



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Μελέτη των σημειακών πολυμορφισμών
του lncRNA RECUR1 στον καρκίνο»

«Investigating single nucleotide polymorphisms
of lncRNA RECUR1 in cancer»

Ηλίας-Θεόδωρος Κούλαλης

Ilias-Theodoros Koulalis

Πτυχιακή εργασία για την απόκτηση τίτλου σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Επιβλέπων καθηγητής:
Γιακουντής Αντώνιος

Λάρισα, Αύγουστος 2020

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής:

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Συνεπιβλέποντες καθηγητές:

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Χαχάμη Γεωργία, Επίκουρη καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Ο καρκίνος.....	7
1.2 Ο καρκίνος του στομάχου.....	7
1.2.1 Κατηγορίες γαστρικού καρκίνου βάσει ανατομίας.....	9
1.2.2 Ιστολογική ταξινόμηση υποτύπων γαστρικού καρκίνου.....	10
1.2.3 Μοριακή ταξινόμηση υποτύπων γαστρικού καρκίνου.....	11
1.3 Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNP).....	16
1.3.1 Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στον καρκίνο του στομάχου.....	17
1.4 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (lncRNA).....	20
1.4.1 Ταξινόμηση lncRNA ανάλογα με τον εντοπισμό στο γονιδίωμα.....	21
1.4.2 Ταξινόμηση lncRNA ανάλογα με το μηχανισμό δράσης.....	24
1.4.3 Ταξινόμηση lncRNA ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό.....	25
1.4.4 Τα lncRNA στον καρκίνο.....	26
2. Ερευνητική υπόθεση & σκοπός	29
3. Υλικά & μέθοδοι	31
3.1 Υλικά.....	32
3.1.1 Κυτταρικές σειρές.....	32
3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς.....	32
3.1.3 Βακτηριακά στελέχη.....	33
3.1.4 Ένζυμα και αντιδραστήρια.....	33
3.1.5 Kit απομόνωσης/καθαρισμού DNA.....	34
3.1.6 Συσκευές και εργαλεία.....	35
3.2 Μέθοδοι.....	35
3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	35
3.2.2 Χαρακτηρισμός του μεταγράφου RECUR1 και μελέτη των επιπέδων έκφρασης του.....	36
3.2.3 Κλωνοποίηση ενθέματος DNA και διαμόλυνση κυτταρικών σειρών.....	40
3.2.4 Γονοτύπηση κυτταρικών σειρών με τη μέθοδο derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS).....	44
4. Αποτελέσματα	48
4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	49
4.2 Μελέτη έκφρασης σε κυτταρικές σειρές.....	55
4.3 Γονοτύπηση με dCAPS.....	57
4.4 Καταστολή έκφρασης RECUR1 με shRNA.....	58
5. Συζήτηση	60
Βιβλιογραφία	65

Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ο 5^{ος} κατά συχνότητα εμφάνιση καρκίνος, εμφανίζοντας συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή, ενώ κατέχει την 3^η θέση σε ό,τι αφορά τη θνησιμότητα. Αποτελεί σημαντικό υγειονομικό και δημοσιονομικό πρόβλημα για τις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης, Ανατολικής Ασίας και Νοτίου Αμερικής, οι οποίες είναι εκείνες που πλήττονται κατά κύριο λόγο. Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας απορρέουν ως επί το πλείστον από τη δυσκολία στην πρόληψη και την έλλειψη επαρκών διαγνωστικών εργαλείων και εξειδικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες μοριακής ταξινόμησης της ασθένειας σε υποτύπους βάσει του γενετικού υποβάθρου των ασθενών, κάτι που ενδέχεται να αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμο για την πρόγνωση και την εξατομικευμένη θεραπεία, καθώς και για την εκτίμηση της γενετικής προδιάθεσης στη νόσο. Με την έλευση νέων και φθηνότερων τεχνολογιών αλληλούχησης DNA, η ανάλυση του γενετικού προφίλ στην κλινική πράξη μπορεί να επεκταθεί και στον τομέα της πρόληψης και διάγνωσης, μέσω της ταυτοποίησης και του χαρακτηρισμού πολυμορφισμών που προδιαθέτουν την εμφάνιση και πρόοδο της νόσου. Η πολυπληθέστερη ομάδα τέτοιων γενετικών δεικτών σε ένα καρκινικό γονιδίωμα είναι οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου, η πλειοψηφία των οποίων απαντά σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος. Αυτές οι γονιδιωματικές περιοχές μπορεί να αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία ή σημεία μεταγραφής μη κωδικοποιητικών μορίων RNA. Μια κατηγορία τέτοιων μεταγράφων είναι τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA ή lncRNA, των οποίων ο ρόλος στην καρκινογένεση και την εξέλιξη της νόσου είναι κομβικός. Τα lncRNA έχουν ποικίλους και πολύπλοκους τρόπους λειτουργίας και εμφανίζουν εξειδικευμένη έκφραση σε ό,τι αφορά τον ιστό, χαρακτηριστικά τα οποία τα καθιστούν χρήσιμους μοριακούς δείκτες και θεραπευτικούς στόχους. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία με βιοπληροφορικές και πειραματικές μεθόδους χαρακτηρίστηκε ένα μη μελετημένο μη κωδικοποιητικό μετάγραφο, το RECUR1, και διερευνήθηκε ένας σημειακός πολυμορφισμός που εδρεύει στον γενετικό τόπο αυτού. Το συγκεκριμένο μετάγραφο βάσει μη δημοσιευμένων δεδομένων, εμφανίζει καρκινοειδική έκφραση στο αδενοκαρκίνωμα στομάχου, η οποία φαίνεται να επηρεάζεται από τον γονότυπο όσον αφορά έναν συγκεκριμένο σημειακό πολυμορφισμό. Τα βιοπληροφορικά και πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται επιβεβαιώνουν την καρκινοειδική έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA, ενισχύουν την υπόθεση εξάρτησής του από τον υπό μελέτη σημειακό πολυμορφισμό, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις για ιστοειδικότητα της έκφρασής του.

Abstract

Gastric cancer ranks 5th in terms of incidence worldwide compared to other types of cancer, while showing a marked geographical bias in its distribution. Intriguingly, it holds the 3rd place in terms of mortality. Gastric cancer has become a major public health and fiscal concern, especially for Eastern European, East Asian and South American countries, which are those predominantly affected. Its high mortality rate can, for the most part, be attributed to difficulties in prevention and screening, lack of adequate diagnostic tools and to non-specific therapeutic strategies. To that end, there have recently been attempts to classify gastric cancer into distinct molecular subtypes based on patients' genetic background; an approach which could prove useful in prognosis and personalized treatment, as well as in determining the genetic susceptibility to the disease. The emergence of new and affordable DNA sequencing technologies could broaden the clinical use of genetic profiling, through the identification and characterization of polymorphisms which increase predisposition to gastric cancer, thus adding them to the preventive and diagnostic toolbox. The most numerous of such genetic markers in a cancer genome are single nucleotide polymorphisms, the majority of which are found in non-protein coding regions of the human genome. These non-coding genomic loci are often regulatory elements or the transcriptional sites of non-coding RNAs. A broad and diverse category of such transcripts are long non-coding RNAs or lncRNAs, which play a pivotal role in the emergence and progression of cancer. These transcripts have varied and complex mechanisms of action and are expressed in a tissue-specific manner, characteristics which taken together render them ideal biomarker and therapeutic target candidates. In this thesis, an uncharacterized long non-coding transcript, RECUR1, along with a single nucleotide polymorphism in its locus, were examined with bioinformatic and experimental approaches. Based on unpublished data, the transcript at issue has been shown to have cancer-specific expression in gastric adenocarcinoma, which is apparently affected by the genotype as it pertains to a specific single nucleotide polymorphism. The results presented herein confirm this transcript's cancer-specific expression and seem to support the hypothesis of its dependence on the aforementioned polymorphism, while also indicating a degree of tissue specificity in its expression.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελείται από ένα σύνολο σχεδόν 100 διακριτών παθολογιών με κοινή συνιστώσα τον ακατάσχετο πολλαπλασιασμό κυττάρων. Η διαδικασία της καρκινογένεσης ακολουθεί όμοια πρότυπα, ανεξαρτήτως του τύπου καρκίνου (Stratton, Campbell, & Futreal, 2009). Πρόκειται για μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται γονιδιακές μεταλλάξεις, πολλές από τις οποίες είναι «οδηγοί» της πορείας της ογκογένεσης. (David E. Malarkey, Mark Hoenerhoff, & Maronpot, 2013). Όλοι οι τύποι καρκίνου χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα ορόσημα (Hanahan & Weinberg, 2011):

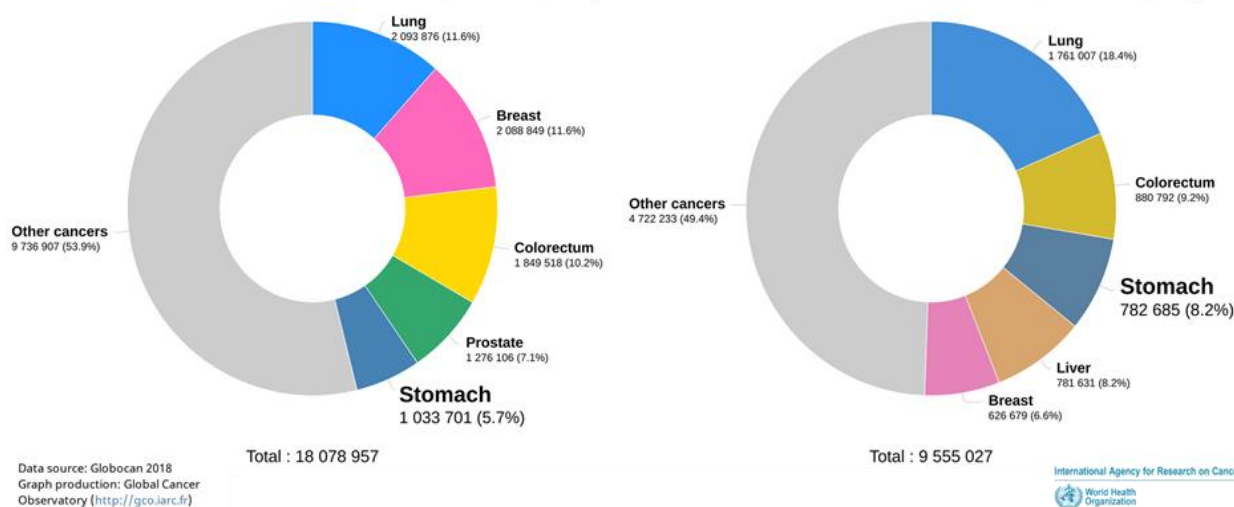
1. διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης,
2. αποφυγή καταστολών της κυτταρικής αύξησης,
3. αντίσταση στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο,
4. επαγωγή αναπαραγωγικής αθανασίας,
5. επαγωγή της νέο-αγγειογένεσης,
6. ενεργοποίηση της κυτταρικής διήθησης και της μετάστασης,
7. επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού και
8. αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης.

1.2 Ο καρκίνος του στομάχου

Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά

Ο καρκίνος του στομάχου ευθύνεται για ένα σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από χαμηλό ποσοστό επιβίωσης σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου (McLean & El-Omar, 2014). Το 2018 αποτελούσε τον πέμπτο κατά συχνότητα εμφάνισης τύπο καρκίνου παγκοσμίως, ακολουθώντας τους καρκίνους του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη (Εικόνα 1). Ωστόσο, ήταν ο τρίτος σε θνησιμότητα τύπος καρκίνου, έχοντας οδηγήσει σε 782.685 θανάτους (Ferlay J et al., 2018; Ferlay et al., 2019).

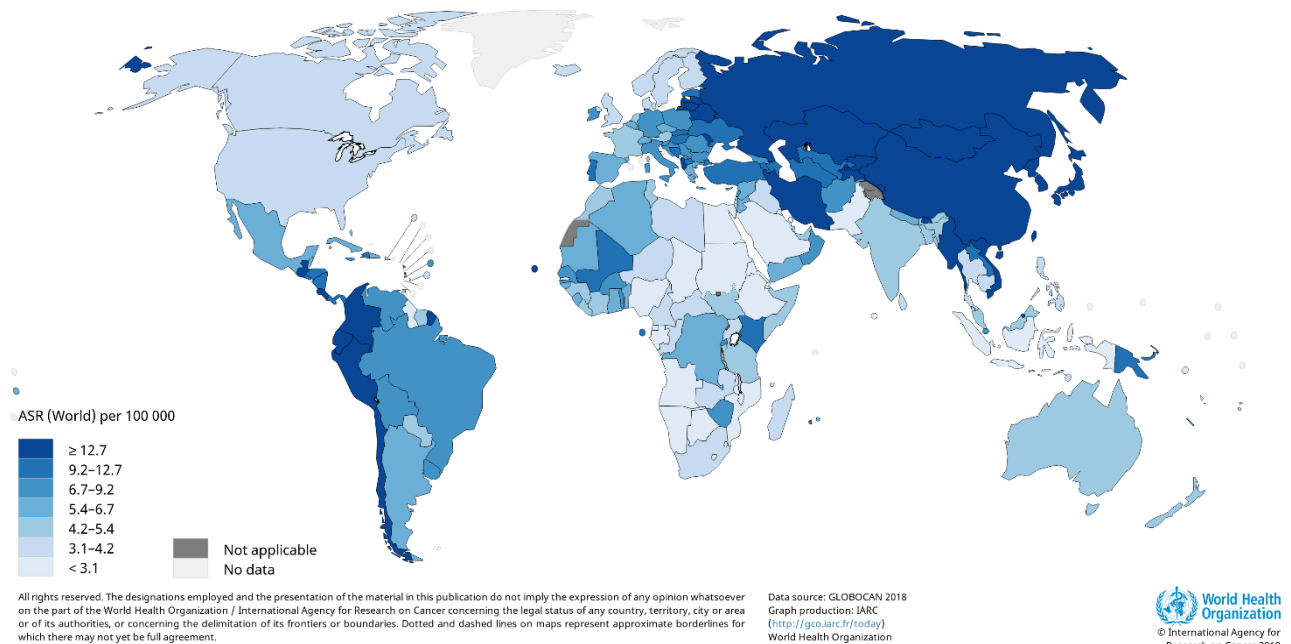
Estimated number of new cases in 2018, worldwide, both sexes, all ages Estimated number of deaths in 2018, worldwide, both sexes, all ages



Εικόνα 1.1: Συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητα ανά τύπο καρκίνου παγκοσμίως. Πηγή: GLOBOCAN 2018, Γράφημα: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) World Health Organization, © International Agency for Research on Cancer 2020.

Επιπλέον, σύμφωνα με το Διεθνές Παρατηρητήριο για την Έρευνα του Καρκίνου (GLOBOCAN) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 2018, ο καρκίνος του στομάχου εμφάνιζε ανομοιόμορφη γεωγραφική κατανομή, με εμφανώς μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην ανατολική Ασία (Εικόνα 2), όπου καταγράφηκε περίπου το 60% των νέων περιστατικών. Ακολουθούν η κεντρική Ασία και ανατολική Ευρώπη, καθώς και πολλές περιοχές της κεντρικής και νότιας Αμερικής (Ferlay et al., 2019).

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, stomach, both sexes, all ages



Εικόνα 1.2: Συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου ανά περιοχή, ανά 100.000 κατοίκους. Πηγή: GLOBOCAN 2018, Γράφημα: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 2020.

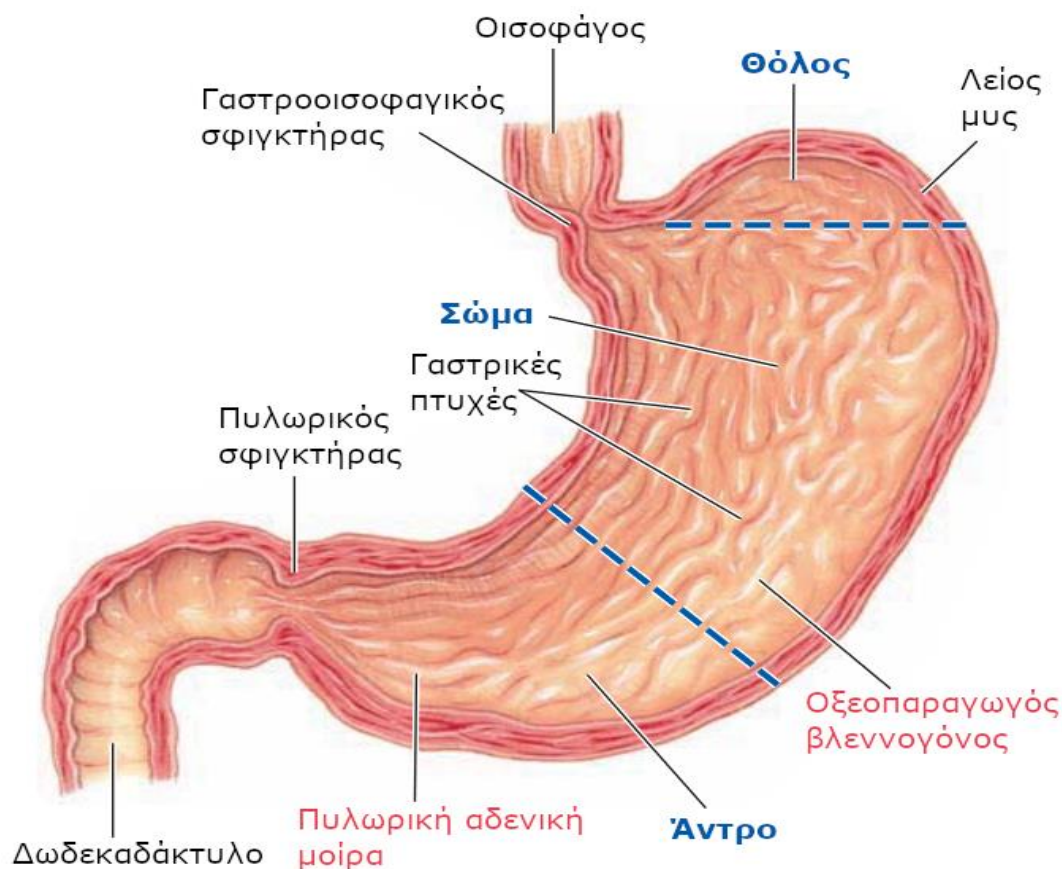
Το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης για το συγκεκριμένο καρκίνο αποτελεί μείζον πρόβλημα. Οι κύριες αιτίες για την υψηλή θνησιμότητα του γαστρικού καρκίνου είναι η καθυστερημένη διάγνωση και η ανεπαρκής απόκριση στις διαθέσιμες θεραπευτικές αγωγές. Ένας λόγος που πιθανώς να εξηγεί τα δυσμενή κλινικά αποτελέσματα είναι η υψηλή ετερογένεια της νόσου (Gullo, Carneiro, Oliveira, & Almeida, 2018). Στην Ευρώπη και τις Η.Π.Α., το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης δεν ξεπερνά το 25%. Αντιθέτως, χώρες όπως η Ιαπωνία και η Νότια Κορέα όπου εφαρμόζεται εκτεταμένος προληπτικός έλεγχος με τη χρήση φωτοφθορογραφίας και ενδοσκόπησης με λήψη βιοψιών, έχουν κατορθώσει να αυξήσουν σημαντικά το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης από τη στιγμή της διάγνωσης καρκίνου του στομάχου (Brenner, Rothenbacher, & Arndt, 2009; Pasechnikov, Chukon, Fedorov, Kikuste, & Leja, 2014). Με την έγκαιρη διάγνωση γαστρικού καρκίνου που περιορίζεται στον βλεννογόνο του στομάχου (πρώιμος γαστρικός καρκίνος), το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης μπορεί να προσεγγίσει το 95%. Επειδή, όμως, σημαντικό ποσοστό των ασθενών στα αρχικά στάδια της ασθένειας δεν εμφανίζουν συμπτώματα, η διάγνωση συχνά καθυστερεί, γεγονός που καθιστά την έγκαιρη διάγνωση επιτακτική ανάγκη (Pasechnikov et al., 2014).

Παράγοντες κινδύνου

Ο καρκίνος του στομάχου θεωρείται πως προκύπτει ως αποτέλεσμα συνδυασμού περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως το κάπνισμα και η διατροφή, του ευρύτερου γενετικού υποβάθρου και της συσσώρευσης γενικευμένων ή εξειδικευμένων γενετικών μεταλλάξεων (Milne, Carneiro, O'Morain, & Offerhaus, 2009). Η πλειονότητα των γαστρικών καρκίνων συσχετίζεται με μολυσματικούς παράγοντες, όπως είναι το βακτήριο *Helicobacter pylori* και ο ιός Epstein-Barr (EBV) (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Μάλιστα, το *H. pylori* έχει χαρακτηριστεί ως κατηγορίας 1 καρκινογόνο από τον Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1994). Συγκεκριμένα στελέχη του *H. pylori* παράγουν ογκογόνες πρωτεΐνες, όπως η CagA, και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να οδηγήσουν σε καρκίνο του στομάχου, ενώ συνύπαρξη των δύο παραπάνω μολυσματικών παραγόντων μπορεί να επιδεινώσει αυτήν την ογκογόνο επίδραση (Ajani et al., 2017).

1.2.1 Κατηγορίες γαστρικού καρκίνου βάσει ανατομίας

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη υποενότητα, ο καρκίνος του στομάχου είναι μία ασθένεια με υψηλή ετερογένεια. Συγκεκριμένα, εμφανίζονται διαφορές από άτομο σε άτομο σε ό,τι αφορά την επιθετικότητα, την ιστοπαθολογία, τα μοριακά χαρακτηριστικά της νόσου και την απόκριση στην θεραπεία. Συνεπώς, έχουν γίνει προσπάθειες ταξινόμησης της ασθένειας σε υπότυπους, για την καλύτερη προσέγγιση της πρόγνωσης και της θεραπείας (Tan et al., 2011).



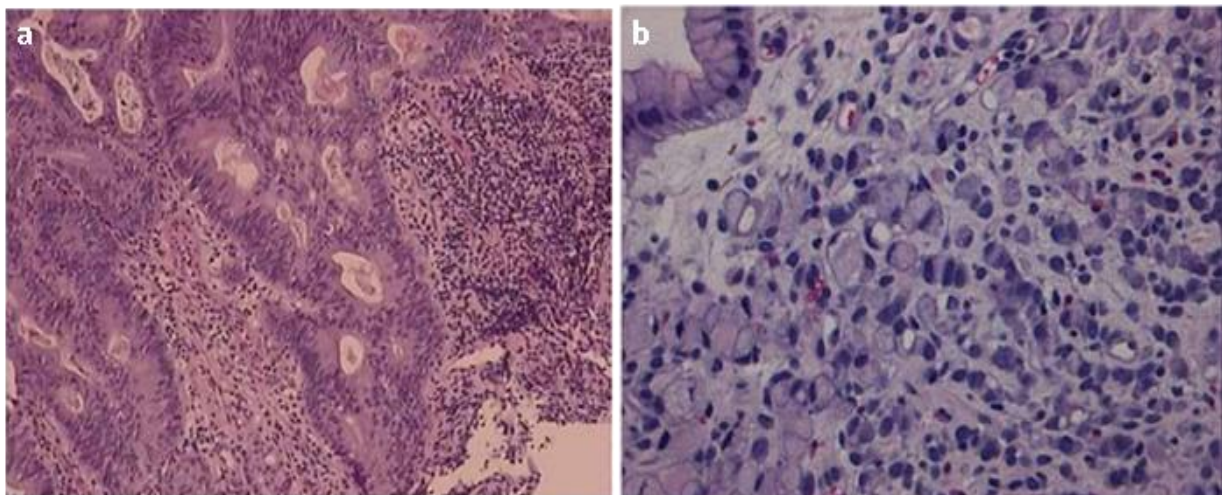
Εικόνα 1.3: Ανατομία του στομάχου. Τροποποιημένο από: «Human Physiology: From cells to systems» (Sherwood & Cengage Learning (Firm), 2013).

Ο στόμαχος μπορεί να χωριστεί αδρά σε τέσσερις ανατομικές περιοχές: την καρδία, το θόλο, το σώμα, και το άντρο (συμπεριλαμβανομένου του πυλωρού) (Εικόνα 3). Η γαστροοισοφαγική συμβολή είναι η ανατομική περιοχή, όπου ο οισοφάγος ενώνεται με τον στόμαχο και αποτελεί το σημείο έναρξης της γαστρικής καρδίας, τα απώτερα όριά της οποίας, όμως, δεν είναι επαρκώς καθορισμένα (Aaltonen, Hamilton, World Health Organization., & International Agency for Research on Cancer., 2000). Η μικροσκοπική δομή του θόλου και του σώματος είναι πανομοιότυπη, ενώ διαφέρει από αυτή της καρδίας και του άντρου (Schottenfeld & Fraumeni, 2006). Οι όγκοι του στομάχου διακρίνονται σε εγγύς γαστρικά καρκινώματα (στην περιοχή της καρδίας) και απομακρυσμένα καρκινώματα (εκτός της περιοχής της καρδίας). Οι δύο αυτές κατηγορίες γαστρικού καρκίνου εμφανίζουν διαφορετικές επιδημιολογικές τάσεις, με τάση αύξησης για τα εγγύς, και τάση μείωσης για τα απομακρυσμένα καρκινώματα. Εκτός αυτού, εμφανίζουν διαφορετική θνησιμότητα και νοσηρότητα, με τα εγγύς γαστρικά καρκινώματα να παρουσιάζουν τη χειρότερη πρόγνωση (Y. J. Kim, Chung, Cho, Kim, & Kim, 2019; Pisco, Werner, Lang, Mirena, & Klempnauer, 2000).

1.2.2 Ιστολογική ταξινόμηση υποτύπων γαστρικού καρκίνου

Ο πιο συχνός ιστολογικά τύπος γαστρικού καρκίνου είναι το αδenoκαρκίνωμα στομάχου, το οποίο προκύπτει από τη βλεννογόνο στοιβάδα, την επιφανειακότερη στοιβάδα του στομάχου. Ευθύνεται για περίπου το 95% των περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου (Ajani et al., 2017), με τα υπόλοιπα περιστατικά να αφορούν σε διαφορετικές γαστρικές στοιβάδες. Εφεξής η παρούσα εργασία θα εστιάσει περισσότερο στο γαστρικό αδenoκαρκίνωμα.

Η πιο διαδεδομένη ταξινόμηση του γαστρικού αδenoκαρκινώματος είναι αυτή που προτάθηκε το 1965 από τον Laurén, βάσει ιστολογικών κριτηρίων. Σύμφωνα με τα κριτήρια αυτά, μπορούν να περιγραφούν δύο διακριτοί ιστολογικοί τύποι: ο εντερικός (intestinal type) και ο διάχυτος (diffuse type) (Karimi, Islami, Anandasabapathy, Freedman, & Kamangar, 2014).



Εικόνα 1.4: Ιστολογικά χαρακτηριστικά δύο τύπων αδenoκαρκινώματος βάσει της ταξινόμησης κατά Laurén. a) Εντερικού τύπου, b) Διάχυτου τύπου και δεξιά δίκηνη σφραγιστήρος δακτυλίου (Hu et al., 2012).

Το εντερικού τύπου γαστρικό αδenoκαρκίνωμα οφείλει το όνομά του στη μορφολογική ομοιότητα που εμφανίζει με πρωτογενή καρκινώματα του βλεννογόνου του εντέρου. Αυτός ο τύπος καρκίνου σχηματίζει σωληνοειδείς ή θηλώδεις δομές. Διαφορετική δομή έχει ο

διάχυτος τύπος αδενοκαρκινώματος, ο οποίος ονομάστηκε έτσι λόγω του τρόπου ανάπτυξής του. Το διάχυτου τύπου αδενοκαρκίνωμα χαρακτηρίζεται από ασθενή συνοχή και αυξημένη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων, ενώ μπορεί να εμφανίσει και κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring cell). Τέλος, υπάρχουν επιπλέον μερικά αδενοκαρκινώματα που συνδυάζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά και των δύο παραπάνω κατηγοριοποιήσεων και χαρακτηρίζονται ως μεικτού τύπου (Gullo et al., 2018; Lauren, 1965).

Το εντερικού και το διάχυτου τύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους ήδη σε πρώιμα στάδια, καθώς ακολουθούν διαφορετική πορεία παθογένεσης. Όσον αφορά το εντερικού τύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα έχει περιγραφεί μια σειρά βαθμιαίων ιστολογικών και κυτταρικών αλλαγών, που δεν απαντούν στο διάχυτου τύπου αδενοκαρκίνωμα. Αυτές οι προκαρκινικές αλλοιώσεις αποτελούν μέρος του μοντέλου παθογένεσης κατά Correa, το οποίο περιγράφει την καρκινογένεση ως μια γραμμική πορεία, προτείνοντας ως κύριο παθολογικό αίτιο τη μόλυνση από στελέχη *cagA+* του *H. pylori* (Correa, 1992).



Εικόνα 1.5: Η πορεία παθογένεσης του εντερικού τύπου γαστρικού αδενοκαρκινώματος κατά Correa. Τροποποιημένο από (Correa, 1992).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.), επεκτείνοντας την ταξινόμηση κατά Laurén, προτείνει ένα σύστημα κατηγοριοποίησης που βασίζεται, επίσης, σε ιστολογικά κριτήρια. Το σύστημα ταξινόμησης του Π.Ο.Υ. περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, πέντε τύπους αδενοκαρκινώματος, χωρισμένους βάσει μορφολογικών προτύπων που παρατηρούνται και σε νεοπλασίες άλλων τμημάτων της γαστρεντερικής οδού. Οι κύριες κατηγορίες είναι: το σωληνοειδές, το θηλώδες, το βλενώδες, το ασθενώς συνεκτικό (συμπεριλαμβανομένου και του τύπου κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου) και το μεικτού τύπου αδενοκαρκίνωμα (Bosman, World Health Organization., & International Agency for Research on Cancer., 2010).

1.2.3 Μοριακή ταξινόμηση υποτύπων γαστρικού καρκίνου

Η χρησιμότητα των ιστολογικών ταξινομήσεων στην κλινική πράξη είναι περιορισμένη, επομένως απαιτείται ένα συμπληρωματικό σύστημα ταξινόμησης που να μπορεί να ομαδοποιήσει και να χαρακτηρίσει πιο στοχευμένα τους υποτύπους της νόσου (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Η έλευση νέων, προσιτών γονιδιωματικών και μεταγραφωμικών μεθόδων έχει διευκολύνει την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μοριακών διαφοροποιήσεων. Έτσι, έχουν βρεθεί «μεταλλάξεις-οδηγοί» για τον γαστρικό καρκίνο, που

βοηθούν στην ταξινόμηση των υποτύπων της νόσου βάσει μοριακών κριτηρίων (Bijlsma, Sadanandam, Tan, & Vermeulen, 2017).

