αρκετός χρόνος για τα πλασμίδια να πλησιάσουν τη μεμβράνη των βακτηρίων.
- 4) Με το πέρας των 20 λεπτών, τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το παροδικό άνοιγμα πόρων στην μεμβράνη των βακτηρίων, που επιτρέπει την είσοδο των πλασμιδίων στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων.
- 5) Αφήνουμε τα βακτήρια στον πάγο για 2 λεπτά προκειμένου να κλείσουν οι πόροι που έχουν δημιουργηθεί στη μεμβράνη τους
- 6) Προσθέτουμε την απαραίτητη ποσότητα θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό, μέχρι η τελική ποσότητα δείγματος να φτάσει στο 1ml, περνάμε το δείγμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες και το αφήνουμε σε επωαστήρα για 50 λεπτά, στις 160 στροφές το λεπτό, στους 37 βαθμούς Κελσίου. Η προσθήκη θρεπτικού χωρίς αντιβιοτικό γίνεται προκειμένου να δοθεί ο απαραίτητος χρόνος που χρειάζονται τα κύτταρα, προκειμένου να εκφράσουν από μια φορά όλο το γενετικό τους υλικό(δηλαδή να προλάβουν να έχουν κάνει όλα τα βακτήρια από έναν αναδιπλασιασμό, εξ' ου και ο χρόνος επώασης των 50 λεπτών). Επομένως, προσθήκη θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικό θα είχε ως αποτέλεσμα την θανάτωση της πλειονότητας των βακτηρίων.
- 7) Γίνεται επίστρωση ποσότητας από την βακτηριακή καλλιέργεια σε τρυβλία παρουσία 100ng/μl αμπικιλλίνης, προς την επιλογή των θετικών ως προς το μετασχηματισμό κλώνων(η επιλογή εδώ γίνεται επειδή το πλασμίδιο που έχουν παραλάβει τα θετικά ως προς τον μετασχηματισμό βακτήρια φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι της αμπικιλλίνης). Οι ποσότητες που γίνονται επίστρωση εξαρτώνται από την πειραματική

διαδικασία – συνθήκη που επικρατεί για τα πλασμίδια προ του πειράματος μετασηματισμού, δηλαδή:

- i) Αν το πλασμίδιο προέρχεται από αντίδραση λιγάσης, τότε γίνεται επίστρωση 350μl από την υγρή καλλιέργεια βακτηρίων στο τρυβλίο,
 - ii) Αν η προέλευση του είναι διαφορετική, τότε γίνεται επίστρωση 200μl από την υγρή καλλιέργεια.
- 8) Τα τρυβλία αφήνονται σε επωαστήρα να μεγαλώσουν για ~16-18 ώρες, μέχρι να αναπτυχθούν οι αποικίες, και στην συνέχεια μεταφέρονται σφραγισμένα στο ψυγείο, έως ότου χρησιμοποιηθούν για την επόμενη πειραματική διαδικασία. Αυτά θα αξιοποιηθούν για την επιλογή και λήψη μιας μοναδιαίας αποικίας από το τρυβλίο, για μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό της over-night στους 37 βαθμούς Κελσίου, στις 210 στροφές, σε 2ml θρεπτικό υλικό παρουσία αμπικιλίνης.

Αυτό το πειραματικό πρωτόκολλο είναι κοινό και για τα 2 στελέχη βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, και απλά διαφοροποιούνται οι περιπτώσεις ανάλογα με τις συνθήκες οι οποίες αναφέρονται

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν kit από την εταιρεία Macherey-Nagel, και πιο συγκεκριμένα αυτό για το mini-prep, και αυτό για αυτό για το midi-prep, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.3.1 Δημιουργία των pLKO constructs

Σε πρώτη φάση γίνεται πέψη του πλασμιδίου προκειμένου να γίνει εισαγωγή του ενθέματος, το οποίο στην περίπτωση αυτή είναι το shRNA έναντι του GrACILe2, καθώς και τα shRNAs αρνητικού ελέγχου έναντι του GFP και μιας αλληλουχίας χωρίς στόχο στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Scrambled). Σύμφωνα με τον χάρτη του pLKO (Παράρτημα, **εικόνα 6.1**), η ένθεση του shRNA προϋποθέτει πέψη του πλασμιδίου με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες AgeI και EcoRI, ώστε να υπάρχουν και έτοιμα τα κολλώδη άκρα για την προσθήκη του όλιγο-νουκλεοτιδικού τμήματος που θα παράγει εν τέλει τα shRNAs (το οποίο είναι κατασκευασμένο ώστε να φέρει έτοιμα τα άκρα αυτά).

Η πέψη που θα πρέπει να γίνει, λοιπόν, είναι η εξής:

Αντιδραστήριο/δείγμα	Ποσότητα ανά αντίδραση
10X buffer CutSmart	5 μl
AgeI	3 μl
EcoRI	3 μl
Plasmid	1000 ng
H ₂ O	38 μl

Πίνακας 3.6 Σύσταση της πέψης του Tet-pLKO-puro, προκειμένου να ετοιμαστεί για την λήψη του ενθέματος του shRNA, ανά δείγμα.

Η πέψη διαρκεί 5 ώρες, και μπορεί στις 3 ώρες να γίνει λήψη 5μl από το κάθε δείγμα, και προσθήκη αντίστοιχα 1μl από το κάθε ένζυμο σε κάθε δείγμα αντίστοιχα, προκειμένου τα

5μl με τη προσθήκη 10 μl H₂O και 3 μl loading dye, να φορτωθούν σε ένα gel αγαρόζης 1%, ώστε να έχουμε μια εκτίμηση για το πως προχωράει η αντίδραση. Στο πέρασμα των 5 ωρών, σταματά η αντίδραση και γίνεται, μετά από προσθήκη 10 μl loading dye, ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% ώστε να γίνει gel extraction και απομόνωση του τμήματος 8 χιλιάδων βάσεων του πλασμιδίου, που θα φέρει όλα τα γονίδια και ρυθμιστικά στοιχεία του pLKO, και είναι έτοιμος για την προσθήκη του ενθέματος. Το gel extraction γίνεται με το αντίστοιχο kit (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης του πλασμιδίου που απομονώθηκε, και η κατάλληλη αραίωση ώστε η τιμή της συγκέντρωσης να αντιστοιχεί σε 30 ng/μl. Ακολουθεί στη συνέχεια αντίδραση λιγάσης, με την εξής σύσταση:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
10x T ₄ ligase buffer	2
T ₄ ligase (NEB)	2
pLKO	2
Ένθεμα	4
H ₂ O	10

Πίνακας 3.7 Σύσταση της αντίδρασης λιγάσης με την λιγάση της εταιρείας NEB ανά δείγμα.

Η αντίδραση λιγάσης γίνεται over-night (~16 ώρες) στους 16 βαθμούς Κελσίου.

Μετά από αυτή την αντίδραση, ακολουθεί μετασηματισμός βακτηρίων του στελέχους Xlblue, ακολουθώντας τις προϋποθέσεις του πειραματικού πρωτοκόλλου για τα προϊόντα αντίδρασης λιγάσης. Σε επόμενο βήμα γίνεται απομόνωση του πλασμιδιακού DNA μέσω mini-prep (με το πρωτόκολλο για το low-copy πλασμίδιο), από το σύνολο των αποικιών που είχαν αναπτυχθεί στο τρυβλίο το οποίο και επιστρώθηκε κατά τον μετασηματισμό. Αφού έγινε επιτυχώς η απομόνωση και ακολούθησε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων, έγινε διαπίστωση μετά και από μια διαγνωστική PCR του ότι όντως έχουμε στη διάθεση μας το πλασμίδιο που να φέρει και το επιθυμητό ένθεμα. Η αντίδραση PCR σε αυτή τη περίπτωση γίνεται ως εξής:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα(μl)
Buffer	3
dNTPs	0,5
Forward primer	1
Reverse primer	1
Template	1
Taq DNA polymerase	0,3

Water	Up to 30
--------------	----------

Πίνακας 3.8 Σύσταση της διαγνωστικής PCR για ανίχνευση των κλώνων που φέρουν το ένθεμα.

Ο forward primer υβριδίζεται πάνω στην περιοχή του ενθέματος, ενώ ο reverse primer υβριδίζεται επάνω στο πλασμίδιο. Συνεπώς, παρουσία του ενθέματος περιμένουμε μετά από ηλεκτροφόρηση να πάρουμε την αντίστοιχη μπάντα.

Το αποτέλεσμα αυτό θα επιβεβαιωθεί και μέσω αλληλούχησης τύπου Sanger.

3.3.2 Δημιουργία των pBluescript constructs

Ο συγκεκριμένος φορέας χρησιμοποιείται για την υπερέκφραση του full-length μεταγράφου του GrACILe2. Αυτό το κάνει χάρη στην ύπαρξη του υποκινητή T7 και του υποκινητή T3 εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης (ο πλασμδιακός του χάρτης φαίνεται στην εικόνα 3.2 στο Παράρτημα). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το να είναι εφικτή η μεταγραφή του GrACILe2 και από τις δυο κατευθύνσεις από τους δυο διαφορετικούς υποκινητές, ή μεταγραφή του μόνο από τον T7 υποκινητή (καλύτερη απόδοση), εάν έχουμε στη διάθεση μας το ένθεμα κλωνοποιημένο και από τις δυο κατευθύνσεις. Η προσέγγιση που επιλέχθηκε είναι να χρησιμοποιηθεί μόνο ο T7 υποκινητής, , Για την κλωνοποίηση αξιοποιήθηκαν δείγματα cDNA από την κυτταρική σειρά MKN45, και σε αυτά έγινε PCR, με εκκινητές οι οποίοι να υβριδίζουν ακριβώς στην αρχή και το τέλος του μεταγράφου, όπως αυτό προβλέπεται από το γονιδιωματικό φυλλομετρητή UCSC. Η σύσταση της PCR ανά αντίδραση ήταν η εξής :

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
10X Buffer	5
dNTPs	1
Primers	5
Template	4
Q5 (High fidelity) DNA polymerase	0,5
Nuclease free water	Up to 50

Πίνακας 3.9 Σύσταση της αντίδρασης PCR για λήψη του full-length μεταγράφου του GrACILe2 ανά δείγμα.

Χρησιμοποιείται υψηλής πιστότητας πολυμεράση προκειμένου να μην εισάγουμε μεταλλάξεις που μπορεί να επηρεάζουν τις δευτεροταγείς δομές που σχηματίζει το lncRNA, έτσι ώστε τα αποτελέσματά μας σε μετέπειτα πειράματα να είναι όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστα, ενώ ακόμα εξασφαλίζουμε μεγαλύτερη σιγουριά ως προς την μη ύπαρξη παραπροϊόντων στην αντίδραση.

Προκειμένου να είναι εφικτή η εισαγωγή του ενθέματος σε αυτή τη περίπτωση, γίνεται πέψη του pBluescript με την περιοριστική ενδονουκλεασή EcoRV. Μετά από αυτή τη πέψη, ο φορέας θα έχει τυφλά άκρα, και συνεπώς θα είναι εφικτή η εισαγωγή και από τις δύο κατευθύνσεις του ενθέματος, όπως ακριβώς θα έχει προκύψει από την PCR, δίχως την ανάγκη για περαιτέρω επεξεργασία του. Έγιναν 8 αντιδράσεις, με την εξής σύσταση η κάθε μια:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
Buffer 10X	5
EcoRV	2
pBluescript (Συγκέντρωση 1000 ng/μl)	1
Nuclease-free water	Up to 50

Πίνακας 3.10 Σύσταση αντίδρασης πέψης του pBluescript για ετοιμασία λήψης του ενθέματος, ανά δείγμα.

Στο τέλος αυτής της αντίδρασης λοιπόν, θα έχουμε λάβει ένα μέρος από τα αρχικά 8μg πλασμίδιου που χρησιμοποιήθηκαν. Η πέψη διαρκεί για 2 ώρες στους 37 βαθμούς Κελσίου.

Στην συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR, καθώς και του προϊόντος της πέψης του pBluescript, και gel extraction σε αυτά (με το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό που προαναφέρθηκε. Το elution στην περίπτωση του pBluescript γίνεται με 20μl nuclease-free water, ενώ στην περίπτωση του PCR product με 15μL. Μετά από μέτρηση της συγκέντρωσης τους με το Qubit, προσαρμόστηκε ανάλογα και η αντίδραση λιγάσης που ακολούθησε (καθώς και για το self-ligation), η οποία είχε την εξής σύσταση:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
10X T4 ligase buffer	2
T4 ligase	2
pBluescript (linearized)	5
Insert (GrACILe2 full-length PCR product)	11(- στο self-ligation)
Nuclease free water	0 (11 στο self-ligation)

Πίνακας 3.11 Σύσταση αντίδρασης λιγάσης, για την ένθεση του full-length μεταγράφου του GrACILe2 στον φορέα pBluescript.

Μετά από αυτή την αντίδραση, έγινε μετασχηματισμός DH5α δεκτικών βακτηρίων με τη χρήση φορέα με και χωρίς ένθεμα (self-ligation control) Για την επιλογή θετικών κλώνων αξιοποιήθηκε η χρώση x-gal. ενώ η επιβεβαίωση της ένθεσης και του προσανατολισμού

αυτής στηρίχθηκε σε διαγνωστικές πέψεις με το PstI για τους 10 κλώνους που επιλέχθηκαν συνολικά. Αυτό το ένζυμο αναγνωρίζει μια θέση πάνω στον πλασμίδιο, και μια θέση πάνω στο ένθεμα, και μετά από ηλεκτροφόρηση σε gel με 1% αγαρόζης, δίνει μια ζώνη στις 400 βάσεις στην περίπτωση που έχει γίνει η ένθεση με κατεύθυνση 5'-3' ως προς τον T7 υποκινητή, και στις 700 βάσεις, αν γίνει ένθεση με κατεύθυνση 3'-5' ως προς τον T7 υποκινητή. Η πέψη έχει την εξής σύσταση:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl or ng)
10X buffer	5
Plasmid	1000
PstI	2
Nuclease free water	Up to 50

Πίνακας 3.12 Διαγνωστική πέψη του *pBluescript*, για ταυτοποίηση λήψης του ενθέματος και από ποια φορά έγινε η λήψη, ανά δείγμα.

Στη συνέχεια έγινε επιλογή των επιθυμητών κλώνων και στάλθηκαν για αλληλούχηση, προκειμένου να γίνει και ανεξάρτητη επιβεβαίωση της ορθής ένθεσης βάση προς βάση. Αφού γίνει αυτή η επιβεβαίωση γίνεται στη συνέχεια midi-prep, και πάλι για το πρωτόκολλο για το high cory πλασμίδιο.

3.4. Γενετική τροποποίηση κυττάρων MKN45

Για την κατασκευή γενετικά τροποποιημένων καρκινικών κυττάρων με επαγόμενη υπερέκφραση shRNA έναντι του GrAC1L2, επιλέχθηκε ο φορέας Tet-pLKO-puro, που είναι φορέας συμβατός με γενετική τροποποίηση μέσω λεντιών, επιτρέποντας τη σταθερή γενετική τροποποίηση των κυττάρων της σειράς MKN45, μέσα στα οποία θα επάγεται το shRNA, παρουσία δοξυκυκλίνης.

Αφού έγινε επιτυχώς η παραγωγή των λεντιών (βλ. Παράρτημα), σε επόμενη φάση προχωράμε στον μετασχηματισμό των κυττάρων MKN45. Αφού γίνει η προσθήκη του κάθε ιού στο πιάτα που μεγαλώνουν τα κύτταρα, τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν παρουσία πουρομυκίνης, προκειμένου να γίνει επιλογή των κυττάρων που έχουν λάβει το ένθεμα. Από αυτά, επιλέγονται μονοκλωνικές αποικίες, και αφήνονται να μεγαλώσουν σε 12-well πιάτα, για μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό της κάθε αποικίας σε κάθε πιάτο. Αφού αυτές αναπτυχθούν αρκετά, αφαιρείται το θρεπτικό από το συγκεκριμένο well, προστίθεται τριζόλη, και προχωράει για RNA extraction, DNase treatment και cDNA synthesis. Η μόνη διαφορά σε αυτή τη διαδικασία είναι ότι στο mix 1 του cDNA synthesis, προστίθεται και επιπλέον 0,5 μl από stem-loop primer, ειδικό για να ανιχνεύει το siRNA έναντι του lncRNA στόχου.

Προκειμένου να ελεγχθεί το κατά πόσο ήταν πετυχημένη η γενετική τροποποίηση, γίνεται μια qPCR στο cDNA των κλώνων που έχουν συλλεχθεί, με εκκινητές που να αναγνωρίζουν και να ενισχύουν την αλληλουχία του TetR.

