



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Χαρακτηρισμός του lncRNA GREAT6-1 που ρυθμίζεται από ογκοεπαγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον καρκίνο”

“Characterization of GREAT6-1: a lncRNA regulated by oncogenic transcription factors in cancer”



Όνοματεπώνυμο: Ασλάνογλου Πετρίνα-Μαρίνα

Πατρώνυμο: Βίκτωρ

Επιβλέπων Καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Λάρισα 2020

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

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

Μυλωνής Ηλίας: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ο πέμπτος πιο συχνός τύπος καρκίνου παγκοσμίως και αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο. Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια και συνήθως η διάγνωση του πραγματοποιείται σε προχωρημένο στάδιο, που έχει ως αποτέλεσμα δυσμενή πρόγνωση για τους ασθενείς. Γι' αυτό, είναι επιτακτική η ταυτοποίηση γονιδιωματικών και μοριακών διαφοροποιήσεων του καρκίνου του στομάχου, ώστε να αναπτυχθούν νέοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες καθώς και θεραπευτικοί στόχοι. Πρόσφατα γονιδιωματικές μελέτες οδήγησαν σε μια νέα μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου σε τέσσερις υπότυπους, με πιο κοινό υπότυπο την χρωμοσωμική αστάθεια (CIN). Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6, ο οποίος έχει σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυική ανάπτυξη, έχει βρεθεί συχνά σε γονιδιωματική ενίσχυση στον καρκίνο του στομάχου. Έχοντας καθοριστικό ρόλο στην προαγωγή της ογκογένεσης έχει θεωρηθεί ογκογονίδιο προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας (lineage survival oncogene), ενώ μαζί με τους KLF5 και GATA4 συμπλοκοποιείται, ενισχύοντας την ανάπτυξη του γαστρικού όγκου. Παρόλα αυτά, η έκφραση του GATA6 σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς δεν επιτρέπει τη θεραπευτική του στόχευση. Κατά συνέπεια, προσελκύουν το ενδιαφέρον γονίδια-στόχοι αυτών των ογκοεπαγωγικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως τα lncRNAs. Τα lncRNAs παρουσιάζουν εξειδικευμένη έκφραση ως προς τους ιστούς ή/και τα κύτταρα και εκφράζονται διαφορετικά στον καρκίνο, γεγονός που τα καθιστά ιδανικούς υποψήφιους για τη διάγνωση ή/και τη θεραπεία του καρκίνου. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός του GREAT6-1 (**GATA REgulated lncRNA GasTric**), ενός lncRNA που ρυθμίζεται από ογκοεπαγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον καρκίνο του στομάχου. Η βιοπληροφορική ανάλυση που διεξήχθη με χρήση δεδομένων RNA-seq από καρκινικές κυτταρικές σειρές και βιοψίες ασθενών, έδειξε εξειδικευμένη και υψηλή έκφραση του GREAT6-1 στον καρκίνο του στομάχου. Η μεταγραφική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1. Επίσης από τα πειράματα της υποκυτταρικής κλασμάτωσης και της μεταγραφικής σταθερότητας αναδείχθηκε ότι η ρυθμιστική δράση του GREAT6-1 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα. Τέλος η κλωνοποίηση shRNA σε πλασμιδιακούς φορείς οδήγησε σε επιτυχή σίγηση του GREAT6-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου.