Μοριακή ταξινόμηση TCGA

Ένα ευρέως διαδεδομένο σύστημα κατηγοριοποίησης βασισμένο σε μοριακά κριτήρια έχει προταθεί από την ερευνητική κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA). Το σύστημα αυτό συνίσταται από τέσσερις βασικούς υπότυπους, που προέκυψαν έπειτα από πρωτεομική, μεταγραφωμική, γονιδιωματική και επιγονιδιωματική ανάλυση 295 δειγμάτων από πρωτοπαθή αδενοκαρκινώματα στομάχου, και οι οποίοι αναλύονται παρακάτω (Cancer Genome Atlas Research, 2014).

1. Όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (EBV positive)

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) είναι ένας ευρέως διαδεδομένος γάμμα-ερπητοϊός που προκαλεί χρόνια εμμένουσα λοίμωξη των Β-λεμφοκυττάρων. Ο συγκεκριμένος ιός είναι παρών σε περίπου 1 στα 10 γαστρικά αδενοκαρκινώματα (Murphy, Pfeiffer, Camargo, & Rabkin, 2009) και έχει συσχετιστεί με την πρόκληση καρκίνου σε διάφορους τύπους κυττάρων. Παρόλο που σε άλλους τύπους κυττάρων η καρκινογονικότητα του EBV οφείλεται συχνά σε ικές ογκοπρωτεΐνες, όπως είναι η EBNA2 και η LMP1, στον καρκίνο του στομάχου, ο EBV φαίνεται να οδηγεί σε ογκογένεση μέσω διαφορετικής πορείας (Lim, Kim, Kim, & Kim, 2016). Στον στόμαχο, ο EBV μπορεί να προκαλέσει ανώμαλη μεθυλίωση του DNA στα προσβεβλημένα κύτταρα, γεγονός που οδηγεί σε μεταγραφική αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στα αρχικά στάδια της γαστρικής καρκινογένεσης (Ajani et al., 2017). Πράγματι, οι περισσότεροι θετικοί ως προς τον ιό όγκοι (EBV⁺) εμφανίζουν αυξημένα πρότυπα μεθυλίωσης νησίδων CpG (φαινότυπος μεθυλίωσης νησίδων CpG). Συγκεκριμένα, παρατηρείται καθολικά υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *CDKN2A*, που κωδικοποιεί την p16^{INK4a}, μια πρωτεΐνη-αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Επιπλέον, σύμφωνα με το TCGA, στον συγκεκριμένο υπότυπο γαστρικού καρκίνου, παρατηρείται συχνά ενίσχυση των γονιδίων *PD-L1* και *PD-L2* (Programmed death-ligands). Το γονίδιο *PD-L1*, γνωστό και ως CD274, κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία προκαλεί κλωνική ανεργία (anergy) σε Τ λεμφοκύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα της, τον PD-1, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί αντιαποπτωτικά γονίδια σε άλλα κύτταρα που την εκφράζουν. Με αυτόν τον τρόπο, καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν PD-L1 μπορούν να διαφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα (Manjili, 2018). Πέραν τούτου, σε όγκους θετικούς ως προς τον EBV παρατηρούνται μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *PIK3CA*, το οποίο μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες, όπως την αύξηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Ακόμα, σε μεγάλο αριθμό EBV⁺ όγκων, εμφανίζεται συχνά μετάλλαξη του γονιδίου *ARID1A*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης, και του αντιαποπτωτικού γονιδίου *BCOR*. Τέλος, παρατηρείται ενίσχυση και μεταλλάξεις του γονιδίου *JAK2*, το οποίο κωδικοποιεί μια τυροσινική κινάση και αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Garattini et al., 2017).

2. Όγκοι με μεγάλη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high)

Μια δεύτερη προτεινόμενη κατηγορία μοριακού υπότυπου είναι οι όγκοι με μεγάλη μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI), οι οποίοι απαρτίζουν το 22% των καρκίνων που ελέγχθηκαν από το TCGA. Οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν συσχέτιση με εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματα βάσει της ιστολογικής ταξινόμησης κατά Laurén και χαρακτηρίζονται από κακή απόκριση σε χημειοθεραπευτικά κυτταροτοξικά φάρμακα (Ratti, Lampis, Hahne, Passalacqua, & Valeri, 2018).

Οι μικροδορυφόροι είναι βραχείες και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) χαρακτηρίζεται από την αδυναμία επιδιόρθωσης μεταλλάξεων στις περιοχές των μικροδορυφόρων και είναι ένας μοριακός φαινότυπος που προκύπτει από βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων (MMR) (D. G. Kim et al., 2019).

Απώλεια λειτουργίας πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σύστημα επιδιόρθωσης MMR, όπως είναι τα προϊόντα των γονιδίων *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, και *hPMS2*, μπορεί να προκύψει με μεταλλάξεις στην κωδική τους περιοχή, μεθυλίωση του υποκινητή τους ή χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Ratti et al., 2018). Η πιο συχνά παρατηρούμενη τροποποίηση είναι η επιγενετική σίγηση του γονιδίου *hMLH1*, ως αποτέλεσμα καθολικής υπερμεθυλίωσης του γονιδιώματος. Εν προκειμένω, ο φαινότυπος μεθυλίωσης των νησίδων CpG διαφέρει από αυτόν που παρατηρείται σε EBV⁺ όγκους (Cancer Genome Atlas Research, 2014).

Οι λειτουργικές βλάβες στον μηχανισμό MMR ενδέχεται να οδηγήσουν σε συσσώρευση μεταλλάξεων σε κείρια ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, προκαλώντας έναν υπερμεταλλαγμένο φαινότυπο. Σε μια τέτοια περίπτωση οι επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές αλληλουχίες, συγκεντρώνουν μεγάλο αριθμό ελλειμάτων ή ενθέσεων. Ως εκ τούτου, η μικροδορυφορική αστάθεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης λειτουργίας του συστήματος MMR (Ratti et al., 2018).

3. Όγκοι με γονιδιωματική σταθερότητα (GS)

Οι εναπομείναντες όγκοι, δηλαδή όσοι είναι αρνητικοί σε μόλυνση από Epstein-Barr και εμφανίζουν σταθερότητα μικροδορυφόρων, μπορούν να διαχωριστούν βάσει του εύρους αποκλίσεων στον αριθμό αντιγράφων γονιδιωματικών περιοχών (SCNAs). Οι όγκοι με χαμηλό αριθμό SCNAs και χωρίς ανευπλοειδία χαρακτηρίζονται ως γονιδιωματικά σταθεροί (genomically stable, GS) και συχνά συμπίπτουν με τα διάχυτου τύπου αδενοκαρκινώματα βάσει της ιστολογικής ταξινόμησης κατά Laurén (Cancer Genome Atlas Research, 2014).

Οι όγκοι με γονιδιωματική σταθερότητα χαρακτηρίζονται από τρεις κύριες μεταλλάξεις. Η πρώτη αφορά το γονίδιο *ARID1A*, το οποίο επηρεάζεται συχνά και στον υπότυπο EBV⁺. Το γονίδιο *ARID1A* είναι μέρος του συμπλόκου SWI-SNF και ένας από τους βασικούς τροποποιητές της αρχιτεκτονικής χρωματίνης στον γαστρικό καρκίνο (Cancer Genome Atlas Research, 2014; K. Wang et al., 2011). Άλλη συχνή μετάλλαξη στο συγκεκριμένο μοριακό υπότυπο εντοπίζεται στο γονίδιο *CDH1*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης E-καδερίνη. Τέλος, παρατηρούνται μεταλλάξεις και συχνά μετατοπίσεις του γονιδίου *RHOA*, το προϊόν του οποίου, μια μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνη δέσμευση

GTP, ρυθμίζει μεταξύ άλλων την οργάνωση του κυτταροσκελετού, την κυτταρική προσκόλληση, την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο (Garattini et al., 2017). Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου *RHOA* έχουν ανιχνευθεί αποκλειστικά στον ιστολογικό υπότυπο διάχυτου τύπου, ενώ απουσιάζουν από το εντερικού τύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (Ajani et al., 2017).

4. Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN)

Ο τελευταίος μοριακός υπότυπος του συστήματος ταξινόμησης TCGA περιλαμβάνει όγκους με υψηλό αριθμό SCNAs, και ειδικότερα όγκους που εμφανίζουν ανευπλοειδία. Αφορά το 50% των ασθενών και εμφανίζει θετική συσχέτιση με τον ιστολογικό υπότυπο εντερικού τύπου. Οι συγκεκριμένοι όγκοι χαρακτηρίζονται από χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, καθώς και από μεγάλη μεταβλητότητα στον αριθμό χρωμοσωμάτων. Παρόλο που αυτός ο υπότυπος παρουσιάζει σχετικά χαμηλό ρυθμό μεταλλάξεων, έχουν βρεθεί ορισμένες κοινές μεταλλάξεις σε όγκους με χρωμοσωμική αστάθεια (Lim et al., 2016). Ειδικότερα, παρατηρούνται μεταλλάξεις στο κείριας σημασίας ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*, το οποίο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος μέσω των δράσεων του στην επιτήρηση του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση (Hanel & Moll, 2012).

Παράλληλα, συχνά εντοπίζονται μεταλλάξεις ή υπερέκφραση/ενίσχυση υποδοχέων με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης (RTKs), οι οποίοι συμμετέχουν στο μονοπάτι RTK/RAS/MAPK. Πέραν τούτου, οι γαστρικοί καρκίνοι με χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability, CIN) εμφανίζουν αύξηση του αριθμού γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι αυτά των κυκλινών E1 και D1 και της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 6 (Garattini et al., 2017).

Μοριακή ταξινόμηση ACRG

Ένα δεύτερο σύστημα μοριακής κατηγοριοποίησης προτάθηκε από την κοινοπραξία Asian Cancer Research Group (ACRG), σχεδόν ένα χρόνο μετά τη δημοσίευση του συστήματος TCGA. Με πραγματοποίηση ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) σε δεδομένα γονιδιακής έκφρασης, υπολογισμό αριθμού αντιγράφων γονιδιωματικών περιοχών και στοχευμένη αλληλούχηση γονιδίων σε 300 δείγματα καρκίνου του στομάχου, προέκυψαν οι ακόλουθες τέσσερις βασικές κατηγορίες (Cristescu et al., 2015).

1. Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI)

Η αρχική υποδιαίρεση έγινε βάσει μικροδορυφορικής σταθερότητας διαχωρίζοντας τα δείγματα σε δύο συστοιχίες, τους όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και τους όγκους με μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS). Οι πρώτοι, που αποτελούσαν περίπου το 23% των όγκων που αναλύθηκαν, συνιστούν τον πρώτο μοριακό υπότυπο καρκίνου του στομάχου (Cristescu et al., 2015). Ο συγκεκριμένος υπότυπος ομοιάζει με τον αντίστοιχο (MSI) που προσδιορίστηκε στο σύστημα του δικτύου TCGA, δηλαδή από απώλεια του *hMLH1* και εμπλουτισμό σε μεταλλάξεις ογκογονιδίων (Serra et al., 2019). Συγκεκριμένα, τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια ήταν τα *KRAS*, *PI3K-PTEN-MTOR*, *ALK* και *ARID1A* (Cristescu et al., 2015).

2. Όγκοι με επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (MSS/EMT)

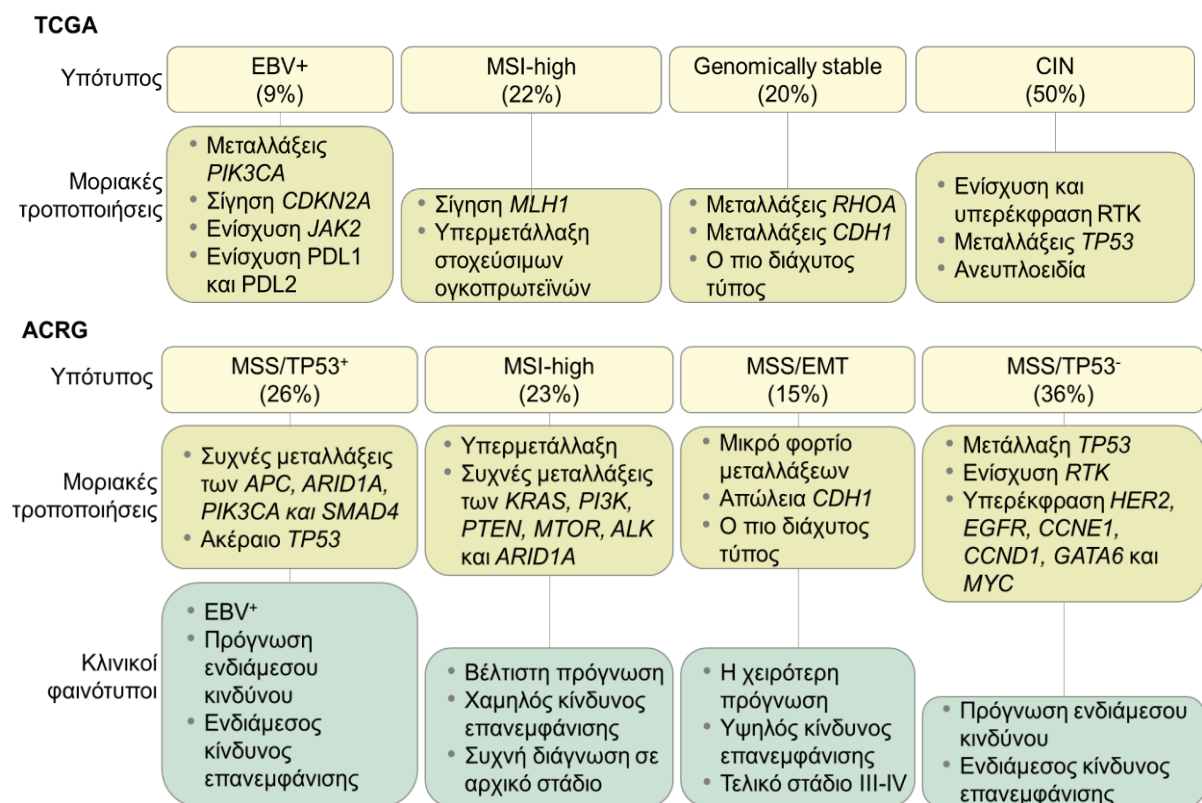
Τα δείγματα που εμφανίζουν μικροδορυφορική σταθερότητα (*microsatellite stability*, MSS) μπορούν να χωριστούν βάσει των προτύπων έκφρασης σε όγκους επιθηλιακού τύπου και όγκους με επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (*epithelial mesenchymal transition* - EMT) (Cristescu et al., 2015). Οι όγκοι MSS/EMT αντιπροσωπεύονται κυρίως από τον διάχυτο ιστολογικό υπότυπο και εμφανίζουν μεταλλάξεις σε γονίδια που ευθύνονται για την κυτταρική προσκόλληση, την αγγειογένεση και την κινητικότητα (Cristescu et al., 2015; Garattini et al., 2017).

3. Όγκοι με λειτουργικότητα TP53 (MSS/TP53⁺)

Τα εναπομείναντα δείγματα όγκων (MSS και χωρίς EMT) κατηγοριοποιήθηκαν με κριτήριο την ενεργότητα του TP53, του πιο συχνά μεταλλαγμένου γονιδίου στον γαστρικό καρκίνο, και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (MSS/TP53⁺ και MSS/TP53⁻). Σε ό,τι αφορά λοιπές μοριακές τροποποιήσεις, στον υπότυπο MSS/TP53⁺ εμφανίζονται συχνότερα μεταλλάξεις στα γονίδια APC, ARID1A, KRAS, PIK3CA και SMAD4. Επιπλέον, η μόλυνση με EBV ήταν πιο συχνή στο συγκεκριμένο υπότυπο σε σχέση με τους υπόλοιπους (Cristescu et al., 2015).

4. Όγκοι χωρίς λειτουργικότητα TP53 (MSS/TP53⁻)

Τα δείγματα όπου η ενεργότητα του TP53 ήταν χαμηλή είχαν και τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο γονίδιο TP53. Επιπλέον, τέτοιες μεταλλάξεις εμφάνιζαν υψηλό βαθμό συσχέτισης με εμφάνιση γονιδιωματικής αστάθειας, καθώς και με εστιασμένη ενίσχυση των γονιδίων ERB2 (HER), EGFR, CCND1 (p21), MDM2, GATA6 και MYC (Cristescu et al., 2015).



Πίνακας 1.1: Μοριακές ταξινομήσεις TCGA και ACRG, οι μοριακές τροποποιήσεις που παρατηρούνται και τα κλινικά αποτελέσματα. Τροποποιημένο από (Ajani et al., 2017).

Μελέτη	Αντιστοιχία μοριακών υποτύπων				
ACRG	*MSS/EMT	MSS/TP53-	**MSS/TP53+	MSI	--
TCGA	GS	CIN	--	MSI	EBV

Πίνακας 1.2: Αντιστοιχία μεταξύ των διαφορετικών μοριακών υποτύπων καρκίνου του στομάχου ανάμεσα σε διαφορετικές προτάσεις μοριακής ταξινόμησης. (*) MSS/EMT – GS: Κατά προσέγγιση, στον υπότυπο MSS/EMT δεν υπήρχαν οι χαρακτηριστικές μεταλλάξεις RHOA και CDH1 του GS, (**) Πιο συχνή μόλυνση με EBV σε αυτόν τον υπότυπο. Τροποποιημένο από (Serra et al., 2019).

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή της παρούσας υποενότητας, η μοριακή κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου μπορεί να αποτελέσει ένα εργαλείο που έχει τη δυνατότητα να συνδράμει στον τομέα της πρόγνωσης και της θεραπείας. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστούν και ορισμένοι τρέχοντες περιορισμοί. Συγκρίνοντας τα δύο συστήματα κατηγοριοποίησης που αναφέρθηκαν προκύπτουν περισσότερες διαφορές παρά ομοιότητες. Επιπρόσθετα, η εξειδικευμένη και πολύπλοκη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση όγκων σε μοριακούς υπότυπους δεν μπορεί να αναπαραχθεί σε εργαστήρια που δεν έχουν πρόσβαση σε προηγμένες τεχνολογίες (Garattini et al., 2017). Επομένως, απαιτούνται απλούστερα και πιο τυποποιημένα εργαλεία, καθώς και επιλογή μικρότερου αριθμού αντιπροσωπευτικών γονιδίων για τον κάθε υπότυπο, ώστε να καταστούν τα συστήματα μοριακής ταξινόμησης εφαρμόσιμα στην κλινική πράξη (Sohn et al., 2017).

Εκτός από τη συμβολή στην πρόγνωση και θεραπεία, η γνώση του γενετικού υποβάθρου του γαστρικού καρκίνου μπορεί να αποτελέσει εργαλείο πρόληψης και έγκαιρης διάγνωσης. Αν και ο καρκίνος του στομάχου προκύπτει, όπως προαναφέρθηκε, ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων, η εμφάνισή του έχει οικογενή χαρακτηριστικά στο 10-20% των περιπτώσεων (Lott & Carvajal-Carmona, 2018). Μελέτη διδύμων έχει υπολογίσει ότι η κληρονομικότητα εξηγεί το 28% της διακύμανσης του κινδύνου εμφάνισης νεοπλασίας του στομάχου, γεγονός που μεν υποδεικνύει μεγαλύτερη συμμετοχή περιβαλλοντικών παραγόντων, χωρίς όμως δε να αποκλείει την εμπλοκή του ευρύτερου γενετικού πλαισίου (Lichtenstein et al., 2000). Εντούτοις, μόνο ένα γονίδιο, το *CDH1*, έχει συσχετιστεί με κληρονομικότητα στον γαστρικό καρκίνο, αν και έχουν περιγραφεί διάφοροι τύποι κληρονομικών καρκίνων του στομάχου. Με την έλευση νέων υψηλής απόδοσης τεχνολογιών αλληλούχησης και γονοτυπικής ανάλυσης, ένας μεγάλος αριθμός γονιδιωματικών περιοχών έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου. (Lott & Carvajal-Carmona, 2018). Σε αυτές τις γονιδιωματικές περιοχές, πολυμορφισμοί εντός και εκτός γονιδίων μπορούν να συμβάλλουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου. Η ταυτοποίηση των πολυμορφισμών που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης και των μεταλλάξεων-οδηγών της ασθένειας, θα αποτελέσει σημαντικό πλεονέκτημα για την πρόληψη και έγκαιρη διάγνωση, ενώ μπορεί να συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην πρόγνωση και τη θεραπεία.

1.3 Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNP)

Μια συχνή απόκλιση στην αλληλουχία μεταξύ ανθρώπινων γονιδιωμάτων είναι η διαφορά σε μια νουκλεοτιδική βάση, δηλαδή ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNP). Εξ ορισμού, οι σημειακοί αυτοί πολυμορφισμοί είναι γενετικοί τόποι με αλληλόμορφα που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο, με το σπανιότερο αλληλόμορφο

να εμφανίζει συχνότητα τουλάχιστον 1% σε ένα τυχαίο δείγμα ενός πληθυσμού. Δύο οποιαδήποτε ανθρώπινα γονιδιώματα εμφανίζουν κατά μέσο όρο διαφορά ενός μοναδικού ζεύγους βάσης κάθε 1000 νουκλεοτίδια, ενώ επιπλέον SNP εμφανίζονται συχνότερα στις μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος (Keats & Sherman, 2013).

Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση από τόπο σε τόπο, αφού προκύπτουν ως αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων με χαμηλή διεισδυτικότητα, οι οποίες διατηρούνται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Επιπλέον, SNP που εδράζονται στις ίδιες χρωμοσωμικές περιοχές συνήθως δεν κληρονομούνται τυχαία, αλλά ως συνδυασμοί πολλών αλληλομόρφων που σχηματίζουν σύμπλοκα απλοτύπων, δηλαδή περιοχές που συν-κληρονομούνται, λόγω της μειωμένης συχνότητας ανασυνδυασμού εντός τους. Η ιδιότητα αυτή τέτοιων γειτονικών πολυμορφισμών ορίζεται ως ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium – LD) (Erichsen & Chanock, 2004; Keats & Sherman, 2013). Οι σημειακοί πολυμορφισμοί ενδέχεται οι ίδιοι να επηρεάζουν, ή να εμφανίζουν γενετική σύνδεση με μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση, τη σταθερότητα του RNA και τη μεταφραστική αποδοτικότητα. Επομένως, συγκεκριμένα SNP μπορούν να συνδέονται με επιρρέπεια στην εμφάνιση συμπτωμάτων ή την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών (Shastry, 2009).

Η πλειονότητα των SNP δεν προσδίδει κάποια φαινοτυπική αλλαγή, ωστόσο SNP ενδέχεται να εδράζονται στον ίδιο απλότυπο με άλλους πολυμορφισμούς που έχουν ένα παρατηρούμενο αποτέλεσμα στη γονιδιακή έκφραση και λειτουργία. Οι σημειακοί πολυμορφισμοί που δεν επιφέρουν κάποιο αποτέλεσμα, αλλά βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με λειτουργικούς πολυμορφισμούς, χαρακτηρίζονται ως SNP επισήμανσης απλοτύπου (haplotype tagging SNP). Ένας απλότυπος, ο οποίος περιέχει πολυμορφισμούς που επιφέρουν ένα φαινοτυπικό αποτέλεσμα, μπορεί να επισημανθεί από διαφορετικά SNP εντός του, ακόμη και αν τα ίδια δεν έχουν επίδραση στον φαινότυπο. Συνεπώς, για την κατανόηση της σύνδεσης ασθενειών με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, θα πρέπει να γίνεται διαφοροποίηση μεταξύ των SNP ως γενετικών δεικτών και ως αιτιολογικών παραγόντων του φαινοτύπου. Οι συνιστώντες πολυμορφισμοί ενός απλοτύπου που έχει συνδεθεί με ένα φαινοτυπικό αποτέλεσμα θα πρέπει να αναλύονται ως προς την επίδραση που έχουν, ώστε να βρεθούν οι λειτουργικά σημαντικοί πολυμορφισμοί (Erichsen & Chanock, 2004).

Όσον αφορά την παθογένεση ασθενειών όπως ο καρκίνος, μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί που προσδίδουν κάποιο λειτουργικό πλεονέκτημα στον όγκο ονομάζονται μεταλλάξεις-οδηγοί (driver mutations). Συνήθως η επίδραση που έχει μια μεμονωμένη τέτοια μετάλλαξη είναι μικρή και επομένως καθίσταται δύσκολη η εύρεσή τους. Παρ' όλα αυτά πολυμορφισμοί, οι οποίοι δεν διαθέτουν αιτιολογική σχέση με τον φαινότυπο, αλλά εντοπίζονται στον ίδιο απλότυπο με μεταλλάξεις-οδηγούς μπορούν να δράσουν ως SNP επισήμανσης απλοτύπου και έτσι να τις υποδείξουν. Τέτοιες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί ονομάζονται επιβάτες (passengers) (Vogelstein et al., 2013).

1.3.1 Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στον καρκίνο του στομάχου

Ο καρκίνος περιλαμβάνει ένα σύνολο πολύπλοκων ασθενειών και συνήθως ένας πολυμορφισμός δεν αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την εμφάνισή του. Ακόμη και

σε περιπτώσεις σπάνιων κληρονομήσιμων μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, η διεισδυτικότητα δεν είναι πλήρης, δηλαδή η παρουσία μιας μετάλλαξης δεν οδηγεί απαραίτητα σε καρκινογένεση γεγονός που υποδεικνύει ότι, ως και σε πλαίσιο υψηλού κινδύνου, στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται επιπρόσθετες γενετικές τροποποιήσεις και περιβαλλοντικοί παράγοντες (Erichsen & Chanock, 2004).

Μελέτες γενετικής συσχέτισης με δεδομένα από πολλούς ασθενείς επιτρέπουν τη διερεύνηση SNP και απλοτύπων που έχουν χαμηλή έως μέτρια επίδραση στην καρκινογένεση. Κατά τη διερεύνηση της επίδρασης συγκεκριμένων SNP ή απλοτύπων στην εμφάνιση και έκβαση ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος, το μέτρο της επίδρασης είναι οι διαφορές στην πρόγνωση ή τον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας παρουσία των πολυμορφισμών. Κατά τη σύγκριση ομάδων ελέγχου και ασθενών, μια μη τυχαία κατανομή πολυμορφισμών υποδεικνύει πως οι ανιχνευόμενες διαφορές διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στην υπό μελέτη ασθένεια (Erichsen & Chanock, 2004).

Σε ό,τι αφορά τον καρκίνο, η χρησιμότητα ενός μεμονωμένου πολυμορφισμού στον υπολογισμό του κινδύνου εμφάνισης ή την πρόγνωση είναι συχνά χαμηλή, καθώς η επίδραση ενός SNP δεν είναι επαρκώς μεγάλη. Εντούτοις, το συνολικό αποτέλεσμα πολλαπλών SNP έχει τη δυνατότητα να παράσχει ένα δείκτη διαχωρισμού βάσει κινδύνου, που θα χρησιμεύσει σε προγράμματα πρόληψης και έγκαιρης διάγνωσης. Ένα τέτοιο σύνολο δεικτών έχει δημιουργηθεί για τον καρκίνο του μαστού με τον συνδυασμό 77 μη συνδεδεμένων πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου που συσχετίζονται με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Mavaddat et al., 2015).

Παρόμοιες προσπάθειες έχουν γίνει και για τον καρκίνο του στομάχου σε μικρότερο, όμως, εύρος, όπως αυτή των (Yuan et al., 2016). Η εύρεση πολυμορφισμών με επίδραση στον καρκίνο του στομάχου, μπορεί να επιτρέψει τη δημιουργία ενός αξιόπιστου συστήματος υπολογισμού του κινδύνου εμφάνισης της νόσου, βάσει ενός συνόλου γενετικών τροποποιήσεων. Μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS), καθώς και μετα-αναλύσεις των δεδομένων που έχουν προκύψει, έχουν αναδείξει ορισμένα SNP που εμπλέκονται στον καρκίνο του στομάχου (Lott & Carvajal-Carmona, 2018).