4.Αποτελέσματα

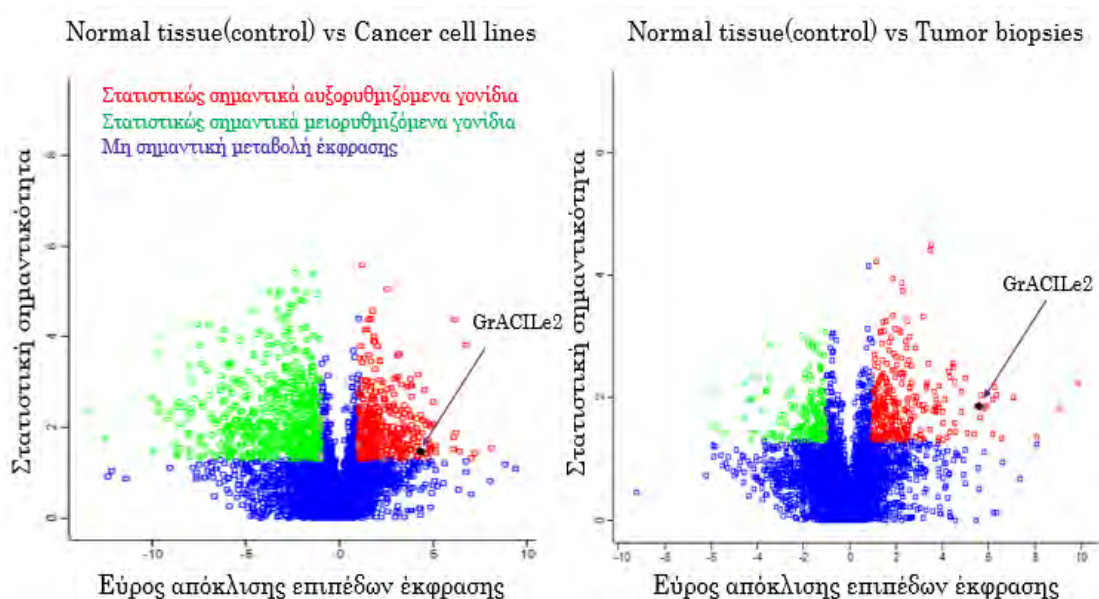
4.1. Βιοπληροφορική ανάλυση

4.1.1 Μετανάλυση μεταγραφομικής και επιλογή του GrACILe2

Για την ανάλυση διαφορετικά εκφρασμένων lncRNA στον καρκίνο του στομάχου δημιουργήθηκαν τρία διαγράμματα volcano έπειτα από μετανάλυση δεδομένων RNA-seq που αφορούν:

- την σύγκριση των δειγμάτων φυσιολογικών ιστών με καρκινικές κυτταρικές σειρές (εικόνα 4.1-δεξιά διάγραμμα),
- την σύγκριση των δειγμάτων φυσιολογικών παρακείμενων ιστών με τις αντίστοιχες βιοψίες ασθενών με καρκίνο του στομάχου (εικόνα 4.1-αριστερό διάγραμμα), προκειμένου να αναλυθεί η έκφραση ανάμεσα σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς,

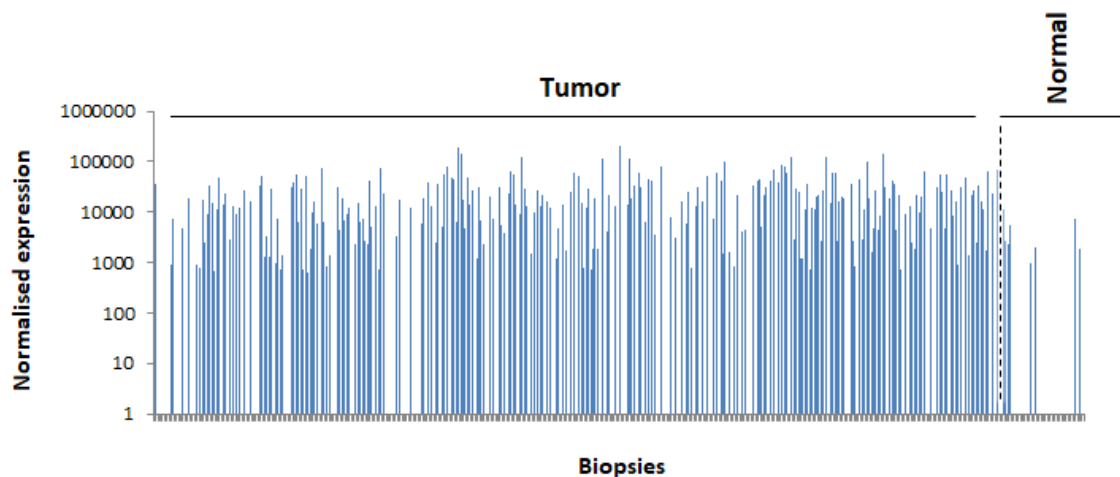
Σε καθένα από τα volcano plots, στον άξονα x αναπαρίστανται οι τιμές του εύρους αλλαγής ως προς την έκφραση του κάθε γονιδίου, ανάμεσα στην υπό εξέταση συνθήκη, σε σχέση με την συνθήκη control, και στον άξονα y αναπαρίστανται οι τιμές p-value, που δρουν ως ένας δείκτης στατιστικής σημαντικότητας του αποτελέσματος. Ως ελάχιστο όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται η μετασηματισμένη τιμή p ίση ή μεγαλύτερη από 1,3 (που αντιστοιχεί σε τιμές $p < 0,05$), ενώ ως όρια του εύρους αλλαγής ορίζονται τιμές μικρότερες του -1 και τιμές μεγαλύτερες του +1 (που αντιστοιχούν σε κατ' ελάχιστον υποδιπλασιασμό ή διπλασιασμό των επιπέδων έκφρασης έναντι του φυσιολογικού). Γονίδια των οποίων το εύρος αλλαγής έκφρασης βρίσκεται κάτω από την τιμή -1, και έχουν στατιστική σημαντικότητα μικρότερη από 1,3, χαρακτηρίζονται ως τα μειορυθμισμένα γονίδια της υπό εξέτασης συνθήκης και απεικονίζονται με πράσινο χρώμα στις εικόνες. Αντίστοιχα, με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται γονίδια των οποίων η έκφραση αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά. Τα γονίδια των οποίων η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης δεν παρουσιάζουν είτε μεγάλο εύρος απόκλισης, ή/και δεν παρουσιάζουν κάποια υψηλή στατιστική σημαντικότητα, απεικονίζονται με μπλε χρώμα.



Εικόνα 4.1 Volcano plots που προκύπτουν από την σύγκριση φυσιολογικών παρακείμενων ιστών (συνθήκη control) με τις καρκινικές κυτταρικές σειρές (αριστερό διάγραμμα) και με τις βιοψίες (διάγραμμα δεξιά).

Στο αριστερό volcano plot φαίνεται ότι το GrACILe2 (με μαύρη κουκίδα) ανήκει στα στατιστικώς αυξορυθμιζόμενα γονίδια των καρκινικών κυτταρικών σειρών, σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Αντίστοιχα, και στο δεξί volcano plot φαίνεται με μαύρη κουκίδα το GrACILe2, το οποίο φαίνεται ότι ανήκει στα στατιστικώς σημαντικά αυξορυθμιζόμενα γονίδια των καρκινικών κυττάρων των βιοψιών, σε σχέση με τον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό. Και στις δύο περιπτώσεις το μετάγραφο υπερεκφράζεται περισσότερο από 30 φορές στον καρκίνο κατά μέσο όρο.

Η υπερέκφραση του συγκεκριμένου lncRNA σε μερικούς καρκινικούς ιστούς ή σειρές δεν είναι αρκετή για να δικαιολογήσει την επιλογή του συγκεκριμένου lncRNA, έναντι των υπολοίπων μεταγράφων Έτσι αξιοποιήθηκαν υπάρχοντα δεδομένα από την ερευνητική κοινοπραξία TCGA για την συστηματική μελέτη της έκφρασης του Gracile2 σε εκατοντάδες μεταγραφόμενα από βιοψίες καρκινικού ή φυσιολογικού ιστού στομάχου (**Εικ. 4.2**) (Bo Hwa Sohn, 2017).



Εικόνα 4.2 Έκφραση του GrACILe2 σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του στομάχου. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι βιοψίες καρκίνου του στομάχου και πιο συγκεκριμένα 370 δείγματα καρκινικού ιστού έναντι 40 δειγμάτων φυσιολογικού παρακείμενου ιστού. Στον κάθετο άξονα απεικονίζεται σε λογαριθμική κλίμακα η κανονικοποιημένη τιμή έκφρασης του GrACILe2 ανά δείγμα έπειτα από μετανάλυση μεταγραφομικών δεδομένων από την κοινοπραξία TCGA. Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε μια βιοψία ασθενούς.

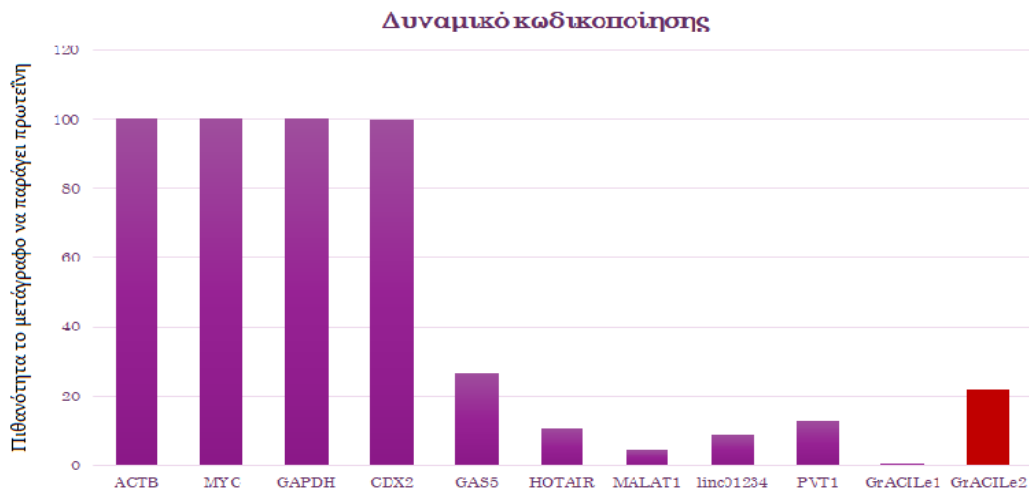
Παρατηρήθηκε, ότι στην πλειοψηφία των καρκινικών δειγμάτων, η έκφραση του GrACILe2 είναι πολύ αυξημένη, συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό, στον οποίο το Gracile2 εκφράζεται κάτω από το όριο ανίχνευσης του RNA-seq στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων (36 από τα 40)

Συνεπώς, φαίνεται ότι το GrACILe2 αποτελεί ένα γονίδιο με στατιστικώς σημαντική και καθολικά αυξορυθμιζόμενη έκφραση στον καρκίνο του στομάχου τόσο σε επίπεδο κυτταρικών σειρών όσο και σε επίπεδο βιοψιών από ασθενείς. Αυτό το συμπέρασμα,

επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα που παρέχονται από τα volcano plots, αλλά και από τα δεδομένα έκφρασης του από τις βιοψίες των ασθενών. Ακόμη, επιπρόσθετες αναλύσεις τύπου Kaplan Meier έχουν πραγματοποιηθεί για το GrACILe2 (δεν γίνεται παράθεση τους σε αυτή τη πτυχιακή), οι οποίες έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση του GrACILe2 σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση για τον ασθενή. Για αυτούς τους λόγους, λοιπόν, επιλέχθηκε το GrACILe2 για περαιτέρω ανάλυση και μελέτη.

4.1.2 Ανάλυση του κωδικού δυναμικού του GrACILe2

Παρόλο που το Gracile2 υπομνηματίζεται ως μη κωδικοποιητικό μετάγραφο στο ανθρώπινο γονιδίωμα, κρίθηκε σκόπιμη η ανεξάρτητη επιβεβαίωση της μη κωδικοποιητικής του φύσης με βιοπληροφορικές μεθόδους. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του κωδικού δυναμικού της αλληλουχίας Gracile2 με το πρόγραμμα CPC2. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν οι αλληλουχίες γνωστών και πειραματικά τεκμηριωμένων κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών μεταγράφων ως θετικά και αρνητικά δείγματα ελέγχου (Εικ. 4.3)

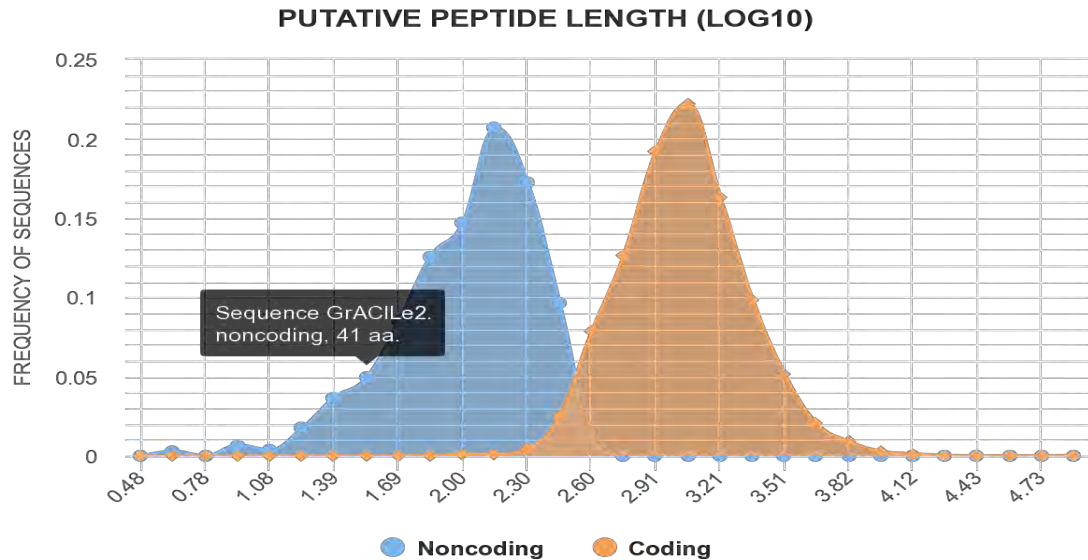


Εικόνα 4.3 Εκτίμηση του κωδικοποιητικού δυναμικού του GrACILe2. Στον άξονα x βρίσκονται τα παραδείγματα γνωστών και κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών μεταγράφων ως θετικά και αρνητικά δείγματα ελέγχου, καθώς και το GrACILe1 & GrACILe2. Στον άξονα y, βρίσκεται σε αριθμητική κλίμακα η πιθανότητα τα μετάγραφα των γονιδίων αυτών να μεταφράζονται σε κάποια πρωτεΐνη, με την τιμή 100 να αναπαριστά την 100% πιθανότητα το μετάγραφο αυτό να μπορεί να αποδώσει κάποια πρωτεΐνη, και τιμές συνήθως κάτω από 40 (δηλαδή <40% πιθανότητα) αντιστοιχούν σε lncRNAs.

Από την συγκεκριμένη ανάλυση συμπεραίνεται ότι το GrACILe2(κόκκινη μπάρα), όντως ανήκει στα lncRNAs. Για να στηριχθεί περαιτέρω αυτή η υπόθεση, από το πρόγραμμα CPC2 λήφθηκαν και κάποια επιπλέον διαγράμματα, τα οποία συνοψίζουν το κωδικό δυναμικό του GrACILe2 έναντι της κατανομής των τιμών κωδικού δυναμικού για το σύνολο του ανθρώπινου μεταγραφώματος, όπως υπολογίζονται με βάση το μήκος που θα είχε το παραγόμενο από αυτό πεπτίδιο, εάν αυτό μπορούσε να παράγει κάποιο (Εικ. 4.4).