Abstract

Gastric cancer is the fifth most common type of cancer worldwide and one of the leading causes of cancer-related death. This type of cancer is characterized by great heterogeneity and is often diagnosed at an advanced stage, which results in a poor prognosis for the patients. Therefore, it is imperative to identify genomic and molecular alterations associated with gastric cancer, in order to develop new diagnostic and prognostic biomarkers as well as therapeutic targets. Recently, genomic studies have led to a new molecular classification of gastric cancer into four subtypes, with the most common subtype being chromosomal instability (CIN). The transcriptional factor GATA6 which plays an important role in embryonic development, has been frequently reported to exhibit genomic amplification in gastric cancer. Due to its crucial role in tumorigenesis, GATA6 has been considered a lineage survival oncogene, which in gastric cancer may form complexes with GATA4 and KLF5 to enhance tumor development. However, the expression of GATA6, both in normal and tumor tissues does not allow its therapeutic targeting. As a result, target genes of these oncogenic transcription factors, such as lncRNAs attract great interest. lncRNAs exhibit tissue or/and cell specific expression and are differentially expressed in cancer, which makes them excellent candidates for the diagnosis and/or therapy of cancer. The aim of the present thesis was the characterization of GREAT6-1 (**GATA REgulated lncRNA GasTric**), a lncRNA regulated by oncogenic transcription factors in gastric cancer. The bioinformatic analysis that was conducted using RNA-seq data from cancer cell lines and biopsies from patients, showed specific and high expression of GREAT6-1 in gastric cancer. Transcriptional silencing of GATA4, GATA6 and KLF5 in gastric cell lines led to a decrease in GREAT6-1 expression levels. Also, from the experiments of subcellular fractionation and transcriptional stability, the possible regulatory effect of GREAT6-1 in the nucleus was revealed. Finally, shRNA cloning into plasmid vectors led to successful transcriptional silencing of GREAT6-1 in stomach cancer cell lines.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή	1
1.1 Ο καρκίνος του στομάχου	1
1.1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	1
1.2.3 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου	3
1.2.4 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου	5
1.3 Ογκογονίδια προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας	8
1.4 Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA.....	10
1.4.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 στην εμβρυική ανάπτυξη	10
1.4.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 στο φυσιολογικό στόμαχο	12
1.4.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 στον καρκίνο του στομάχου	14
1.5 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (Long non-coding RNAs).....	15
1.5.1 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα στον καρκίνο	19
2.Σκοπός.....	22
3.Υλικά και Μέθοδοι	23
3.1 Υλικά	23
3.1.1 Πλασμιδιακός φορέας pSicoR PGK puro	23
3.1.2 Κυτταρικές σειρές.....	24
3.2 Μέθοδοι.....	24
3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση	24
3.2.2 Δημιουργία shRNA και κλωνοποίηση αυτού στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puro	25
3.2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puro ...	25
3.2.4 Διαγνωστική πέψη	26
3.2.5 Απομόνωση RNA	27
3.2.6 Επεξεργασία με DNάση.....	27
3.2.7 Σύνθεση cDNA	28
3.2.8 Ποσοτική PCR (qPCR).....	29
4. Αποτελέσματα	30
4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	30
4.1.1 Προσδιορισμός κωδικοποιητικού δυναμικού	30
4.1.2 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA για το GREAT6-1 και τον GATA6	32
4.2 Πειραματικά αποτελέσματα	41
4.2.1 Απομόνωση RNA	41
4.2.2 Έκφραση του GREAT6-1 στις κυτταρικές σειρές	42
4.2.3 Υποκυτταρική κλασμάτωση	44

4.2.4 Μεταγραφική σταθερότητα	47
4.2.5 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 έπειτα από μεταγραφική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6, KLF5.....	48
4.2.6 Διαγνωστική πέψη	51
4.2.7 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του GATA6 και του GREAT6-1 έπειτα από μεταγραφική σίγηση τους στα κύτταρα AGS	52
5. Συμπεράσματα και Συζήτηση	54
6. Παράρτημα	58
6.1 Η ανατομία του στομάχου	58
7. Βιβλιογραφία	60