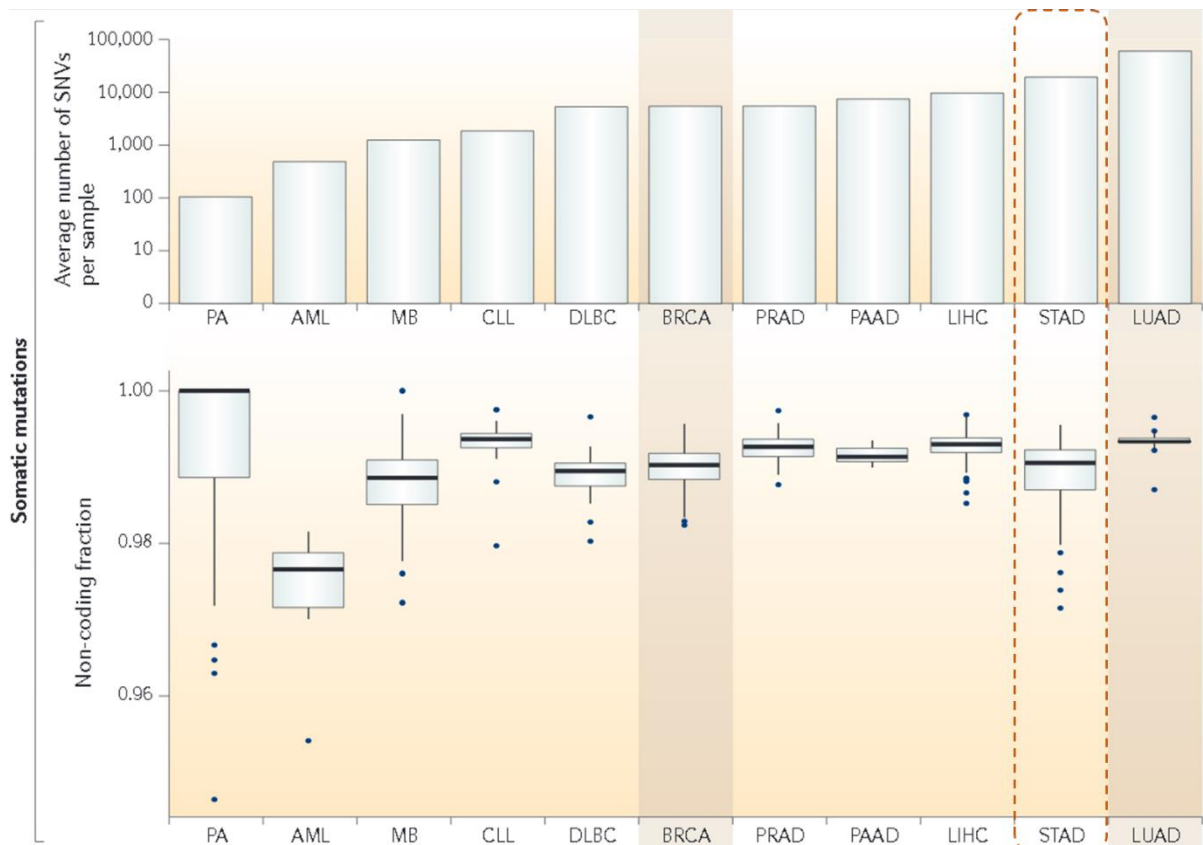
Πολυμορφισμός (Variant ID)	Γειτονικό γονίδιο	Γενετικός τόπος	Αλληλόμορφο αυξ. κινδύνου	Αναφέρεται από:
rs4072037	MUC1	1q22	A	(Saeki et al., 2011), (Z. Wang et al., 2017)
rs2070803	MUC1 (και TRIM46)	1q22	A	(Mocellin, Verdi, Pooley, & Nitti, 2015), (Saeki et al., 2011)
rs2075570	MTX1	1q22	G	(Mocellin et al., 2015)
rs13361707	PRKAA1	5p13.1	C	(Mocellin et al., 2015), (Y. Jiang, Li, Lu, Zhao, & Li, 2018)
rs2294008	PSCA	8q24.3	T	(Mocellin et al., 2015), (Z. Wang et al., 2017)
rs7712641	lnc-POLR3G-4 (LINC02161)	5q14.3	C	(Z. Wang et al., 2017)

Πίνακας 1.3: Ορισμένοι πολυμορφισμοί που έχουν συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου έπειτα από διαφορετικές πληθυσμιακές μελέτες και μετα-αναλύσεις δεδομένων. Επιλεγμένα από: (Y. Jiang et al., 2018; Mocellin et al., 2015; Saeki et al., 2011; Z. Wang et al., 2017).

Ένας καλά μελετημένος πολυμορφισμός σε Ασιατικούς πληθυσμούς είναι το SNP rs4072037 (G>A), το οποίο αποτελεί SNP επισήμανσης (tag SNP) για τη χρωμοσωμική περιοχή 1q22 και έχει συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης διάχυτου τύπου γαστρικού αδενοκαρκινώματος (Lott & Carvajal-Carmona, 2018; Saeki et al., 2011). Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται στο δεύτερο εξόνιο του γονιδίου *MUC1* και έχει συνδεθεί με την επιλογή της θέσης ματίσματος. Συγκεκριμένα, καθένα από τα δύο συχνότερα εναλλακτικά μετάγραφα του *MUC1* στο στόμαχο συνδέεται με ένα αλληλόμορφο του SNP rs4072037, γεγονός που καταδεικνύει έναν πιθανό ρόλο του πολυμορφισμού στον καθορισμό του κυρίαρχου εναλλακτικού μεταγράφου στο επιθήλιο του στομάχου. Το προϊόν του γονιδίου *MUC1*, μια γλυκοπρωτεΐνη, έχει συνδεθεί με την ογκογένεση, ενώ φυσιολογικά εμπλέκεται στη λίπανση της βλεννογόνου, την προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς και τη διακυτταρική επικοινωνία (Saeki et al., 2011).

Ένα επιπλέον παράδειγμα πολυμορφισμού που συνδέεται με τον καρκίνο του στομάχου είναι το SNP rs2294008 (C>T), το οποίο εδράζεται στο πρώτο εξόνιο του γονιδίου *PSCA* (Mocellin et al., 2015). Το γονίδιο αυτό είναι πιθανό να εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων του στομάχου. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είχε αρχικά συσχετιστεί με την τροποποίηση του σημείου έναρξης της μετάφρασης και άρα μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης. Ως εκ τούτου θα μπορούσε να επηρεαστεί η αμινοτελική αλληλουχία σηματοδότησης, γεγονός το οποίο θα είχε επίδραση στην ενδοκυτταρική επεξεργασία ή την υποκυτταρικό εντοπισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης. (Study Group of Millennium Genome Project for et al., 2008). Ωστόσο, το SNP rs2294008 φαίνεται να επιδρά στο γονίδιο *PSCA* μέσω της ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας στην περιοχή ανοδικά του γονιδίου. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός rs2294008 (C>T) δημιουργεί μια συναινετική αλληλουχία πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα Yin Yang 1 (YY1) ανοδικά του σημείου έναρξης της αντιγραφής. Ο μεταγραφικός παράγοντας YY1 ενδέχεται να δρα ως μεταγραφικός καταστολέας, οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση του *PSCA* (Lott & Carvajal-Carmona, 2018; Saeki et al., 2015).

Αν και πληθώρα SNP έχει ρόλο στην εμφάνιση ασθενειών μέσω της δράσης τους στις παραγόμενες πρωτεΐνες, το μεγαλύτερο ποσοστό SNP που έχουν συσχετιστεί με αυξημένη επιρρέπεια σε πολύπλοκες ασθένειες από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS), εντοπίζεται σε μη κωδικές, όμως, λειτουργικές περιοχές, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.6 (Hindorff et al., 2009; Zhang & Lupski, 2015). Οι περιοχές αυτές μπορεί να είναι ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής μεταξύ γονιδίων, ιντρονικές περιοχές ή μη κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNA - ncRNA) (Diederichs et al., 2016). Ειδικότερα, τα μη κωδικοποιητικά RNA μπορούν να συγκεντρώνουν μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών, δηλαδή αλλαγών στην αλληλουχία, καθώς η δράση τους βασίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στη δημιουργία ενδομοριακών ή διαμοριακών ζευγών βάσεων (Freyhult, Bollback, & Gardner, 2007). Η απορρύθμιση των μη κωδικοποιητικών RNA αποτελεί καρκινική υπογραφή, και σε ορισμένες περιπτώσεις οφείλεται σε και επηρεάζεται από πολυμορφισμούς (Khurana et al., 2016).



Εικόνα 1.6: Σωματικές μεταλλάξεις ανά τύπο καρκίνου. Το ραβδόγραμμα δείχνει τον μέσο αριθμό μεταλλαγών ενός νουκλεοτιδίου (SNV) ανά δείγμα. Το θηκόγραμμα (boxplot) αφορά στο ποσοστό των SNV που εντοπίζονται σε μη κωδικοποιητικές περιοχές. STAD: Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, LUAD: Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα, BRCA: Καρκίνος μαστού, LIHC: Ηπατοκαρκίνωμα, PAAD: Παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, PRAD: Αδενοκαρκίνωμα προστάτη, DLBC: Διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β-κυττάρων, CLL: Χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία, MB: Μυελοβλάστωμα, AML: Οξεία μυελογενής λευχαιμία, PA: Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα. (Khurana et al., 2016).

1.4 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (lncRNA)

Οι πιο καλά μελετημένες περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος αφορούν σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ωστόσο, ενώ εικάζεται ότι έως και το 70% του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι μεταγραφικά ενεργό, μόλις το 2% χρησιμεύει ως εκμαγείο για την παραγωγή πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση σε αυτές τις πολυπληθέστερες μη μεταφραζόμενες, αλλά μεταγραφικά ενεργές γονιδιωματικές περιοχές. Έτσι, εκτός από τα ήδη γνωστά μη κωδικοποιητικά RNA, όπως τα μεταφορικά (tRNA), ριβοσωμικά (rRNA), μικρά πυρηνικά (snRNA) και μικρά RNA του πυρηνίσκου (snoRNA), έχει αποκαλυφθεί και ένα μεγάλο εύρος νέων μη κωδικοποιητικών RNA με ποικίλες κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες.

Μια κατηγορία τέτοιων μεταγράφων είναι τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs), μια ετερογενής ομάδα μη κωδικοποιητικών μεταγράφων με μήκος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία, μάλιστα, συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος του ανθρώπινου μεταγραφώματος (Esteller, 2011). Αν και τα lncRNA παρατηρούνται σε ένα μεγάλο εύρος ειδών, κατά κανόνα δεν εμφανίζουν τα ίδια πρότυπα εξελικτικής συντήρησης της αλληλουχίας ανάμεσα στα διάφορα είδη σε σύγκριση με τα mRNA. Ορισμένα lncRNA

εμφανίζουν υψηλή συντήρηση, όπως είναι το GAS5 του οποίου τα εξόνια εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας 70% μεταξύ ανθρώπου και ποντικού. Παρ' όλα αυτά είναι γεγονός ότι δεν διαθέτουν τους ίδιους περιορισμούς που έχουν τα κωδικοποιητικά γονίδια. Η δράση ενός μεγάλου αριθμού lncRNA δεν προκύπτει ως αποτέλεσμα της αλληλουχίας, αλλά ως απόρροια της δευτεροταγούς τους δομής. Αυτά τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής, όπως είναι οι προεκβολές και οι βρόχοι, είναι συχνά δομοστοιχειωτά, δηλαδή λειτουργούν ως ανεξάρτητες μονάδες και δεν επηρεάζονται από την αλληλουχία άλλων περιοχών του lncRNA. Έτσι, ανάλογα με τον τρόπο δράσης μιας αλληλουχίας RNA παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα συντήρησης (Johnsson, Lipovich, Grander, & Morris, 2014).

Επιπλέον, τα lncRNA εκφράζονται συνήθως σε χαμηλά επίπεδα, ομοιάζοντας περισσότερο με «μεταγραφικό θόρυβο» (Ma et al., 2013). Παρ' όλα αυτά έχει βρεθεί και χαρακτηριστεί ένα σημαντικό πλήθος λειτουργικών lncRNA, ενώ νέα ανακαλύπτονται ακόμη. Αν και δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, τα lncRNA έχουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες μέσω της δράσης τους στη ρύθμιση της δυναμικής χρωματίνης, τη γονιδιακή έκφραση, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση (Bhan et al., 2017; Esteller, 2011).

Ο ορισμός των lncRNA ως κωδικοποιητικών μεταγράφων με μήκος άνω των 200 νουκλεοτιδίων είναι αυθαίρετος και δεν αντικατοπτρίζει κάποια βιολογική παράμετρο. Επομένως, για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργικής σημασίας τους, είναι σκόπιμη η ταξινόμηση τους σε ομάδες που θα αντικατοπτρίζουν τη βιολογική τους λειτουργία. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ταξινόμησης που έχουν προταθεί, οι οποίες βασίζονται στη γονιδιωματική θέση όπου εντοπίζονται, στους μηχανισμούς δράσης και στο σημείο δράσης τους (Bhan et al., 2017; Ma et al., 2013).

1.4.1 Ταξινόμηση lncRNA ανάλογα με τον εντοπισμό στο γονιδίωμα

Αν και δεν υπάρχουν καθορισμένα συστήματα ταξινόμησης για τη διάκριση των lncRNA ανάλογα με το σημείο του γονιδιώματος από όπου μεταγράφονται, συνήθως ταξινομούνται σε μια από τις παρακάτω έξι ευρείες κατηγορίες (Bhan et al., 2017; Ma et al., 2013; Ponting et al., 2009).

1. Σημαίνοντα lncRNA (sense-overlapping ή sense lncRNAs)

Μια ομάδα lncRNA μεταγράφεται από την κωδική αλυσίδα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και εμφανίζει επικάλυψη με ιντρόνια και εξόνια τους (Bhan et al., 2017). Μερικά lncRNA που επικαλύπτουν την κωδική αλυσίδα γονιδίων, εμφανίζουν μια μεγάλη ιδιαιτερότητα, αφού έχουν λειτουργική δράση και ως RNA, αλλά κωδικοποιούν παράλληλα και πρωτεΐνες, δρώντας ως mRNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *SRA*, του οποίου το μετάγραφο μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, ενώ παράλληλα μπορεί να δράσει και ως ικρίωμα για πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή. Εντούτοις, τα περισσότερα lncRNA δεν έχουν κωδικοποιητικό δυναμικό (Ma et al., 2013).

2. Αντι-σημαίνοντα lncRNA (anti-sense lncRNAs)

Τα αντι-σημαίνοντα lncRNA, όπως και η προηγούμενη κατηγορία lncRNA, επικαλύπτουν ένα ή περισσότερα εξόνια και ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, με τη διαφορά ότι μεταγράφονται με φορά αντίθετη από αυτή της μεταγραφής του mRNA. Αυτά τα μετάγραφα ενδέχεται να είναι συμπληρωματικά με την κωδική αλληλουχία, αλλά κάτι

τέτοιο δεν είναι απαραίτητο (Bhan et al., 2017). Ένας σημαντικός αριθμός μεταγραφικών μονάδων σε διάφορους ευκαρυώτες εμπεριέχει *cis*-φυσιολογικά αντι-σημαίνοντα μετάγραφα (*cis*-natural anti-sense transcripts, *cis*-NATs). Ένα τέτοιο RNA μπορεί να δράσει δημιουργώντας ένα δίκλωνο μόριο RNA με το συμπληρωματικό του μετάγραφο, ρυθμίζοντας έτσι τα δραστικά επίπεδά του (Ponting et al., 2009).

3. lncRNA που μεταγράφονται με αντίθετη φορά από κωδικά γονίδια (bidirectional lncRNAs)

Η επόμενη κατηγορία μακρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων αφορά σε lncRNA, τα οποία εντοπίζονται σε μικρή απόσταση από κωδικά γονίδια, αλλά μεταγράφονται με αντίθετη φορά από αυτά εκκινώντας από τον ίδιο υποκινητή. Αυτά τα αντι-σημαίνοντα μετάγραφα, μέσω στρατολόγησης επιγενετικών ρυθμιστικών συμπλόκων στο σημαίνοντα υποκινητή του γειτονικού κωδικού γονιδίου, ενδέχεται να αποτελούν μέρος ενός μηχανισμού ρύθμισης της μεταγραφής του (Gutschner & Diederichs, 2012).

4. Ιντρονικά lncRNA (intronic lncRNA)

Τα ιντρονικά lncRNA προέρχονται εξ ολοκλήρου από ένα και μόνο ιντρόνιο ενός δεύτερου μεταγράφου, συνήθως πρόδρομου mRNA. Αρκετά από τα προτεινόμενα ιντρονικά lncRNA ενδέχεται αντ' αυτού να αποτελούν απλώς κομμάτια πρόδρομων μορίων mRNA. Εντούτοις, ορισμένα ιντρονικά lncRNA ακολουθούν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε σύγκριση με το κωδικό γονίδιο από το οποίο προέρχονται, ενώ επίσης κάποια από αυτά εμφανίζουν και μεγάλη συντήρηση στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, κάτι που υποδεικνύει έναν πιθανό λειτουργικό ρόλο (Ponting et al., 2009).

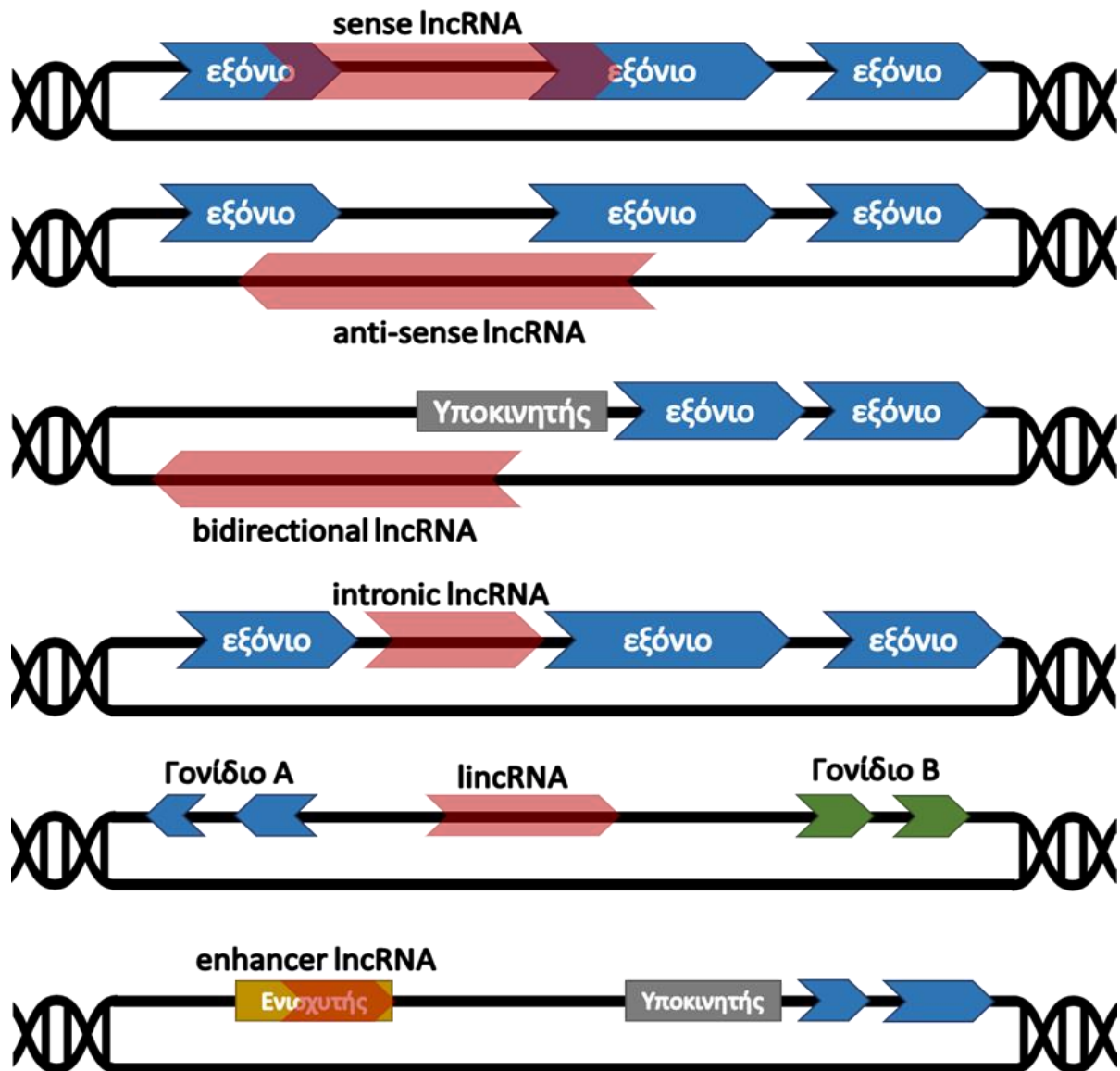
5. lncRNA μεταξύ γονιδίων (long intergenic non-coding RNAs, lincRNAs)

Μια μεγάλη κατηγορία μακρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων αποτελούν τα lncRNA που εντοπίζονται στο διάστημα μεταξύ δύο γονιδίων, τα οποία ονομάζονται long intergenic non-coding RNA ή lincRNA. Τέτοια μετάγραφα μπορούν να ταυτοποιηθούν με αναζήτηση χρωματινικών υπογραφών, οι οποίες σχετίζονται με μεταγραφικά ενεργές περιοχές. Τα lincRNA εμπλέκονται σε *cis* ή *trans* μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων, στον έλεγχο της μετάφρασης, καθώς και σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση (Esteller, 2011; Ma et al., 2013). Ένα παράδειγμα αυτής της κατηγορίας μη κωδικοποιητικών μεταγράφων είναι το *lincRNA-p21* (το οποίο πήρε αυτό το όνομα λόγω της εγγύτητας του με το γονίδιο της πρωτεΐνης p21), ένα lincRNA που ρυθμίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Το συγκεκριμένο lincRNA διαθέτει ένα μοτίβο πρόσδεσης της p53 στον υποκινητή του. Ως απόκριση σε βλάβη του DNA η p53 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής του *lincRNA-p21*, το οποίο φαίνεται να δρα καθοδικά του κανονικού μονοπατιού της p53 ως μεταγραφικός καταστολέας (Esteller, 2011; Huarte et al., 2010).

6. lncRNA που μεταγράφονται από ενισχυτές (enhancer lncRNAs, eRNAs)

Μια επιπλέον ομάδα μακρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων περιλαμβάνει τα RNA που μεταγράφονται από τους ενισχυτές (eRNAs) (Bhan et al., 2017). Οι ενισχυτές αποτελούν *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία που ελέγχουν τη μεταγραφή γονιδίων, καθώς απαρτίζονται από πολύπλοκες συστοιχίες σημείων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (TFBSs). Είναι γνωστό πως η πολυμεράση II του RNA (RNAPII) μπορεί να μεταγράψει τμήματα ή το πλήρες μήκος ενεργών ενισχυτών, παράγοντας eRNA, τα οποία μπορούν να οδηγούν είτε σε

παρεμβολή στη δράση των ενισχυτών ή να έχουν θετική επίδραση στην επαγωγή της μεταγραφής των ελεγχόμενων από τους ενισχυτές γονιδίων. Υπάρχει το ενδεχόμενο, η μεταγραφή των ενισχυτών να προκύπτει συχνά ως αποτέλεσμα εναλλαγής της θέσης μεταγραφής από την RNAPII μεταξύ του υποκινητή και του ενισχυτή, παράγοντας αντικανονικά και πιθανώς μη λειτουργικά RNA. Εντούτοις, τα eRNA δεν σχετίζονται με εγγύτητα σε ενεργούς υποκινητές και είναι πιθανότερο να αποτελούν λειτουργικά μη κωδικοποιητικά RNA παρά παραπροϊόντα της μεταγραφής (Pande, Makalowski, Brosius, & Raabe, 2020).



Εικόνα 1.7: Κατηγορίες lncRNA ανάλογα με τη θέση στο γονιδίωμα. Σχεδιασμένο βάσει πληροφοριών και σχεδίων από (Bhan, Soleimani, & Mandal, 2017; Ma, Bajic, & Zhang, 2013; Ponting, Oliver, & Reik, 2009).

Στο γονιδίωμα υπάρχουν επιπλέον ορισμένες μεταγραφικά ενεργές περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή συντήρηση, οι υπερσυντηρημένες περιοχές (ultraconserved regions, UCRs). Οι UCR αποτελούν μια ομάδα τμημάτων DNA με μήκος μεγαλύτερο των 200 ζευγών βάσεων, οι οποίες εμφανίζουν πλήρη συντήρηση στα γονιδιώματα του ανθρώπου, του

ποντικού και του αρουραίου, ενώ οι περισσότερες από αυτές τις αλληλουχίες είναι συντηρημένες στην όρνιθα και στον σκύλο. Ενώ μερικές UCR βρίσκονται εντός αλληλουχιών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αυτές εντοπίζονται επίσης σε ιντρόνια και «ερημικές» περιοχές του γονιδιώματος (Johnsson et al., 2014). Η πλειονότητα αυτών των περιοχών μεταγράφεται σε μακρά μόρια RNA, που ονομάζονται μετάγραφα των UCR (T-UCRs), τα περισσότερα από τα οποία δεν μεταφράζονται, οπότε και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως lncRNA. Τα T-UCR βρίσκονται συχνά υπό τον έλεγχο miRNA εκφράζονται καθολικά ή με συγκεκριμένα πρότυπα σε φυσιολογικούς ιστούς, ενώ φαίνεται ότι η απορρύθμισή τους συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος (Esteller, 2011; Johnsson et al., 2014).

1.4.2 Ταξινόμηση lncRNA ανάλογα με το μηχανισμό δράσης

Βάσει του τρόπου λειτουργίας τους, μπορεί να γίνει κατηγοριοποίηση των lncRNA σε τέσσερις ομάδες, τα σηματοδοτικά lncRNA, τα lncRNA-δολώματα, τα lncRNA-οδηγούς και τα lncRNA που δρουν ως ικριώματα.

1. Σηματοδοτικά lncRNA (signaling lncRNAs)

Τα σηματοδοτικά lncRNA είναι μη κωδικοποιητικά RNA που σχετίζονται με συγκεκριμένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και των οποίων η έκφραση προωθεί ή υποδεικνύει ένα σηματοδοτικό γεγονός, ανεξαρτήτως του μηχανισμού δράσης τους (Bhan et al., 2017).

2. lncRNA-δολώματα (decoy lncRNAs)

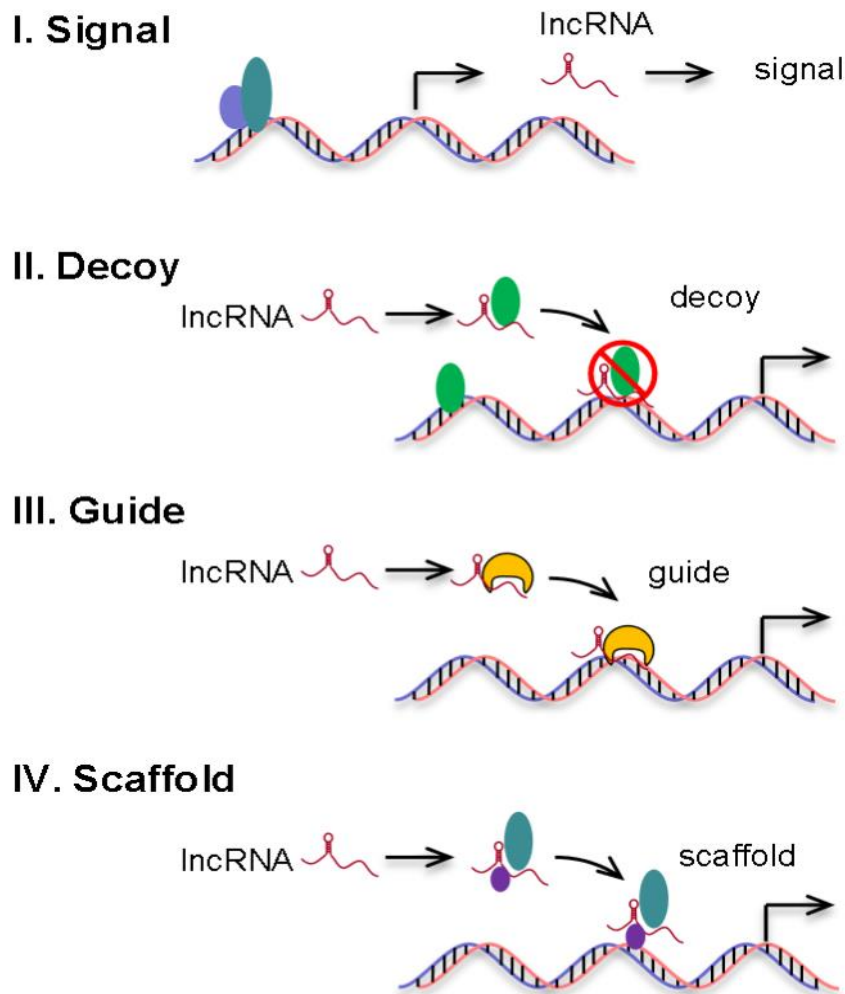
Μια ομάδα lncRNA μπορούν να δράσουν ως δολώματα για μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρώντας μαζί τους, αποτρέπουν τους μεταγραφικούς ρυθμιστές τους από το να συνδεθούν στα ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος που στοχεύουν, επιτυγχάνοντας έτσι μεταγραφική σίγηση ή ενεργοποίηση (Bhan et al., 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα lncRNA που δρα με αυτόν τον τρόπο αποτελεί το GAS5. Το συγκεκριμένο μετάγραφο έχει μια δευτεροταγή δομή, η οποία αποκαλύπτει μια αλληλουχία RNA που μιμείται τα στοιχεία απόκρισης του DNA στα οποία προσδένεται ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR). Έτσι το GAS5 δρα ως δόλωμα για τον GR εμποδίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων απόκρισης σε αγωνιστές γλυκοκορτικοειδών (Johnsson et al., 2014).

3. lncRNA-οδηγοί (guide lncRNAs)

Τα lncRNA-οδηγοί προσδένονται σε ρυθμιστικά ή ενζυμικά δραστικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα καθοδηγώντας τα σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές, ώστε να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση. Σε αυτήν την κατηγορία lncRNA ανήκει και το *lincRNA-p21* που αναφέρθηκε στην υποενότητα 1.4.1 (Bhan et al., 2017).

4. lncRNA ικριώματα (scaffold lncRNAs)

Η τελευταία κατηγορία lncRNA, σε ό,τι αφορά τον τρόπο λειτουργίας, περιλαμβάνει τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα που δρουν ως ικριώματα. Αυτά τα lncRNA δρουν ως ένας κεντρικός σκελετός που μπορεί να δεσμεύσει διάφορες πρωτεΐνες βοηθώντας τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπει τη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων, καθώς και την αρχιτεκτονική της χρωματίνης (Bhan et al., 2017).



Εικόνα 1.8: Είδη lncRNA ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους (Mathy & Chen, 2017).

Ανάμεσα στους τρόπους με τους οποίους τα lncRNA μπορούν να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση καίρια σημασία έχει η διαμεσολάβησή τους στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Ανάλογα με την εμβέλεια της επίδρασής τους, τα lncRNA που δρουν στη χρωματίνη μπορούν να διακριθούν σε *cis*-δραστικά – εάν δρουν κοντά στο σημείο μεταγραφής τους – και *trans*-δραστικά – εάν ρυθμίζουν την έκφραση απομακρυσμένων γονιδίων (Ma et al., 2013).

1.4.3 Ταξινόμηση lncRNA ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό

Όπως συμβαίνει στην περίπτωση των πρωτεϊνών, η δράση των lncRNA εξαρτάται από τον εντοπισμό τους στο κύτταρο. Έτσι, μακρά μη κωδικοποιητικά RNA που δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής εμφανίζουν πυρηνικά πρότυπα εντοπισμού, ενώ μετάγραφα που έχουν ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα. Παρ' όλ' αυτά, ο εντοπισμός των lncRNA μπορεί να παρουσιάζει μεγάλο εύρος προτύπων, με μετάγραφα να βρίσκονται παράλληλα σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα (Chen, 2016). Ταυτόχρονα, η κατανομή των lncRNA είναι συχνά μια δυναμική διαδικασία. Επί παραδείγματι, τα lncRNA *NORAD* και *SNHG* εντοπίζονται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HCT116, όμως σε

περίπτωση βλάβης του DNA, εμφανίζουν πυρηνικό πρότυπο εντοπισμού (Carlevaro-Fita & Johnson, 2019).