Όπως βλέπουμε σε αυτή την εικόνα, με βάση την αλληλουχία του GrACILe2 το πιθανό παραγόμενο πεπτίδιο θα είχε μέγεθος 41 αμινοξέων, και στην κατανομή εντάσσεται στα μη

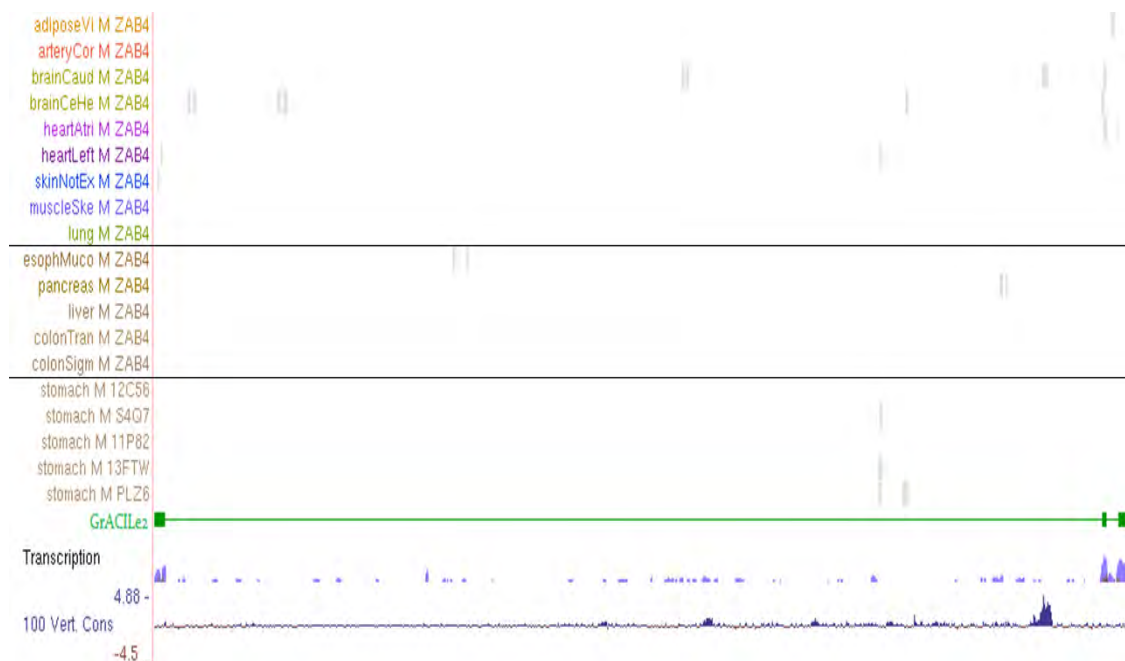
κωδικοποιητικά μετάγραφα, όντας πολύ χαμηλότερη τιμή από αυτές στις οποίες παρατηρούνται τα υπάρχοντα μεγέθη λειτουργικών πρωτεϊνών, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι το GrACILe2 αποτελεί ένα μη κωδικοποιητικό μετάγραφο.



Εικόνα 4.4 Εκτίμηση του μήκους του παραγόμενου πεπτιδίου.

4.1.3 Ανάλυση έκφρασης του GrACILe2 σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς.

Από την ανάλυση της έκφρασης του GrACILe2 σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ιστούς που έγινε προέκυψε η **εικόνα 4.5**, η οποία αφορά την φυσιολογική έκφραση με βάση δείγματα τα οποία λήφθηκαν από άντρες ηλικίας 20 έως 49 ετών.



Εικόνα 4.5 Έκφραση του GrACILe2 σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς. Από πάνω προς τα κάτω, παρατηρούνται δείγματα από ιστούς ποικίλης προέλευσης, ιστούς ενδοδερμικής

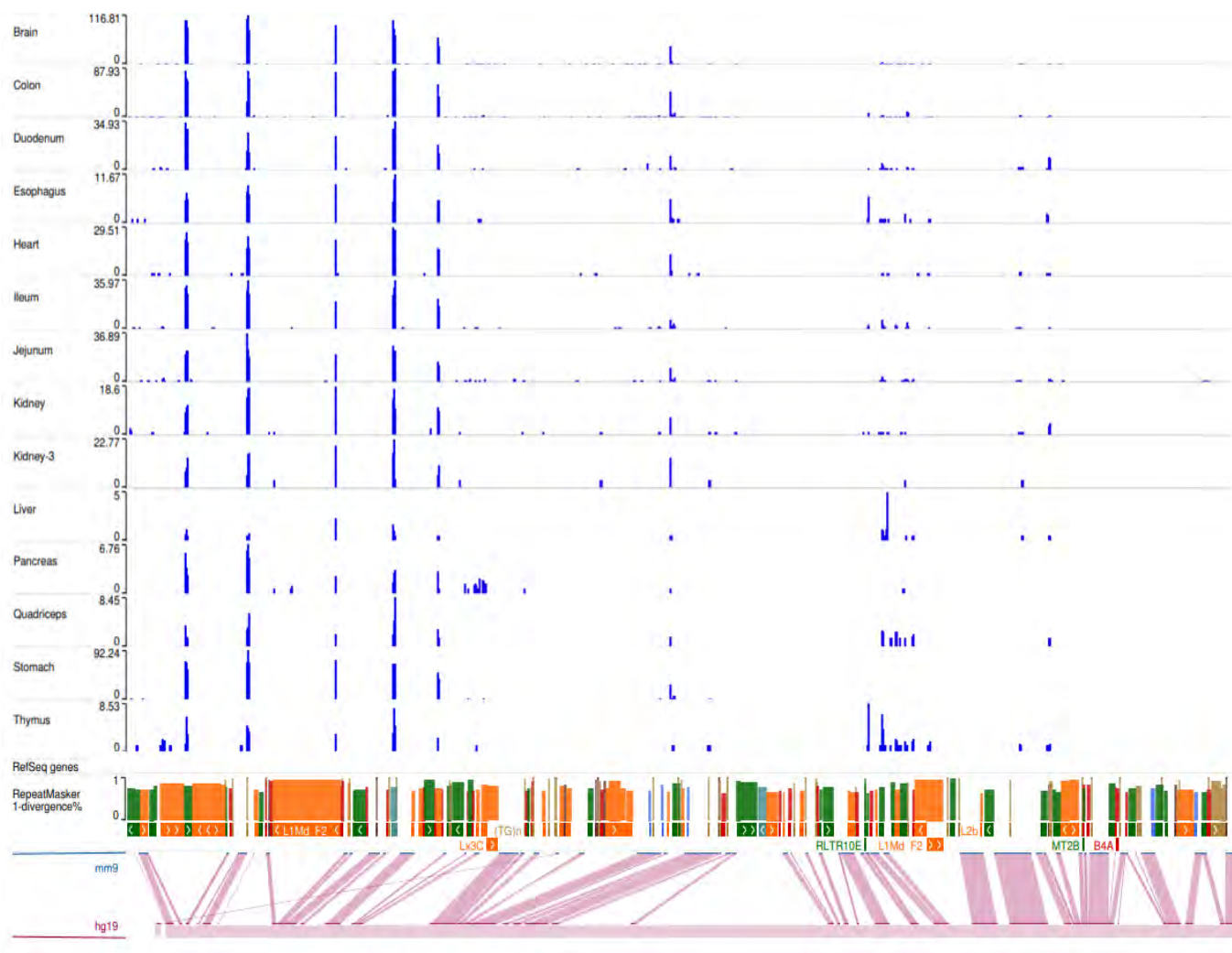
προέλευσης, και δείγματα από στόμαχο. Επίσης, στο κάτω μέρος της εικόνας παρατηρούνται τα επίπεδα μεταγραφής του συγκεκριμένου lncRNA, καθώς και τα επίπεδα συντήρησης της αλληλουχίας του σε 100 σπονδηλωτά, στο οποίο και φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια συντήρηση της αλληλουχίας του.

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε κανέναν από τους ιστούς που αναλύθηκαν (συνολικά 49, εδώ παρουσιάζονται ενδεικτικά 19) δεν παρατηρήθηκε έκφραση του lncRNA σε επίπεδα ανώτερα του πειραματικού θορύβου, είτε πρόκειται για φυσιολογικό ιστό στομάχου, είτε πρόκειται για άλλους φυσιολογικούς ιστούς. Αντίστοιχη εικόνα παρατηρείται και σε δείγματα ιστού που προέρχονται από θηλυκούς δότες (δεν παρουσιάζονται). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η έκφραση του Gracile2 είναι μη ανιχνεύσιμη είτε σε ανθρώπινο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο είτε στο σύνολο των υπολοίπων φυσιολογικών ιστών, σε αντιδιαστολή με την καθολική υπερέκφραση του σε καρκινικούς ιστούς στομάχου.

4.1.4 Ανάλυση συνταίνιας-συνέκφρασης στον ποντικό

Καθώς ο ποντικός αποτελεί τον κατ' εξοχήν οργανισμό μοντέλο για την μελέτη του καρκίνου, είναι αναγκαίο να γίνει ένας έλεγχος για το αν η γονιδιωματική περιοχή του GrACILe2 είναι αυτούσια και στον ποντικό, όπως και στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Σε δεύτερη φάση, και εφόσον είναι όντως αυτούσια, θα γίνει μια εκτίμηση του εάν και σε ποιους ιστούς εκφράζεται το GrACILe2 στον ποντικό. Παρατηρείται ότι η γονιδιωματική περιοχή του GrACILe2, βρίσκεται σε γενικές γραμμές αυτούσια στο γονιδίωμα του ποντικού, φέροντας διαφορές κυρίως στη ποσότητα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, δίχως να αντιστοιχεί με κάποιο annotated gene που να βρίσκεται σε αυτή την περιοχή. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης τα οποία παρατηρούνται σε αυτή την περιοχή με βάση τα tracks τα οποία προστέθηκαν, παρατηρούνται κάποιες κορυφές, οι οποίες όμως δεν αντιστοιχούν απόλυτα με τη περιοχή του GrACILe2, συνεπώς θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το GrACILe2 δεν εκφράζεται στους φυσιολογικούς ιστούς ποντικού οι οποίοι και εξετάστηκαν. Το αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης αυτής φαίνεται στην **εικόνα 4.6**. Σε αυτή την εικόνα φαίνεται η περιοχή του χρωμοσώματος του ποντικού που αντιστοιχεί στην γονιδιωματική περιοχή του γονιδίου του GrACILe2 στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται η περιοχή από την αλληλουχία έναρξης της μεταγραφής του, μέχρι την περιοχή που βρίσκεται η αλληλουχία λήξης της μεταγραφής, με την προσθήκη 1000 νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν των δυο αυτών άκρων του γονιδίου.

Άρα, η γονιδιωματική περιοχή του GrACILe2 βρίσκεται στο γονιδίωμα του ποντικού αυτούσια σαν τμήμα (δηλαδή δεν αντιστοιχεί σε κάποιο έλλειμμα), αλλά με διαφοροποιήσεις σε επίπεδο αλληλουχίας. Αυτό όμως δεν αναιρεί το ότι μπορεί να παράγεται κάποιο μετάγραφο και στον ποντικό με παρόμοια λειτουργία, καθώς τα lncRNAs βασίζονται στη δευτεροταγή τους δομή προκειμένου να εκτελέσουν τη λειτουργία τους. Βέβαια, φαίνεται ότι τουλάχιστον στους φυσιολογικούς ιστούς του ενήλικου ποντικού, δεν παρατηρείται κάποια έκφραση σε αυτόν τον γονιδιωματικό τόπο, συνεπώς το πιθανό ορθόλογο GrACILe2 στον ποντικό μπορεί να εκφράζεται μόνο στον καρκίνο, όπως και στον άνθρωπο ή να μην εκφράζεται καθόλου



Εικόνα 4.6 Εστίαση στην γονιδιωματική περιοχή του GrACILe2. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι υπάρχει κάποια συντήρηση στον ποντικό σε σχέση με τον άνθρωπο καθ' όλο το μήκος του γονιδίου, αλλά μικρό μέρος αυτής βρίσκεται σε αντιστοιχία με τα εξόνια του GrACILe2.

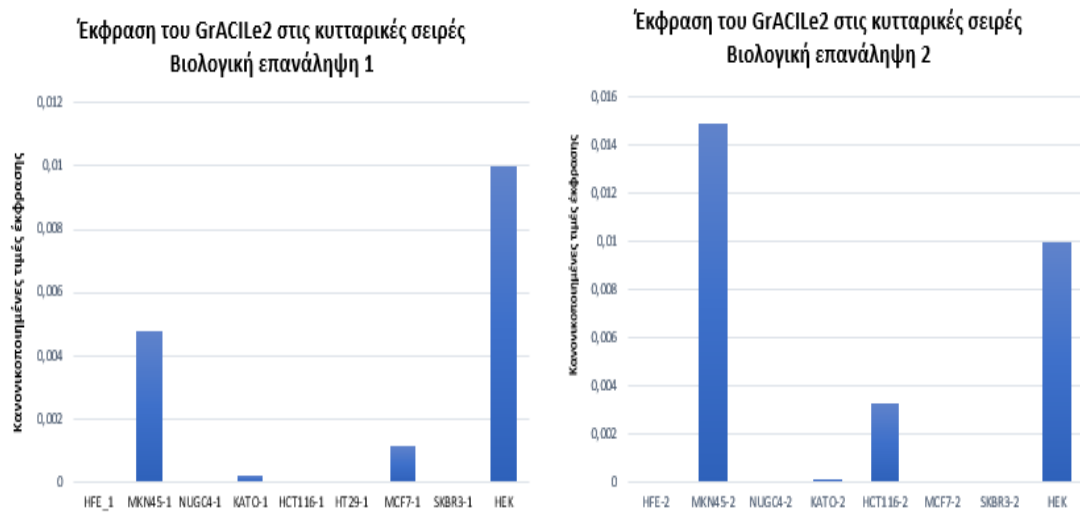
4.2.Χαρακτηρισμός του μεταγράφου του GrACILe2

4.2.1 Επίπεδα έκφρασης του GrACILe2 στα δείγματα κυτταρικών σειρών

Προκειμένου να γίνει η μελέτη του GrACILe2, θα πρέπει να γίνει πειραματικός έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου και επιλογή αυτής στην οποία εντοπίζονται τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Προκειμένου να έχουμε στη διάθεση μας όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα, έγινε το πείραμα εις διπλούν, δηλαδή με τη παρασκευή και ανάλυση cDNA από δυο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις από όλες τις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές.

Με βάση τον υπολογισμό της αρχικής συγκέντρωσης των δειγμάτων κατά την αντίδραση qPCR, προκύπτουν τα διαγράμματα που φαίνονται στην **εικόνα 4.7**, με αριστερά να φαίνεται το διάγραμμα που προκύπτει από το πείραμα με τα δείγματα από την πρώτη

βιολογική επανάληψη, και δεξιά το διάγραμμα από τα δείγματα της δεύτερης βιολογικής επανάληψης.



Εικόνα 4.7 Αριστερά: Κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του GrACILe2 στις κυτταρικές σειρές, με βάση το πρώτο σετ δειγμάτων cDNA από τις κυτταρικές σειρές. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του GAPDH στα αντίστοιχα δείγματα. Δεξιά: Κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του GrACILe2 στις κυτταρικές σειρές, με βάση το δεύτερο σετ δειγμάτων cDNA από τις κυτταρικές σειρές. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του GAPDH στα αντίστοιχα δείγματα.

Φαίνεται από το πρώτο σετ δειγμάτων ότι το GrACILe2 έχει την μέγιστη έκφραση του στα φυσιολογικά εμβρυακά νεφρικά κύτταρα HEK, και από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές εκφράζεται σε μεγαλύτερα ποσά στην γαστρική καρκινική MKN45, και σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στην μαστική MCF7. Στις υπόλοιπες καρκινικές σειρές φαίνεται πως δεν εκφράζεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα, ενώ δεν παρατηρείται και καθόλου έκφραση στην HFE, που αντιστοιχεί σε φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου. Από το δεύτερο σετ δειγμάτων cDNA φαίνεται ότι μέγιστη έκφραση του GrACILe2 υπάρχει στην σειρά MKN45. Στην MCF7, που στη προηγούμενη βιολογική επανάληψη παρατηρούνταν έκφραση του, σε αυτή την επανάληψη δεν παρατηρείται ανιχνεύσιμη έκφραση. Αντίστροφα, σε αυτή την επανάληψη παρατηρείται έκφραση στην εντερική HCT116, που προηγουμένως φαινόταν ότι δεν εκφράζεται. Συνεπώς αυτές οι δύο περιπτώσεις θεωρούνται αποτέλεσμα πειραματικής παραλλακτικότητας εξαιτίας του δείγματος.

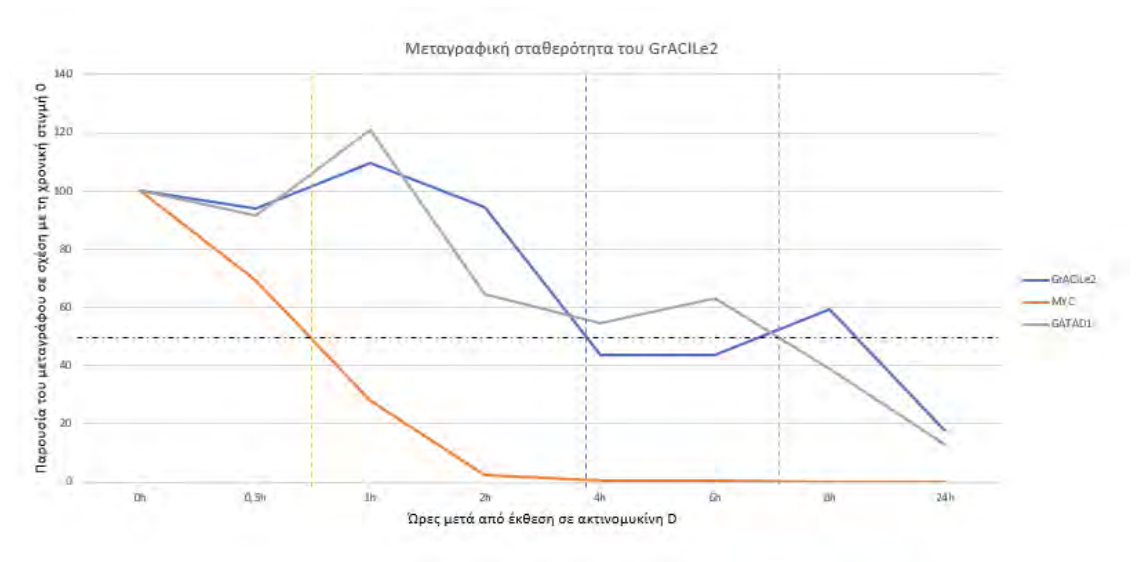
Εν κατακλείδι, η κατάλληλη καρκινική κυτταρική σειρά για την μελέτη του GrACILe2 είναι η MKN45, καθώς είναι η μόνη στην οποία εκφράζεται το συγκεκριμένο lncRNA, επιβεβαιώνοντας την έκφραση του στον καρκίνο του στομάχου και όχι σε άλλους τύπους καρκίνου.