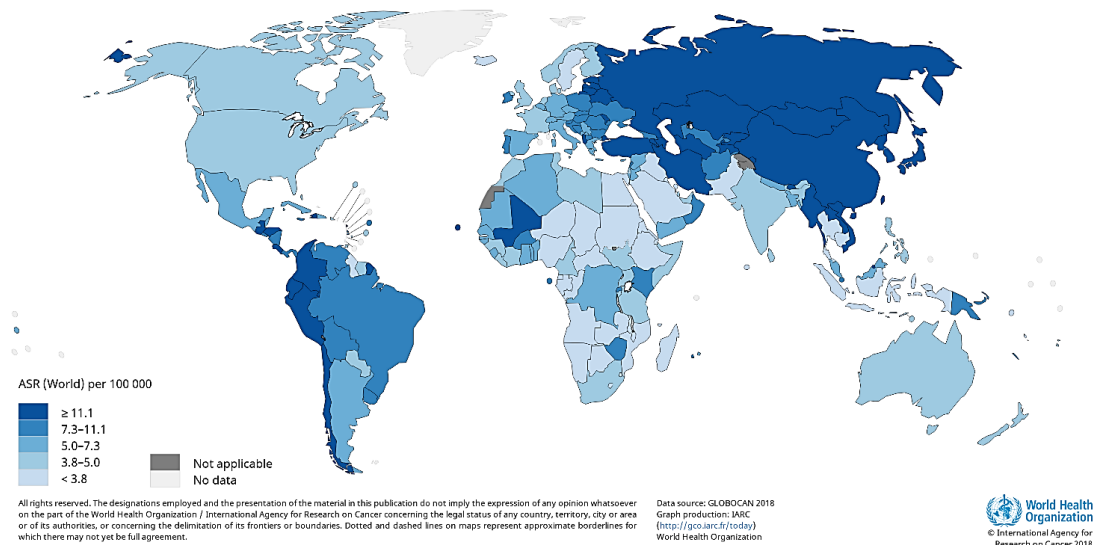
1.Εισαγωγή

1.1 Ο καρκίνος του στομάχου

1.1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί τον πέμπτο πιο συχνό τύπο καρκίνου στον κόσμο με 1,033,701 νέες περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου να έχουν καταγραφεί παγκοσμίως το 2018. Για την ίδια χρονιά σε παγκόσμιο επίπεδο ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου κατατάσσεται ως η τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο με 782,685 (75,72%) θανάτους να έχουν καταγραφεί. Η Κορέα είναι η χώρα με τις περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου του στομάχου και ακολουθούν χώρες της Ανατολικής Ασίας, της Ανατολικής Ευρώπης, της Νότιας Αμερικής, και της Δυτικής Ασίας (**Εικόνα 1**). Επίσης έχει παρατηρηθεί διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των δύο φύλων με τους άνδρες να εμφανίζουν καρκίνο του στομάχου σε σχεδόν διπλάσιο βαθμό σε σχέση με τις γυναίκες (683,754 άνδρες και 349,947 γυναίκες διαγνώστηκαν με καρκίνο του στομάχου το 2018 παγκοσμίως)¹.

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



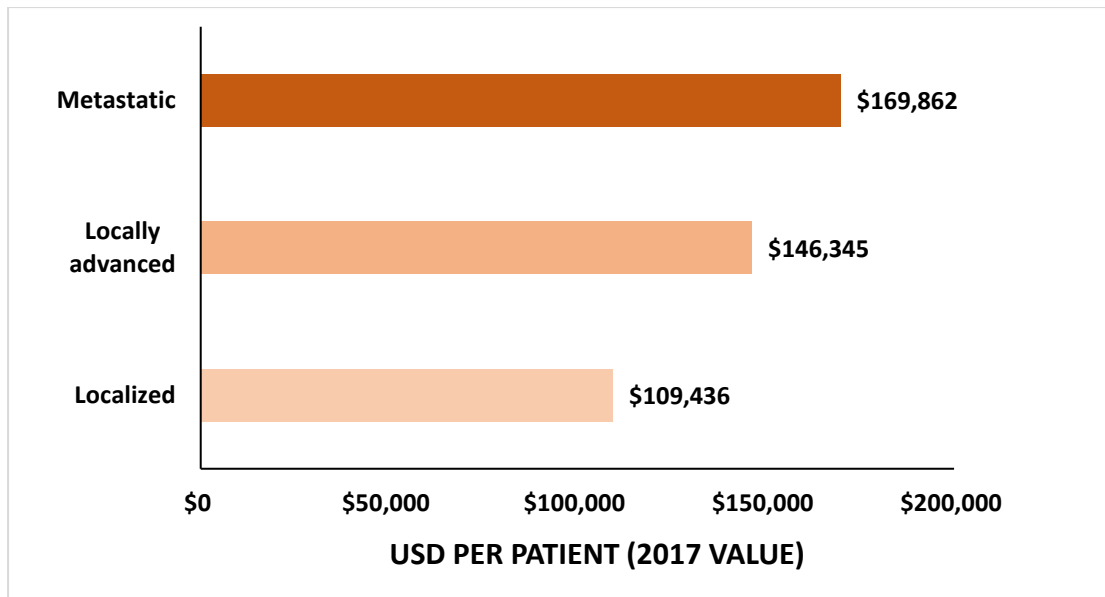
Εικόνα 1 Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου παγκοσμίως. Ο χρωματικός κώδικας αντικατοπτρίζει τα ποσοστά εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου για κάθε χώρα, με το πιο έντονο χρώμα να αντιστοιχεί σε υψηλότερη συχνότητα².