Πυρηνικά lncRNA

Τα lncRNA που εντοπίζονται στον πυρήνα είναι κατά κύριο λόγο εκείνα που έχουν ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Μια ειδικότερη κατηγορία lncRNA είναι αυτά που συμπλέκονται με τη χρωματίνη και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωσή της. Παραδείγματα τέτοιων μεταγράφων είναι το MALAT1 και το NEAT1, τα οποία σχηματίζουν συγκεκριμένες εστίες χρωματινικών δομών (nuclear speckles, nuclear paraspeckles). Η κατακράτηση των πυρηνικών μεταγράφων επιτυγχάνεται μέσω δημιουργίας ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων με πρωτεΐνες του πυρηνικού σκελετού ή με σηματοδοτικά πεπτιδία πυρηνικού εντοπισμού ή λόγω έλλειψης πολύ-A ουράς, κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών πυρηνικών lncRNA (Batista & Chang, 2013).

Κυτταροπλασματικά lncRNA

Ένα μεγάλο μέρος lncRNA έχει δράσεις στο κυτταρόπλασμα όπου και εντοπίζεται. Πολλά κυτταροπλασματικά lncRNA, όπως το *lincRNA-p21* έχουν ρόλο στη ρύθμιση της σταθερότητας ή της μεταφραστικής απόδοσης των mRNA (Carlevaro-Fita & Johnson, 2019). Πολλά lncRNA δρουν στο κυτταρόπλασμα ως σπόγγοι miRNA ή δολώματα πρωτεϊνών, ενώ μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγωγή σήματος μέσω παρεμβολής στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών (Carlevaro-Fita & Johnson, 2019; Chen, 2016).

1.4.4 Τα lncRNA στον καρκίνο

Οι ολοένα και περισσότερες βιολογικές διεργασίες, οι οποίες αποδεικνύεται ότι ρυθμίζονται μέσω της δράσης lncRNAs, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική σηματοδότηση, η διαφοροποίηση και η ανάπτυξη, υποδεικνύουν πως τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα ενδέχεται να εμπλέκονται στη παθογένεση διάφορων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων και των καρκίνων. Πράγματι, συσσωρεύονται συνεχώς στοιχεία που καταδεικνύουν ότι απορρύθμιση αρκετών lncRNA διαδραματίζει έναν διόλου ευκαταφρόνητο ρόλο στην ογκογένεση (Xie, Jin, Xu, Zhuo, & Zhou, 2016).

Επιστρέφοντας στα ορόσημα του καρκίνου, είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν lncRNA που συνδέονται με αυτές τις βασικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, υπάρχουν:

1. lncRNA που προάγουν τη διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης (όπως το SRA που δρα ως συν-ενεργοποιητής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών),
2. lncRNA με δράση στην αποφυγή καταστολής της κυτταρικής αύξησης (όπως το GAS5 που δρα ως δόλωμα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών),
3. lncRNA που προσδίδουν αντίσταση στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (όπως το ANRIL, το οποίο εκφράζεται από τον γενετικό τόπο της p16^{INK4a} και αναστέλλει τη λειτουργία ογκοκαταστολέων),
4. lncRNA με ρόλο στην αναπαραγωγική αθανασία (όπως το TERC που αποτελεί τμήμα του ολοενζύμου της τελομεράσης και τα TERRA που θεωρούνται αρνητικοί ρυθμιστές της τελομεράσης),

5. lncRNA με ρόλο στην κυτταρική διήθηση και τη μετάσταση (όπως το MALAT1 ή αλλιώς NEAT2, το οποίο συμμετέχει στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση RNA και έχει συσχετιστεί με μεγάλο αριθμό καρκίνων) (Gutschner & Diederichs, 2012).

Επομένως, μπορούμε να κάνουμε λόγο για lncRNA που δρουν ως ογκογονίδια. Ορισμένα τέτοια μετάγραφα έχουν συσχετιστεί και με τον καρκίνο του στομάχου. Συγκεκριμένα, το lncRNA H19 έχει φανεί ότι αυξορρυθμίζεται στο γαστρικό καρκίνο και πως, επιπλέον, σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Επιπρόσθετα, αυξημένη συσχέτιση με τον καρκίνο του στομάχου έχει αναδειχθεί και για τα lncRNA ANRIL, GHET1 και MALAT1 (Xie et al., 2016).

Προοπτικές στη διάγνωση και τη θεραπεία

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 1.2, ένα μεγάλο μέρος της θνησιμότητας του καρκίνου του στομάχου μπορεί να αποδοθεί στην καθυστερημένη διάγνωση της νόσου. Τα lncRNA ως διαγνωστικοί δείκτες αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη λύση σε αυτό το πρόβλημα. Ογκογόνα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα έχουν εξειδικευμένη τοπική και χρονική έκφραση, ενώ παράλληλα είναι ανιχνεύσιμα σε κυκλοφορούντα εξωσώματα που προέρχονται από όγκους (Begolli, Sideris, & Giakountis, 2019). Συνεπώς, lncRNA με συγκεκριμένη λειτουργία στην ογκογένεση και με ιστοειδική και καρκινοειδική έκφραση μπορούν να χρησιμεύσουν ως μοριακή «υπογραφή» του όγκου.

Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα των lncRNA εντοπίζεται στον τομέα της πρόγνωσης. Τα επίπεδα έκφρασης μη κωδικοποιητικών RNA μπορούν να συνδεθούν με κλινικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διήθησης και τη μετάσταση. Στον καρκίνο του στομάχου, για παράδειγμα, τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA H19, ANRIL, GHET1, HOTAIR, GAS5, LET, GAPLINC και FENDRR εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των πασχόντων (Xie et al., 2016).

Όπως αναφέρθηκε στις υποενότητες 1.3 και 1.3.1, ένα σημαντικός αριθμός SNP σχετίζονται με την έκφραση και λειτουργία των μη κωδικοποιητικών RNA στο πλαίσιο του καρκίνου. Η ταυτοποίηση πολυμορφισμών που επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης ή την πρόγνωση της νόσου μέσω επιδράσεων τους σε lncRNA μπορεί στο μέλλον, σε συνδυασμό με την έλευση νέων και φθηνότερων τεχνολογιών αλληλούχησης, να χρησιμεύσει στον εξατομικευμένο υπολογισμό του κινδύνου που διατρέχει ένα άτομο βάσει του γενετικού του υποβάθρου ή στο παρόν, στη δημιουργία νέων συστημάτων μοριακής ταξινόμησης.

Οι προεκτάσεις των lncRNA στην κλινική πράξη δεν περιορίζονται στη διάγνωση και την πρόγνωση, αλλά επεκτείνονται και στη θεραπεία. Τα πρότυπα έκφρασής τους, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή ιστοειδικότητα, τα καθιστούν ικανούς θεραπευτικούς στόχους. Μια τυπική προσέγγιση στη θεραπεία μέσω στόχευσης lncRNA αποτελεί η χρήση μεθόδων σίγησης τους με παρεμβολή RNA. Επιπλέον προσεγγίσεις, οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, είναι η στόχευση lncRNA με αντι-σημαίνοντα ολιγονουκλεοτίδια, η χρήση αναλόγων DNA που δεσμεύουν RNA οδηγώντας σε αποδόμησή του και η ανάπτυξη απταμερών, δηλαδή ολιγονουκλεοτιδίων που μπορούν να στοχεύσουν μικρά μόρια βάσει της δομής τους (Begolli et al., 2019). Παράλληλα, η εύρεση SNP που σχετίζονται με lncRNA με λειτουργικό ρόλο στον καρκίνο, ενδέχεται να προσφέρει τη

δυνατότητα εξατομικευμένης και στοχευμένης θεραπείας ανάλογα με τον γονότυπο του ασθενούς.

Εν όψει όλων των παραπάνω, η εύρεση νέων λειτουργικών και καρκινοειδικών lncRNA, καθώς και η διαλεύκανση της βιολογικής λειτουργίας των ήδη γνωστών, έχει τη δυνατότητα να προσφέρει νέα εργαλεία στην αντιμετώπιση πολύπλοκων ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος.

2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ & ΣΚΟΠΟΣ

Τα lncRNA είναι μια σχετικά ανεξερεύνητη ομάδα μορίων με καίρια σημασία στον καρκίνο, τα οποία μπορούν να χρησιμεύσουν ως διαγνωστικοί δείκτες και θεραπευτικοί στόχοι. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός ενός μη μελετημένου μέχρι στιγμής lncRNA, του RECUR1 (Regulatory cancer mutation lncRNA 1), καθώς και των σημειακών πολυμορφισμών με ρόλο στην έκφραση του. Βάσει μη δημοσιευμένων δεδομένων, το συγκεκριμένο μετάγραφο αυξορρυθμίζεται στον καρκίνο του στομάχου εμφανίζοντας συσχέτιση όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης με συγκεκριμένο αλληλόμορφο ενός σημειακού πολυμορφισμού.

Προς επίτευξη του στόχου που τέθηκε, χρησιμοποιούνται τόσο βιοπληροφορικές, όσο και πειραματικές μέθοδοι που αποσκοπούν στην ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του RECUR1 ανά ιστό σε φυσιολογική και παθολογική κατάσταση, καθώς και την πειραματική μελέτη μοριακών χαρακτηριστικών όπως ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η σταθερότητα του μεταγράφου. Επιπλέον, γίνεται χαρακτηρισμός του γονοτύπου των διαθέσιμων κυτταρικών σειρών του εργαστηρίου ως προς το SNP που φέρεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης του RECUR1. Τέλος, το πειραματικό σκέλος περιλαμβάνει την καταστολή του μεταγράφου RECUR1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μέσω μετασχηματισμού τους με την κατάλληλη κατασκευή shRNA. Το πείραμα καταστολής του εν λόγω μεταγράφου έχει ως στόχο τη μελέτη του φαινοτύπου των κυττάρων απουσία του.

Σε περίπτωση που αποδειχθεί ότι το συγκεκριμένο lncRNA διαδραματίζει κάποιον ρόλο στον καρκίνο, ο οποίος μάλιστα επηρεάζεται από σημειακούς πολυμορφισμούς του, μελλοντικός στόχος είναι η διερεύνησή του ως πιθανού διαγνωστικού εργαλείου ή στόχου θεραπείας.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Για τον χαρακτηρισμό και τη μελέτη του εξεταζόμενου μακρού μη κωδικοποιητικού μεταγράφου χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Οι κυτταρικές σειρές που ήταν διαθέσιμες για την πραγματοποίηση πειραμάτων είναι οι ακόλουθες.

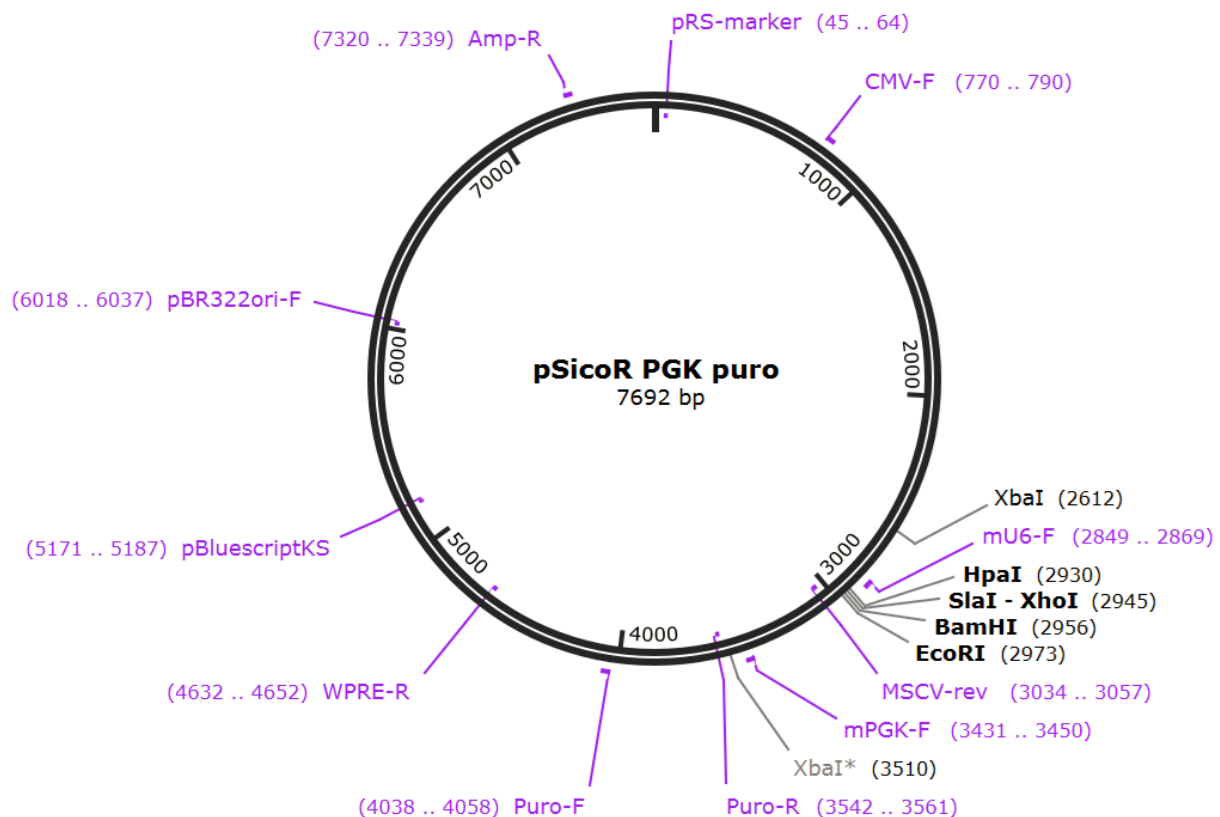
Κυτταρική σειρά	Περιγραφή
HFE145	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά προερχόμενη από πρωτογενή καλλιέργεια φυσιολογικών κυττάρων του γαστρικού επιθηλίου ¹
MKN45 (RRID:CVCL_0434)	Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από ηπατική μετάσταση γαστρικού αδενοκαρκινώματος ²
NUGC4 (RRID:CVCL_3082)	Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από μετάσταση γαστρικού αδενοκαρκινώματος με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου σε παραγαστρικούς λεμφαδένες. Χωρίς μετάλλαξη TP53 ²
KATOIII (RRID:CVCL_0371)	Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από μετάσταση γαστρικού αδενοκαρκινώματος με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου σε υπερκλείδιους και μασχαλιαίους λεμφαδένες και διασπορά σε πλευριτική συλλογή. Ομόζυγη για έλλειμμα TP53. ^{2,3}
AGS (RRID:CVCL_0139)	Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Ετερόζυγη για μετάλλαξη PIK3CA, KRAS. Χωρίς μετάλλαξη TP53 ^{2,3}
HT29 (RRID:CVCL_0320)	Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Ετερόζυγη μετάλλαξη PIK3CA, Ομόζυγη μετάλλαξη TP53, SMAD4 ²
HCT116 (RRID:CVCL_0291)	Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Ετερόζυγη μετάλλαξη CDKN2A, KRAS, PIK3CA. Χωρίς μετάλλαξη TP53 ²
MCF7 (RRID:CVCL_0031)	Καρκινική κυτταρική σειρά πορογενούς καρκινώματος του μαστού προερχόμενη από διασπορά σε πλευριτική συλλογή. Ομόζυγη για έλλειμμα CDKN2A. Ετερόζυγη μετάλλαξη PIK3CA. Χωρίς μετάλλαξη TP53 ²
SKBR3 (RRID:CVCL_0033)	Καρκινική κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος μαστού προερχόμενη από διασπορά σε πλευριτική συλλογή. Ομόζυγη για έλλειμμα CDH1 και μετάλλαξη TP53 ²

Πίνακας 3.1: Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. ¹(Duane T. Smoot et al., 2000), ²(ExpASY (SIB) - Cellosaurus), ³(ATCC product catalogue).

3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Για την παροδική γενετική τροποποίηση των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pSicoR PGK puro (RRID:Addgene_12084) με μήκος 7692 bp. Στον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα μπορεί να εντεθεί αλληλουχία της οποίας η έκφραση θα σχηματίσει shRNAs, τα οποία στοχεύουν το υπό μελέτη lncRNA σε πειράματα καταστολής του. Οι τροποποιημένοι πλασμιδιακοί φορείς μπορούν στη συνέχεια να εισαχθούν στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές με διαμόλυνση μέσω λεντιών. Για να ελεγχθεί η τυχόν επίδραση του λεντικού μετασχηματισμού στα αποτελέσματα της ποσότητας του

μεταγράφου, στα δείγματα ελέγχου έγινε εισαγωγή μέσω λεντιών του κενού πλασμιδιακού φορέα pLL3.7 (RRID:Addgene_11795).



Εικόνα 3.1: Ο πλασμιδιακός φορέας pSicoR PGK puro. Πλασμιδιακός χάρτης: Addgene, αρ. καταλόγου 12084 (<http://n2t.net/addgene:12084>, RRID:Addgene_12084). Από (Ventura et al., 2004). Απεικόνιση με το λογισμικό SnapGene Viewer® (GSL Biotech LLC).

3.1.3 Βακτηριακά στελέχη

Η επιλογή των πλασμιδιακών φορέων που φέρουν το επιθυμητό ένθεμα, καθώς και ο πολλαπλασιασμός τους, έγινε στο βακτηριακό στέλεχος *E. coli* XL1-Blue. Τα βακτήρια *E. coli* XL1-Blue έχουν έλλειμμα των γονιδίων *endA* και *recA*, που κωδικοποιούν για μια ενδονουκλεάση και μια ρεκομπινάση αντίστοιχα. Αυτές οι μεταλλάξεις βελτιώνουν τη γενετική σταθερότητα του ενθέματος, αφού μειώνουν τη συχνότητα γεγονότων ανασυνδυασμού. Επιπλέον, τα βακτήρια του στελέχους XL1-Blue φέρουν μια μετάλλαξη στο γονίδιο *hsdR*, η οποία εμποδίζει την κατάτμηση του πλασμιδιακού φορέα από το σύστημα ενδονουκλεασών EcoK.

3.1.4 Ένζυμα και αντιδραστήρια

Για αντιδράσεις πέψης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ένζυμα περιορισμού:

Ένζυμο περιορισμού	Περιγραφή
BamHI (Minotech biotechnology)	<p>5' ...G▼GATCC...3'</p> <p>3' ...CCTAG▲G...5'</p> <p>Διάλυμα αποθήκευσης: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 μg/ml BSA, 50% γλυκερόλη. Αποθήκευση στους -20°C.</p>

<p>XbaI (Minotech biotechnology)</p>	<p>5' ...T▼CTAGA...3' 3' ...AGATC▲T...5'</p> <p>Διάλυμα αποθήκευσης: 100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 500 μg/ml BSA, 50% γλυκερόλη. Αποθήκευση στους -20°C.</p>
<p>BshFI (Minotech biotechnology)</p>	<p>5' ...GG▼CC...3' 3' ...CC▲GG...5'</p> <p>Διάλυμα αποθήκευσης: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 μg/ml BSA, 50% γλυκερόλη. Αποθήκευση στους -20°C.</p>
<p>XhoI (New England BioLabs)</p>	<p>5' ...C▼TCGAG...3' 3' ...GAGCT▲C...5'</p> <p>(Ισοσχιζομερές της S1aI)</p>

Πίνακας 3.2: Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Από τον κατάλογο προϊόντων της MINOTECH biotechnology (<https://minotech.gr/index.php/products>) και της New England BioLabs.

Για αντιδράσεις πέψης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer K (10x, 200 mM Tris-acetate (pH 7,9 στους 25°C), 100 mM Mg-acetate, 500 mM K-acetate, 1 mg/ml BSA) του προμηθευτή MINOTECH biotechnology.

Για αντιδράσεις λιγάσης χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση του προμηθευτή New England BioLabs (NEB) με αριθμό καταλόγου M0202 και το διάλυμα T4 DNA Ligase Buffer (10X).

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε η KAPA Taq Standard πολυμεράση του προμηθευτή Kara Biosystems και το διάλυμα KAPA Taq Buffer A (10x, Tris-ammonium sulphate-base, 15 mM MgCl₂ at 10x).

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal του προμηθευτή Kara Biosystems, το οποίο περιέχει KAPA hot-start Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, MgCl₂, dNTPs και σταθεροποιητές.

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού του RNA από κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNase I του προμηθευτή New England BioLabs (NEB) με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα και το αντιδραστήριο TRI Reagent® (MRC). Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκαν η αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV και το αντιδραστήριο RNaseOUT™ του προμηθευτή Invitrogen.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν ο μάρτυρας 1 kb Plus DNA Ladder και η χρωστική Gel Loading Dye, Purple (6X) του προμηθευτή New England BioLabs (NEB).

3.1.5 Kit απομόνωσης/καθαρισμού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια *E. coli* XL1Blue χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Plasmid isolation kit του προμηθευτή Macherey-Nagel. Για την απομόνωση γονιδιακού DNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν το Higher Purity™ Genomic DNA Extraction Mini Spin Kit της εταιρίας Canvax Biotech ([{ 34 }](https://lifescience.canvaxbiotech.com/wp-content/uploads/sites/2/2015/08/HigherPurity™-Blood-Cell-culture-</p>
</div>
<div data-bbox=)

DNA-Isolation-Kit.pdf) και το EXTRACTME DNA BLOOD KIT (EM05) από την blirt (https://blirt.eu/wp-content/uploads/2018/05/DNA_BLOOD_EM05_en_05062018-min.pdf).

Για τον καθαρισμό DNA έπειτα από PCR χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit του προμηθευτή Macherey-Nagel.

3.1.6 Συσκευές και εργαλεία

Για την πραγματοποίηση PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System με αριθμό καταλόγου #185-5201.

Οι αντιδράσεις συμβατικής PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad T100 Thermal Cycler με αριθμό καταλόγου #186-1096

Οι συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων, καθώς και οι λόγοι απορροφήσεων τους μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 (micro-volume UV spectrophotometer).

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Μελέτη κωδικοποιητικού δυναμικού

Για τη μελέτη του κωδικοποιητικού δυναμικού του μακρού πιθανώς μη κωδικοποιητικού μεταγράφου RECUR1 χρησιμοποιήθηκαν τα διαδικτυακά εργαλεία CPAT (<http://lilab.research.bcm.edu/cpat/>) (L. Wang et al., 2013) και CPC2 (<http://cpc2.cbi.pku.edu.cn/>) (Kang et al., 2017).

Ανάλυση συνταινίας

Για την ανάλυση συνταινίας μεταξύ των γονιδιωμάτων του ανθρώπου και του ποντικού χρησιμοποιήθηκε ο φυλλομετρητής του WashU (<http://epigenomegateway.wustl.edu>). Οι εκδόσεις των γονιδιωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το hg19 και mm9 αντίστοιχα. Η απεικόνιση περαιτέρω δεδομένων για τη γονιδιωματική περιοχή όπου εδράζεται το RECUR1 έγινε με τη χρήση του γονιδιωματικού φυλλομετρητή του UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>).

Μελέτη έκφρασης σε δεδομένα βιοψιών και κυτταρικών σειρών

Η ανάλυση των τιμών RPKM από δεδομένα RNA-Seq σε 559 βιοψίες και 1019 κυτταρικές σειρές και η δημιουργία γραφημάτων έγινε με τη βοήθεια του Microsoft Office Excel.

Μελέτη έκφρασης RECUR1 βάσει γνωστών σημειακών πολυμορφισμών

Η συσχέτιση ανάμεσα στον γονότυπο σε ό,τι αφορά το SNP που συναντάται στον γενετικό τύπου του RECUR1 και στην έκφραση του ίδιου μεταγράφου βασίστηκε σε προηγούμενες αναλύσεις που εκπονήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και που στηρίζονται σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του στομάχου. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένα γονοτύπησης του RECUR1 SNP αξιοποιήθηκαν ώστε να δημιουργηθούν τρεις κατηγορίες όγκων (ομόζυγο-AA, ομόζυγο-αα και ετερόζυγο Αα). Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν θηκογράμματα βάσει των τυπικών τιμών της έκφρασης του RECUR1 από αποτελέσματα RNA-seq στους ίδιους όγκους και ανά κατηγορία αλληλομόρφου.

Ανάλυση αποτελεσμάτων ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Bio-Rad CFX Manager™ και του Microsoft Office Excel. Η σχετική ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέθοδο 2^{-Cq} .

3.2.2 Χαρακτηρισμός του μεταγράφου RECUR1 και μελέτη των επιπέδων έκφρασης του

Για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου RECUR1 στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές, καθώς και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεταγραφικής σίγησής του, είναι απαραίτητη η απομόνωση του ολικού RNA του κυττάρου. Η σχετική ποσοτικοποίηση των μεταγράφων RECUR1 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές και υπό διαφορετικές συνθήκες γίνεται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR). Καθώς όμως η συγκεκριμένη αντίδραση απαιτεί υπόστρωμα DNA, προηγείται ένα στάδιο σύνθεσης cDNA από το απομονωμένο ολικό RNA.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για αυτά τα βήματα παρατίθεται παρακάτω.

Απομόνωση RNA από κυτταρικές σειρές

1. Το κυτταρόλυμα από την κυτταροκαλλιέργεια συλλέγεται σε σωλήνα 1,5 ml (τύπου Eppendorf). Αρχικά προστίθενται κατευθείαν στο κυτταρόλυμα 1000μl αντιδραστηρίου TRI Reagent® (θειοκυανική γουανιδίνη, φαινόλη) του προμηθευτή MRC, το οποίο αναστέλλει τη δράση RNασών και αυξάνει την απόδοση της απομόνωσης RNA.
2. Επώαση 1' σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και έπειτα μεταφορά σε πάγο.
3. Προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο και γίνεται ισχυρή ανάδευση σε vortex για 30".
4. Φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 5 λεπτά.
5. Με μικροπιπέτα αφαιρείται το υπερκείμενο με πολλή προσοχή, ώστε να μη διαταραχθεί η μεσαία φάση, και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα 1,5 ml.
6. Προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης, ανακίνηση 1-2 φορές, επώαση στον πάγο για 10 min και έπειτα φυγοκέντρηση για 15' στα 14.000 rpm στους 4 °C.
7. Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 500μL 70% κατεψυγμένης (ice-cold) αιθανόλης, ανακίνηση σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα, φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 5'.
8. *Επανάληψη του βήματος 7.*
9. Αφαίρεση του υπερκειμένου με μικροπιπέτα, και αναμονή για 10-15' μέχρι ο ανοικτός σωλήνας να στεγνώσει τελείως. Τυχόν υπολείμματα αιθανόλης είναι πιθανόν να παρεμποδίσουν τις μετέπειτα αντιδράσεις.
10. Προσθήκη 50μL RNase free H₂O σε κάθε δείγμα με μικροπιπέτα αλλάζοντας ρύγχος κάθε φορά, θέρμανση στους 50 °C για 3 λεπτά και μετά αμέσως vortex για ανασύσταση, τοποθέτηση πάγο ή σε βαθεία κατάψυξη (-80 °C) για αποθήκευση.

Σε αυτό το σημείο κάθε δείγμα περιέχει μείγμα νουκλεϊκών οξέων (Total Nucleic Acid sample, TNA). Για την απομάκρυνση DNA απαιτείται κατεργασία με *DNάση*.

Κατεργασία με DNAση

1. Για κάθε δείγμα υπολογίζονται 30μl αντίδρασης που περιλαμβάνουν :

Αντιδραστήρια	Όγκος
NEB DNase I Buffer (10x)	3 μl
NEB DNase I	1 μl
Invitrogen RNaseOUT™	1 μl
Total Nucleic Acid (TNA)	25 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	30 μl

Η ποσότητα του RNA που θα υπάρχει στην αντίδραση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg συνολικά.

2. Αφού τοποθετηθούν τα αντιδραστήρια σε σωλήνα 1,5 ml, γίνεται σύντομη ανάδευση σε vortex και πολύ σύντομη φυγοκέντρηση σε χαμηλή ταχύτητα (ώστε η γλυκερόλη που περιέχουν τα διαλύματα αποθήκευσης να αναμιχθεί με το νερό). Μετά απευθείας τοποθετείται σε υδατόλουτρο ή σε συσκευή ξηρής θέρμανσης (dry bath) με θερμοκρασία 37 °C για 1 h.
3. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο, όπου προστίθενται 40 μl οξικού νατρίου (sodium acetate) RNA grade 3M με pH 5,6 και 310 μl ddH₂O (WFI, Water for injection) σε κάθε δείγμα.
4. Προσθήκη 400 μl φαινόλης/χλωροφόρμιου (phenol/chloroform), σε κάθε δείγμα και ανάδευση σε vortex για 30''-1'. Φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm, για 5 min στους 4 °C.
5. Αφαίρεση 400 μl από το υπερκείμενο, με πολύ προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η μεσαία φάση, και τοποθέτηση σε άδειο σωλήνα τύπου erpendorf.
6. Προσθήκη 1000 μl 100 % κατεψυγμένης (ice-cold) EtOH, ήπια ανάδευση και τοποθέτηση σε βαθεία κατάψυξη (-80 °C) για τουλάχιστον 1 h (τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε αυτό το στάδιο για εβδομάδες).
7. Απόψυξη, φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 min, 14.000 rpm, 4 °C. Αφαίρεση με πολύ προσοχή ολόκληρου του υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
8. Προσθήκη 500 μl 70 % κατεψυγμένης (ice-cold) EtOH (παρασκευασμένη με WFI). Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, 5 min, 4 °C.
9. Αφαίρεση με πολύ προσοχή του υπερκειμένου με μικροπιπέτα χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Αναμονή για 10-15' μέχρι ο ανοικτός σωλήνας να στεγνώσει τελείως. Τυχόν υπολείμματα αιθανόλης είναι πιθανόν να παρεμποδίσουν τις μετέπειτα αντιδράσεις.
10. Επαναδιάλυση με WFI στα 20-30 μl και τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 5' ώστε να γίνει επαναδιάλυση του ιζήματος. Έντονη ανάδευση σε vortex για 1 min, σύντομη φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές και ξανά ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν σε βαθεία κατάψυξη (- 80 °C).

Η συγκέντρωση του RNA στο δείγμα μπορεί να μετρηθεί στο φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000.

Σύνθεση cDNA

1. Ανάλογα με τη συγκέντρωση του RNA στο δείγμα, σε σωλήνα 1,5 ml (τύπου erpendorf) προστίθεται τόσος όγκος δείγματος, ώστε η ποσότητα RNA να είναι 1 μg, και

συμπληρώνεται ddH₂O (WFI) μέχρι τελικού όγκου 10μl (δηλαδή συγκέντρωση RNA 0,1 μg/μl).