4.2.2 Μεταγραφική σταθερότητα του GrACILe2

Ανάλογα με τον χρόνο ημιζωής του κάθε lncRNA, ορίζεται και η ακρίβεια της ρύθμισης της λειτουργίας που αυτό επιτελεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετάγραφα όπως αυτό του

γονιδίου MYC, το οποίο έχει ογκοεπαγωγικό ρόλο, έχουν χρόνο ημιζωής μικρότερο από τη μια ώρα, ενώ lncRNAs που δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες, και συνεπώς βρίσκονται προστατευμένα από RNases θα έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Συνεπώς ο χρόνος ημιζωής του μεταγράφου, και δη για τα lncRNAs, αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη και της λειτουργίας του, αλλά και της ρύθμισής του.

Η σταθερότητα του GrACILe2 μεταγράφου ελέγχθηκε έπειτα από προσθήκη ακτινομυκίνης σε καρκινικά κύτταρα MKN45. Το διάγραμμα (Εικόνα 4.8) που προκύπτει μετά από την αντίστοιχη qPCR, εκφράζει τις τιμές συγκέντρωσης σε επί τοις εκατό ποσοστό, σε σχέση με την τιμή που δόθηκε για την χρονική στιγμή μηδέν (απουσία ακτινομυκίνης). Φαίνεται λοιπόν ότι ο χρόνος ημιζωής του μεταγράφου (δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για την αποικοδόμηση του 50% των συνολικών μεταγράφων) βρίσκεται κάπου ανάμεσα στην χρονική στιγμή των 2 και 4 ωρών, γεγονός το οποίο μαρτυρά έναν όχι τόσο γρήγορο ρυθμό αποικοδόμησης, που κινεί το ενδιαφέρον για το ποιος μπορεί να είναι ο ρόλος του.



Εικόνα 4,8 Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού μεταβολής του ποσοστού παρουσίας του GrACILe2, καθώς και των MYC, GATAD1, λόγω της αποικοδόμησης τους. Η ακτινομυκίνη D, μπλοκάρει την μεταγραφή, επομένως την χρονική στιγμή έχουμε το 100% της ποσότητας του lncRNA. Σε αυτό το πείραμα δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο γονίδιο για την κανονικοποίηση των τιμών, καθώς το κάθε μετάγραφο έχει και διαφορετικό χρόνο ημιζωής. Η χρονική στιγμή που φτάνουν τον χρόνο ημιζωής τους φαίνεται για το κάθε μετάγραφο από την διακεκομμένη κάθετη γραμμή, με το αντίστοιχο χρώμα.

Για το MYC, το οποίο είναι ένα μετάγραφο κωδικοποιητικού γονιδίου με πολύ αυστηρά όρια ρύθμισης της γονιδιακής του έκφρασης, παρατηρείται ο αναμενόμενος μικρός χρόνος ημιζωής, της τάξης της μισής με μία ώρα. Για το μετάγραφο του GATAD1, επίσης παρατηρείται η αναμενόμενη εικόνα ως προς τον χρόνο ημιζωής του, καθώς είναι γνωστό ότι αυτός βρίσκεται περίπου στο χρονικό περιθώριο των 6 με 8 ωρών. Μέχρι και τη χρονική στιγμή των 2 ωρών, φαίνεται ότι το GrACILe2 είναι ένα σχετικά σταθερό μετάγραφο, χωρίς κάποια αισθητή μείωση του ποσοστού εμφάνισης του στα κύτταρα. Με

το πέρασμα όμως στις 4 ώρες, παρατηρείται απότομη απώλεια >50% στα ποσοστά εμφάνισης του GrACILe2, μαρκάροντας έτσι και τον χρόνο ημιζωής του lncRNA. Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν επαληθευθεί και από μια δεύτερη ανεξάρτητη βιολογική επανάληψη στα MKN45.

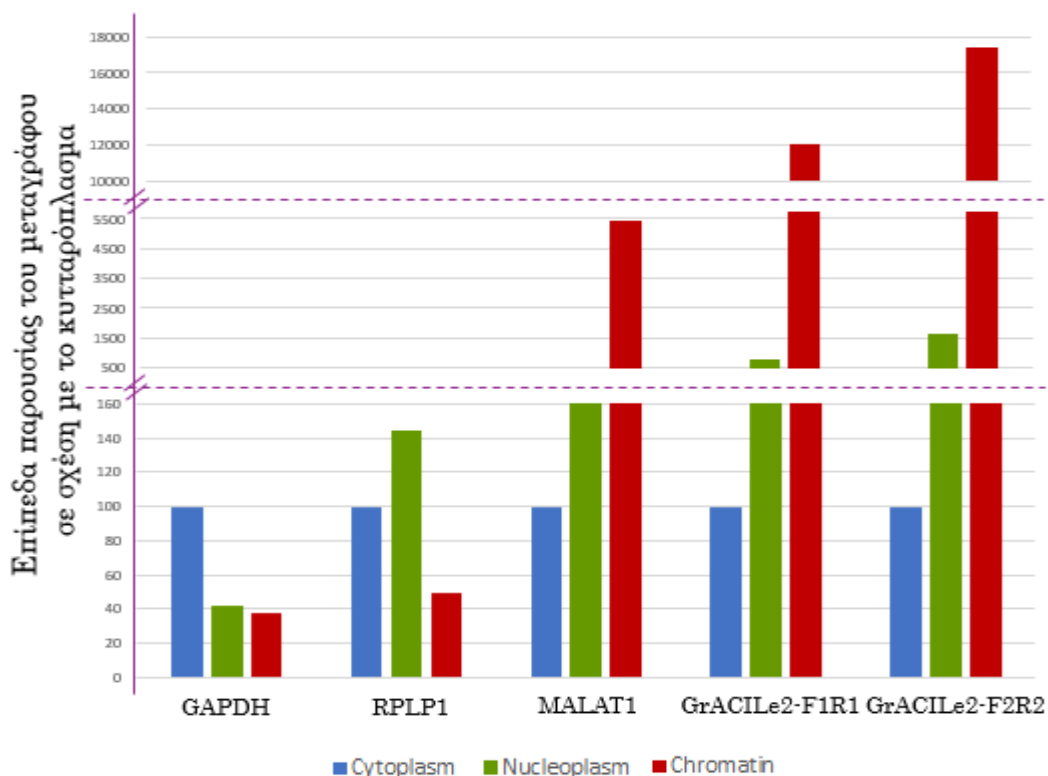
4.2.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταγράφου του GrACILe2.

Όπως αναλύθηκε και στην *Εισαγωγή*, τα lncRNAs έχουν μια ευρεία γκάμα ρόλων που επιτελούν στο κύτταρο, με αυτούς τους ρόλους να διαφοροποιούνται δραματικά ανάμεσα στους ρόλους που μπορούν να εκτελέσουν στο κυτταρόπλασμα, και τους ρόλους που έχουν στον πυρήνα. Συνεπώς, για τη μελέτη της λειτουργίας του lncRNA, είναι απαραίτητος και ο προσδιορισμός της υποκυτταρικής τοποθέτησης του μεταγράφου.

Για αυτό το πείραμα έχουμε αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρήση 2 διαφορετικών σετ εκκινήτων, οι οποίοι να στοχεύουν σε διαφορετικό μέρος του μεταγράφου του GrACILe2, προκειμένου να είμαστε απολύτως βέβαιοι για το αποτέλεσμα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ακόμα τα:

- GAPDH και RPLP1 ως παραδείγματα κωδικοποιητικών γονιδίων των οποίων τα μεταγράφα εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα λόγω πρωτεϊνοσύνθεσης.
- MALAT1, ως παράδειγμα μη κωδικοποιητικού γονιδίου, το μεταγράφο του οποίου αλληλεπιδρά στενά με τη χρωματίνη.

Τα αποτελέσματα του υποκυτταρικού εντοπισμού εκφράζονται ως το ποσοστό της έκφρασης του εκάστοτε μεταγράφου στα δύο πυρηνικά διαμερίσματα (όπως αυτά διαχωρίστηκαν από την πειραματική διαδικασία), σε σχέση με την έκφραση του ανιχνεύτηκε στο κυτταρόπλασμα (*Εικόνα 4.9*).



Εικόνα 4.9 Παρουσία του μεταγράφου του εκάστοτε δείγματος στο κάθε υποκυτταρικό κλάσμα, εκφρασμένο σε αναλογία με την παρουσία του μεταγράφου στο κυτταρόπλασμα ανά δείγμα. GAPDH, RPLP1 και MALAT1 εμφανίζουν τα μέγιστα επίπεδα τους σε κυτταρόπλασμα, πυρηνόπλασμα και χρωματίνη αντίστοιχα, όπως ήταν και αναμενόμενο. Το GrACILe2, με βάση το πως προκύπτει το αποτέλεσμα και από τα δύο ζεύγη εκκινητών αποτελεί ένα χρωματινικό lncRNA.

Όσον αφορά τα 3 δείγματα ελέγχου για το κάθε κλάσμα, και στα τρία παρατηρείται το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Δηλαδή, το καθένα από αυτά παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή παρουσίας του μεταγράφου του, στο αντίστοιχο κλάσμα που αναφέρθηκε και προηγουμένως. Επομένως, αυτό σημαίνει ότι η πειραματική διαδικασία ήταν επιτυχής, και τα αποτελέσματα για το GrACILe2 μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα. Και με τα δυο ζεύγη εκκινητών, λοιπόν, συμπεραίνεται ότι, στο κυτταρόπλασμα η παρουσία του GrACILe2 είναι ελάχιστη, αυξάνεται ελαφρώς στο πυρηνόπλασμα, αλλά με μεγάλη σαφήνεια φαίνεται ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός του είναι κατά κύριο λόγο στο χρωματινικό κλάσμα. Αυτό το αποτέλεσμα είναι μια ισχυρή ένδειξη, που αυξάνει την πιθανότητα ότι το GrACILe2 διαδραματίζει τον λειτουργικό του ρόλο στο κύτταρο μέσω άμεσης, ή έμμεσης με την χρωματίνη (π.χ. μέσω αλληλεπίδρασης με κάποια ιστόνη, μεταγραφικό παράγοντα, ή άλλη πρωτεΐνη που μπορεί να συνδέεται στο DNA),.

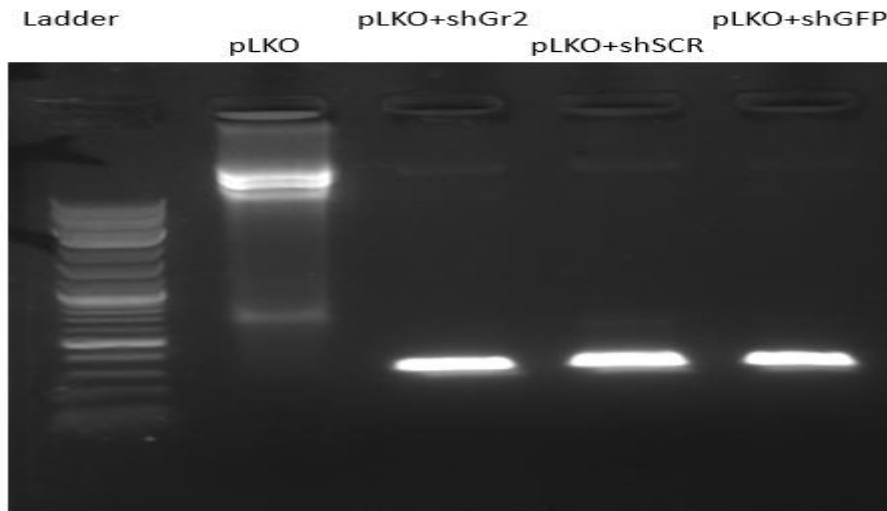
4.3. Δημιουργία των εργαλείων για τη μελέτη του GrACILe2.

4.3.1 Δημιουργία των pLKO constructs

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι το lncRNA GrACILe2 εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στον καρκίνο του στομάχου, ικανοποιητική μεταγραφική σταθερότητα και χρωματινικό εντοπισμό και συμπερασματικά χρήζει περαιτέρω λειτουργικής μελέτης με σκοπό την διασαφήνιση της λειτουργίας του στον καρκίνο. Προκειμένου να γίνει μελέτη του φαινοτύπου καταστολής της έκφρασης του GrACILe2, επιλέχθηκε η κλωνοποίηση shRNA έναντι του GrACILe2 στον φορέα Tet-pLKO-puro. Αυτός ο φορέας, όπως προαναφέρθηκε, επιλέχθηκε χάρη στην ιδιότητα της επαγόμενης (υπό τον έλεγχο του TetR) υπερέκφρασης του shRNA είτε έναντι του GrACILe2 είτε έναντι των αρνητικών μαρτύρων GFP και Scrambled τα οποία επίσης κλωνοποιήθηκαν στον ίδιο φορέα. Για να γίνει ταυτοποίηση ότι όντως το πλασμίδιο φέρει το επιθυμητό shRNA ένθεμα, πραγματοποιήθηκε PCR σε πλασμδιακό DNA των υπό εξέταση αποικιών *E. coli* για κάθε μοριακό εργαλείο (GrACILe2, GFP, Scrambled). Σε αυτή την PCR οι θετικοί κλώνοι αναμένεται να δώσουν μια ζώνη στις 300 βάσεις ενώ δεν θα πρέπει να παρατηρείται ζώνη στους αρνητικούς κλώνους. Από την αντίδραση PCR και στη συνέχεια την ηλεκτροφόρηση που έγινε προκύπτει η **Εικόνα 4.10** για τα GFP και Scrambled αρνητικούς μάρτυρες, αλλά και για το GrACILe2 construct.

Πιο συγκεκριμένα σε αυτή την εικόνα παρατηρούμε ως pLKO τον φορέα δίχως ένθεμα (αρνητικό control ως προς την ένθεση), στον οποίο δεν έχει γίνει κάποια ενίσχυση κατά την PCR, και συνεπώς εμφανίζει μόνο τις ζώνες που αντιστοιχούν στις 3 διαμορφώσεις του πλασμιδίου: κυκλική, γραμμική και υπερελικωμένη. Στα άλλα 3 constructs (shGr2 χρησιμοποιείται ως συντόμευση για το construct που φέρει την ολιγονουκλεοτιδική

αλληλουχία που θα οδηγήσει στην παραγωγή των shRNAs έναντι του GrACILe2- αντίστοιχα και για GFP & Scrambled) παρατηρείται το ενισχυμένο προϊόν της PCR, που δίνει μια ζώνη περίπου στις 300 βάσεις. Επομένως, με βάση αυτή τη πειραματική διαδικασία επιβεβαιώνεται ότι έχει γίνει επιτυχώς η ένθεση της επιθυμητής ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας για κάθε περίπτωση. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και στη συνέχεια και για το κάθε δείγμα ξεχωριστά και βάση προς βάση μέσω αλληλούχησης Sanger.