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μια ασθένεια στην εμφάνιση της οποίας συμβάλλουν πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες. Έχει παρατηρηθεί πως η διατροφή συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου αν και τα τελευταία χρόνια οι συνθήκες συντήρησης των τροφίμων έχουν βελτιωθεί. Η αυξημένη κατανάλωση πλούσιων σε αλάτι τροφίμων, καπνιστών τροφίμων και η μειωμένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών έχει συσχετισθεί θετικά με την εμφάνιση καρκίνου του στομάχου³. Επίσης έχει αναφερθεί πως το κάπνισμα και το αλκοόλ συμβάλλουν στον καρκίνο του στομάχου. Ένας πολύ σημαντικός εξωγενής παράγοντας ο οποίος έχει

συνδεθεί ισχυρά με την ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου είναι το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*). Περίπου το 50% του πληθυσμού της γης είναι φορείς του ελικοβακτηριδίου, ενώ πολλοί ασθενείς με καρκίνο του στομάχου είχαν μολυνθεί προηγουμένως από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Η μόλυνση από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού οδηγεί σε χρόνια γαστρίτιδα και φλεγμονή αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισης δυσπλασίας^{4,5}.

Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια με διαφορές τόσο σε γενετικό, μοριακό και δημογραφικό επίπεδο, όπως φαίνεται και από τα παραπάνω όσο και στα συμπτώματα και την επιθετικότητα. Τα αρχικά στάδια της ασθένειας είναι ασυμπτωματικά με αποτέλεσμα η διάγνωση να γίνεται σε προχωρημένα στάδια και η πρόγνωση να είναι δυσμενής⁶. Περίπου το 30% των ασθενών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του στομάχου σε προχωρημένο στάδιο δεν επιβιώνουν για περισσότερο από πέντε έτη, γεγονός που υπογραμμίζει τα αυξημένα ποσοστά θνητότητας που καταγράφονται λόγω του καρκίνου του στομάχου⁶. Σε μια προσπάθεια μείωσης της θνητότητας, έχει προταθεί η εφαρμογή συστηματικών προληπτικών ελέγχων σε επίπεδο πληθυσμού ώστε να ανιχνεύεται η πιθανή ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου σε αρχικά στάδια^{7,8}. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδος και με υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση διαφοροποιήσεων στο γαστρικό επιθήλιο είναι η γαστροσκόπηση. Για τη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου χρησιμοποιούνται και μέθοδοι απεικόνισης με χαμηλότερο όμως δείκτη ανίχνευσης σε σύγκριση με την γαστροσκόπηση, όπως έχει βρεθεί⁷. Σε αυτές τις μεθόδους περιλαμβάνονται η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography) και η ακτινογραφία με τη χρήση σκιαγραφικού υγρού (βαρίου)^{9,10}. Αν και η γαστροσκόπηση αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου, το υψηλό κόστος της πραγματοποίησης της σε συνδυασμό με την πολυπλοκότητα της διαδικασίας δεν επιτρέπει την εφαρμογή της ως μια μέθοδο ρουτίνας σε ευρεία κλίμακα. Γι' αυτό έχει περιοριστεί η εφαρμογή αυτής της μεθόδου σε ευρεία κλίμακα μόνο σε χώρες υψηλού κινδύνου όπως η Ιαπωνία, η Κορέα, όπου παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου¹⁰.

Παρόλα αυτά ο καρκίνος του στομάχου δεν θα πρέπει να εξετάζεται μόνο ως πρόβλημα για την υγεία και τη ζωή των ανθρώπων αλλά και ως οικονομική επιβάρυνση για τα ασφαλιστικά συστήματα κάθε χώρας. Έχει υπολογισθεί πως στον δυτικό κόσμο δαπανώνται περίπου 150.000\$ ανά ασθενή ενώ στην Ιαπωνία περίπου 78.000\$, στο Ιράν περίπου 2.800\$ και στην Κίνα περίπου 1.400\$¹¹. Επιπλέον, μελέτες που έγιναν στην Αμερική έδειξαν πως η πραγματοποίηση προληπτικού ελέγχου μείωσε το κόστος περίθαλψης κάτω από τα 100,000\$ ανά ασθενή¹². Όπως υπολογίσθηκε στην Αμερική το κόστος περίθαλψης φαίνεται να αυξάνεται ανάλογα με το στάδιο, με τους ασθενείς με μεταστατικούς όγκους να έχουν αυξημένο κόστος κατά 60,000\$ ανά ασθενή σε σχέση με το αρχικό στάδιο¹¹ (**Εικόνα 2**). Γι' αυτό κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη και χρήση ιδιαίτερα εξειδικευμένων μορίων τα οποία είτε λειτουργούν ως δείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση της ασθένειας είτε θα λειτουργούν ως μια θεραπευτική μη επεμβατική επιλογή¹³.