2. Σε κάθε αραιωμένο δείγμα προστίθεται 1 μl από 10mM oligodT εκκινητές. Επίσης προστίθεται 1 μl dNTPs (10 mM) και το δείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 5 min. Μετά αμέσως πάγο.
3. Για κάθε δείγμα ετοιμάζεται το mix (MMLV/Superscript II) :

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (5x)	4 μl
DTT (100 mM)	2 μl
Invitrogen RNaseOUT™	1 μl
Invitrogen M-MLV Reverse Transcriptase	1 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	8 μl

Το Invitrogen RNaseOUT™ είναι ένας μικτού τύπου αναστολέας των RNασών A,B και C. Χρησιμοποιείται για την προστασία του RNA από αποδόμηση κατά τη διάρκεια της σύνθεσης cDNA.

4. Το mix αναδεύεται σε vortex, φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές για σύντομο χρονικό διάστημα και από αυτό προστίθενται 8 μl σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο ή σε συσκευή ξηρής θέρμανσης (dry bath) με θερμοκρασία στους 37 °C για 2 ώρες.
5. Μετά το πέρας 2 ωρών προστίθενται 380 μl ddH₂O και το δείγμα αποθηκεύεται στους -20 °C.

Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται δείγμα που δεν περιέχει αντίστροφη μεταγραφή (no RT control).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η ποσοτικοποίηση των μεταγράφων γίνεται με qPCR. Η προετοιμασία της αντίδρασης γίνεται βάσει των προδιαγραφών του κατασκευαστή του διαλύματος KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal. Οι συγκεκριμένη σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήρια	Όγκος
KAPA SYBR master mix (2x)	10 μl
Primer	2 μl
H ₂ O	4 μl
Template	4 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	20 μl

Μεταγραφική σταθερότητα του lncRNA RECUR1

Προκειμένου να εξεταστεί η μεταγραφική σταθερότητα, δηλαδή ο χρόνος υποδιπλασιασμού του μεταγράφου RECUR1, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MKN45, τα οποία είχαν εκτεθεί σε 1 μg/ml ακτινομυκίνης D. Η ακτινομυκίνη D δρα ως μεταγραφικός καταστολέας στα ευκαρυωτικά κύτταρα, επομένως στα κύτταρα τα οποία εκτίθενται σε αυτή την ουσία τα ήδη υπάρχοντα μετάγραφα δεν αναπληρώνονται.

Πριν από την έκθεση σε ακτινομυκίνη D, ελήφθη δείγμα κυττάρων, του οποίου η δειγματοληψία ορίστηκε ως χρονική στιγμή 0. Επειτα από την έκθεση σε ακτινομυκίνη D,

ελήφθησαν δείγματα στη 0,5 ώρα, 1 ώρα, 2 ώρες, 4 ώρες, 6 ώρες, 8 ώρες και 24 ώρες. Σε κάθε δείγμα κυττάρων έγινε απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και ποσοτικοποίηση των μεταγράφων με qPCR σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιεγράφηκαν παραπάνω. Εκτός από τον χρόνο παραμονής του μεταγράφου RECUR1, εξετάστηκαν στο ίδιο δείγμα cDNA και τα μετάγραφα c-myc και GATAD1, τα οποία έχουν γνωστό χρόνο ζωής, με τα επίπεδα του πρώτου να μειώνονται στο μισό μετά από μια ώρα, ενώ του δεύτερου μετά από περίπου 8 ώρες.

Υποκυτταρικός εντοπισμός του lncRNA RECUR1

Για τη μελέτη της κατανομής του μεταγράφου RECUR1 στο κύτταρο, έγινε υποκυτταρική κλασμάτωση σε δείγματα των κυτταρικών σειρών MKN45 και NUGC4. Συγκεκριμένα, έπειτα από θρυψινοποίηση και μηχανική λύση των κυττάρων, ακολουθεί διαφορική φυγοκέντρηση και συλλογή 3 κλασμάτων, ενός κυτταροπλασματικού (S2 – υπερκείμενο 2), ενός πυρηνοπλασματικού (S3 – υπερκείμενο 3) και ενός χρωματινικού (P3 – ίζημα 3).

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

1. Αρχικά, γίνεται επεξεργασία κυττάρων με θρυψίνη, προκειμένου να χαθεί η πρόσφυση των κυττάρων με την επιφάνεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Προστίθενται 2,5 ml θρυψίνης μετά από αφαίρεση του θρεπτικού που βρίσκεται στον περιέκτη καλλιέργειας, γίνεται προσθήκη ορού και ακολουθεί αφαίρεση του υγρού στοιχείου (θρυψίνη + υπολείμματα θρεπτικού). Στη συνέχεια προστίθενται εκ νέου 2,5ml θρυψίνης, στην οποία επωάζονται τα κύτταρα για 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 2,5 ml RPMI, ήπια ανάδευση και διαμοιρασμός των κυττάρων σε σωλήνες τύπου erpendorf (1,5 ml).
2. Γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 3000 στροφές, στους 4 °C και απόρριψη του υπερκειμένου.
3. Γίνεται προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος λύσης των κυττάρων (lysis buffer) σε αναλογία 1/10 με τον όγκο του ιζήματος κυττάρων που έχει δημιουργηθεί.
4. Γίνεται μηχανική ρήξη των κυττάρων με τη χρήση ομογενοποιητή, σε ήπιες συνθήκες προκειμένου να μην γίνει ρήξη της πυρηνικής μεμβράνης.
5. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές, για 5 λεπτά, στους 4°C.
6. Το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα τύπου erpendorf, σημασμένο ως S2 (supernatant 2), και αντιστοιχεί στο κυτταροπλασματικό κλάσμα.
7. Προσθέτουμε αντιδραστήριο TRI σε αναλογία 1:1 με το δείγμα S2.
8. Προσθέτουμε το buffer NLB800 στο ίζημα που περιέχει του πυρήνες.
9. Το δείγμα τοποθετείται σε κεφαλή μη σταθερής γωνίας και φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές, στους 4°C για μισή ώρα.
10. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στους 4°C, για 15 λεπτά, στις 14000 στροφές.
11. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το πυρηνόπλασμα, μεταφέρεται σε τρίτο σωλήνα τύπου erpendorf, σημασμένο ως S3 (supernatant 3).
12. Γίνεται προσθήκη 300 μl αντιδραστηρίου TRI στο ίζημα (P3-χρωματίνη) και στο S3, και όλα τα δείγματα αποθηκεύονται στους -30°C.

Σε αυτά τα κλάσματα ακολουθεί απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη μεταγράφων με qPCR.

3.2.3 Κλωνοποίηση ενθέματος DNA και διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

Για πειράματα μεταγραφικής σίγησης με χρήση short hairpin RNA (shRNA) απαιτείται η έκφραση μιας κατασκευής που θα δώσει shRNA εντός των υπό μελέτη κυττάρων. Προκειμένου να γίνει ο πολλαπλασιασμός και η εισαγωγή των σωστών κατασκευών DNA στα κύτταρα απαιτείται η ένθεσή τους σε έναν φορέα κλωνοποίησης. Μετά από την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης τους, η εισαγωγή στα κύτταρα γίνεται μέσω λεντιών.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για αυτά τα βήματα παρατίθεται παρακάτω.

Σχεδιασμός shRNA

Για τη μεταγραφική σίγηση του RECUR1 σχεδιάστηκε shRNA ολικού μήκους περίπου 50 bp. Το shRNA περιέχει μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου, καθώς και την παλίνδρομη της, έπειτα από μια σύντομη αλληλουχία-συνδέτη (linker). Το shRNA εκφράζεται ως γραμμικό μόριο, το οποίο λόγω συμπληρωματικότητας των βάσεων σχηματίζει δομή φουρκέτας (hairpin loop). Στη συνέχεια επεξεργάζεται από τις πρωτεΐνες Drosha και Dicer οδηγώντας σε παραγωγή siRNA έναντι του γονιδίου-στόχου.



Εικόνα 3.2: Παράδειγμα δομής shRNA. Απεικόνιση: RNAfold WebServer, University of Vienna <<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>> (Gruber, Lorenz, Bernhart, Neubock, & Hofacker, 2008).

Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων

Η κατασκευή που θα εντεθεί στον φορέα κλωνοποίησης και θα δημιουργήσει το shRNA αφότου εκφραστεί, προκύπτει από χημική σύνθεση μονόκλωνων συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά πρέπει να υβριδοποιηθούν, ώστε να σχηματιστούν οι αλληλουχίες που θα είναι συμπληρωματικές με τα κολλώδη άκρα του επεξεργασμένου με ένζυμα περιορισμού φορέα κλωνοποίησης.

Τα συντεθειμένα ολιγονουκλεοτίδια παραλαμβάνονται λυοφιλοποιημένα και επομένως πρέπει να ανασυσταθούν. Αυτό γίνεται με προσθήκη ddH₂O μέχρι τελικής συγκέντρωσης 100μM.

Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

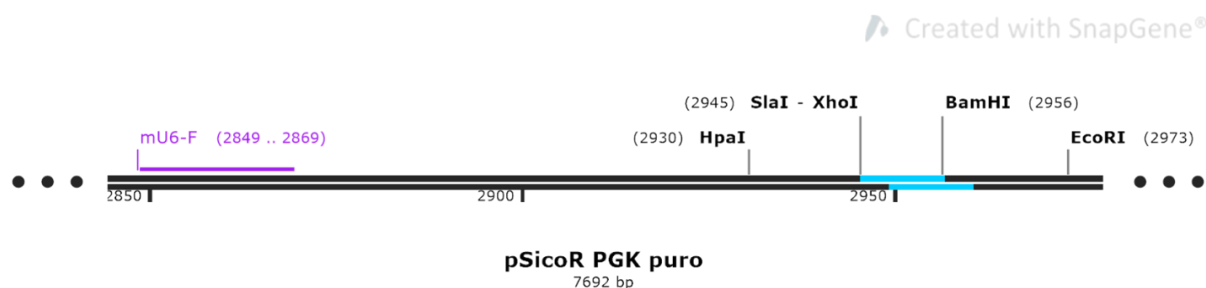
Αντιδραστήρια	Όγκος
Σημαινόντα Ολιγονουκλεοτίδια (100μM)	2 μl
Αντισημαινόντα Ολιγονουκλεοτίδια (100 μM)	2 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης (50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8)	96 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	100 μl

Το δείγμα πρέπει να φτάσει σε σημείο βρασμού για 5 λεπτά και έπειτα να αφηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 1:30 h, ώστε να κρυώσει μέχρι τους 30 °C.

Πέψη φορέα κλωνοποίησης

Ο φορέας κλωνοποίησης pSicoR υπόκειται πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XhoI/SlaI και BamHI, ώστε να αφαιρεθεί ένα τμήμα 11bp και να δημιουργηθούν κολλώδη άκρα. Έπειτα

από την πέψη, ο ανοικτός πλέον πλασμιδιακός φορέας ονομάζεται pSicoRmod, χάριν σαφήνειας.



Εικόνα 3.3: Σημεία κοπής του πλασμιδιακού φορέα pSicoR PGK puro. Το τμήμα που απομακρύνεται μετά από πέψη απεικονίζεται με γαλάζιο χρώμα. Απεικόνιση με το λογισμικό SnapGene Viewer® (GSL Biotech LLC).

Αντίδραση λιγάσης

Έπειτα από την υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων που θα αποτελέσουν το ένθεμα και την πέψη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης, ακολουθεί η αντίδραση λιγάσης, όπου το δίκλωνο πλέον ένθεμα συνδέεται ενζυμικά στα κολλώδη άκρα του φορέα κλωνοποίησης.



Εικόνα 3.4: Ένθεμα στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puro. Το εντιθέμενο τμήμα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. Απεικόνιση με το λογισμικό SnapGene Viewer® (GSL Biotech LLC).

Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα και αποτελεί τροποποίηση του πρωτόκολλου «Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202)» <<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>>.

Αντιδραστήρια	Όγκος
dsOligos (annealed RECUR1 shRNA)	10μl
pSiCORmod (XhoI/BamHI) (50ng/μl)	1,5μl
Buffer T4 ligase (NEB)	2μl
T4 ligase (NEB)	2μl
dH ₂ O	4,5μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	20μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια ολονύκτιας επώασης στους 16 °C.

Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται δείγμα στο οποίο δεν προστίθενται τα δίκλινα ολιγονουκλεοτιδία η έκφραση των οποίων θα δώσει shRNA έναντι του μεταγράφου RECUR1. Σε αυτό το δείγμα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τα πλασμίδια μπορούν να επανακυκλοποιηθούν μερικώς, καθώς τα κολλώδη άκρα δεν είναι συμπληρωματικά. Για αυτόν τον λόγο, το συγκεκριμένο δείγμα ελέγχου ονομάζεται Self-Ligation control (SL).

Μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* XL1Blue με θερμικό σοκ

Τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα σε βαθεία κατάψυξη (-80 °C), σε διάλυμα αποθήκευσης που περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης.

Για τον μετασχηματισμό των βακτηρίων ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

(Τα βήματα της συγκεκριμένης διαδικασίας λαμβάνουν χώρα σε ημι-αποστειρωμένο χώρο, κάτω από τη φλόγα λύχνου Bunsen)

1. Από την ολική ποσότητα βακτηρίων μοιράζονται 100μl σε σωλήνες 1,5 ml (τύπου erpendorf) ανάλογα με τον αριθμό των συνθηκών που θέλουμε να εξετάσουμε.
2. Από το προϊόν αντίδρασης λιγάσης με τελικό όγκο 20μl προστίθενται 10μl.
3. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στον πάγο για 20 λεπτά.
4. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθεί το θερμικό σοκ των βακτηρίων. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ή σε συσκευή ξηρής θέρμανσης (dry bath) με θερμοκρασία 42-45°C για 50 δευτερόλεπτα. Το θερμικό σοκ οδηγεί σε άνοιγμα πόρων στη μεμβράνη των βακτηρίων, από όπου θα μπορεί να εισέλθει το ξένο DNA (πλασμίδιο).
5. Οι σωλήνες που περιέχουν τα βακτήρια τοποθετούνται ξανά στον πάγο για 2 λεπτά, ώστε να αποκατασταθούν οι ασυνέχειες στη μεμβράνη που δημιούργησε το θερμικό σοκ.
6. Το περιεχόμενο του σωλήνα προστίθεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με πύμα που περιέχουν 1-3 ml θρεπτικού υλικού SOB χωρίς αντιβιοτικό. Οι σωλήνες θα πρέπει να παραμείνουν σε επωαστήριο για 50 λεπτά, στις 160 στροφές το λεπτό, στους 37 °C. Αυτό είναι απαραίτητο ώστε να δοθεί χρόνος στα βακτήρια να εκτελέσουν έναν κύκλο αναδιπλασιασμού και επομένως, όσα κύτταρα έχουν λάβει το πλασμίδιο, να εκφράσουν το γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό που θα υπάρχει στο θρεπτικό υλικό στο οποίο θα αναπτυχθούν.
7. Έπειτα από το πέρας της επώασης γίνεται επίστρωση της βακτηριακής καλλιέργειας σε τρυβλία που περιέχουν LB agar με την προσθήκη 100 ng/μl αμπικιλίνης, η οποία καθιστά δυνατή την επιλογή των κλώνων που έχουν μετασχηματιστεί.
8. Τα επιστρωμένα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστήριο για περίπου 16 ώρες, μέχρις ότου να αναπτυχθούν αποικίες, οι οποίες όμως θα ξεχωρίζουν μεταξύ τους.
9. Από το τρυβλίο μπορεί να ληφθεί ένας ή περισσότεροι κλώνοι για να εξεταστεί εάν τα πλασμίδια που περιέχουν έχουν λάβει το ένθεμα με τον σωστό τρόπο. Οι επιλεγμένες αποικίες που αποτελούν μοναδιαίο κλώνο, αναπτύσσονται σε επωαστήριο στους 37 °C, στις 210 στροφές, σε θρεπτικό υλικό LB Broth που περιέχει αμπικιλίνη.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Προκειμένου να εξεταστεί η επιτυχής ένθεση της επιθυμητής κατασκευής DNA στους πλασμιδιακούς φορείς, απαιτείται η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από έναν βακτηριακό κλώνο. Για τη διαδικασία αυτή υπάρχουν τόσο πρωτόκολλα που περιέχουν ευρέως διαθέσιμα αντιδραστήρια, όσο και εμπορικά διαθέσιμα kit. Εν προκειμένω χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο προσεγγίσεις.

Παρατίθεται το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη χρήση διαθέσιμων αντιδραστηρίων.

Αρχικά παρασκευάζονται τα ρυθμιστικά διαλύματα που θα χρειαστούν, ως εξής:

Διάλυμα I (Lysis buffer I) (Φυλάσσεται στους 4 °C):

- a) 50mM Tris : 2,5 ml από 1 M stock (για 50 ml buffer)
- b) 10mM EDTA : 1 ml από 0,5 M stock (για 50 ml buffer)
- c) ddH₂O : 46,5 ml

Διάλυμα II (Lysis buffer II):

- a) 1% SDS : 1 ml από 10 % SDS stock (για 10 ml buffer)
- b) 0,2M NaOH : 400 μl 5M NaCl (για 10 ml buffer)
- c) ddH₂O : 8,6 ml

Διάλυμα III (Lysis buffer III) 3 M KOAc, pH 6,0 (Φυλάσσεται στους 4 °C):

- a) 60ml 5M οξικό κάλιο (49,07g οξικού καλίου σε 100ml H₂O)
- b) 11,5ml άνυδρου οξικού οξέως
- c) 28,5ml ddH₂O

Βήματα:

1. Σε σωλήνα 1,5 ml (τύπου erpendorf), προστίθεται δείγμα από την βακτηριακή καλλιέργεια.
2. Ο σωλήνας φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στους 4 °C, στις μέγιστες στροφές. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
3. Προστίθενται 100 μl διαλύματος I (σε θερμοκρασία 4 °C), μαζί με RNase A συγκέντρωσης 100 μg/ml.
4. Τα δείγματα αναδεύονται σε vortex.
5. Προστίθενται 200 μl διαλύματος II (σε θερμοκρασία δωματίου) και γίνεται ήπια ανάδευση. Το διάλυμα II πρέπει να παρασκευάζεται εκ νέου για κάθε καινούρια διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση του SDS.
6. Στη συνέχεια γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων.
7. Έπειτα, προστίθενται 150 μl του διαλύματος III (σε θερμοκρασία 4 °C) και γίνεται ήπια ανάδευση.
8. Ακολουθεί περαιτέρω επώαση 5 λεπτών σε πάγο.
9. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στους 4 °C, στις μέγιστες στροφές.
10. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωλήνα 1,5 ml (τύπου erpendorf), ενώ ο σωλήνας με το ίζημα απορρίπτεται.
11. Προστίθεται 1 ml 99+% EtOH και γίνεται ανάδευση σε vortex.
12. Ακολούθως, τα δείγματα παραμένουν για 20 λεπτά σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C).
13. Αφού αφαιρεθούν από την κατάψυξη, τα δείγματα φυγοκεντρούνται αμέσως για 20 λεπτά στους 4 °C, στις μέγιστες στροφές.
14. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, και προστίθενται 600 μl 70% EtOH.
15. Γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4 °C, στις μέγιστες στροφές.
16. Το υπερκείμενο αφαιρείται με μικροπιπέτα, και ο σωλήνας παραμένει ανοικτός για 10-15' μέχρι να στεγνώσει τελείως.
17. Το ίζημα επαναιωρείται σε 70 μl ddH₂O.

Επιπρόσθετα, για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το Macherey-Nagel NucleoSpin® Plasmid isolation kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πέψη πλασμιδίου με ένζυμα περιορισμού

Για τον έλεγχο της ένθεσης της επιθυμητής κατασκευής στους πλασμιδιακούς φορείς που απομονώθηκαν, μπορεί να γίνει διαγνωστική πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Αυτά είναι το BamHI, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και κατά την αρχική πέψη του φορέα κλωνοποίησης, και το XbaI, το οποίο βρίσκεται εξωτερικά της θέσης όπου εντίθεται η κατασκευή που θα δώσει το shRNA.

Αντιδραστήρια	Όγκος	
Κατασκευή pSicoRmod ή Επανακυκλοποιημένο (SL, Self-ligated) control	2 μg pSicoRmod με επιβεβαιωμένο ένθεμα ή κενού φορέα pSicoR PGK puro	10μl
BamHI(minotech)		2μl
XbaI (minotech)		2μl
Buffer K(10x) (minotech)		5μl
H ₂ O		31μl
Τελικός όγκος αντίδρασης		50μl

Ως δείγμα θετικού ελέγχου μπορεί να χρησιμοποιηθεί φορέας κλωνοποίησης, όπου έχει εισαχθεί διαφορετικό ένθεμα, η εισαγωγή του οποίου έχει επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση. Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται το επανακυκλοποιημένο πλασμίδιο (SL control) και ο κενός πλασμιδιακός φορέας pSicoR PGK puro (empty pSicoR).

Η πέψη των διαφορετικών τύπων πλασμιδιακού φορέα με τα ένζυμα BamHI και XbaI, θα αποδώσει τμήματα με διαφορετικό μέγεθος και διαμόρφωση. Τόσο ο άδειος φορέας, όσο και ο φορέας που φέρει το ένθεμα θα κοπούν στις δύο θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού δίνοντας δύο τμήματα. Στην περίπτωση του άδειου φορέα το ένα από αυτά τα τμήματα θα είναι μικρότερο κατά περίπου 50 bp, καθώς δεν θα περιέχει την αλληλουχία που έχει εντεθεί μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης BamHI και SmaI.

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης απαιτείται η αλληλούχηση τμήματος του πλασμιδιακού φορέα. Στον φορέα pSicoR-PGK-Puro χρησιμοποιείται ο εκκινητής mU6-F για την αλληλούχηση.

Επιμόλυνση κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα

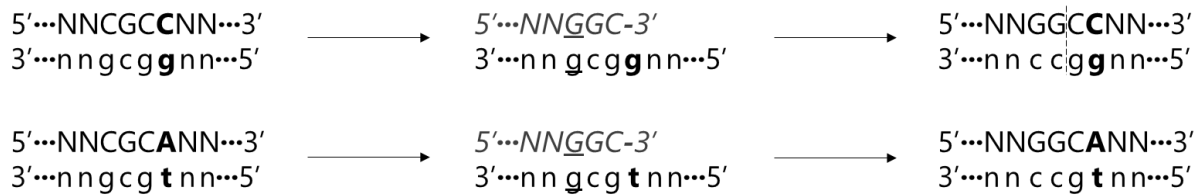
Η διαδικασία επιμόλυνσης έγινε με χρήση λεντιών και περιγράφεται σε προηγούμενες πτυχιακές του εργαστηρίου.

3.2.4 Γονοτύπηση κυτταρικών σειρών με τη μέθοδο derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS)

Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των διαθέσιμων κυτταρικών σειρών του στομάχου όσον αφορά τον υπό μελέτη σημειακό πολυμορφισμό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).

Η μέθοδος αυτή αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), η οποία βασίζεται στην ύπαρξη ενός πολυμορφισμού του οποίου το ένα

αλληλόμορφο δημιουργεί μια θέση αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού. Με αυτόν τον τρόπο, η επιτυχία ή αποτυχία της πέψης από το συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού υποδεικνύει το αλληλόμορφο της υπό μελέτη αλληλουχίας. Σε περίπτωση που το SNP ενδιαφέροντος δεν βρίσκεται εντός μιας θέσης αναγνώρισης ενός ευρέως διαθέσιμου ενζύμου περιορισμού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος dCAPS, η οποία βασίζεται στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με εξειδικευμένους εκκινητές που σχηματίζουν αταίριαστα ζεύγη βάσεων, προκειμένου να εισαγάγουν μια θέση αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού, ανάλογα με τη θέση του υπό μελέτη SNP (Neff, Neff, Chory, & Pepper, 1998).



Εικόνα 3.5: Παράδειγμα χρήσης της μεθόδου dCAPS για δημιουργία θέσης αναγνώρισης από το ένζυμο BshFI. Με έντονη γραφή εμφανίζονται τα υπό μελέτη SNP και τα αταίριαστα ζεύγη βάσεων μεταξύ εκκινητή και εκμαγείου DNA είναι υπογραμμισμένα.

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA (gDNA)

Προκειμένου να γίνει η γονοτύπηση για το SNP ενδιαφέροντος στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του στομάχου, απαιτείται η απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αυτές. Προς αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα εμπορικά διαθέσιμα kit:

Canvax Biotech Higher Purity™ Genomic DNA Extraction Mini Spin Kit (Πρωτόκολλο B: DNA Purification from Cultured Cells) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

<<https://lifescience.canvaxbiotech.com/wp-content/uploads/sites/2/2015/08/HigherPurity™-Blood-Cell-culture-DNA-Isolation-Kit.pdf>>

blirt EXTRACTME DNA BLOOD KIT (EM05), τροποποιημένο ώστε να προηγείται ανασύσταση ιζήματος κυττάρων σε 500 μl PBS.

Ακολούθως, η συγκέντρωση και η καθαρότητα του gDNA μπορεί να μετρηθεί στο φασματοφωτόμετρο Quawell.

dCAPS - PCR

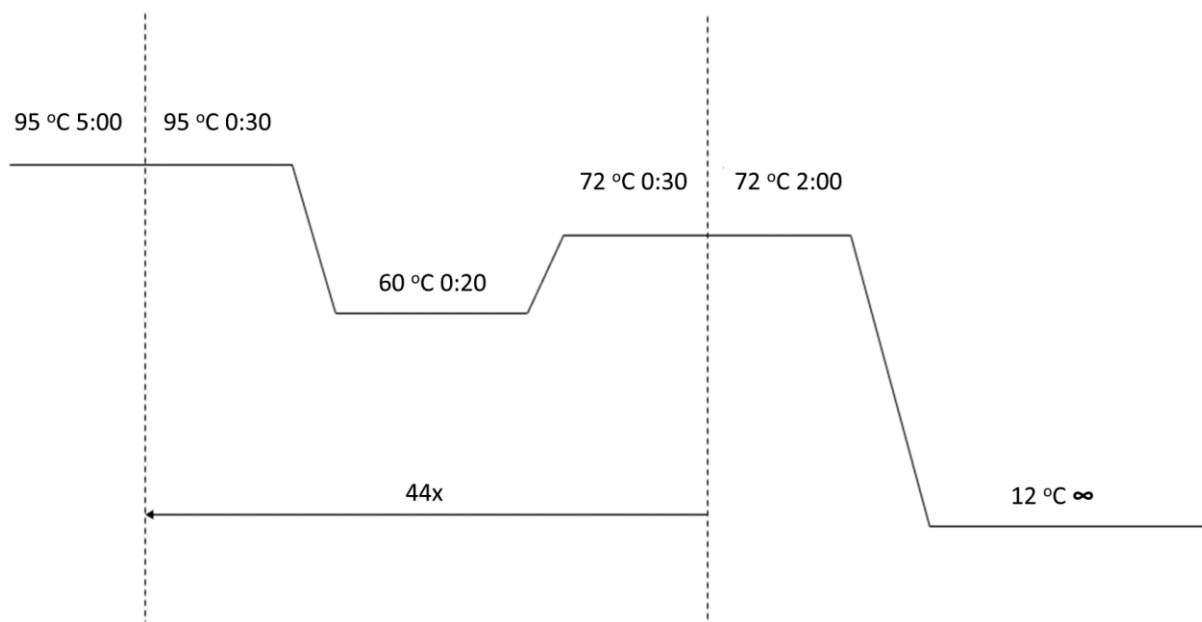
Προκειμένου να δημιουργηθούν θέσεις αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού ανάλογα με το SNP που διαθέτει το εκμαγείο DNA, σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές. Σε ό,τι αφορά το RECUR1, για τον συχνότερα απαντώμενο πολυμορφισμό, έπειτα από PCR με εξειδικευμένους εκκινητές δημιουργείται θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BshFI.

Η σύσταση της αντίδρασης είναι η εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκος	
10x Taq A Buffer (+MgCl ₂)	5 μl	
10 μM dNTPs	1 μl	
dCAPS Primer F	1 μl	2 μl

dCAPS Primer R	1 μ l	
DNA Template	x μ l (100 ng)	
H ₂ O	(41,7-x) μ l	
Taq (KAPA Biosystems)	0,3 μ l	
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μ l	

Η ποσότητα gDNA που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο ήταν 100 ng, επομένως είναι απαραίτητος ο καθορισμός της συγκέντρωσης του.



Εικόνα 3.6: Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή για το βήμα PCR της μεθόδου dCAPS.

dCAPS – Καθαρισμός προϊόντων PCR

Προκειμένου η πέψη από τα ένζυμα περιορισμού να έχει υψηλή απόδοση, απαιτείται η απομάκρυνση ανεπιθύμητων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (μικρού μήκους εκκινητές), ενζύμων (πολυμεράση Taq), ρυθμιστικών διαλυμάτων και αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη PCR. Προς αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο 5.1 του NucleoSprin® Gel and PCR Clean-up kit του προμηθευτή Macherey-Nagel. Ο όγκος του διαλύματος έκλουσης (EB) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 30 μ l.

dCAPS - Πέψη προϊόντων PCR

Το καθαρισμένο προϊόν της PCR (30 μ l) χωρίζεται ισομερώς σε δύο σωλήνες 1,5 ml (τύπου erpendorf), όπου προστίθενται τα ίδια αντιδραστήρια, με τη διαφορά ότι σε έναν δεν θα προστεθεί το ένζυμο περιορισμού. Επομένως, ένα μέρος του προϊόντος της PCR δεν θα υποστεί πέψη (στο εξής intact product) και θα μπορεί αν χρησιμοποιηθεί ως δείγμα ελέγχου με το οποίο θα συγκριθεί το μέρος που υπόκειται σε πέψη (στο εξής digested product).

Η σύσταση της αντίδρασης πέψης είναι η ακόλουθη:

Digested product

Αντιδραστήρια	Όγκος	
Sample	15 μ l	15 μ l
Buffer K (10x) (minotech)	3 μ l	2 μ l
BshFI (minotech)	2 μ l	2 μ l
H ₂ O	10 μ l	1 μ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	30 μ l	20 μ l

Intact product

Αντιδραστήρια	Όγκος	
Sample	15 μ l	15 μ l
Buffer K (10x) (minotech)	3 μ l	2 μ l
H ₂ O	12 μ l	3 μ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	30 μ l	20 μ l

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης σε πηκτική αγαρόζης 2% - με ρυθμιστικό διάλυμα TBE.