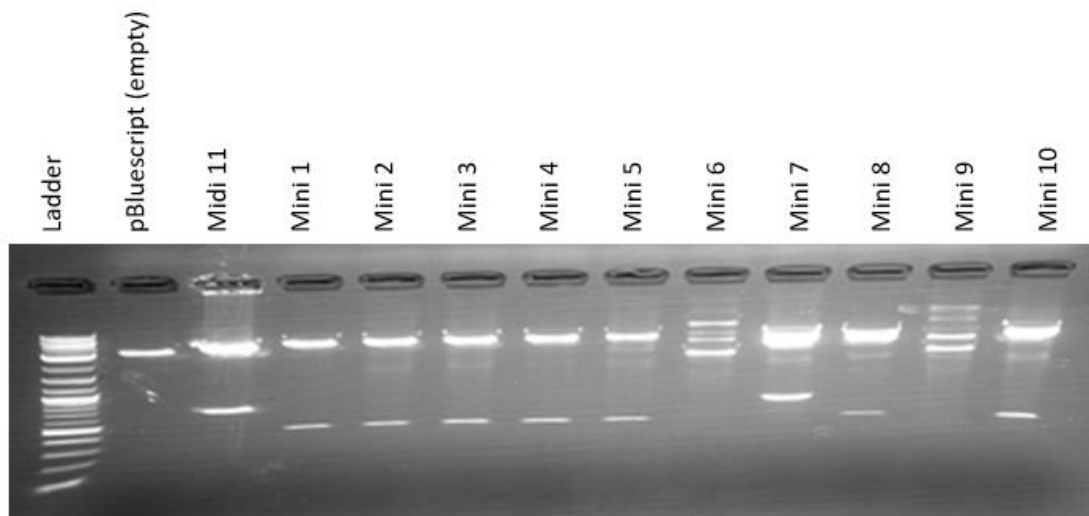


Εικόνα 4.10 Ηλεκτροφόρηση της PCR για τα Tet-pLKO-puro constructs. Σε αυτή την εικόνα παρατηρούμε τον Tet-pLKO-puro με τις 3 διαμορφώσεις του, καθώς και την μπάντα του ενισχυμένου προϊόντος στα 3 θετικά ως προς την ύπαρξη ενθέματος δείγματα.

4.3.2 Κλωνοποίηση του ολικού μεταγράφου GrACILe2 στον φορέα pBluescript με σκοπό την υπερέκφραση

. Για την πληρέστερη λειτουργική μελέτη του GrACILe2 επιλέχθηκε η κλωνοποίηση της πλήρους αλληλουχίας του μεταγράφου του στον φορέα pBluescript.. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε PCR που ενίσχυσε το πλήρες μετάγραφο του GrACILe2 με χρήση πολυμεράσης ακριβείας (proof-reading), καθώς και κατάλληλη πέψη του φορέα pBluescript για την δημιουργία τυφλών άκρων. Για την ταυτοποίηση της κατεύθυνσης από την οποία έχει εισέλθει σε κάθε πλασμίδιο το ένθεμα, έγινε κατάλληλη ενζυματική πέψη του πλασμιδίου που απομονώθηκε από τους υπό εξέταση κλώνους *E. coli* (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην **Εικόνα 4.11**.

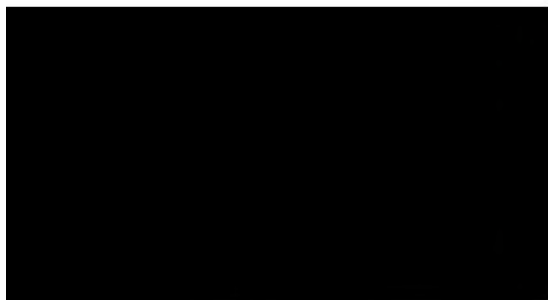
Θετικά δείγματα για την 5'-3' κατεύθυνση ένθεσης ως προς τον T7 υποκινητή φαίνονται τα δείγματα mini 1,2,3,4,5,8 και 10. Θετικό δείγμα για την 3'-5' κατεύθυνση ένθεσης φαίνεται να είναι μόνο το δείγμα του mini 7. Τα δείγματα 6 και 9 θεωρούνται αρνητικό αποτέλεσμα αφού δεν εμφανίζουν καμία ειδική ως προς το ένθεμα ζώνη, πλην αυτών που αφορούν τον πλασμιδιακό φορέα. Μετά από αυτή τη πειραματική διαδικασία, επιλέχθηκε ο κλώνος 1, που φέρει το ένθεμα με την 5'-3' κατεύθυνση ένθεσης (sense ως προς τον T7), καθώς και ο κλώνος 7, που φέρει το ένθεμα με την 3'-5' κατεύθυνση ένθεσης (antisense ως προς τον T7). Τα δείγματα αυτά στάλθηκαν για αλληλούχηση Sanger, η οποία επιβεβαίωσε και την επιτυχή ένθεση τους στον φορέα βάση προς βάση.



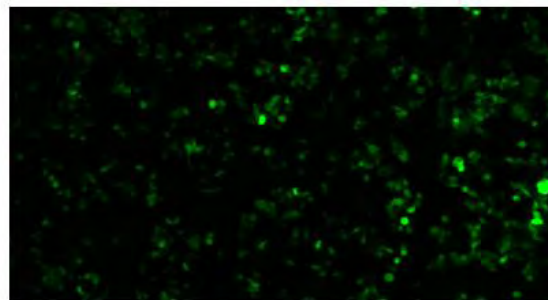
Εικόνα 4.11 Πέψεις του pBluescript. Στη πρώτη θέση μετά τον ladder βρίσκεται ο κενός φορέας σαν αρνητικός μάρτυρας. Ως midi φαίνεται ο θετικός μάρτυρας που βρισκόταν στη διάθεση μας από προηγούμενη προσπάθεια απόκτησης των κλώνων, για την είσοδο του ενθέματος στη μη νοηματική κατεύθυνση ως προς τον T7 υποκινητή.

4.4. Γενετική τροποποίηση κυττάρων MKN45

Για να είναι εφικτός ο αποδοτικός μετασχηματισμός κυττάρων με το επιθυμητό ένθεμα, επιλέχθηκε η χρήση λεντιών, κατάλληλα σχεδιασμένων ώστε να τροποποιούν γενετικά τα κύτταρα στόχος (π.χ. καρκινικά στομάχου) μόνο με την επιθυμητή κασέτα έκφρασης, χωρίς την ικανότητα σχηματισμού εκ νέου μολυσματικών ιών αφού απουσιάζουν τα γονίδια αναπαραγωγής του ιικού γονιδιώματος (γεγονός που εξασφαλίζεται από τον σχεδιασμό του πειράματος). Αυτή η προσπάθεια στέφθηκε με επιτυχία, όπως αποδεικνύεται από τις εικόνες της μικροσκοπίας φθορισμού σε κύτταρα της σειράς MKN45 (**Εικ. 4.12**). Ο συγκεκριμένος έλεγχος στηρίζεται στην ένθεση του γονιδίου GFP που σημαίνει με φθορισμό τα γενετικά τροποποιημένα από τους λεντιούς καρκινικά κύτταρα αποδεικνύοντας ότι οι ιοί που έχουμε στη διάθεση μας μπορούν με πολύ υψηλή απόδοση να μετασχηματίσουν τα καρκινικά κύτταρα θηλαστικών στα οποία χορηγούνται.



Συνθήκη Control



Προσθήκη του ιού με το τμήμα του pLL3

Εικόνα 4.12 Εικόνα από μικροσκοπία φθορισμού, για ανίχνευση φθορισμού στη συνθήκη του μάρτυρα (λεντιός χωρίς GFP) και στην πειραματική συνθήκη (λεντιός με GFP). Φαίνεται ότι οι λεντιοί που κατασκευάζονται στο εργαστήριο έχουν πολύ υψηλό δυναμικό γενετικής τροποποίησης των κυττάρων MKN₄₅.

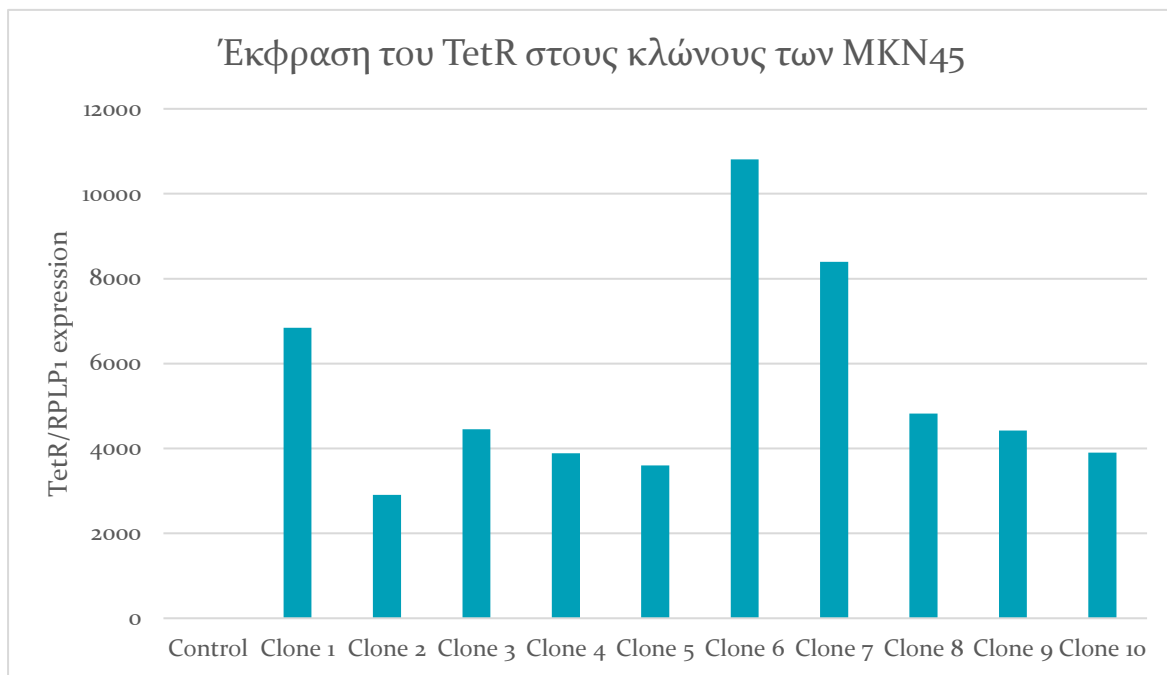
Για να γίνει το πείραμα καταστολής της έκφρασης του GrACILe₂, πρέπει να γίνει χορήγηση των ιών που φέρουν την κασέτα έκφρασης του shRNA έναντι του GrACILe₂ σε κύτταρα της σειράς MKN₄₅ (καθώς σε αυτή εκφράζεται το GrACILe₂ σε υψηλά επίπεδα). Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση των ιών, οι οποίοι φέρουν την αντίστοιχη κασέτα, και το υπόλοιπο τμήμα που δέχτηκαν από τον Tet-pLKO-puro, που όπως αποδείχθηκε παραπάνω, είχε λάβει επιτυχώς το ένθεμα (δηλαδή την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο shRNA έναντι του GrACILe₂). Αφού έγινε η μόλυνση των κυττάρων με αυτόν τον ιό, και επιλέχθηκαν οι κλώνοι στους οποίους έγινε το RNA extraction, τα δείγματα προχώρησαν μέχρι και το στάδιο της qPCR.

Σε αυτή, έγινε η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης του TetR, για να πιστοποιηθεί τόσο η απόδοση μετασηματισμού, όσο η ικανότητα έκφρασης του γονιδίου μέσα στα καρκινικά κύτταρα. Υπενθυμίζεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του TetR είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ανθεκτικότητας σε πουρομυκίνη (και άρα με την επιτυχία του μετασηματισμού), καθώς η μετάφραση αυτών των δυο γονιδίων γίνεται από το ίδιο χιμαιρικό μετάγραφο χάρη στη παρουσία της περιοχής IRES, που προηγείται του γονιδίου ανθεκτικότητας. Στο διάγραμμα που προκύπτει (**Εικόνα 4.13**), παρατηρούνται κανονικοποιημένες οι τιμές έκφρασης του TetR, ως εύρος απόκλισης (fold change) έναντι του αρνητικού μάρτυρα για:

- το δείγμα χωρίς χορήγηση του ιού, το οποίο αποτελεί και τον αρνητικό μάρτυρα της διαδικασίας, καθώς αναμένουμε να μην υπάρχει καθόλου έκφραση του TetR σε αυτά τα κύτταρα, εξαιτίας της απουσίας του από το γονιδίωμα τους (ορίστηκε ως τιμή “1”), και
- τα δείγματα των 10 κλώνων που επιλέχθηκαν σε μια πρώτη πειραματική δοκιμή με σκοπό την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου γενετικού μετασηματισμού με λεντιούς Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω χρονικών περιορισμών η συγκεκριμένη δοκιμή περιορίστηκε στην αξιολόγηση του εύρους επιτυχούς μετασηματισμού, χωρίς να πραγματοποιηθεί δοκιμή για την επαγωγή της έκφρασης shRNAs έναντι του GrACILe₂, η οποία βρίσκεται σε εξέλιξη κατά την συγγραφή της πτυχιακής.

Με βάση το διάγραμμα φαίνεται ότι όντως δεν παρατηρείται κάποια έκφραση στον αρνητικό μάρτυρα (όπως ήταν και αναμενόμενο), αλλά σε όλα τα δείγματα των κλώνων παρατηρούνται πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης του TetR, με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του να φτάνει επίπεδα άνω των 10.000 φορές.

Συνεπώς, το πείραμα της γενετικής τροποποίησης στέφθηκε με επιτυχία, κλειδώνοντας παράλληλα και τις συνθήκες της γενετικής τροποποίησης επιτρέποντας έτσι την εκπόνηση πειραμάτων μελέτης του φαινοτύπου καταστολής της έκφρασης του GrACILe₂.



Εικόνα 4.13 Έκφραση του TetR στα δείγματα των κλώνων των ΜΚΝ₄₅ θετικών ως προς την γενετική τροποποίηση, και στη συνθήκη του αρνητικού μάρτυρα.

5. Συμπεράσματα και συζήτηση

Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος σαν ασθένεια αποτελεί μια από τις μάστιγες της ανθρωπότητας στον τομέα της υγείας. Πιο συγκεκριμένα, ο καρκίνος του στομάχου, αποτελεί ένα παράδειγμα καρκίνου που και έχει πολύ υψηλά ποσοστά εμφάνισης, σε συνδυασμό με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (2^η θέση στην Ασία και 3^η παγκοσμίως) (Jaffer A. Ajani, 2017). Από τα βασικότερα προβλήματα που υπάρχουν με την διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του στομάχου, είναι ότι δεν υπάρχουν επαρκή διαγνωστικά εργαλεία, που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγκυρη διάγνωση του, ενώ παράλληλα οι θεραπείες που εφαρμόζονται δεν είναι εξειδικευμένες ως προς τη στόχευση των καρκινικών κυττάρων ανά ασθενή. Η καθυστερημένη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου, οδηγεί σε ανίχνευση του σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας, στο οποίο συνήθως ήδη έχουν αρχίσει να εμφανίζονται λεμφικές διηθήσεις ή και μεταστάσεις σε απομακρυσμένους ιστούς καθιστώντας ουσιαστικά αδύνατη την αντιμετώπιση της νόσου (Diego M. Marzese, 2015; Victor Pasechnikov, 2014; Shafqat Ali Khan, 2015). Επίσης, ως προς τις χορηγούμενες θεραπείες, δεν υπάρχει κάποια ουσία που να δίνει μια θεραπευτική λύση για την πλειονότητα του πληθυσμού που πάσχει από τον καρκίνο του στομάχου. Πολύ συχνά μάλιστα, ως θεραπευτική προσέγγιση επιλέγεται η χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση του όγκου, χωρίς όμως να έχει κάποιο ουσιαστικό αποτέλεσμα, καθώς συχνά παρατηρείται επανεμφάνιση των καρκινικών εστιών, είτε στον ίδιο ιστό, είτε από τις μεταστατικές θέσεις που έχουν αναπτυχθεί λόγω καθυστερημένης διάγνωσης (Roberto Santoro, 2014). Επομένως, δημιουργείται η ανάγκη για εύρεση νέων στόχων για τη πρώιμη διάγνωση, ή ακόμα και θεραπεία του καρκίνου.

Μια ομάδα γονιδίων η οποία δεν έχει αξιοποιηθεί στο πλήρες δυναμικό της σε αυτόν τον τομέα, είναι τα γονίδια που μεταγράφουν lncRNAs. Τα lncRNAs αποτελούν μια ομάδα μη κωδικοποιητικών μεταγράφων με μια πληθώρα ρόλων, σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα, που έχουν σχέση με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τη λειτουργία μορίων τελεστών σηματοδοτικών μονοπατιών (Huarte, 2015). Ακόμα όμως ένα στοιχείο των lncRNAs που τα καθιστά ιδανικό αντικείμενο μελέτης στον καρκίνο, είναι το ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης τους. Δηλαδή, υπάρχουν lncRNAs που εκφράζονται φυσιολογικά είτε σε μεμονωμένους ιστούς, είτε εκφράζονται αποκλειστικά κατά την εμβρυική ανάπτυξη και απουσιάζουν από ενήλικους ιστούς, σε αντίθεση με την πληθώρα των κωδικοποιητικών μεταγράφων που συχνά παρουσιάζουν εκτεταμένη έκφραση σε ενήλικους ιστούς (Chunjie Jiang, 2016). lncRNAs που δεν εκφράζονται σε κανέναν φυσιολογικό ιστό στο ενήλικο άτομο αλλά υπερεκφράζονται σε παθολογικούς ιστούς αποτελούν ιδανικά εργαλεία για τη διάγνωση και πιθανή θεραπεία του ασθενή, εφόσον αυτά συνδεθούν με κάποιον φαινότυπο.