Εικόνα 2 Μεταβολή του κόστους περίθαλψης ανά ασθενή ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου του στομάχου στην Αμερική¹¹.

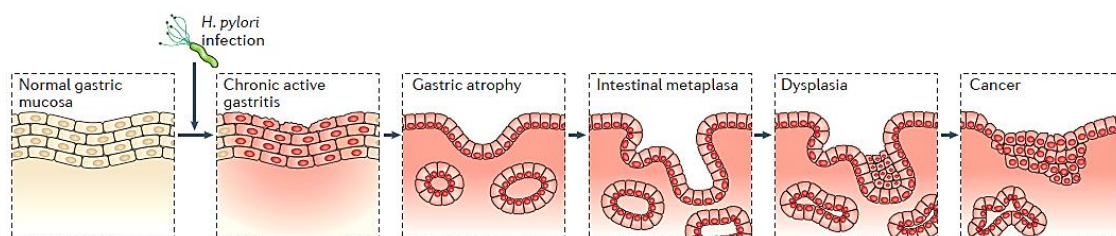
1.2.3 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου

Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου (95%)¹⁴ αποτελούν γαστρικά αδενοκαρκινώματα τα οποία όμως διαφέρουν σε πολλά επίπεδα όπως την αιτία, την μορφολογία τους, την διαφοροποίηση των κυττάρων τους και τα μοριακά χαρακτηριστικά¹⁵. Αυτή η ποικιλομορφία χαρακτηριστικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφορετικών συστημάτων ιστολογικής ταξινόμησης του γαστρικού καρκίνου, με κυριότερο το σύστημα ταξινόμησης του Lauren¹⁶. Σύμφωνα λοιπόν με τον Lauren ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να διαιρεθεί στον εντερικό υπότυπο (intestinal type) στον διάχυτο υπότυπο (diffuse type) και στον μικτό-ενδιάμεσο υπότυπο (mixed-intermediate type).

Εντερικός υπότυπος

Ο εντερικός υπότυπος είναι ο πιο διαδεδομένος υπότυπος, σε ποσοστό 54% των αδενοκαρκινωμάτων, ενώ εμφανίζεται με διπλάσια συχνότητα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες και κατά μέσο όρο σε ηλικίες άνω των 55 ετών. Στην εμφάνιση του συμβάλλουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού¹⁷. Η μόλυνση από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού συνήθως στο άντρο του στομάχου ακολουθείται από το μονοπάτι Correa που προδιαθέτει για καρκίνο¹⁸. Αρχικά το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού προκαλεί χρόνια γαστρίτιδα η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του γαστρικού βλεννογόνου και αυξημένη παρουσία λεμφοκυττάρων και ουδετερόφιλων. Στη συνέχεια εμφανίζεται ατροφική γαστρίτιδα με απώλεια της αδενικής μοίρας και αντικατάσταση της από ινώδη ιστό, με αφετηρία το άντρο και μετέπειτα επέκταση προς το σώμα. Ακολουθεί η εντερική μεταπλασία κατά την οποία το γαστρικό επιθήλιο αντικαθίσταται από κύτταρα εντερικού επιθηλίου. Αυτός ο εντερικός φαινότυπος των κυττάρων εξηγεί γιατί ονομάστηκε

εντερικός υπότυπος. Σε επόμενο στάδιο εμφανίζεται δυσπλασία κατά την οποία η μορφολογία του επιθηλίου αλλοιώνεται, τα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και είναι λιγότερο διαφοροποιημένα. Έπειτα από συσσώρευση μεταλλάξεων λόγω του αυξημένου ρυθμού κυτταρικών διαιρέσεων αναπτύσσεται καρκίνος όπου παρατηρείται διήθηση των νεοπλαστικών κυττάρων εκτός της βασικής μεμβράνης του βλεννογόνου¹⁹ (**Εικόνα 3**). Στον εντερικό υπότυπο έχουν εντοπιστεί επίσης διαφοροποιήσεις στην έκφραση κάποιων γονιδίων. Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX-2 ο οποίος εκφράζεται φυσιολογικά στον εντερικό βλεννογόνο αλλά όχι στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο, αυξορρυθμίζεται σε σημαντικά επίπεδα στο μεταπλαστικό εντερικό επιθήλιο του στομάχου κατά την εντερική μεταπλασία. Ο CDX-2 λειτουργεί ως ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που σηματοδοτεί την διαφοροποίηση του γαστρικού επιθηλίου σε εντερικό επιθήλιο και άρα προδιαθέτει για γαστρικό καρκίνο²⁰. Η τελική μετάβαση στη δημιουργία γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων περιλαμβάνει μεταλλάξεις στα ογκογονίδια KRAS, APC, TP53, TERT και άλλα²¹.