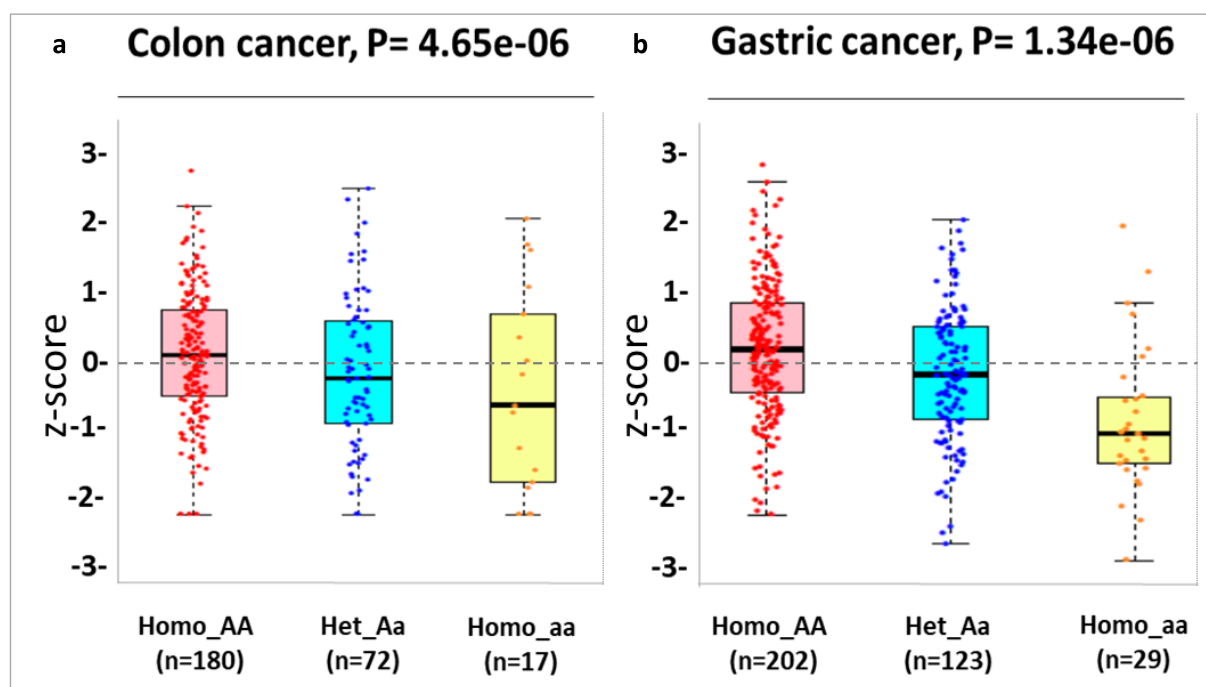
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Στο πλαίσιο του γενικότερου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου, προηγούμενες μελέτες συνδύασαν δεδομένα γονιδιωματικής στον καρκίνο καρκίνου με δεδομένα μεταγραφομικής σε βιοψίες γαστρικών όγκων με στόχο την εύρεση SNP σε γενετικούς τόπους lncRNA με πιθανό ρόλο στην έκφραση τους. Από αυτήν τη μελέτη προέκυψε το RECUR1, του οποίου τα πρότυπα έκφρασης και η συσχέτιση τους με σημειακούς πολυμορφισμούς του περιγράφονται παρακάτω.

Μελέτη έκφρασης RECUR1 βάσει γνωστών σημειακών πολυμορφισμών

Για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών αλληλομόρφων ενός σημειακού πολυμορφισμού στην έκφραση του RECUR1 χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα έκφρασης από βιοψίες καρκίνου του παχέος εντέρου και του στομάχου που συνοδεύονταν από γονιδιωματικά δεδομένα. Ο σημειακός πολυμορφισμός που μελετήθηκε βρίσκεται στον γενετικό τόπο από τον οποίο μεταγράφεται το RECUR1 και έχει δύο αλληλόμορφα, εκ των οποίων το ένα εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη συχνότητα στον πληθυσμό. Βάσει αυτών των δεδομένων, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα της εικόνας 4.1, τα οποία συσχετίζουν τις τυπικές τιμές έκφρασης (πηλίκο της διαφοράς τιμών έκφρασης από τον αριθμητικό μέσο προς την τυπική απόκλιση του συνόλου δεδομένων) με τον γονότυπο.

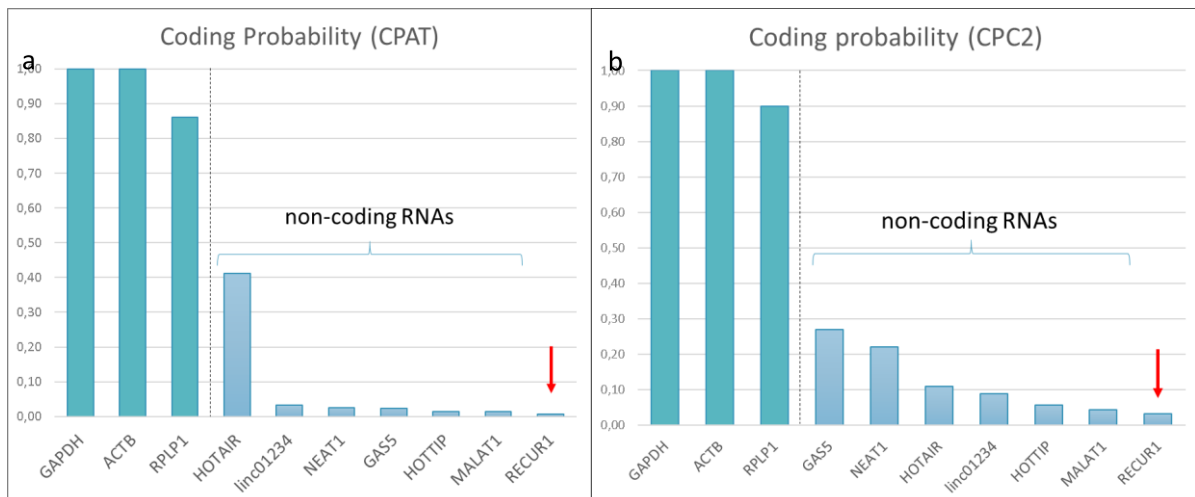


Εικόνα 4.1: Θηκογράμματα απόκλισης στην έκφραση του RECUR1 από τον μέσο όρο ανά αλληλόμορφο σε καρκίνο α) παχέος εντέρου και β) στομάχου. Ο άξονας γ'γ αφορά σε τυπικές τιμές (z-score).

Η έκφραση του RECUR1 φαίνεται να εξαρτάται από το αλληλόμορφο του σημειακού πολυμορφισμού. Συγκεκριμένα, η έκφραση του RECUR1 είναι κατά μέσο όρο χαμηλότερη σε βιοψίες όγκων όπου το σπανιότερο αλληλόμορφο (a) βρίσκεται σε ομοζυγωτία, μεγαλύτερη όταν το συχνότερα απαντώμενο αλληλόμορφο (A) βρίσκεται σε ομοζυγωτία και ενδιάμεση στην ετερόζυγη κατάσταση. Αυτό το αποτέλεσμα είναι πιο εμφανές στον καρκίνο του στομάχου σε σύγκριση με τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

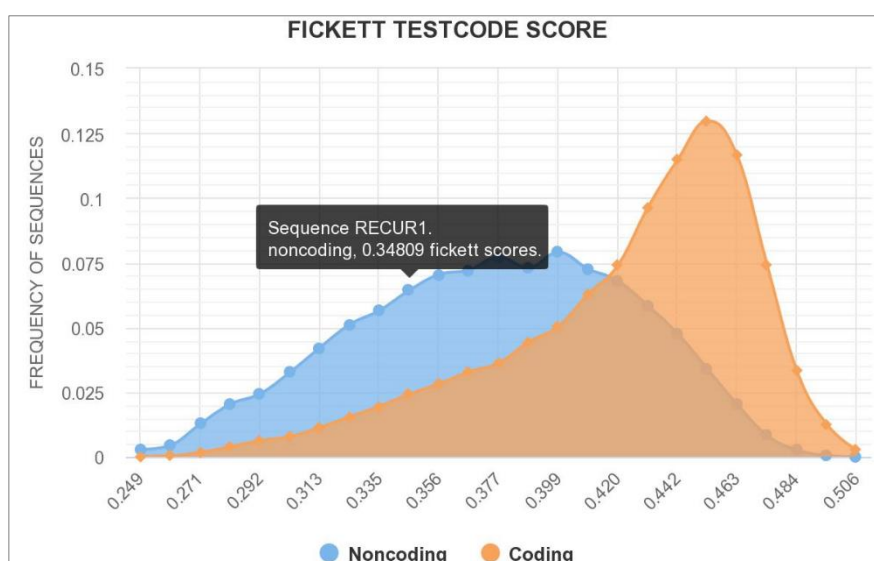
Μελέτη κωδικοποιητικού δυναμικού του μεταγράφου RECUR1

Για τη μελέτη της ικανότητας του υπό μελέτη μεταγράφου RECUR1 να κωδικοποιεί για πεπτιδίο χρησιμοποιήθηκαν τα διαδικτυακά εργαλεία CPAT και CPC2. Επιπρόσθετα, έγινε σύγκριση του με μετάγραφα πειραματικά επιβεβαιωμένων κωδικοποιητικών (*GAPDH*, *ACTB*, *RPLP1*) και μη κωδικοποιητικών (*GAS5*, *NEAT1*, *HOTTIP*, *HOTAIR*, *linc01234*, *MALAT1*) γονιδίων, των οποίων το κωδικοποιητικό δυναμικό υπολογίστηκε βάσει της αλληλουχίας cDNA. Το RECUR1 χαρακτηρίστηκε ως μη κωδικό και από το CPAT και από το CPC2.



Εικόνα 4.2: Υπολογισμός κωδικοποιητικού δυναμικού γνωστών κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών RNA σε σύγκριση με το μετάγραφο RECUR1 (υποδεικνύεται από το βέλος). Βάσει τιμών από τα διαδικτυακά εργαλεία α)CPAT και β)CPC2.

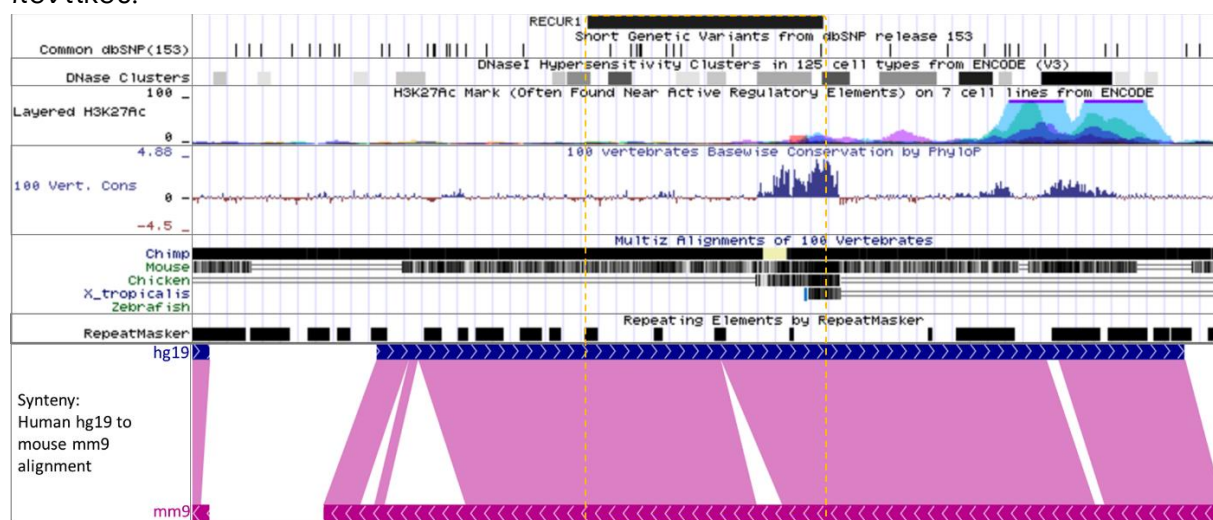
Τα διαδικτυακά εργαλεία αυτά χρησιμοποιούν μια πληθώρα αλγορίθμων για τον υπολογισμό του κωδικοποιητικού δυναμικού. Ένας από αυτούς είναι ο Fickett TESTCODE, που μετράει τη συμμετρικότητα της κατανομής των νουκλεοτιδίων σε καθεμιά από τις τρεις θέσεις ενός κωδικονίου ενός πιθανού ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) (Fickett, 1982). Το αποτέλεσμα της εξεταζόμενης αλληλουχίας (RECUR1) σε σύγκριση με επιβεβαιωμένες κωδικοποιητικές και μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες φαίνεται στην εικόνα 4.3.



Εικόνα 4.3: CPC2: Ταξινόμηση αλληλουχία RECUR1 βάσει αποτελέσματος Fickett TESTCODE.

Ανάλυση συνταινίας

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 1.4, τα lncRNA κατά κανόνα δεν εμφανίζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης αλληλουχίας ανάμεσα στα διάφορα είδη σε σύγκριση με κωδικοποιητικά RNA. Εντούτοις, για τον καλύτερο χαρακτηρισμό ενός νέου μεταγράφου μπορεί να είναι χρήσιμα και πειράματα *in vivo*. Σε περίπτωση που υπάρχει μεγάλος βαθμός συντήρησης στην αλληλουχία ενός μεταγράφου μεταξύ διαφορετικών ειδών, ενδέχεται να υπάρχει και συντήρηση στη λειτουργία, και επομένως ένα άλλο είδος να αποτελέσει εργαλείο για μελέτη ανθρώπινων lncRNA. Ο ποντικός αποτελεί έναν ευρύτατα χρησιμοποιούμενο οργανισμό-μοντέλο και άρα κρίνεται σκόπιμη η σύγκριση των αλληλουχιών από τις οποίες μεταγράφεται το εξεταζόμενο lncRNA. Η συντήρηση τμημάτων ανάμεσα σε δύο χρωμοσώματα ονομάζεται συνταινία. Για το RECUR1 πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συνταινίας ανάμεσα στα γονιδιώματα του ανθρώπου (έκδοση hg19) και του ποντικού (έκδοση mm9) με τη βοήθεια του φυλλομετρητή WashU. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.4 η αλληλουχία RECUR1 εμφανίζει σχετικά υψηλή συντήρηση στο γονιδίωμα του ποντικού.

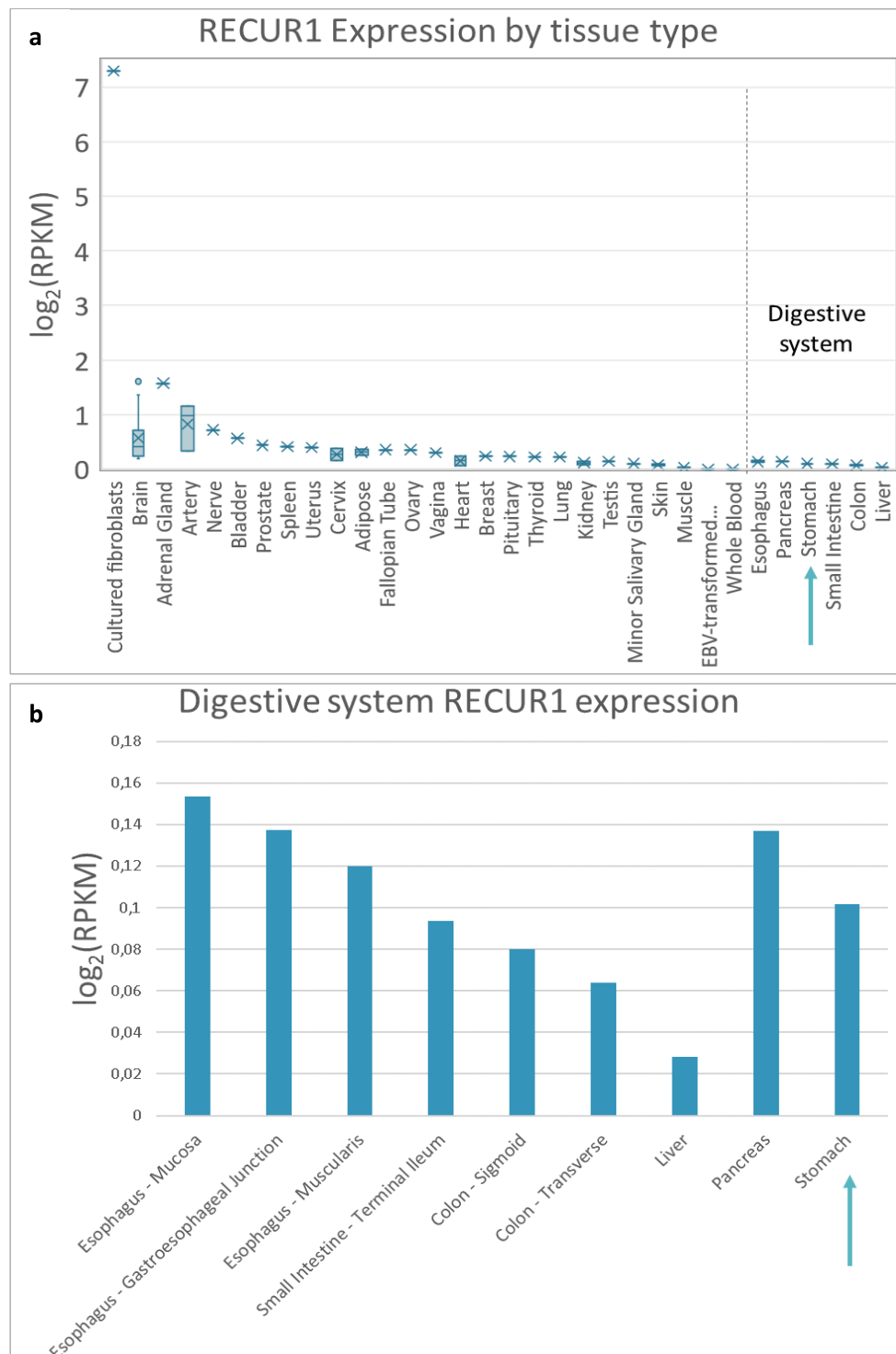


Εικόνα 4.4: Δεδομένα πολυμορφισμών από dbSNP, συμπλέγματα υπερευαισθησίας σε DNάση I, σήματα H3K27Ac (υποδηλώνει ενεργούς ενισχυτές/ ρυθμιστικά στοιχεία μεταγραφής), συντήρηση αλληλουχίας μεταξύ σπονδυλωτών από τον γονιδιωματικό φυλλομετρητή UCSC. Ανάλυση συνταινίας ανάμεσα στα γονιδιώματα του ανθρώπου και του ποντικού για το RECUR1.

Μελέτη έκφρασης σε δεδομένα βιοψιών και κυτταρικών σειρών

Για την εύρεση ενός lncRNA με πιθανή επίδραση στην ογκογένεση, το οποίο να μπορεί να αξιοποιηθεί προγνωστικά ή θεραπευτικά, είναι απαραίτητη η ιστοειδική και καρκινοειδική έκφρασή του. Για τον λόγο αυτό, κατά τα πρώτα στάδια επιλογής ενός ερευνητικά αξιοποιήσιμου lncRNA, η ανάλυση των επιπέδων έκφρασής του σε διάφορους ιστούς, καρκινικούς και μη, μπορεί να φανεί χρήσιμη. Η έκφραση του μεταγράφου RECUR1 μελετήθηκε, επομένως, σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών, έπειτα από βιοπληροφορική ανάλυση ακατέργαστων δεδομένων RNA-Seq περιορισμένης πρόσβασης από βιοψίες και κυτταρικές σειρές. Όλα τα μεταγραφικά δεδομένα που παρατίθενται είναι εκφρασμένα ως δυαδικός λογάριθμος τιμών RPKM (Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads).

Η πρώτη ανάλυση, της οποίας τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 4.5, αφορά σε βιοψίες από μη καρκινικούς ιστούς ενηλίκων ατόμων.

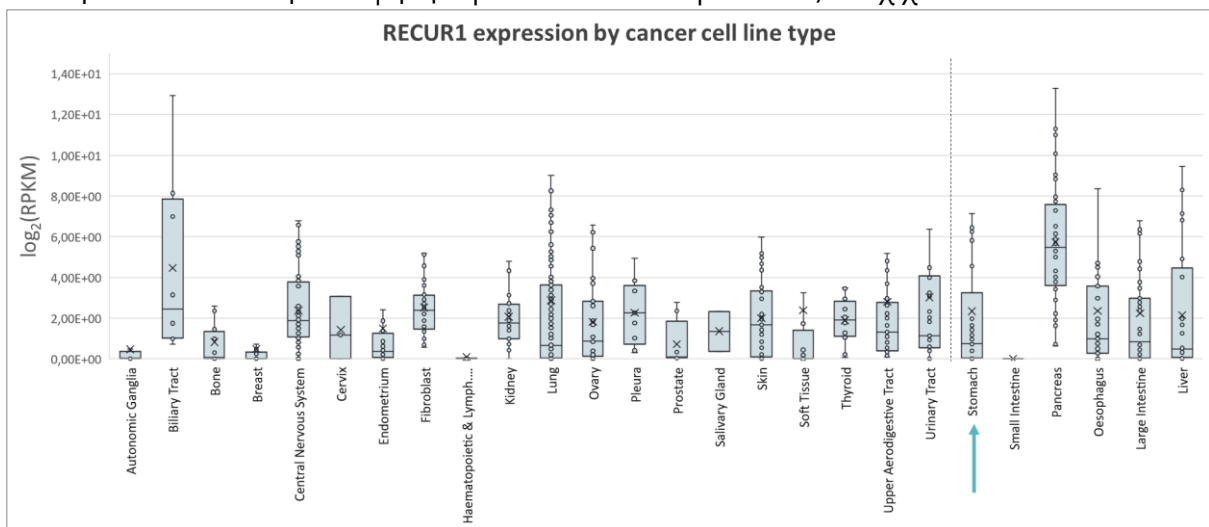


Εικόνα 4.5: Επίπεδα έκφρασης RECUR1 σε βιοψίες από μη καρκινικούς ιστούς. α) Θηκόγραμμα (boxplot) επιπέδων έκφρασης του RECUR1 ανά ιστό. β) Μέσος όρος επιπέδων έκφρασης RECUR1 ανά ιστό του πεπτικού συστήματος. Τα δεδομένα βιοψιών στομάχου υποδεικνύονται με βέλος. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε RPKM έπειτα από λογαρίθμηση.

Από τα αποτελέσματα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι φυσιολογικά το RECUR1 εμφανίζει χαμηλή έκφραση στο στομάχο ενώ τα επίπεδα έκφρασης του σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς του γαστρεντερικού συστήματος είναι στα επίπεδα του πειραματικού

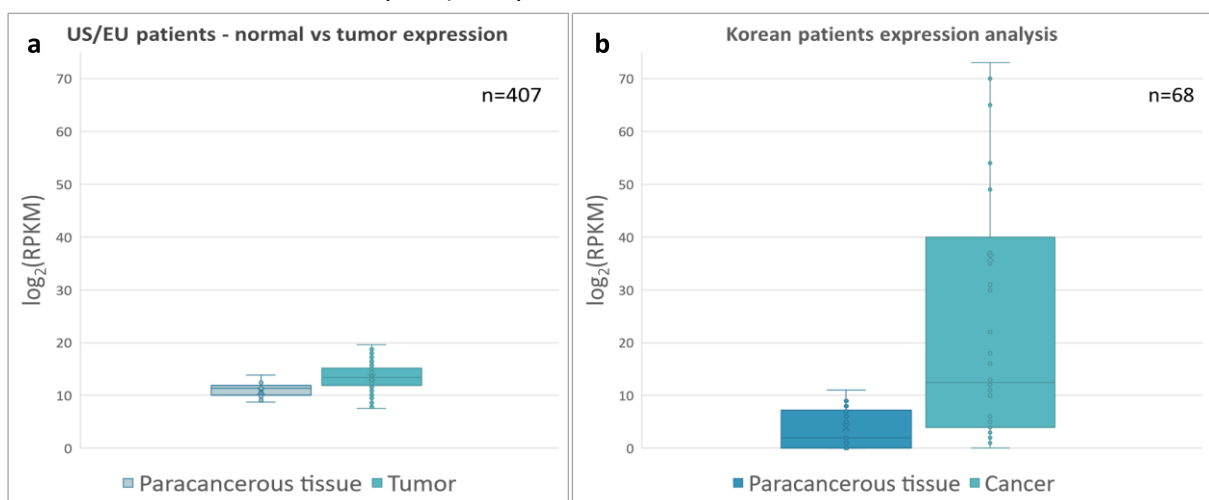
θορύβου. Επιπλέον, δεν εμφανίζεται μεγάλη διακύμανση μεταξύ των υπόλοιπων φυσιολογικού τύπου ιστών.

Η επόμενη ανάλυση αφορά στην έκφραση του RECUR1 σε διάφορους τύπους καρκινικών κυτταρικών σειρών. Το θηκόγραμμα (boxplot) της εικόνας 4.6 κατασκευάστηκε με ταξινόμηση των κυτταρικών σειρών βάσει του ιστού προέλευσης τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέσες τιμές έκφρασης είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές που παρουσιάζονται στην εικόνα 4.5a, ενώ σε ορισμένες κυτταρικές σειρές η έκφραση είναι μηδενική, γεγονός που υποδηλώνεται από την επαφή ορισμένων πλαισίων με τον άξονα χ'χ'.



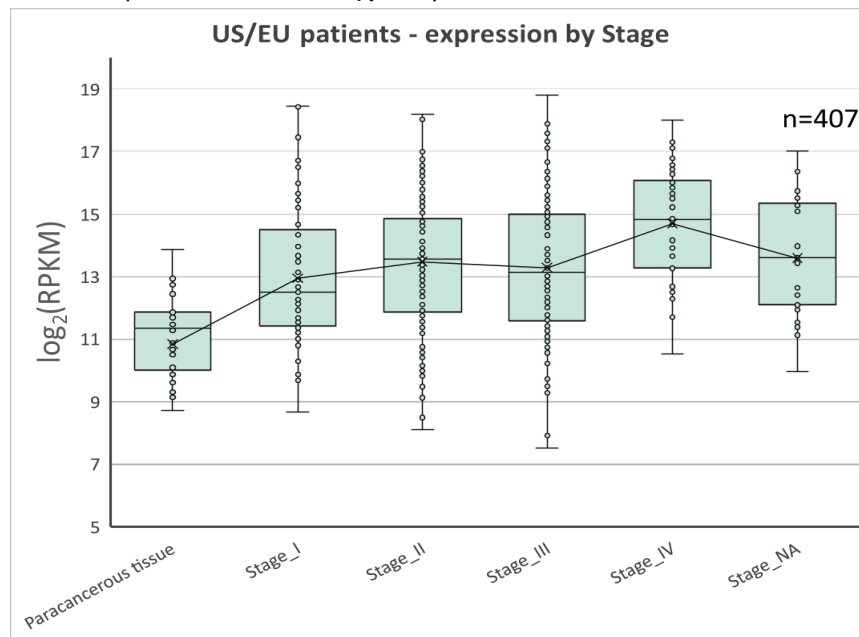
Εικόνα 4.6: Θηκόγραμμα επιπέδων έκφρασης RECUR1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Το πλαίσιο που αντιστοιχεί σε κυτταρικές σειρές στομάχου υποδεικνύεται με βέλος. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε RPKM έπειτα από λογαρίθμηση.

Για την περαιτέρω μελέτη της καρκινοειδικότητας του RECUR1 εξετάστηκαν δεδομένα έκφρασης σε βιοψίες όγκων και παρακείμενων φυσιολογικού τύπου ιστών. Τα δεδομένα αυτά αφορούσαν σε ασθενείς από τις Η.Π.Α, την Ευρώπη και τη Νότια Κορέα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι τιμές έκφρασης που αφορούν σε Κορεάτες ασθενείς εμφανίζουν μεγαλύτερη διακύμανση, αλλά είναι και κατά μέσο όρο υψηλότερες σε σύγκριση με τους ασθενείς από τις Η.Π.Α και την Ευρώπη (εικόνα 4.7).



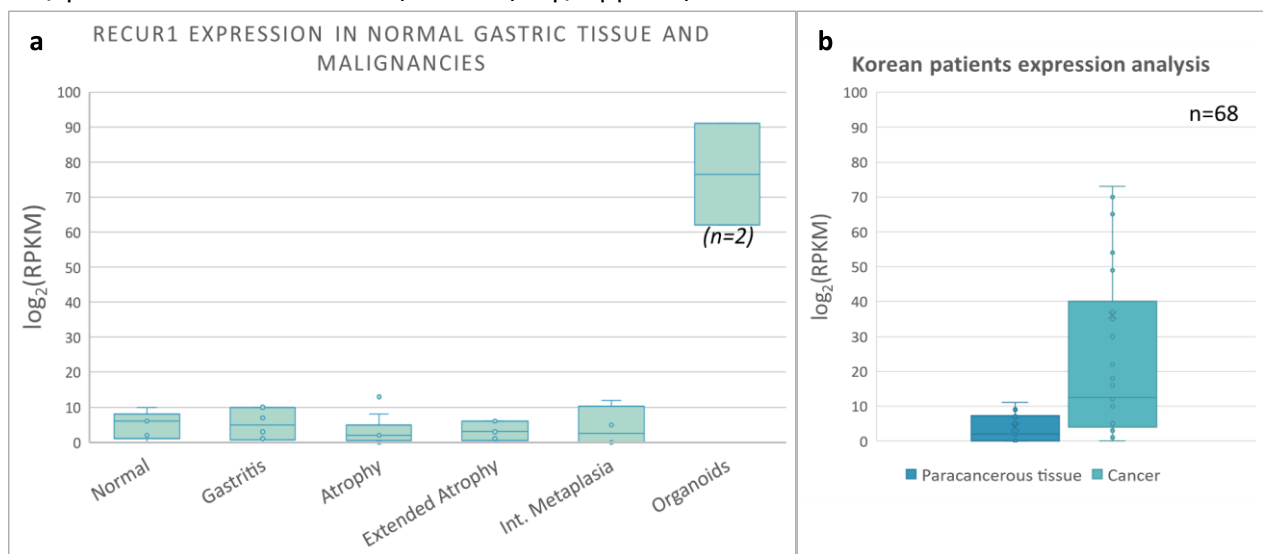
Εικόνα 4.7: Θηκογράμματα επιπέδων έκφρασης RECUR1 σε βιοψίες από όγκους σε σύγκριση με παρακαρκινικό φυσιολογικού τύπου ιστό. α) ασθενείς από Ευρώπη και Η.Π.Α., β) ασθενείς από Νότια Κορέα). Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε RPKM έπειτα από λογαρίθμηση.