Στα παραπάνω πλαίσια πραγματοποιείται στο εργαστήριο μια συστηματική ανίχνευση και χαρακτηρισμός των lncRNA που να εμφανίζουν εξειδικευμένη έκφραση στον καρκίνο του στομάχου, στα πλαίσια της οποίας εντάσσεται και η παρούσα διατριβή. Για να βρεθεί ένα τέτοιο υποψήφιο lncRNA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταγραφομικής, από την οποία επιλέχθηκε το lncRNA GrACILe2. Το GrACILe2 φαίνεται ότι είναι ένα lncRNA που παρουσιάζει αύξηση των επιπέδων έκφρασης του σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, και μάλιστα αυτή η αύξηση των επιπέδων του συνδέεται στατιστικώς σημαντικά με μείωση του προσδόκιμου ζωής του ασθενή. Ελέγχοντας τα επίπεδα έκφρασης του σε 370 ασθενείς, και σε 40 δείγματα από φυσιολογικούς ιστούς, αποδείχθηκε η παρουσία αυξημένων

επιπέδων έκφρασης του στη πλειονότητα των ασθενών. Η σποραδική έκφραση που παρατηρείται σε τέσσερις φυσιολογικές βιοψίες μπορεί να οφείλεται είτε σε φυσιολογική γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των ατόμων, είτε σε επιμόλυνση από τον παρακείμενο καρκινικό ιστό κατά την δειγματοληψία. Ακόμα, από μετέπειτα ανάλυση που έγινε, φαίνεται ότι το GrACILe2 δεν εκφράζεται σε κανέναν φυσιολογικό ιστό ενήλικου ατόμου. Συνεπώς, μπορεί να ειπωθεί ότι στους ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του στομάχου το μετάγραφο του GrACILe2, παράγεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα κυρίως αν όχι αποκλειστικά από τα καρκινικά κύτταρα. Επιπροσθέτως, στα πλαίσια της βιοπληροφορικής ανάλυσης, φάνηκε ότι ο γονιδιωματικός τόπος του GrACILe2 διατηρείται ακέραιος και στον ποντικό, χωρίς να ανιχνεύεται έκφραση κάποιου μεταγράφου lncRNA σε φυσιολογικούς ιστούς του ενήλικου ποντικού. Αυτό το γεγονός φυσιολογικό, καθώς η εξελικτική πίεση στα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα είναι μικρότερη από ότι στα κωδικοποιητικά μετάγραφα, άρα μπορούν να εισάγονται πιο εύκολα μεταλλάξεις σε επίπεδο αλληλουχίας. Αυτή η παρατήρηση, λοιπόν, μπορεί να ερμηνευτεί είτε ως : i) απουσία κάποιου ορθόλογου GrACILe2 στον ποντικό, συμπέρασμα που συμφωνεί με την αυξημένη είδο-ειδικότητα των lncRNA, είτε ως ii) απουσία έκφρασης του. (Cinta Pegueroles, 2016)

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ένας αναλυτικός χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων του μεταγράφου του GrACILe2, που αποσκοπούσε σε ταυτοποίηση των καρκινικών κυτταρικών σειρών στις οποίες εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα. Από αυτή την ανάλυση προέκυψε ότι το GrACILe2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα μόνο στην κυτταρική σειρά MKN45 από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές που βρίσκονται στη διάθεση μας, η οποία προέρχεται από δείγμα πρωτογενούς καρκίνου του στομάχου. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της κλινικής συσχέτισης (δεν παρουσιάζονται) αλλά και την καθολική έκφραση του μεταγράφου στην συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών ανεξαρτήτως σταδίου, ηλικίας, εθνικότητας και φύλου (**Εικ. 4.2**), ενισχύει την αξιοποίηση του GrACILe2 ως ενός νέου δείκτη για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμα στάδια, αλλά και για την παρακολούθηση της πορείας εξέλιξης και πιθανής επανεμφάνισης της νόσου έπειτα από συστηματική θεραπεία.

Ως προς τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του μεταγράφου, αποδείχθηκε ότι το GrACILe2 αποτελεί ένα μετάγραφο με χρόνο ημιζωής ενδιάμεσο των 2 και 4 ωρών, ενώ ακόμα βρίσκεται σε στενή αλληλεπίδραση με την χρωματίνη. Ενδιαφέρον έχει και το γεγονός ότι στις 2 πρώτες ώρες, το μετάγραφο του GrACILe2 παρουσιάζεται σχετικά σταθερό, και μετά στις 4 ώρες, περισσότερο από το 50% του αριθμού των μεταγράφων στο κύτταρο έχει χαθεί. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τον μέσο όρο της μεταγραφικής σταθερότητας τόσο των mRNA όσο και των lncRNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Hidenori Tani, 2012). Μια πιθανή ερμηνεία αυτής της παρατήρησης μπορεί να είναι το ότι το μετάγραφο του GrACILe2 μπορεί να είναι μέλος ενός ασταθούς ριβοπρωτεϊνικού συμπλόκου, άρα και να μην είναι αρχικά εκτεθειμένο σε RNases, ωστόσο αυτό το σύμπλοκο να διασπάται (έστω μερικώς) μετά το πέρας των δύο ωρών, και για αυτό να παρατηρείται η ταχεία αποικοδόμηση του μέχρι το χρονικό σημείο των τεσσάρων ωρών. Επίσης, η παρουσία του μεταγράφου του GrACILe2 σε στενή αλληλεπίδραση με τη χρωματίνη, απομακρύνει το ενδεχόμενο στόχευσης του από miRNA που θα μπορούσε να εξηγήσει την ταχεία αποικοδόμηση ενώ αποτελεί ταυτόχρονα και μια αρχική ένδειξη του

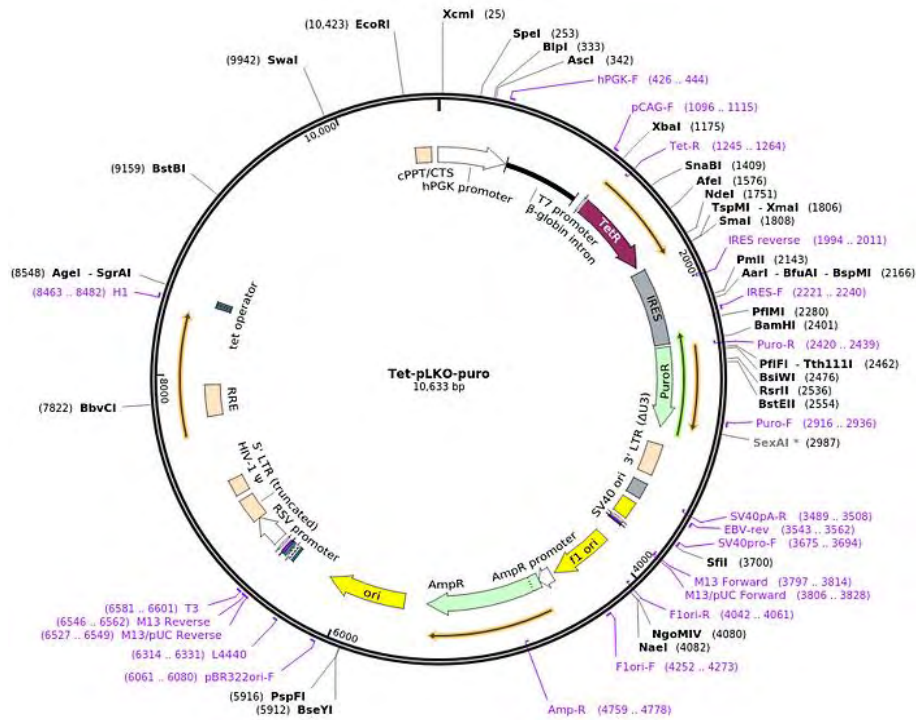
ρόλου του, είτε ως ένα lncRNA που να αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες, ή τροποποιητές της χρωματίνης, ή ακόμα υποβοηθώντας την αλληλεπίδραση απομακρυσμένων περιοχών της χρωματίνης, ή στη ρύθμιση του ματίσματος. Μάλιστα, φαίνεται ότι το GrACILe2 παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο στην υποκυτταρική κλασμάτωση με το MALAT1, το μεταγράφο του οποίου είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά στενά με τη χρωματίνη, ενισχύοντας και την παραπάνω υπόθεση (Bahar Halpern, 2015).

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του συγκεκριμένου lncRNA κλωνοποιήθηκε η συνολική αλληλουχία του μεταγράφου στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η κλωνοποίηση και των δύο προσανατολισμών του μεταγράφου του GrACILe2 στον φορέα, ως προς τον T7 υποκινητή. Αυτό το εργαλείο μπορεί να αξιοποιηθεί μελλοντικά σε ένα πρώτο υπολογισμό του αριθμού των μεταγράφων GrACILe2 ανά καρκινικό κύτταρο, αποτέλεσμα που με την σειρά του θα φανερώσει περαιτέρω τον τρόπο λειτουργίας του.

Το πιο καθοριστικό σημείο όμως για τη μελέτη του GrACILe2, είναι η πειραματική συσχέτιση του με έναν φαινότυπο. Για να γίνει αυτό, ο πιο συνηθισμένος τρόπος είναι μέσω καταστολής της έκφρασης του. Για τον σκοπό αυτό στην παρούσα διατριβή έγινε χρήση του φορέα Tet-pLKO-puro, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επαγόμενη υπερέκφραση shRNA. Στη προκειμένη περίπτωση, τα shRNAs που κλωνοποιήθηκαν είτε στοχεύουν το GFP, είτε δεν στοχεύουν το ανθρώπινο γονιδίωμα (Scrambled shRNA) και θα αξιοποιηθούν ως μάρτυρες ελέγχου των σειρών που θα υπερεκφράζουν το shRNA έναντι του GrACILe2. Η γενετική τροποποίηση στέφθηκε με επιτυχία, όπως αυτό αποδεικνύεται από την δραματική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TetR στους κλώνους των γενετικώς τροποποιημένων κυττάρων των MKN45, με το shRNA έναντι του GrACILe2. Αυτό σημαίνει, ότι αυτή τη στιγμή βρίσκεται στη διάθεση μας και η βελτιστοποιημένη μεθοδολογία γενετικής τροποποίησης για να προχωρήσουμε στην δημιουργία διαγονιδιακών σειρών επαγόμενης καταστολής (πείραμα σε εξέλιξη) με απώτερο στόχο φαινοτυπικό χαρακτηρισμό του GrACILe2 έπειτα από επαγόμενη καταστολή.

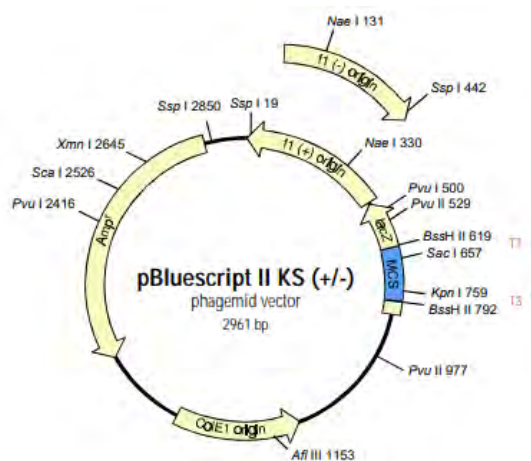
6. Παράρτημα

6.1 Πλασμιδιακός χάρτης του Tet-pLKO-puro

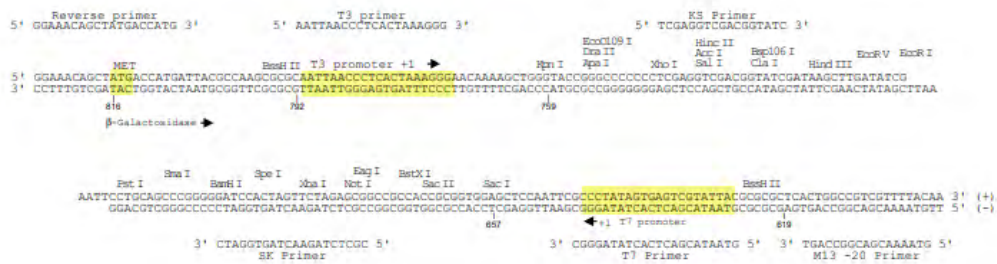


Εικόνα 6.1 Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα Tet-pLKO-puro. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που αξιοποιούνται για την πέψη του φορέα και την εισαγωγή των ολιγονουκλεοτιδίων που θα μεταγραφούν στα εκάστοτε shRNAs είναι η AgeI και η EcoRI. Το τμήμα που θα μεταφερθεί στους ιούς ορίζεται από τα 5' και 3' LTRs, και περιέχει την κασέτα έκφρασης του shRNA, και μια κασέτα παράλληλης έκφρασης του TetR και του γονιδίου ανθεκτικότητας σε πουρομυκίνη.

6.2 Πλασμιδιακός χάρτης του pBluescript



Εικόνα 6.2 Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pBluescript



Εικόνα 6.3 Ο πολυσυνδέτης του φορέα pBluescript. Για να είναι εφικτή η ένθεση του full-length μεταγράφου του GrACILe2, έγινε πέψη του φορέα με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV.

6.3 Παραγωγή των λεντιών

Πρώτο βήμα στη διαδικασία της γενετικής τροποποίησης είναι ο σχηματισμός των λεντιών. Προκειμένου να σχηματιστούν οι λεντιοί, χρειάζονται:

- Οι θετικοί φορείς Tet-pLKO-puro ως προς την λήψη του εκάστοτε ενθέματος
- 2 επιπρόσθετα πλασμίδια που φέρουν τις πληροφορίες για σύνθεση του καψιδίου του ιού και για την εκτομή του τμήματος του Tet-pLKO-puro στις LTRs, και την εισαγωγή του στο ικό καψίδιο. Τα στοιχεία αυτά βρίσκονται σε ξεχωριστά πλασμίδια, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται αυξημένη βιοασφάλεια κατά τον σχηματισμό των ιών,
- Κύτταρα από την κυτταρική σειρά HEK, η οποία θεωρείται μια κυτταρική σειρά εύκολη στον μετασχηματισμό με λιποσφαιρίδια, αλλά και γενικά εύκολη στον χειρισμό με γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης τους. Παράλληλα είναι ικανή για παραγωγή υψηλών τίτλων του ιού.

Οι ιοί που θα προκύψουν εν τέλει θα φέρουν τα στοιχεία του Tet-pLKO-puro που βρίσκονται ανάμεσα στις περιοχές LTR του πλασμιδίου. Αυτά τα στοιχεία είναι η κασέτα έκφρασης του shRNA, και η κασέτα που επιτρέπει την παράλληλη έκφραση του TetR (θα αξιοποιηθεί σε πείραμα ελεγχόμενης έκφρασης του shRNA σε μετέπειτα στάδιο), και του γονιδίου ανθεκτικότητας σε πουργομυκίνη (γονίδιο επιλογής θετικών κλώνων)

Εν τέλει, αφού γίνει επιτυχώς ο μετασχηματισμός των κυττάρων HEK με τα 3 πλασμίδια (2 πακεταρίσματα και τον Tet-pLKO-puro), ακολουθεί λήψη του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας, το οποίο θα φέρει τον ικό τίτλο.

7. Βιβλιογραφία

Encyclopedia Britannica.

- Abdel-Rahman N. Zekri, I. A.-D. (2016). Circulating Serum miRNAs as Diagnostic Markers for Colorectal Cancer. *PLoS One*.
- Abril Marcela Herrera-Solorio, I. L.-L.-S.-M. (2017). Histone code and long non-coding RNAs (lncRNAs) aberrations in lung cancer: implications in the therapy response. *Clin Epigenetics*.
- Ali HEA, I. E.-D.-W. (2019, Jan 15). Circulating miR-26a, miR-106b, miR-107 and miR-133b stratify hepatocellular carcinoma patients according to their response to transarterial chemoembolization. *Clin Biochem*.
- Amy Bradshaw, I. A. (2016). Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg*.
- Ana C Tahira, M. S.-C.-A. (2011). Long noncoding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer. *Molecular Cancer*.
- Archimandritis, G. V. (2005, July 7). Role of Helicobacter pylori eradication in aspirin or non-steroidal anti-inflammatory drug users. *World J Gastroenterol.*, σσ. 3811-3816.
- Beiqin Yu, I. D. (2017, April 18). GLI1-mediated regulation of side population is responsible for drug resistance in gastric cancer. *Oncotarget.* , σσ. 27412-27427.
- Bernard W. Stewart, C. P. (2014). *World Cancer report*.
- Bijan K. Dey, K. P. (2014, Mar 1). The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev.*, σσ. 491-501.
- Bo Hwa Sohn, I. J.-E.-J.-S.-J.-W.-H. (2017). Clinical significance of four molecular subtypes of gastric cancer identified by The Cancer Genome Atlas project. *Clin Cancer Res*.
- Boku, N. (2014). HER2-positive gastric cancer. *Gastric Cancer.*, σσ. 1-12.
- Bumsoo Han, I. C. (2017). Recapitulation of complex transport and action of drugs at tumor microenvironment using tumor-microenvironment-on-chip. *Cancer Lett*.
- Butian Li, S. Z. (2017). MicroRNA-144-3p suppresses gastric cancer progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Caiyun He, I. H. (2015). SNP interactions of Helicobacter pylori-related host genes PGC, PTPN11, IL1B, and TLR4 in susceptibility to gastric carcinogenesis. *Oncotarget*, σσ. 19017-19026.
- Cancer-Research-UK.
- Carlos Sostres, C. J. (2014, July 28). Interaction between Helicobacter pylori infection, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and/or low-dose aspirin use: Old question new insights. *World J Gastroenterol.*, σσ. 9439-9450.
- Chan TH, I. Q. (2016, Oct). ADAR-Mediated RNA Editing Predicts Progression and Prognosis of Gastric Cancer. *Gastroenterology.* , σσ. 637-650.