Για την πλειοψηφία του συνόλου δεδομένων ασθενών από την Ευρώπη και τις Η.Π.Α. ήταν γνωστό το στάδιο του όγκου από τον οποίο λήφθηκε η βιοψία. Επομένως, έγινε ταξινόμηση βάσει των τιμών έκφρασης του RECUR1 βάσει σταδίου (εικόνα 4.8) και παρατηρήθηκε αύξουσα τάση στην έκφραση σε πιο προχωρημένα στάδια.



Εικόνα 4.8: Θηκόγραμμα επιπέδων έκφρασης RECUR1 σε βιοψίες ασθενών (Ευρώπη, Η.Π.Α.) ανά στάδιο καρκίνου. Η σειρά δεδομένων Stage_NA αφορά σε βιοψίες από όγκους αδιευκρίνιστου σταδίου. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε RPKM έπειτα από λογαρίθμηση.

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 1.2.2, στον εντερικού τύπου ιστολογικό υπότυπο του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, κατά το μοντέλο Correa, παρατηρείται μια σταδιακή πορεία εμφάνισης προκαρκινικών αλλοιώσεων. Βάσει δεδομένων έκφρασης από βιοψίες σε διάφορα στάδια της πορείας κατά Correa και από τρισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες οργανοειδών κατασκευάστηκε το θηκόγραμμα της εικόνας 4.9a.



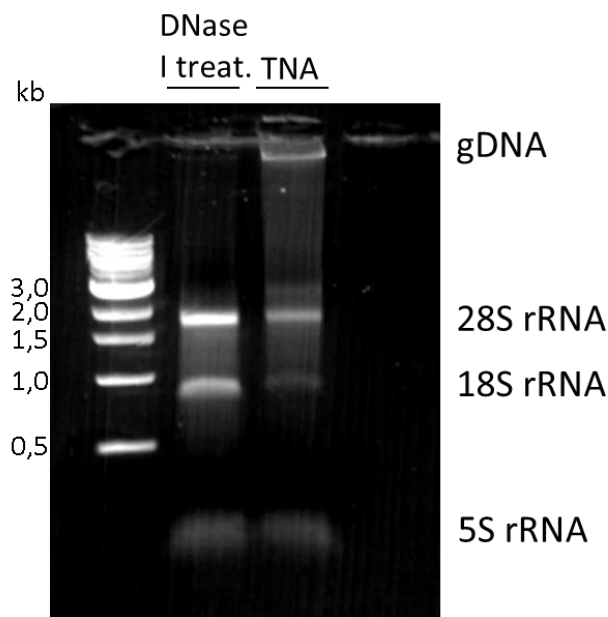
Εικόνα 4.9: a) Θηκόγραμμα έκφρασης RECUR1 σε φυσιολογικό ιστό στομάχου, διαφορετικά στάδια προκαρκινικών αλλοιώσεων και καλλιέργεια οργανοειδών. b) Το θηκόγραμμα 4.6b στην ίδια κλίμακα. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε RPKM έπειτα από λογαρίθμηση.

Παράλληλα παρατίθεται το διάγραμμα τιμών έκφρασης σε βιοψίες Κορεατών ασθενών προσαρμοσμένο στην ίδια κλίμακα για σκοπούς σύγκρισης. Οι τιμές έκφρασης του RECUR1 στα οργανοειδή είναι σαφώς μεγαλύτερες.

4.2 Μελέτη έκφρασης σε κυτταρικές σειρές

Χαρακτηρισμός ποιότητας απομονωμένου RNA

Έπειτα από την απομόνωση του συνόλου των νουκλεϊκών οξέων από κυτταρικές σειρές, ακολουθεί η κατεργασία με DNάση I, για να απομακρυνθεί το gDNA και mtDNA, πριν από τη σύνθεση cDNA. Σε αυτό το στάδιο είναι χρήσιμη η ηλεκτροφόρηση μέρους των δειγμάτων πριν και μετά την κατεργασία με DNάση I, ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης, καθώς και η καθαρότητα και η ακεραιότητα του

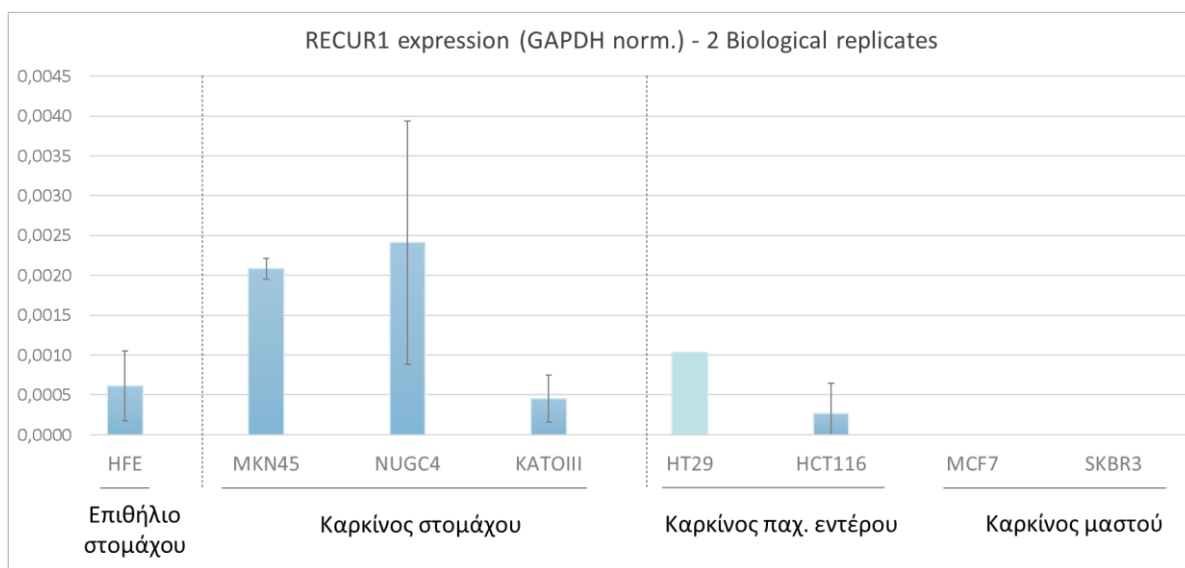


Εικόνα 4.10: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TBE ολικών νουκλεϊκών οξέων (total nucleic acid – TNA) με και χωρίς κατεργασία με DNase I.

RNA. Η μεγαλύτερη ποσότητα RNA στο κύτταρο είναι το ριβοσωμικό RNA, το οποίο στα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελείται από το 28S, 18S, 5.8S και 5S rRNA. Βάσει της εικόνας 4.10, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το RNA δεν έχει αποικοδομηθεί, και ότι το δείγμα που έχει κατεργαστεί με DNάση I εμφανίζει υψηλή καθαρότητα.

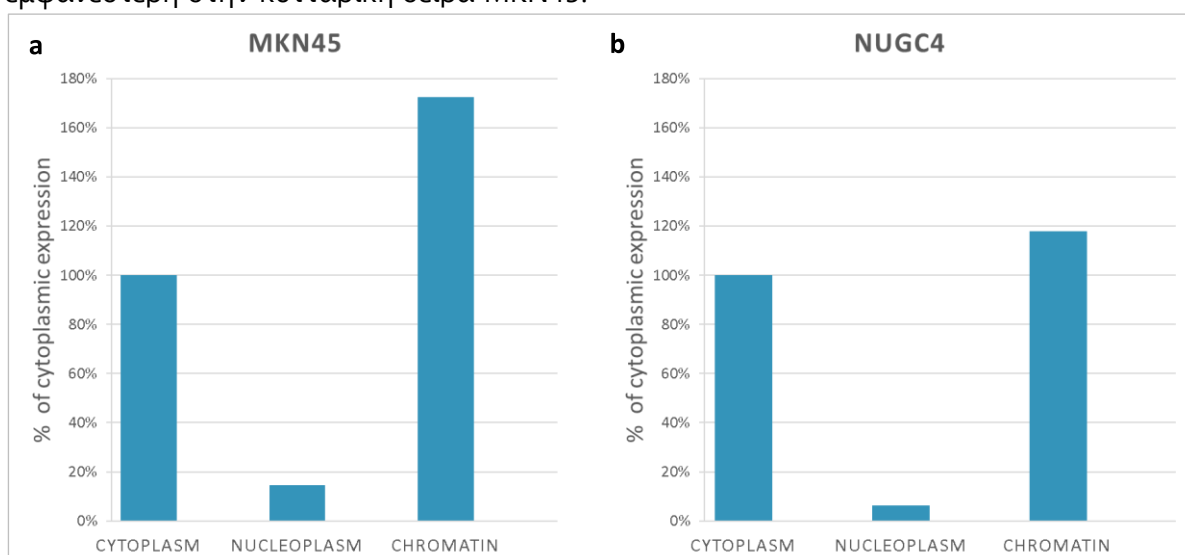
Έκφραση RECUR1 σε κυτταρικές σειρές

Τα βασικά επίπεδα έκφρασης του RECUR1 μελετήθηκαν και στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου. Στην εικόνα 4.11 φαίνεται η σχετική έκφραση του RECUR1 σε 8 κυτταρικές σειρές, ποσοτικοποιημένη με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta CT}$ και κανονικοποιημένη ως προς το ιδιοσύστατα εκφρασμένο γονίδιο GAPDH. Τα αποτελέσματα αφορούν σε δύο βιολογικές επαναλήψεις, με εξαίρεση την κυτταρική σειρά HT29, η οποία εξετάστηκε μόνο μια φορά. Στις κυτταρικές σειρές MCF7 και SKBR3 παρατηρήθηκε αμελητέο και μη ειδικό σήμα φθορισμού, επομένως η έκφραση θεωρείται ως μηδενική. Η μεγαλύτερη σχετική έκφραση παρατηρήθηκε στις κυτταρικές σειρές του στομάχου MKN45 και NUGC4, με την πρώτη να εμφανίζει μικρότερη διακύμανση.



Εικόνα 4.11: Κανονικοποιημένα σχετικά επίπεδα έκφρασης RECUR1 σε 8 κυτταρικές σειρές.

Ο εντοπισμός ενός lncRNA μέσα στο κύτταρο, έχει άμεση σχέση με τον τρόπο λειτουργίας του, όπως επισημάνθηκε στην υποενότητα 1.4.3. Για το λόγο αυτό, είναι χρήσιμος ο πειραματικός έλεγχος του κυτταρικού διαμερίσματος στο οποίο εντοπίζεται και δρα το υπό μελέτη lncRNA. Στην εικόνα 4.12 παρουσιάζονται τα επίπεδα του RECUR1 σε 3 υποκυτταρικά κλάσματα (κυτταροπλασματικό, πυρηνοπλασματικό, χρωματινικό) των κυτταρικών σειρών MKN45 και NUGC4, ποσοτικοποιημένα με qPCR. Και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρείται μεγαλύτερη σχετική ποσότητα του μεταγράφου στο κλάσμα της χρωματίνης σε σχέση με το κυτταροπλασματικό κλάσμα, με τη διαφορά αυτή να είναι εμφανέστερη στην κυτταρική σειρά MKN45.

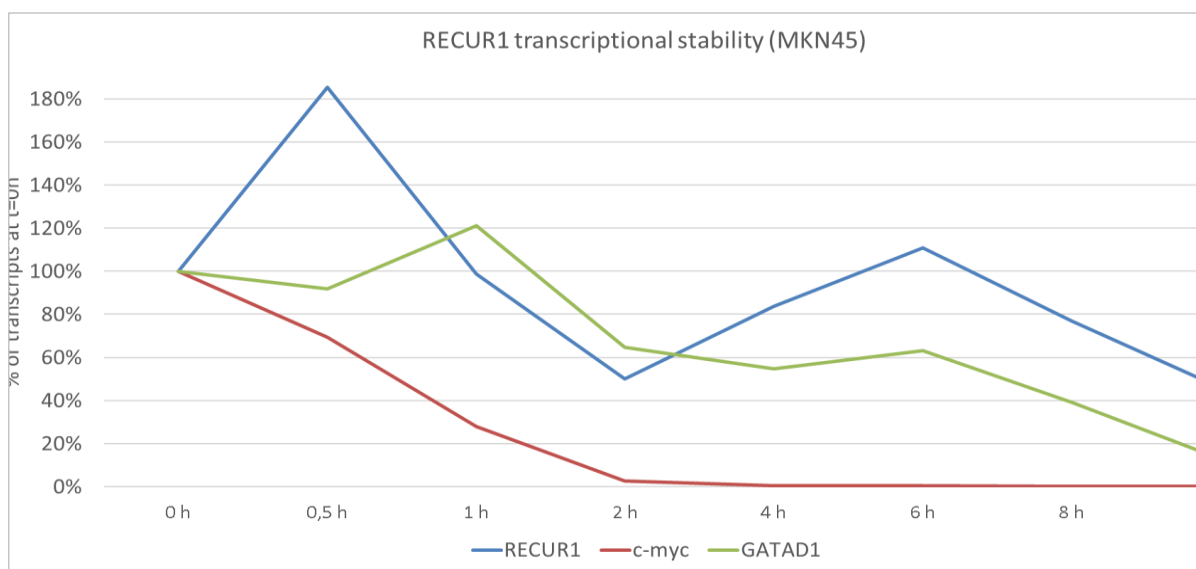


Εικόνα 4.12: Επίπεδα RECUR1 σε υποκυτταρικά κλάσματα των κυτταρικών σειρών a) MKN45 και b) NUGC4.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός δεν αποτελεί τη μόνη ένδειξη του τρόπου λειτουργίας ενός lncRNA. Λαμβάνοντας υπόψιν τη σταθερότητα του μεταγράφου, δηλαδή τον ρυθμό αποικοδόμησής του, μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τις πιθανές δράσεις του. Επί παραδείγματι, ρυθμιστικά μεταγράφα, όπως αυτά που συμπλέκονται με μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν σχετικά μικρό χρόνο ζωής, ενώ lncRNA που δρουν ως ικρίωματα έχουν

μεγαλύτερο χρόνο ζωής. Επιπλέον, τα lncRNA εμφανίζουν παρόμοιο εύρος με τα κωδικοποιητικά RNA όσον αφορά τη μεταγραφική τους σταθερότητα, επομένως κωδικοποιητικά μετάγραφα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέτρο σύγκρισης του χρόνου ζωής (Clark et al., 2012).

Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε πείραμα μεταγραφικής σταθερότητας για το RECUR1 στην κυτταρική σειρά MKN45, τα αποτελέσματα του οποίου φαίνονται στην εικόνα 4.13. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό ακτινομυκίνη D, δεδομένου ότι αναστέλλει την μεταγραφή και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του ρυθμού αποδόμησης των μεταγράφων (Reich, Franklin, Shatkin, & Tatum, 1961; Yang et al., 2003). Ως δείγματα ελέγχου με γνωστό χρόνο ζωής χρησιμοποιήθηκαν τα κωδικοποιητικά μετάγραφα των γονιδίων *c-myc* και *GATAD1*. Βάσει του αποτελέσματος, το μετάγραφο παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα με χρόνο υποδιπλασιασμού σε επίπεδα που προσομοιάζουν αυτά του μάρτυρα θετικού ελέγχου *GATAD1*.



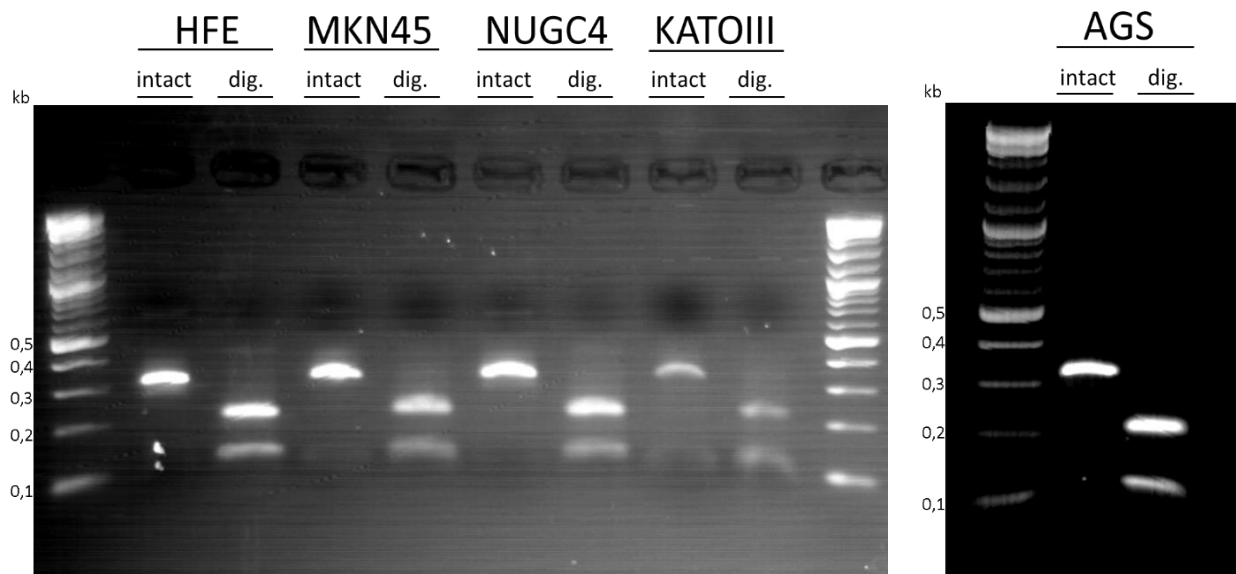
Εικόνα 4.13: Επίπεδα έκφρασης μεταγράφων *RECUR1*, *c-myc* και *GATAD1* σε κύτταρα MKN45 σε διάφορα χρονικά διαστήματα έπειτα από την έκθεση σε ακτινομυκίνη-D.

4.3 Γονοτύπηση με dCAPS

Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των γαστρικών κυτταρικών σειρών του εργαστηρίου όσον αφορά το SNP ενδιαφέροντος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος dCAPS. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δημιουργούν τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BshFI για το συχνότερα απαντώμενο αλληλόμορφο. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έπειτα από την αντίδραση πέψης με το ένζυμο BshFI φαίνονται στην εικόνα 4.14. Ως μάρτυρας σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιείται ένα μέρος του προϊόντος PCR που δεν έχει υποστεί πέψη. Αν το προϊόν PCR συνολικού μήκους περίπου 330 bp δεν φέρει το επικρατέστερο αλληλόμορφο, τότε δεν θα κοπεί από το ένζυμο BshFI. Εάν φέρει τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, τότε θα υποστεί πέψη και θα δώσει δύο τμήματα μικρότερων μεγεθών.

Σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν προέκυψε το ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή η πέψη των προϊόντων της PCR, γεγονός που υποδηλώνει πως οι κυτταρικές σειρές φέρουν

στο σύνολό τους το επικρατέστερο αλληλόμορφο του υπό μελέτη σημειακού πολυμορφισμού.



Εικόνα 4.14: dCAPS: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων αντίδρασης πέψης σε πηκτή αγαρόζης 2% με ρυθμιστικό διάλυμα TBE.

4.4 Καταστολή έκφρασης RECUR1 με shRNA

Κατά τη διαδικασία κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα που φέρει το ένθεμα που θα δώσει anti-RECUR1 shRNA μόλις εκφραστεί, είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση ότι το απομονωμένο πλασμίδιο περιέχει την επιθυμητή κατασκευή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαγνωστικής πέψης του φορέα με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XbaI, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην εικόνα 4.15.

Τα τρία πρώτα δείγματα είναι δείγματα ελέγχου, ενώ το τέταρτο είναι εκείνο που εξετάζεται ως προς την παρουσία ή απουσία ενθέματος.

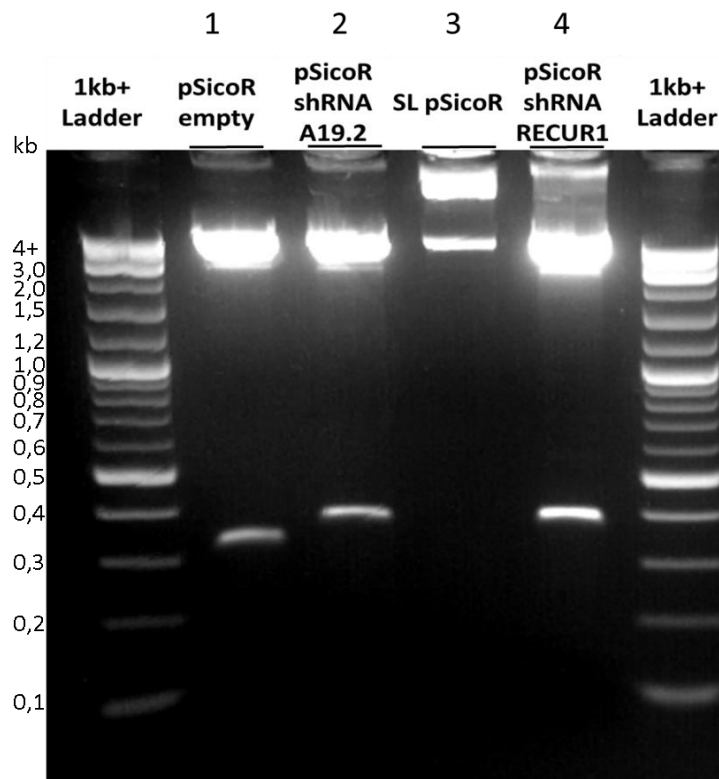
Στην πρώτη διαδρομή μετά τον μάρτυρα, περιέχονται 2 μg του πλασμιδιακού φορέα pSicoR-PGK-ruro, ο οποίος έπειτα από την πέψη έχει κοπεί σε ένα τμήμα μεγέθους 344 bp, το οποίο αντιστοιχεί στο τμήμα μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης BamHI και XbaI, και σε ένα τμήμα μεγέθους 7348 bp που αντιστοιχεί στον γραμμοποιημένο σκελετό του πλασμιδίου.

Ως θετικός μάρτυρας (διαδρομή 2) χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pSicoR-PGK-ruro που φέρει κατασκευή shRNA έναντι ενός διαφορετικού lncRNA, η ένθεση της οποίας έχει επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση. Όταν πέπτεται ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το ένθεμα shRNA παρατηρείται ομοίως η ζώνη που αντιστοιχεί στον σκελετό του πλασμιδικού φορέα (7348 bp) και μια ζώνη μεγέθους περίπου 390 bp, λόγω της προσθήκης του ενθέματος με μήκος περίπου 40bp.

Στην περίπτωση του επανακυκλοποιημένου πλασμιδίου (SL pSicoR, διαδρομή 3), η θέση αναγνώρισης από το ένζυμο BamHI έχει καταστραφεί έπειτα από την αντίδραση λιγάσης. Έτσι κόβεται σε μια μόνο θέση από το ένζυμο XbaI και δίνει μια ζώνη που αντιστοιχεί στο γραμμοποιημένο πλασμίδιο μήκους 7692 bp.

Στην τέταρτη διαδρομή βρίσκεται ο υπό εξέταση πλασμιδιακός φορέας (pSicoR anti-RECUR1 shRNA), ο οποίος εμφανίζει το ίδιο πρότυπο με τον θετικό μάρτυρα στη διαδρομή 2.

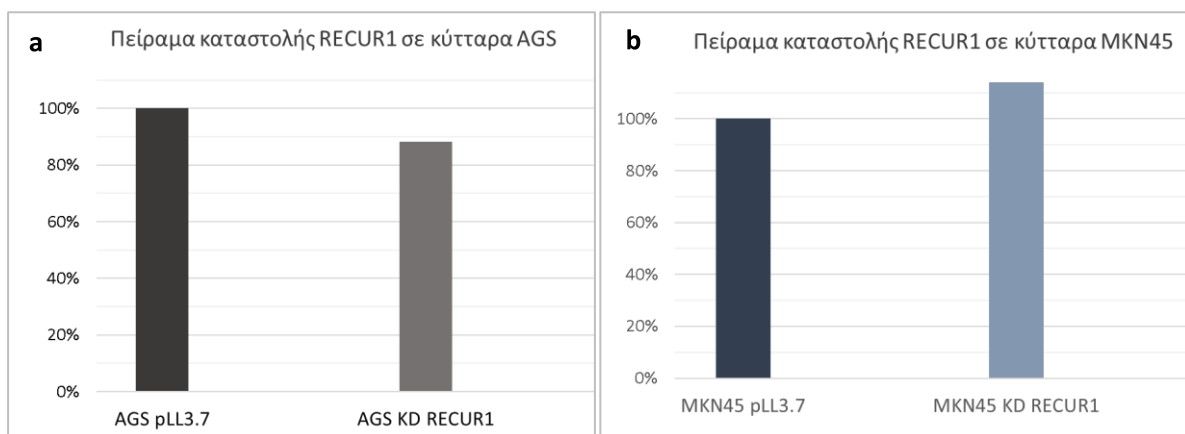
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι επειδή η συγκέντρωση του πλασμιδίου στην αντίδραση πέψης για τα δείγματα της διαδρομής 3 και 4 ήταν μεγάλη, το ένζυμο δεν έχει δράσει σε όλα τα αντίγραφα των πλασμιδίων. Επομένως, εμφανίζεται μια επιπλέον έντονη ζώνη σε πολύ μεγαλύτερο μήκος, η οποία αντιστοιχεί στην ακέραια κυκλική διαμόρφωση του πλασμιδίου.



Εικόνα 4.15: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων διαγνωστικής πέψης πλασμιδιακών φορέων σε πηκτή αγαρόζης 2% με ρυθμιστικό διάλυμα TBE.

Εν όψει των παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι το υπό εξέταση πλασμίδιο εμπεριέχει το επιθυμητό ένθεμα, κάτι που όμως πρέπει να επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση.

Έπειτα από την επιβεβαίωση ένθεσης της επιθυμητής κατασκευής (anti-RECUR1 shRNA) στον πλασμιδιακό φορέα ακολούθησε παροδική εισαγωγή του σε κύτταρα MKN45 και AGS μέσω λεντιών. Παρ' όλη την επιτυχία της ένθεσης της επιθυμητής κατασκευής, το πείραμα σίγησης δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.16.



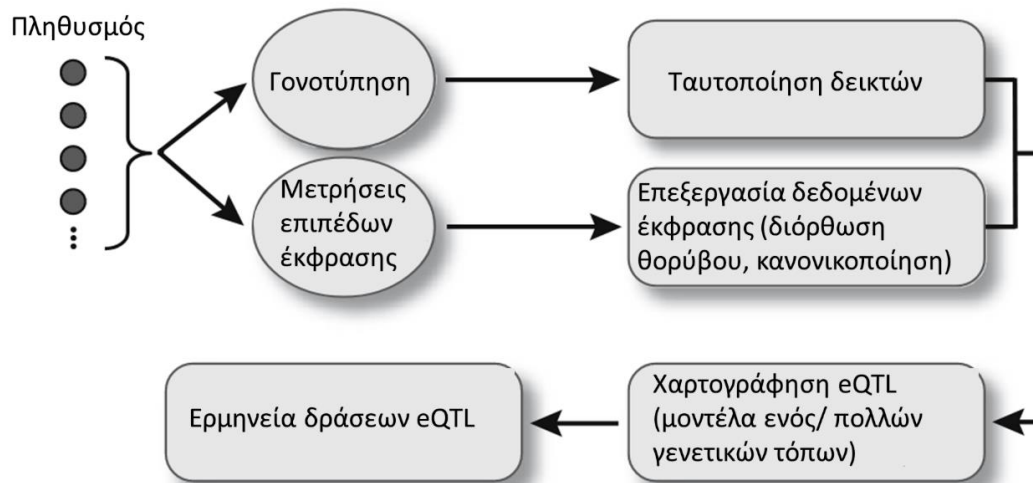
Εικόνα 4.16: Επίπεδα έκφρασης μεταγράφου RECUR1 μετά από εισαγωγή άδειου πλασμιδιακού φορέα pLL3.7 και κατασκευής shRNA έναντι του RECUR1 στις κυτταρικές σειρές a) AGS, b) MKN45.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως έχει καταστεί σαφές στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί ένα σημαντικό υγειονομικό πρόβλημα, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε συνδυασμό με υψηλή θνησιμότητα, κατέχοντας την 3^η θέση παγκοσμίως (Ferlay J et al., 2018; Ferlay et al., 2019). Για τις χώρες της ανατολικής Ασίας τις οποίες κατά κύριο λόγο πλήττει, έχει ιδιαίτερα μεγάλο δημοσιονομικό κόστος. Πιο συγκεκριμένα, έχει υπολογιστεί ότι ο καρκίνος του στομάχου στοίχισε 3 δισεκατομμύρια δολάρια στη Δημοκρατία της Κορέας το 2009 και 423 εκατομμύρια δολάρια στη Δημοκρατία της Ταϊβάν το 2013 (Hong et al., 2017; S. Y. Kim et al., 2015). Το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και το μεγάλο κόστος που επιφέρει ο καρκίνος του στομάχου οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στην ανεπάρκεια διαγνωστικών μεθόδων και στα μικρού βεληνεκούς προγράμματα πρόληψης (Gullo et al., 2018; Pasechnikov et al., 2014). Παράλληλα, οι πιο διαδεδομένες θεραπευτικές προσεγγίσεις αφορούν στη χειρουργική επέμβαση με την επικουρική χρήση χημειοθεραπείας και ραδιοθεραπείας. Η εστίαση σε νέες πιο εξειδικευμένες θεραπείες έχει επέλθει μόνο πρόσφατα, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυξητικών παραγόντων και ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Εντούτοις, λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης και της ελλιπούς γνώσης των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται, η θεραπεία του καρκίνου του στομάχου είναι συχνά αναποτελεσματική (Song, Wu, Yang, Yang, & Fang, 2017). Συνεπώς, η εύρεση νέων διαγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων καθίσταται επιτακτική ανάγκη για την αντιμετώπιση της νόσου.