- Changhwan Yoon, P. S.-J. (2016). Chemotherapy resistance in diffuse type gastric adenocarcinoma is mediated by RhoA activation in cancer stem-like cells. *Clin Cancer Res.*, σσ. 971–983.
- Changwon Kang, J.-J. S. (2014, June 7). Epigenetics: An emerging player in gastric cancer. *World J Gastroenterol.*, σσ. 6433–6447.
- Chiurillo, M. A. (2015, May 20). Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in depth literature review. *World Journal of Experimental Medicine*, σσ. 84–102.
- Chunjie Jiang, #. Y. (2016, February 9). Identifying and functionally characterizing tissue-specific and ubiquitously expressed human lncRNAs. *Oncotarget.*, σσ. 7120–7133.
- Damon S. perez, T. R.-S. (2008). Long, abundantly expressed non-coding transcripts are altered in cancer. *human Molecular Genetics*, σσ. 642–655.
- Dan Li, Y. C. (2018, April 16). Ets-1 promoter-associated noncoding RNA regulates the NONO/ERG/ Ets-1 axis to drive gastric cancer progression. *Oncogene*.
- Dan-dan Wang, #. 1.-b.-p.-g.-j.-z.-q.-j.-x.-l.-c. (2012). Decreased Expression of the ARID1A Gene Is Associated with Poor Prognosis in Primary Gastric Cancer. *PLoS One*.
- Daniel Dominguez, 1. 2.-H. (2016, March 25). An extensive program of periodic alternative splicing linked to cell cycle progression. *eLife*.
- Daniela Cornelia Lazăr, M. F. (2018, Aug 28). Prognostic significance of tumor immune microenvironment and immunotherapy: Novel insights and future perspectives in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, σσ. 3583–3616.
- Daniela Cornelia Lazăr, S. T. (2016, Aug 14). New advances in targeted gastric cancer treatment. *World J Gastroenterol.*, σσ. 6776–6799.
- Daniele V.F. Tauriello, E. B. (2016, September). Targeting the microenvironment in advanced colorectal cancer. *Cell Press*.
- Debina Sarkar, 1. E.-A. (2015). Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. *Epigenetics*, σσ. 103–121.
- DF Quail, J. J. (2013, November 14). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, σσ. 1423–1437.
- Diego M. Marzese, D. S. (2015, May). Emerging technologies for studying DNA methylation for the molecular diagnosis of cancer. *Expert Rev Mol Diagn.*, σσ. 647–664.
- Eduardo M. Reis, S. V.-A. (2012, March 8). Perspectives of long non-coding RNAs in cancer diagnostics. *Frontiers in Genetics*.
- Eichhorn, J. L. (2018). Deciphering the roles of lncRNAs in breast development and disease. *Oncotarget*, σσ. 20179–20212.
- Elena Niccolai, A. T. (2015, May 21). Gastric cancer and the epoch of immunotherapy approaches. *World J Gastroenterol.*, σσ. 5778–5793.
- Eleni Anastasiadou, *. L. (2018). Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer.*, σσ. 5–18.

- El-Omar, M. H. (2014, August 19). Genetics of gastric cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, σσ. 664–674.
- Er-bao Zhang, R. K.-d.-h.-p.-s. (2014, April 30). Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a. *Oncotarget*, σσ. 2276–2292.
- Er-bao Zhang, *. R.-d.-h.-p.-s. (2014, April 16). Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a. *Oncotarget*, σσ. 2276–2292.
- Esquela-Kerscher A, 1. S. (2006, April). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.*, σσ. 259–69.
- Esteller. (2011, Nov 18). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.*, σσ. 861–74.
- Ewan A. Gibb, E. A.-S. (2011, October 3). Human Cancer Long Non-Coding RNA Transcriptomes. *PLoS One*.
- Felipe C. Beckedorff, *. M.-P.-A. (2013, July 22). Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics. *Biosci Rep*.
- Fox, J. G. (2007, January 2). Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *The journal of clinical investigation*, σσ. 60–69.
- Francesca Fornari, 1. M. (2015). Circulating microRNAs, miR-939, miR-595, miR-519d and miR-494, Identify Cirrhotic Patients with HCC. *PLoS One*.
- Francesca Pirini, #. S.-A.-T. (2017, Jun 13). Early detection of gastric cancer using global, genome-wide and IRF4, ELMO1, CLIP4 and MSC DNA methylation in endoscopic biopsies. *Oncotarget.*, σσ. 38501–38516.
- FU, D.-G. (2015). Epigenetic alterations in gastric cancer (Review). *Mol Med Rep*, σσ. 3223–3230.
- Gammon, E. (2013). *Συγχρονη γενική χημεία*. Αθήνα: Εκδοτικός οίκος ΤΡΑΥΛΟΣ.
- Gao Liu, *. T.-F.-X. (2016). Long Noncoding RNA H19-Derived miR-675 Enhances Proliferation and Invasion via RUNX1 in Gastric Cancer Cells. *Oncology Research*, σσ. 99–107.
- Gayatri Arun, S. D. (2018). Therapeutic targeting of long non coding RNAs in cancer. *Cell Press/Trends in molecular medicine*.
- George E. Ronson, 1. A. (2018). PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nature Communications*.
- Gianpiero Di Leva, 1. M. (2014;). microRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.*, σσ. 287–314.
- Gibb EA, B. C. (2011, April 13). The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*.
- Goto K, 1. I. (2016, Jul 7). The transcribed-ultraconserved regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and microRNA-associated regulation. *Oncogene.*, σσ. 3598–606.
- Gracjan Michlewski, 1. a. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*, σσ. 1–16.

- Grieken, N. C. (2003, May). Increased apoptosis in gastric mucosa adjacent to intestinal metaplasia. *Journal of Clinical Pathology*, σσ. 358-361.
- Hansford S, K. P.-C.-L. (2015). Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol.* , σσ. 23-32.
- Hao Li, B. Y. (2014, April 18). Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer. *Oncotarget*, σσ. 2318-2329.
- Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. (χ.χ.).
- Hirata E, S. E. (2017, July 5). Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Hirota Y, Yoshioka, Y. Y. (2017, Jun 9). The Roles of Long Non-Protein-Coding RNAs in Osteo-Adipogenic Lineage Commitment. *Int J Mol Sci.* .
- Hirotsugu Endo, I. . (2013, Oct 10). Enhanced Expression of Long Non-Coding RNA HOTAIR Is Associated with the Development of Gastric Cancer. *PLoS One*.
- Hu W, I. Z. (2017). Diagnostic accuracy of DNA methylation in detection of gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, σσ. 113142-113152.
- Huarte, M. (2015). The emerging roles of lncRNAs in cancer. *Nature Medicine*, σσ. 1253-1261.
- Hua-Si Wu, W.-c. L.-W. (2014). Advances in molecular biomarkers for gastric cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.
- Hui Guo • Lianmei Zhao, Z. •. (2018, March 25). GALNT5 uaRNA promotes gastric cancer progression through its interaction with HSP90. *Oncogene/ Springer Nature*.
- Huiquan Jing, P. F. (2014, Oct). Association of Genetic Variants in and Promoter Hypermethylation of CDH1 With Gastric Cancer. *Medicine (Baltimore)*.
- Hyeong Su Kim, I. J. (2016). Chemotherapy in Elderly Patients with Gastric Cancer. *J Cancer.*, σσ. 88-94.
- Hyuna Sung, I. N. (2017). Association of high-evidence gastric cancer susceptibility loci and somatic gene expression levels with survival. *Carcinogenesis.*, σσ. 1119-1128.
- Ismael Riquelme, #. K. (2015, Sep 22). Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget.*, σσ. 24750-24779.
- J Yu, M. E. (2000, May). α -Catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives. *Gut.* , σσ. 639-644.
- Jaffer A. Ajani, J. L. (2017, June 1). Gastric adenocarcinoma. *NATURE REVIEWS | DISEASE PRIMERS*.
- James E. Audia, R. M. (2016, April). Histone modifications and cancer. *Cold spring harbor perspectives in biology*.
- Jeffrey J. Quinn, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature reviews genetics*, σσ. 47-62.

- Jenny Cook, T. H. (2013). Tumour-associated macrophages and cancer. *Current opinion in pharmacology*, σσ. 1-7.
- Jiajia Yuan, I. Y. (2016). Risk prediction for early-onset gastric carcinoma: a case-control study of polygenic gastric cancer in Han Chinese with hereditary background. *Oncotarget*, σσ. 33608-33615.
- Jijun Yan, *. W. (2018, Dec 21). A negative feedback loop between long noncoding RNA NBAT1 and Sox9 inhibits the malignant progression of gastric cancer cells. *Biosci Rep*.
- Jing Shi, Y.-P. Q. (2014, Oct 14). Pathogenic mechanisms in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, σσ. 13804-13819.
- Jing Zhao, P. D. (2018 , March 12). LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/ VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene/ Springer Nature* .
- Jing Zhao, Y. L. (2015, Aug 03). Long non-coding RNA Linc00152 is involved in cell cycle arrest, apoptosis, epithelial to mesenchymal transition, cell migration and invasion in gastric cancer. *Cell Cycle* .
- Jing Zhao, Y. L. (2015, August 3). Long non-coding RNA Linc00152 is involved in cell cycle arrest, apoptosis, epithelial to mesenchymal transition, cell migration and invasion in gastric cancer. *Cell Cycle*, σσ. 3112-3123.
- Jingpu Zhang, I. Y. (2015). Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as Two Novel Potential Biomarkers to Indicate Progression of Gastric Cancer. *Theranostics*., σσ. 733-745.
- Joan Massague, A. C. (2016, Jan 21). Metastatic colonization. *Nature*, σσ. 298-306.
- João Lobo, I. D.-S. (2018, Nov). The Emerging Role of Epitranscriptomics in Cancer: Focus on Urological Tumors. *Genes (Basel)*.
- John R. Prensner, A. M. (2011). The Emergence of lncRNAs in Cancer Biology. *Cancer Discovery*, σσ. 391-407.
- Jorge Ruiz-Orera, X. M. (2014, Sep 16). Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *eLife*.
- Juan Cui, I. Y.-C. (2015). Comprehensive characterization of the genomic alterations in human gastric cancer. *Int J Cancer*., σσ. 86-95.
- Juan Li, I. Z. (2018, Feb 20). Long non-coding RNA HOTAIR polymorphism and susceptibility to cancer: an updated meta-analysis. *Environ Health Prev Med*.
- Jun Haeng Lee, J. G.-K.-H.-I.-Y. (2014, June). Clinical Practice Guidelines for Gastric Cancer in Korea: An Evidence-Based Approach. *J Gastric Cancer*, σσ. 87-104.
- K S Choi, J. K.-Y.-C. (2015, february 3). Effect of endoscopy screening on stage at gastric cancer diagnosis: results of the National Cancer Screening Programme in Korea. *British Journal of Cancer* , σσ. 608-612.
- K.V. Morris, J. M. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nat Rev Genet.* , σσ. 423-437.
- Kang, H. C. (2013, Oct). Beyond the GIST: Mesechymal tumors of the Stomach. *Radiographics*, σσ. 1673-1690.

- Kasey C. VICKERS, *. K.-A. (2014). microRNAs in the onset and development of cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*.
- Kazumichi Yoshida, I. H. (2015). CD47 is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Med.*, σσ. 1322-1333.
- Keren L Witkin, I. S.-C. (2017). RNA editing, epitranscriptomics, and processing in cancer progression. *Cancer Biol Ther.*, σσ. 21-27.
- Kim YD¹, Y. D. (2014, Jul 14). Risk of gastric cancer is associated with PRKAA1 gene polymorphisms in Koreans. *World J Gastroenterology*, σσ. 8592-8.
- Kim, H. Y. (2015, Jan). Diagnosis and Management of High Risk Group for Gastric Cancer. *Gut Liver*, σσ. 5-17.
- Kurtis D. Davies, R. C. (2013). Molecular Pathways - ROS1 Fusion Proteins in Cancer. *Clin Cancer Res.*, σσ. 4040-4045.
- Lanlan Hui, Y. C. (2015). Tumor microenvironment: sanctuary of the devil. *Cancer Letters*, σσ. 7-13.
- Lee H, I. S. (2017). MicroRNA-296-5p Promotes Invasiveness through Downregulation of Nerve Growth Factor Receptor and Caspase-8. *Mol Cells.*, σσ. 254-261.
- Lee SK, H. J. (2018, May). Interaction of the Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways involving co-stabilization of both β -catenin and RAS plays important roles in the colorectal tumorigenesis. *Adv Biol Regul.*, σσ. 6-54.
- Li K, C. J. (2018, May). Diagnostic staging laparoscopy in gastric cancer treatment: A cost-effectiveness analysis. *J Surg Oncol.*, σσ. 1288-1296.
- Liduan Zheng, I. W. (2016). miRNA-558 promotes gastric cancer progression through attenuating Smad4-mediated repression of heparanase expression. *Cell Death Dis.*
- Lin Y¹, Y. J. (2015, Nov 3). Correlation between SNPs in CDH1 and gastric cancer in Chinese population. *Open Med (Wars)*, σσ. 57-62.
- Lina Ma, I. A. (2015, Jan 28). LncRNAWiki: harnessing community knowledge in collaborative curation of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.*
- Lina Ma, V. B. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol.*, σσ. 924-933.
- Lin-Yong Zhao, #. C.-C.-Y.-L.-H.-Z.-G.-X.-P.-G.-K. (2016, Aug 9). Superiority of lymph node ratio-based staging system for prognostic prediction in 2575 patients with gastric cancer: validation analysis in a large single center. *Oncotarget*, σσ. 51069-51081.
- Liu C, B. B. (2005, January 1). NONCODE: an integrated knowledge database of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.*, σσ. D112-5.
- Liu, T. Q. (2014, March 5). MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer. *FEBS Press*.

- Li-Xin Qiu, #. L.-R.-Y.-J.-H.-Y.-N.-J.-C.-D.-Y. (2016, Feb 23). PSCA polymorphisms and gastric cancer susceptibility in an eastern Chinese population. *Oncotarget*, σσ. 9420–9428.
- Lu Gan, #. M. (2018). The polycomb group protein EZH2 induces epithelial–mesenchymal transition and pluripotent phenotype of gastric cancer cells by binding to PTEN promoter. *J Hematol Oncol*.
- Lucas Faria Abrahao-Machado, C. S.-N. (2016, May 21). HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol.* , σσ. 4619–4625.
- Luo D, G. Y. (2011, Nov). Genetic variation in PLCE1 is associated with gastric cancer survival in a Chinese population. *J Gastroenterol.* , σσ. 1260-6.
- Lu-Qin Wang, 1. P.-H.-R.-L.-H.-S.-H. (2018, Nov). miR-372 and miR-373 enhance the stemness of colorectal cancer cells by repressing differentiation signaling pathways. *Mol Oncol.* , σσ. 1949–1964.
- Ly P. Vu, 1. B. (2017). The N6-methyladenosine (m6A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal and leukemia cells. *Nat Med.* , σσ. 1369–1376.
- Lydia Dyck, K. H. (2017, April 9). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European Journal of Immunology*, σσ. 765-779.
- M. Joaquina Delás, G. J. (2017, July 26). lncRNAs in development and disease: from functions to mechanisms. *Open Biol.* .
- Ma C, 1. Z. (2016). miR-101 inhibits glioma cell invasion via the downregulation of COX-2. *Oncol Lett.* , σσ. 2538-2544.
- Maeda M, M. H. (2017). Mechanisms for the induction of gastric cancer by Helicobacter pylori infection: aberrant DNA methylation pathway. *Gastric Cancer*, σσ. 8-15.
- Magdalena Chmiela, Z. K. (2017, 03 7). Host pathogen interactions in Helicobacter pylori related gastric cancer. *World J Gastroenterol*, σσ. 1521–1540.
- Magdalena Losko, J. K. (2016, Nov 2). Long Noncoding RNAs in Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm*.
- Maite Huarte, M. G.-B. (2010, August 6). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, σσ. 409-419.
- Manuel Amieva, M. P. (2016). Pathobiology of Helicobacter pylori-induced Gastric Cancer. *Gastroenterology.*, σσ. 64–78.
- Manuela Lanzafame, 1. G. (2018). The Role of Long Non-Coding RNAs in Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* .
- Marcel E. Dinger, P. P. (2009, September 21). Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications. *Briefings in Functional Genomics*, σσ. 407–423.
- Margherita Ratti, 1. A. (2018, September 1). Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci.*, σσ. 4151–4162.