Ένα πολλά υποσχόμενο και εξειδικευμένο μοριακό εργαλείο για τη διάγνωση και τη θεραπεία μπορούν να είναι τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA. Ολοένα και περισσότερα στοιχεία συγκεντρώνονται για τον ρόλο τους στον καρκίνο, μέσω των δράσεών τους στη γονιδιακή μεταγραφή, τη μετάφραση και τις μετα-μεταγραφικές και επιγενετικές τροποποιήσεις. Η απορρύθμισή τους σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να αποτελέσει σημαντική ένδειξη για την λειτουργικότητα των διεργασιών που ελέγχουν. Επιπλέον, τα lncRNA εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση στην έκφρασή τους ανάλογα με τον ιστό. (M. C. Jiang, Ni, Cui, Wang, & Zhuo, 2019). Τα χαρακτηριστικά αυτά τα καθιστούν χρήσιμους καρκινοειδικούς και ιστοειδικούς διαγνωστικούς ή προγνωστικούς δείκτες και θεραπευτικούς στόχους.

Η συμμετοχή των lncRNA στην καρκινογένεση μπορεί να προκύψει ως απόρροια αλλαγών στα επίπεδα έκφρασής τους ή τροποποιήσεων στη δομή και λειτουργία τους. Η μελέτη γενετικών τόπων που ελέγχουν το ποσοτικό γνώρισμα της έκφρασης ενός RNA (*expression quantitative trait loci*, eQTL) μπορεί να καταστεί χρήσιμη για την εύρεση αλληλομόρφων με ρόλο στην απορρύθμιση των επιπέδων ενός καρκινοσυσχετιζόμενου lncRNA. Αυτοί οι γενετικοί τόποι μπορεί να έχουν άμεση ή έμμεση επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του εξεταζόμενου RNA. Επιπλέον, μπορούν να βρίσκονται κοντά στο σημείο μεταγραφής (*cis*-eQTL) ή σε μεγάλη απόσταση από αυτό (*trans*-eQTL). Οι γενετικοί τόποι που προκύπτουν από μελέτες eQTL έχουν συνήθως πολύ μεγάλο μέγεθος, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εύρεση της αλληλουχίας ή του πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου που ρυθμίζει τα επίπεδα της έκφρασης (Michaelson et al., 2009). Μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS), σε συνδυασμό με ανάλυση eQTL, μπορούν να αναδείξουν πολυμορφισμούς που έχουν επίδραση στα επίπεδα έκφρασης ενός μεταγράφου ενδιαφέροντος.



Εικόνα 5.1: Πορεία εύρεσης eQTL για ένα μετάγραφο. Τροποποιημένο από (Michaelson, Loguercio, & Beyer, 2009).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμορφισμών που αποτελούν eQTL είναι τα SNP rs11672691 και rs887391, τα οποία σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση στον καρκίνο του προστάτη. Τα συγκεκριμένα SNP βρίσκονται εντός ιντρονικής περιοχής της μεγάλης μήκους ισομορφής του lncRNA *PCAT19* (*PCAT19-long*), η οποία αποτελεί παράλληλα περιοχή υποκινητή για τη μικρού μήκους ισομορφή (*PCAT19-short*). Τα αλληλόμορφα αυξημένου κινδύνου rs11672691 και rs887391 δυσχεραίνουν την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων NKX3.1 και YY1 αντίστοιχα. Έτσι, μειώνεται η έκφραση του *PCAT19-short*, ενώ παράλληλα η αδέσμευτη περιοχή του υποκινητή του τελευταίου, μπορεί να λειτουργήσει ως ενισχυτής για τη μεταγραφή της ισομορφής *PCAT19-long*, υψηλά επίπεδα του οποίου σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Συνεπώς, τα αλληλόμορφα αυξημένου κινδύνου των συγκεκριμένων SNP μπορούν να τροποποιήσουν τον λόγο *PCAT19-long* προς *PCAT19-short* μέσω ρύθμισης της μεταγραφής (Hua et al., 2018).

Ένας πολυμορφισμός μπορεί να δράσει ως eQTL όχι μόνο συμμετέχοντας στη ρύθμιση της μεταγραφής, αλλά και επηρεάζοντας τη σταθερότητα ενός μεταγράφου. Μια περίπτωση τέτοιου σημειακού πολυμορφισμού είναι το SNP rs655237, το οποίο εδράζεται στο τέταρτο εξόνιο του *LINC00673*, ενός μακρού μη κωδικοποιητικού RNA, μειορρύθμιση του οποίου έχει συνδεθεί με αυξημένη προδιάθεση στον καρκίνο του παγκρέατος. Το αλληλόμορφο αυξημένου κινδύνου, ενδέχεται να δημιουργεί θέση πρόσδεσης για το miR-1231, οδηγώντας σε μετα-μεταγραφική σίγηση του *LINC00673* μέσω παρεμβολής RNA. Επομένως, ανάλογα με το αλληλόμορφο του σημειακού πολυμορφισμού rs655237 καθορίζεται ο χρόνος ζωής του μεταγράφου *LINC00673* και άρα και η λειτουργικότητά του (Zheng et al., 2016).

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί τμήμα του ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου, που αποσκοπεί στην εύρεση νέων lncRNA που συσχετίζονται με τον καρκίνο του στομάχου, και εστιάζει στην ανακάλυψη μακρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από σημειακούς πολυμορφισμούς, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των παραπάνω παραδειγμάτων. Η επιλογή του lncRNA που αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας έγινε βάσει μεταγραφωμικής ανάλυσης σε κλινικά δείγματα και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές σε συνδυασμό με ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων προς εύρεση απλοτύπων που συσχετίζονται με τα πρότυπα

έκφρασής τους. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε τρία μετάγραφα, τα οποία ονομάστηκαν *Regulatory cancer mutation lncRNAs* ή *RECURs*. Ως αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας επιλέχθηκε το μετάγραφο *RECUR1*, η έκφραση του οποίου σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του στομάχου επηρεάζεται σημαντικά από τον γονότυπο του ατόμου όσον αφορά έναν σημειακό πολυμορφισμό που εδρεύει στον γενετικό τόπο του συγκεκριμένου *lncRNA* (Εικ. 4.9).

Το *RECUR1* φαίνεται πως είναι ένα μακρό μη κωδικοποιητικό RNA, η αλληλουχία του οποίου εμφανίζει υψηλή συντήρηση στον ποντικό και βρίσκεται σε εγγύτητα με σήμα H3K27Ac, το οποίο υποδηλώνει την παρουσία ανοιχτής δομής χρωματίνης. Επιπλέον, βάσει της ανάλυσης έκφρασης σε 559 κλινικά δείγματα και 1029 κυτταρικές σειρές, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το *RECUR1* εκφράζεται φυσιολογικά σε χαμηλά επίπεδα, ανεξαρτήτως κυτταρικού τύπου. Αν και δεν εμφανίζει μεγάλη ιστοειδικότητα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι σε καρκινικά κύτταρα εντοπίζεται κατά κανόνα μεγαλύτερος αριθμός μεταγράφων *RECUR1* σε σχέση με προκαρκινικά ή φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει καρκινοειδική έκφραση. Ωστόσο, σε καρκινικά κύτταρα, οι τιμές έκφρασης κυμαίνονται από μηδενικές έως πολλαπλάσιες από εκείνες των φυσιολογικών κυττάρων. Αυτή η μεγαλύτερη διακύμανση μπορεί αν εξηγηθεί από την ύπαρξη παραγόντων (π.χ *miRNAs*, μεταγραφικοί παράγοντες) που είτε αυξάνουν σημαντικά, είτε μηδενίζουν την έκφραση, ενδεχομένως συνδυαστικά με το αλληλόμορφο του υπό εξέταση SNP. Επιπλέον, ενδέχεται να υπάρχει ασθενής θετική συσχέτιση της έκφρασής του με το στάδιο της ασθένειας. Τα επίπεδα έκφρασης του *RECUR1* σε καλλιέργειες οργανοειδών είναι, επίσης, υψηλά και εφάμιλλα των τιμών έκφρασης σε βιοψίες καρκινικών ιστών. Τα οργανοειδή είναι τρισδιάστατες καλλιέργειες κυττάρων, που προσομοιάζουν δομικά καρκινικούς ιστούς και προέρχονται από καρκινικά ή φυσιολογικού τύπου βλαστοκύτταρα (Nagle, Plukker, Muijs, van Luijk, & Corpes, 2018). Επομένως, το συγκεκριμένο αποτέλεσμα υποδηλώνει πιθανή παρουσία του μεταγράφου *RECUR1* και σε καρκινικά βλαστοκύτταρα. Τέλος, βάσει ανάλυσης κλινικών δειγμάτων, η ύπαρξη του συχνότερα απαντώμενου αλληλομόρφου ενός σημειακού πολυμορφισμού στον γενετικό τόπο του *RECUR1*, σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *lncRNA*.

Το *lncRNA RECUR1* χαρακτηρίστηκε, επίσης, και σε πειραματικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα qPCR, παρουσιάζει υψηλή έκφραση σε δύο (MKN45, NUGC4) από τις τρεις κυτταρικές σειρές γαστρικού αδενοκαρκινώματος που εξετάστηκαν σε σχέση με τη μη καρκινική κυτταρική σειρά του στομάχου HFE145 και κυτταρικές σειρές που προέρχονται από άλλους τύπους καρκίνου (HCT116, HT29, SKBR3, MCF7). Το *RECUR1* είναι ένα εξαιρετικά σταθερό μετάγραφο, καθώς απαιτούνται παραπάνω από 8 ώρες για την αποικοδόμηση του 50% των μεταγράφων στο κύτταρο. Ο χρόνος ζωής του *RECUR1* είναι μεγαλύτερος από το μέσο χρόνο ζωής τόσο των *lncRNA* (4,8 h), όσο και των κωδικοποιητικών μεταγράφων (7,7 h) (Clark et al., 2012). Η μεγάλη σταθερότητα του *RECUR1* μπορεί να εξηγηθεί από πιθανό του ρόλο ως ικρίωμα για την συναρμολόγηση σταθερών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων, με αποτέλεσμα την προστασία τους από RNάσες. Επιπλέον, υπάρχει ισχυρή ένδειξη ότι δρα, εν μέρει, στον πυρήνα αλληλεπιδρώντας με την χρωματίνη, αφού κατά τον υποκυτταρική κλασμάτωση εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στο χρωματινικό κλάσμα.

Το επόμενο και εξαιρετικά σημαντικό βήμα ως προς τη μελέτη του RECUR1 αφορά στη μεταγραφική του σίγηση μέσω παρεμβολής RNA. Η καταστολή του RECUR1 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μπορεί να υποδείξει τυχόν ρόλο του στην καρκινογένεση, μέσω παρατήρησης φαινοτυπικού αποτελέσματος στη μορφολογία ή τη μοριακή υπογραφή των κυττάρων. Η καταστολή μπορεί να επιτευχθεί με σχεδιασμό anti-RECUR1 shRNA. Έγινε σχεδιασμός του συγκεκριμένου shRNA και εισαγωγή του στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR-PGK-puro. Η γενετική τροποποίηση των κυτταρικών σειρών έγινε με τη χρήση λεντιών που έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα. Εντούτοις, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, η μεταγραφική σίγηση του RECUR1 δεν είχε επιτυχία. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με τρεις τρόπους. Αφενός, ενδέχεται η επιμόλυνση των κυττάρων να μην είχε επιτυχία. Αφετέρου, μπορεί το ίδιο το shRNA να μην εκφράστηκε σε επαρκή επίπεδα ώστε να έχει αποτέλεσμα ή να μην λειτούργησε με τον βέλτιστο κατασταλτικό τρόπο. Τέλος, δεδομένου ότι βάσει δεδομένων RNA-Seq φαίνεται πως υπάρχουν πολλές ισομορφές του RECUR1, η έκφραση που ανιχνεύεται μπορεί να αφορά μια ισομορφή που δεν στοχεύεται από το shRNA που σχεδιάστηκε. Για να διερευνηθούν οι παραπάνω πιθανότητες, μελλοντικός στόχος είναι η επανάληψη του μετασχηματισμού των καρκινικών κυττάρων με μια κατασκευή που θα περιέχει γονίδιο φθορίζουσας πρωτεΐνης και η μέτρηση των επιπέδων φθορισμού αυτών. Επίσης, θα σχεδιαστούν εκκινητές μίσχου βρόχου (stem-loop primers), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία, με στόχο την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης του παραγόμενου siRNA. Τέλος, θα σχεδιαστεί νέο shRNA το οποίο θα κλωνοποιηθεί εκ νέου, με στόχο την ανεξάρτητη αλλά και συνδυαστική καταστολή πολλών ισομορφών του RECUR1 στα καρκινικά κύτταρα.

Για τον χαρακτηρισμό της σχέσης ενός SNP ενδιαφέροντος με τα επίπεδα έκφρασης έγινε γονοτύπηση των διαθέσιμων κυτταρικών σειρών στομάχου του εργαστηρίου με τη μέθοδο dCAPS. Όλες οι εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές είχαν το ίδιο συχνότερα απαντώμενο αλληλόμορφο που προδιαθέτει για αυξημένη έκφραση του lncRNA όσον αφορά το φερόμενο ως εμπλεκόμενο SNP. Δεδομένης της θετικής συσχέτισης του συγκεκριμένου αλληλομόρφου με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του lncRNA, φαντάζει παράδοξη η χαμηλή έκφραση του που παρατηρείται τόσο σε κύτταρα HFE145 (φυσιολογικού γαστρικού επιθήλιο) όσο και σε κύτταρα KATOIII (λεμφική διήθηση γαστρικού αδενοκαρκινώματος). Ωστόσο το γεγονός αυτό μπορεί εύκολα να ερμηνευτεί υπό το πρίσμα διαφορών στην έκφραση ενός ετέρου παράγοντα (μεταγραφικού ή miRNA) που αλληλεπιδρά με το συγκεκριμένο SNP (ή άλλους σημειακούς πολυμορφισμούς εντός του ίδιου απλοτύπου) και λειτουργεί συνδυαστικά ως eQTL. Η εύρεση και χαρακτηρισμός ενός τέτοιου παράγοντα δεν αποτελεί στόχο της παρούσας πτυχιακής και ήδη μελετάται ανεξάρτητα στο εργαστήριο.

Εν όψει των παραπάνω, επόμενο βήμα θα μπορούσε να αποτελέσει η προσπάθεια cis-υπερέκφρασης του RECUR1, μέσω CRISPRa, με τελικό στόχο τη σύνδεση των επιπέδων έκφρασης με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, μελλοντικά, μπορεί να γίνει διεύρυνση των πειραμάτων γονοτύπησης και ανάλυσης έκφρασης του RECUR1, καθώς και εντοπισμένης μεταλλαξιγένεσης *in vitro* και *in vivo* για τη μελέτη της δράσης του εξεταζόμενου απλοτύπου ως eQTL, σε κατάλληλες καρκινικές σειρές στομάχου που εμφανίζουν υψηλή έκφραση.

Βιβλιογραφία

- Aaltonen, L. A., Hamilton, S. R., World Health Organization., & International Agency for Research on Cancer. (2000). *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. Lyon, France: distributor: IARC Press ;Oxford University Press.
- Ajani, J. A., Lee, J., Sano, T., Janjigian, Y. Y., Fan, D., & Song, S. (2017). Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17036. doi:10.1038/nrdp.2017.36
- Batista, P. J., & Chang, H. Y. (2013). Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*, 152(6), 1298-1307. doi:10.1016/j.cell.2013.02.012
- Begolli, R., Sideris, N., & Giakountis, A. (2019). LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential. *Cancers (Basel)*, 11(10). doi:10.3390/cancers11101524
- Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res*, 77(15), 3965-3981. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2634
- Bijlsma, M. F., Sadanandam, A., Tan, P., & Vermeulen, L. (2017). Molecular subtypes in cancers of the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(6), 333-342. doi:10.1038/nrgastro.2017.33
- Bosman, F. T., World Health Organization., & International Agency for Research on Cancer. (2010). *WHO classification of tumours of the digestive system* (4th ed.). Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Brenner, H., Rothenbacher, D., & Arndt, V. (2009). Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol*, 472, 467-477. doi:10.1007/978-1-60327-492-0_23
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202-209. doi:10.1038/nature13480
- Carlevaro-Fita, J., & Johnson, R. (2019). Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization. *Mol Cell*, 73(5), 869-883. doi:10.1016/j.molcel.2019.02.008
- Chen, L. L. (2016). Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. *Trends Biochem Sci*, 41(9), 761-772. doi:10.1016/j.tibs.2016.07.003
- Clark, M. B., Johnston, R. L., Inostroza-Ponta, M., Fox, A. H., Fortini, E., Moscato, P., . . . Mattick, J. S. (2012). Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res*, 22(5), 885-898. doi:10.1101/gr.131037.111
- Correa, P. (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*, 52(24), 6735-6740.
- Cristescu, R., Lee, J., Nebozhyn, M., Kim, K. M., Ting, J. C., Wong, S. S., . . . Aggarwal, A. (2015). Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*, 21(5), 449-456. doi:10.1038/nm.3850
- David E. Malarkey, Mark Hoenerhoff, & Maronpot, R. R. (2013). Chapter 5 - Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. In C. G. R. Wanda M. Haschek, Matthew A. Wallig (Ed.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (pp. 107-146): Academic Press.
- Diederichs, S., Bartsch, L., Berkmann, J. C., Frose, K., Heitmann, J., Hoppe, C., . . . Wullenkord, R. (2016). The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Mol Med*, 8(5), 442-457. doi:10.15252/emmm.201506055
- Duane T. Smoot, Cornell R. Allen, Pamela Barnes, Milton Brown, Suhas Phadnis, Ben Gold, & Hassan Ashktorab. (2000). Human gastric epithelial cell lines derived from primary cultures of normal gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 118(4), A540-A541.
- Erichsen, H. C., & Chanock, S. J. (2004). SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer*, 90(4), 747-751. doi:10.1038/sj.bjc.6601574

- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 12(12), 861-874. doi:10.1038/nrg3074
- ExpASy (SIB) - Cellosaurus. (Online Database). Retrieved 30/7/2020
<https://web.expasy.org/cellosaurus>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, . . . F, B. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Pineros, M., . . . Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, 144(8), 1941-1953. doi:10.1002/ijc.31937
- Fickett, J. W. (1982). Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 10(17), 5303-5318. doi:10.1093/nar/10.17.5303
- Freyhult, E. K., Bollback, J. P., & Gardner, P. P. (2007). Exploring genomic dark matter: a critical assessment of the performance of homology search methods on noncoding RNA. *Genome Res*, 17(1), 117-125. doi:10.1101/gr.5890907
- Garattini, S. K., Basile, D., Cattaneo, M., Fanotto, V., Ongaro, E., Bonotto, M., . . . Aprile, G. (2017). Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications. *World J Gastrointest Oncol*, 9(5), 194-208. doi:10.4251/wjgo.v9.i5.194
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W70-74. doi:10.1093/nar/gkn188
- Gullo, I., Carneiro, F., Oliveira, C., & Almeida, G. M. (2018). Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications. *Pathobiology*, 85(1-2), 50-63. doi:10.1159/000473881
- Gutschner, T., & Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*, 9(6), 703-719. doi:10.4161/rna.20481
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanel, W., & Moll, U. M. (2012). Links between mutant p53 and genomic instability. *J Cell Biochem*, 113(2), 433-439. doi:10.1002/jcb.23400
- Hindorff, L. A., Sethupathy, P., Junkins, H. A., Ramos, E. M., Mehta, J. P., Collins, F. S., & Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(23), 9362-9367. doi:10.1073/pnas.0903103106
- Hong, J., Tsai, Y., Novick, D., Hsiao, F. C., Cheng, R., & Chen, J. S. (2017). The economic burden of advanced gastric cancer in Taiwan. *BMC Health Serv Res*, 17(1), 663. doi:10.1186/s12913-017-2609-1
- Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*, 3(3), 251-261. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
- Hua, J. T., Ahmed, M., Guo, H., Zhang, Y., Chen, S., Soares, F., . . . He, H. H. (2018). Risk SNP-Mediated Promoter-Enhancer Switching Drives Prostate Cancer through lncRNA PCAT19. *Cell*, 174(3), 564-575 e518. doi:10.1016/j.cell.2018.06.014
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M. J., Kenzelmann-Broz, D., . . . Rinn, J. L. (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 142(3), 409-419. doi:10.1016/j.cell.2010.06.040
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (1994). *Schistosomes, liver flukes and helicobacter pylori*. Lyon, France; Geneva: IARC; Distributed for the International Agency for Research on Cancer.
- Jiang, M. C., Ni, J. J., Cui, W. Y., Wang, B. Y., & Zhuo, W. (2019). Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am J Cancer Res*, 9(7), 1354-1366.

- Jiang, Y., Li, W., Lu, J., Zhao, X., & Li, L. (2018). Association between PRKAA1 rs13361707 T>C polymorphism and gastric cancer risk: Evidence based on a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, *97*(14), e0302. doi:10.1097/MD.00000000000010302
- Johnsson, P., Lipovich, L., Grander, D., & Morris, K. V. (2014). Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta*, *1840*(3), 1063-1071. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.035
- Kang, Y. J., Yang, D. C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res*, *45*(W1), W12-W16. doi:10.1093/nar/gkx428
- Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., & Kamangar, F. (2014). Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *23*(5), 700-713. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-1057
- Keats, B. J. B., & Sherman, S. L. (2013). Chapter 13 - Population Genetics. In D. L. Rimoïn, R. E. Pyeritz, & B. R. Korf (Eds.), *Emery and Rimoïn's principles and practice of medical genetics* (pp. 1 online resource.). San Diego, California: Academic Press.
- Khurana, E., Fu, Y., Chakravarty, D., Demichelis, F., Rubin, M. A., & Gerstein, M. (2016). Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat Rev Genet*, *17*(2), 93-108. doi:10.1038/nrg.2015.17
- Kim, D. G., An, J. Y., Kim, H., Shin, S. J., Choi, S., Seo, W. J., . . . Choi, Y. Y. (2019). Clinical Implications of Microsatellite Instability in Early Gastric Cancer. *J Gastric Cancer*, *19*(4), 427-437. doi:10.5230/jgc.2019.19.e38
- Kim, S. Y., Park, J. H., Kang, K. H., Hwang, I., Yang, H. K., Won, Y. J., . . . Yoon, S. J. (2015). The economic burden of cancer in Korea in 2009. *Asian Pac J Cancer Prev*, *16*(3), 1295-1301. doi:10.7314/apjcp.2015.16.3.1295
- Kim, Y. J., Chung, W. C., Cho, I. H., Kim, J., & Kim, S. (2019). Prognostic effect of different etiologies in patients with gastric cardia cancer. *Medicine (Baltimore)*, *98*(50), e18397. doi:10.1097/MD.00000000000018397
- Lauren, P. (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, *64*, 31-49. doi:10.1111/apm.1965.64.1.31
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., . . . Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, *343*(2), 78-85. doi:10.1056/NEJM200007133430201
- Lim, B., Kim, J. H., Kim, M., & Kim, S. Y. (2016). Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, *22*(3), 1190-1201. doi:10.3748/wjg.v22.i3.1190
- Lott, P. C., & Carvajal-Carmona, L. G. (2018). Resolving gastric cancer aetiology: an update in genetic predisposition. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, *3*(12), 874-883. doi:10.1016/S2468-1253(18)30237-1
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*, *10*(6), 925-933. doi:10.4161/rna.24604
- Manjili, M. H. (2018). A Theoretical Basis for the Efficacy of Cancer Immunotherapy and Immunogenic Tumor Dormancy: The Adaptation Model of Immunity. *Adv Cancer Res*, *137*, 17-36. doi:10.1016/bs.acr.2017.11.005
- Mathy, N. W., & Chen, X. M. (2017). Long non-coding RNAs (lncRNAs) and their transcriptional control of inflammatory responses. *J Biol Chem*, *292*(30), 12375-12382. doi:10.1074/jbc.R116.760884
- Mavaddat, N., Pharoah, P. D., Michailidou, K., Tyrer, J., Brook, M. N., Bolla, M. K., . . . Garcia-Closas, M. (2015). Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst*, *107*(5). doi:10.1093/jnci/djv036

- McLean, M. H., & El-Omar, E. M. (2014). Genetics of gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *11*(11), 664-674. doi:10.1038/nrgastro.2014.143
- Michaelson, J. J., Loguercio, S., & Beyer, A. (2009). Detection and interpretation of expression quantitative trait loci (eQTL). *Methods*, *48*(3), 265-276. doi:10.1016/j.ymeth.2009.03.004
- Milne, A. N., Carneiro, F., O'Morain, C., & Offerhaus, G. J. (2009). Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet*, *126*(5), 615-628. doi:10.1007/s00439-009-0722-x
- Mocellin, S., Verdi, D., Pooley, K. A., & Nitti, D. (2015). Genetic variation and gastric cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. *Gut*, *64*(8), 1209-1219. doi:10.1136/gutjnl-2015-309168
- Murphy, G., Pfeiffer, R., Camargo, M. C., & Rabkin, C. S. (2009). Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology*, *137*(3), 824-833. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.001
- Nagle, P. W., Plukker, J. T. M., Muijs, C. T., van Luijk, P., & Coppes, R. P. (2018). Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Semin Cancer Biol*, *53*, 258-264. doi:10.1016/j.semcancer.2018.06.005
- Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J., & Pepper, A. E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. *Plant J*, *14*(3), 387-392. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00124.x
- Pande, A., Makalowski, W., Brosius, J., & Raabe, C. A. (2020). Enhancer occlusion transcripts regulate the activity of human enhancer domains via transcriptional interference: a computational perspective. *Nucleic Acids Res*, *48*(7), 3435-3454. doi:10.1093/nar/gkaa026
- Pasechnikov, V., Chukov, S., Fedorov, E., Kikuste, I., & Leja, M. (2014). Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis. *World J Gastroenterol*, *20*(38), 13842-13862. doi:10.3748/wjg.v20.i38.13842
- Piso, P., Werner, U., Lang, H., Mirena, P., & Klempnauer, J. (2000). Proximal versus distal gastric carcinoma--what are the differences? *Ann Surg Oncol*, *7*(7), 520-525. doi:10.1007/s10434-000-0520-0
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, *136*(4), 629-641. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006
- Ratti, M., Lampis, A., Hahne, J. C., Passalacqua, R., & Valeri, N. (2018). Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci*, *75*(22), 4151-4162. doi:10.1007/s00018-018-2906-9
- Reich, E., Franklin, R. M., Shatkin, A. J., & Tatum, E. L. (1961). Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. *Science*, *134*(3478), 556-557. doi:10.1126/science.134.3478.556
- Saeki, N., Ono, H., Yanagihara, K., Aoyagi, K., Sasaki, H., Sakamoto, H., & Yoshida, T. (2015). rs2294008T, a risk allele for gastric and gallbladder cancers, suppresses the PSCA promoter by recruiting the transcription factor YY1. *Genes Cells*, *20*(5), 382-391. doi:10.1111/gtc.12228
- Saeki, N., Saito, A., Choi, I. J., Matsuo, K., Ohnami, S., Totsuka, H., . . . Sakamoto, H. (2011). A functional single nucleotide polymorphism in mucin 1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology*, *140*(3), 892-902. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.058
- Schottenfeld, D., & Fraumeni, J. F. (2006). *Cancer epidemiology and prevention* (3rd ed.). Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Serra, O., Galan, M., Ginesta, M. M., Calvo, M., Sala, N., & Salazar, R. (2019). Comparison and applicability of molecular classifications for gastric cancer. *Cancer Treat Rev*, *77*, 29-34. doi:10.1016/j.ctrv.2019.05.005
- Shastri, B. S. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*, *578*, 3-22. doi:10.1007/978-1-60327-411-1_1
- Sherwood, L., & Cengage Learning (Firm). (2013). *Human physiology : from cells to systems* (8th ed.). Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning.

- Sohn, B. H., Hwang, J. E., Jang, H. J., Lee, H. S., Oh, S. C., Shim, J. J., . . . Lee, J. S. (2017). Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2211
- Song, Z., Wu, Y., Yang, J., Yang, D., & Fang, X. (2017). Progress in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumour Biol*, 39(7), 1010428317714626. doi:10.1177/1010428317714626
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724. doi:10.1038/nature07943
- Study Group of Millennium Genome Project for, C., Sakamoto, H., Yoshimura, K., Saeki, N., Katai, H., Shimoda, T., . . . Hirohashi, S. (2008). Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat Genet*, 40(6), 730-740. doi:10.1038/ng.152
- Tan, I. B., Ivanova, T., Lim, K. H., Ong, C. W., Deng, N., Lee, J., . . . Tan, P. (2011). Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*, 141(2), 476-485, 485 e471-411. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.042
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C. P., McManus, M., Sharp, P. A., Van Parijs, L., . . . Jacks, T. (2004). Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(28), 10380-10385. doi:10.1073/pnas.0403954101
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558. doi:10.1126/science.1235122
- Wang, K., Kan, J., Yuen, S. T., Shi, S. T., Chu, K. M., Law, S., . . . Leung, S. Y. (2011). Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet*, 43(12), 1219-1223. doi:10.1038/ng.982
- Wang, L., Park, H. J., Dasari, S., Wang, S., Kocher, J. P., & Li, W. (2013). CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Res*, 41(6), e74. doi:10.1093/nar/gkt006
- Wang, Z., Dai, J., Hu, N., Miao, X., Abnet, C. C., Yang, M., . . . Shen, H. (2017). Identification of new susceptibility loci for gastric non-cardia adenocarcinoma: pooled results from two Chinese genome-wide association studies. *Gut*, 66(4), 581-587. doi:10.1136/gutjnl-2015-310612
- Xie, S. S., Jin, J., Xu, X., Zhuo, W., & Zhou, T. H. (2016). Emerging roles of non-coding RNAs in gastric cancer: Pathogenesis and clinical implications. *World J Gastroenterol*, 22(3), 1213-1223. doi:10.3748/wjg.v22.i3.1213
- Yang, E., van Nimwegen, E., Zavolan, M., Rajewsky, N., Schroeder, M., Magnasco, M., & Darnell, J. E., Jr. (2003). Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome Res*, 13(8), 1863-1872. doi:10.1101/gr.1272403
- Yuan, J., Li, Y., Tian, T., Li, N., Zhu, Y., Zou, J., . . . Shen, L. (2016). Risk prediction for early-onset gastric carcinoma: a case-control study of polygenic gastric cancer in Han Chinese with hereditary background. *Oncotarget*, 7(23), 33608-33615. doi:10.18632/oncotarget.9025
- Zhang, F., & Lupski, J. R. (2015). Non-coding genetic variants in human disease. *Hum Mol Genet*, 24(R1), R102-110. doi:10.1093/hmg/ddv259
- Zheng, J., Huang, X., Tan, W., Yu, D., Du, Z., Chang, J., . . . Lin, D. (2016). Pancreatic cancer risk variant in LINC00673 creates a miR-1231 binding site and interferes with PTPN11 degradation. *Nat Genet*, 48(7), 747-757. doi:10.1038/ng.3568