- Mark S. McClain, I. A. (2017, Oct 9). Helicobacter pylori Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins (Basel)*.
- Massimo Negrini, M. S. (2009). MicroRNAs and cancer-new paradigms in molecular oncology. *Current opinion in cell biology*, σσ. 470-479.
- Mercurio, A. M. (2019, January 23). VEGF/neuropilin Signaling in Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Miao Sun, W. L. (2015). From Discovery to Function: The Expanding Roles of Long NonCoding RNAs in Physiology and Disease. *Endocr Rev.*, σσ. 25-64.
- Mihaela Chivu-Economescu, L. M. (2018, May 14). New therapeutic options opened by the molecular classification of gastric cancer. *World J Gastroenterol.*, σσ. 1942-1961.
- Mihailidou C, K. M. (2017, Nov). Co-targeting c-Met and DNA double-strand breaks (DSBs): Therapeutic strategies in BRCA-mutated gastric carcinomas. *Biochimie.*, σσ. 135-143.
- Min Zhao, I. L. (2016, June 7). GCGene: a gene resource for gastric cancer with literature evidence. *Oncotarget.*, σσ. 33983-33993.
- Ming Sun, #. F.-y.-h.-p.-w.-b.-h. (2014, May 6). Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer*.
- Mohini Singh, N. Y. (2017). EMT: mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacology and therapeutics*.
- Morales-Sanchez A, F.-P. E. (2017). Epstein-Barr Virus-associated Gastric Cancer and Potential Mechanisms of Oncogenesis. *Curr Cancer Drug Targets.*, σσ. 534-554.
- Moridikia A, I. M. (2018). MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol.*, σσ. 901-913.
- Mulong Du, W. W. (2015, September 4). The association analysis of lncRNA HOTAIR genetic variants and gastric cancer risk in a Chinese population. *Oncotarget*, σσ. 31255-31262.
- Myoung-Hee Kang, I. G.-Y. (2017, Nov 17). Verteporfin inhibits gastric cancer cell growth by suppressing adhesion molecule FAT1. *Oncotarget.*, σσ. 98887-98897.
- Nan Hu, *. Z.-T. (2016). Genome-wide association study of gastric adenocarcinoma in Asia: A comparison of associations between cardia and noncardia tumors. *Gut.*, σσ. 1611-1618.
- Network, T. C. (2014, September 11). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature vol. 513*, σσ. 202-209.
- Neugut, K. D. (2006, Jan 21). Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, σσ. 354-362.
- Niantao Deng, I. L.-Y.-K. (2012). A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*, σσ. 673-684.
- Nisha Padmanabhan, T. U. (2017). How to stomach an epigenetic insult: the gastric cancer epigenome. *NATURE REVIEWS | GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY*.

- Nonthaphat Kent Wong, C.-L. H. (2018, Nov 22). Long non-coding RNAs in hematological malignancies: translating basic techniques into diagnostic and therapeutic strategies. *J Hematol Oncol*.
- Okugawa Y, I. T. (2018, Dec 18). Enhanced AZIN1 RNA editing and overexpression of its regulatory enzyme ADAR1 are important prognostic biomarkers in gastric cancer. *J Transl Med*.
- Oliveira C, P. H. (2015, Feb 16). Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol*.
- Parisa Karimi, I. F. (2014, May). Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, σσ. 700-713.
- Pei-Fei Li, S.-C. C.-M.-F.-X.-M. (2014, May 14). Non-coding RNAs and gastric cancer. *World J Gastroenterol*, σσ. 5411-5419.
- Peng W, F. J. (2016, February). Long noncoding RNA LUNAR1 associates with cell proliferation and predicts a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Biomed Pharmacother*, σσ. 65-71.
- Petrovchich I, F. J. (2016). Genetic predisposition to gastric cancer. *Semin Oncol*, σσ. 554-559.
- Petty, A. E. (2009). miRNAs and cancer. *Cancer Biology and Therapy*, σσ. 2317-2322.
- Polom K, I. M. (2018, Feb). Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg*, σσ. 159-167.
- R Spizzo, M. A. (2012). long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene*, σσ. 1-11.
- Rajnish A. Gupta, I. N.-C. (2010, April 15). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, σσ. 1071-1076.
- Rau CS, I. Y. (2014, Aug 1). Lipopolysaccharide-induced microRNA-146a targets CARD10 and regulates angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicol Sci*, σσ. 15-26.
- Riccardo Spizzo, D. R. (2009). RNA Inhibition, MicroRNAs and New Therapeutic Agents for Cancer Treatment. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, σσ. 313-318.
- Roadmap Epigenomics Consortium, K. A.-M. (2015, February 19). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, σσ. 317-30.
- Robert J. Coffey, I. M. (2007, January 2). Ménétrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach. *J Clin Invest*, σσ. 70-80.
- Robert I. Nussbaum, R. R. (2011). *Ιατρική Γενετική*. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης/Broken Hill publishers.
- Robert Sitarz, I. M. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res*, σσ. 239-248.

- Roberto Santoro, G. M. (2014, October 14). Subtotal gastrectomy for gastric cancer. *World J Gastroenterol.*, σσ. 13667–13680.
- Röcken. (2017, Mar). Molecular classification of gastric cancer. *Expert Rev Mol Diagn.*, σσ. 293–301.
- Röcken Christoph, S. S. (2017, May). Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology. *Neoplasia*, σσ. 412–420.
- Roopma Wadhwa, S. S.-S. (2013, September 24). Gastric cancer—molecular and clinical dimensions. *NATURE REVIEWS | CLINICAL ONCOLOGY*.
- Roshan Fatima, V. S. (2015, Jun 12). Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther.*
- Russell. (2006). *iGenetics*.
- Sandra L Romero-Cordoba, I. S.-G.-D.-M. (2014). miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther.*, σσ. 1444–1455.
- Sang Cheul Oh, #. B.-H.-B.-L.-Y.-S.-J.-C.-S.-J. (2018). Clinical and genomic landscape of gastric cancer with a mesenchymal phenotype. *Nat Commun.*
- Schneider BG, 1. M.-R. (2015). DNA Methylation Predicts Progression of Human Gastric Lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, σσ. 1607–13.
- Settleman, A. S. (2010, Aug 26). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, σσ. 4741–4751.
- Seung-Jin Hong, #. E.-J.-H.-J.-W.-G. (2010). The gene-reduction effect of chromosomal losses detected in gastric cancers. *BMC Gastroenterol.*
- Shafqat Ali Khan, D. R. (2015, Nov 26). Global histone post-translational modifications and cancer: Biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment? *World J Biol Chem.*, σσ. 333–345.
- Shamshul Ansari, 1. B. (2018, Aug). Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity. *Int J Mol Sci.*
- Shan-Shan Xie, J. J.-H. (2016, Jan 21). Emerging roles of non-coding RNAs in gastric cancer: Pathogenesis and clinical implications. *World J Gastroenterol.*, σσ. 1213–1223.
- Sheetal A. Mitra, A. P. (2012). A central role for long non-coding RNA in cancer. *frontiers in genetics*.
- Shen, Y.-J. C.-M.-D.-W.-T.-Z. (2016). MicroRNA-18a modulates P53 expression by targeting IRF2 in gastric cancer patients. *Gastroenterology*, σσ. 155–163.
- Sherwood, L. (2013). *Εισαγωγή στην Φυσιολογία του ανθρώπου*. Brooks/Cole.
- Shounan Lu, Z. S. (2019, January 31). Altered expression of long non-coding RNA GAS5 in digestive tumors. *Bioscience Reports*.
- Shyam Singh, H. C. (2017). Status of Epstein-Barr Virus Coinfection with Helicobacter pylori in Gastric Cancer. *J Oncol.*

- Siu Tsan Yuen, S. Y. (2016). Genomics study of gastric cancer and its molecular subtypes. *Advances in experimental medicine and biology*.
- Slack, J. (2014). *Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης*. Ακαδημαϊκές εκδόσεις/Wiley-Blackwell.
- Souvik Ghatak, I. P. (2017). Novel APC gene mutations associated with protein alteration in diffuse type gastric cancer. *BMC Med Genet*.
- Strand MS, L. A. (2017, Apr). Genetics of Gastric Cancer. *Surg Clin North Am.* , σσ. 345-370.
- Sun, M. (2014). Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *BMC cancer*.
- Tao J, D. N. (2011, April 6). CD44-SLC1A2 gene fusions in gastric cancer. *Sci Transl Med*.
- Tetsuya Tsukamoto, I. M. (2017). Prevention of Gastric Cancer: Eradication of Helicobacter pylori and Beyond. *Int J Mol Sci*.
- Tianwen Li, X. M. (2016 , February 23). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer. *Oncotarget*, σσ. 8601-8612.
- Tomomitsu Tahara, T. A. (2015). DNA methylation as a molecular biomarker in gastric cancer. *Epigenomics*, σσ. 475-486.
- Tong-Peng Xu, Y.-F. W.-L.-Y.-M.-D.-B.-W.-Q. (2017, June 1). E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death and Disease*.
- T-p Xu, X.-x. L.-m.-d.-q. (2015, January 16). SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer . *Oncogene*, σσ. 1-14 .
- Tropp, B. (2014). *Βασικές αρχές Μοριακής Βιολογίας*.
- Tsukamoto M, I. H. (2017). Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. *Oncology.* , σσ. 360-370.
- Victor Pasechnikov, S. C. (2014, Oct 14). Gastric cancer: Prevention, screening and early diagnosis. *World J Gastroenterol.* , σσ. 13842-13862.
- Vinod Vijay Subhash, I. M. (2015). Strategies and Advancements in Harnessing the Immune System for Gastric Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res*.
- Wang F, M. W. (2014). Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.*, σσ. 196-202.
- Wang H, I. D. (2017, Jan). Concurrent Hypermethylation of SFRP2 and DKK2 Activates the Wnt/ β -Catenin Pathway and Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Mol Cells.*, σσ. 45-53.
- Wang J, I. L. (2017). MicroRNA-195 inhibits human gastric cancer by directly targeting basic fibroblast growth factor. *Clin Transl Oncol.* , σσ. 1320-1328.

- Wang S, C. L. (2013). Effect of TP53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms on survival of gastric cancer among patients who receiving 5-fluorouracil-based postoperative adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.*, σσ. 1073-82.
- Wei Kang, A. S. (2016, Jan 21). Emerging role of Hippo pathway in gastric and other gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol.*, σσ. 1279-1288.
- WEI-YING CHEN, *-C. C.-D.-S. (2013). Factors That Affect Life Expectancy of Patients With Gastric Adenocarcinoma. *CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, σσ. 1595-1600.
- Wesley P. Francis, M. D. (2007). Prophylactic Laparoscopic-Assisted Total Gastrectomy for Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *JSLs.*, σσ. 142-147.
- Whalen, K. (2015). *Φαρμακολογία*. Επιστημονικές εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- Williams, M. R. (2015, September). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. *Genes* , σσ. 484-499.
- (χ.χ.). *World Health Organization*.
- Xia Ma, D. c.-o. (2018). NANOGP8 is the key regulator of stemness, EMT, Wnt pathway, chemoresistance, and other malignant phenotypes in gastric cancer cells. *PLoS One*.
- Xiang-hua Liu, #. M.-q.-b.-b.-d.-h.-h.-m.-x. (2014, April 28). Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. *Mol Cancer*.
- Xiaolei Li, Z. W. (2013). A MicroRNA Component of the Neoplastic Microenvironment: Microregulators with Far-Reaching Impact. *Biomed Res Int*.
- Xiaoxing Huang, #. R. (2017). Uncovering the roles of long non-coding RNAs in cancer stem cells. *J Hematol Oncol*.
- Xin Chen, Z. C. (2018, Februar 1). Long noncoding RNA LINC01234 functions as a competing endogenous RNA to regulate CBFβ expression by sponging miR-204-5p in gastric cancer. *American Association for Cancer Research*.
- Xin-Zu Chen, M. H.-K. (2015). Epstein-Barr Virus Infection and Gastric Cancer. *Medicine (Baltimore)*.
- Xu XD, 1. H. (2013). Abnormal expression of miR-301a in gastric cancer associated with progression and poor prognosis. *J Surg Oncol.* , σσ. 197-202.
- Yan J, Z. Y. (2017, August 18). Long Noncoding RNA H19/miR-675 Axis Promotes Gastric Cancer via FADD/Caspase 8/Caspase 3 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*, σσ. 2364-2376.
- Yang B, 1. H. (2016). miR-335 directly, while miR-34a indirectly modulate survivin expression and regulate growth, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells. *Tumour Biol.* , σσ. 1771-9.
- Yanjing Song, 1. Y. (2017, April 11). A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. *Br J Cancer.*, σσ. 973-989.

- YanJun Qu, #. H. (2016, May 31). MiR-17-5p regulates cell proliferation and migration by targeting transforming growth factor- β receptor 2 in gastric cancer. *Oncotarget*, σσ. 33286–33296.
- Yasuto Araki, 1. ., (2017). The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*.
- Ying Chen, *. G. (2017, July 10). Down regulation of lincRNA-p21 contributes to gastric cancer development through Hippo-independent activation of YAP. *Oncotarget*, σσ. 63813-63824 .
- Yoon Young Choi, #. J.-I.-H. (2016). A Lymph Node Staging System for Gastric Cancer: A Hybrid Type Based on Topographic and Numeric Systems. *PLoS One*.
- You WC, H. J. (2005, Feb 14). Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTT1, GSTP1, GSTM1, ALDH2, and ODC and the risk of advanced precancerous gastric lesions in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, σσ. 451-8.
- Yu Zhao, H. S. (2016). Long noncoding RNAs in DNA methylation: new players stepping into the old game. *Cell Biosci.* .
- Yutong Sun, 1. ., (2014). α -catenin A tumor suppressor beyond adherens junctions. *Cell cycle*, σσ. 2334–2339.
- Zhang X, 1. B. (2014). Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with response to fluorouracil-based chemotherapy in Chinese patients with gastric cancer. *Chin Med J (Engl)*, σσ. 3562-7.
- Zhao T1, 2. G. (2015). Polymorphism in one-carbon metabolism pathway affects survival of gastric cancer patients: Large and comprehensive study. *Oncotarget*, σσ. 9564-76.
- Zhen Wang, 1. ., (2018). lncRNAs Regulate Innate Immune Responses and Their Roles in Macrophage Polarization. *Mediators Inflamm*.
- Zhenzi Peng, C. Z. (2016). Functions and mechanisms of long noncoding RNAs in lung cancer. *Onco Targets Ther.*, σσ. 4411–4424.
- Zhou H, 1. X. (2012 , Mar). MiR-421 is a functional marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Biomarkers.* , σσ. 104-10.
- Zhuo Cao, J. S. (2014). Association between Polymorphisms in XRCC1 Gene and Treatment Outcomes of Patients with Advanced Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*.
- Zixuan Peng, 1. C. (2018, Feb 19). New insights into long noncoding RNAs and their roles in glioma. *Mol Cancer.* .
- Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ. (2011). *Βιολογία*. Βόλος: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Ζίφα Α. (2017). *Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος*.

8.Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γιακουντή, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να αποτελώ ένα μέλος του εργαστηρίου του, και υπό την καθοδήγηση του κατάφερα να αναπτυχθώ σαν άνθρωπος και σαν επιστήμονας. Η όρεξη του για δουλειά, η στάση του σε όλες της πτυχές της ζωής στο εργαστήριο και στη σχολή γενικότερα, αποτελούν έμπνευση για την συνέχεια της επαγγελματικής μου καριέρας, και τον ευχαριστώ που αποτελεί ένα τέτοιο πρότυπο για εμένα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ματθιόπουλο, ο οποίος συντέλεσε στην επιλογή μου σε αυτό το εργαστήριο, αλλά και βρισκόταν εκεί να με καθοδηγήσει όποτε χρειαζόταν, και για την τιμή που μου έκανε με το να είναι ένα από τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Μπαλατσό, για την τιμή που μου προσφέρει το να είναι μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, αλλά και γιατί με τις συμβουλές του στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας, αλλά και κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, συντέλεσε στο να αναπτυχθώ σαν επιστήμονας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής με τα οποία και συνεργάστηκα, για την ομαλή συνεργασία, την συμπαράσταση, και όλες τις ωραίες στιγμές που περάσαμε.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, και όλους αυτούς που με στήριξαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, προκειμένου να φτάσω σε αυτό το σημείο που βρίσκομαι τώρα...