Εικόνα 3 Προτεινόμενο μοντέλο για την ανάπτυξη του εντερικού υπότυπου γαστρικού καρκίνου. Αρχικά υπάρχει ένας φυσιολογικός γαστρικός βλεννογόνος ο οποίος μολύνεται από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Έτσι ξεκινά ένα προκαρκινικό μονοπάτι που μπορεί να καταλήξει σταδιακά στον καρκίνο²².

Διάχυτος υπότυπος

Ο διάχυτος υπότυπος απαντάται σε μικρότερο ποσοστό (32%) μεταξύ των αδενοκαρκινωμάτων, εμφανίζεται με ίση συχνότητα μεταξύ ανδρών και γυναικών ενώ ο μέσος όρος ηλικίας που εμφανίζεται είναι μικρότερος σε σχέση με τον εντερικό υπότυπο¹⁷. Η σποραδική εμφάνισή του έχει συσχετισθεί με κληρονομικούς και γενετικούς παράγοντες ενώ δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια συγκεκριμένη διαδικασία που να τον προδιαθέτει, σε αντίθεση με τον εντερικό υπότυπο. Μορφολογικά φαίνεται να παρουσιάζει μια λιγότερο συνεκτική δομή, με χαλαρές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, αλλά και απουσία διαφοροποιημένων κυττάρων²³. Η μειωμένη προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων ίσως οφείλεται σε απώλεια της έκφρασης του γονιδίου CDH1 που κωδικοποιεί για την E-καδερίνη, η οποία συμβάλλει στην συνοχή των επιθηλιακών κυττάρων²⁴. Μεταλλάξεις στην E-καδερίνη έχουν αναφερθεί στο 50% των περιπτώσεων του διάχυτου υπότυπου καρκίνου αλλά όχι στον εντερικό υπότυπο. Μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί επίσης για τον παράγοντα FGF από τον οποίο μπορεί να προκύψει η ινώδης μορφή που παρουσιάζει ο διάχυτος υπότυπος²⁵.

1.2.4 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου

Στον καρκίνο του στομάχου όπως και στους υπόλοιπους τύπους καρκίνου υπάρχουν γενετικές, επιγενετικές και κατ' επέκταση μοριακές διαφοροποιήσεις που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της καρκινογένεσης και αυξάνουν την πολυπλοκότητα της ασθένειας. Η ταυτοποίηση αυτών των μοριακών διαφορών και η αξιοποίησή τους ως κριτήριο για την ομαδοποίηση των όγκων σε διαφορετικές κατηγορίες αποτελεί σημαντική εξέλιξη για την βελτίωση της πρόγνωσης, της έκβασης της ασθένειας αλλά και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και πρόβλεψη της αποτελεσματικότητάς της. Μια ευρέως διαδεδομένη μοριακή ταξινόμηση έχει προταθεί από την ερευνητική κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA)²⁶. Με βάση το συγκεκριμένο σύστημα ταξινόμησης έχουν προκύψει τέσσερις υπότυποι γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων : όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (positive for Epstein-Barr virus, EBV), όγκοι μικροδορυφορικά ασταθείς (microsatellite unstable tumours, MSI) , όγκοι γονιδιωματικά σταθεροί (genomically stable tumours, GS), όγκοι χρωμοσωμικά ασταθείς (chromosomal instability, CIN).

Όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (EBV)

Οι όγκοι EBV αποτελούν το 10% των γαστρικών καρκίνων και ανατομικά βρίσκονται στο θόλο ή το σώμα του στομάχου (βλ. παράρτημα) και εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε άνδρες. Σε αυτό τον υπότυπο έχει παρατηρηθεί αυξημένη μεθυλίωση των νησίδων CpG (CpG island methylator phenotype-CIMP)²⁷ και υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου CDKN2A που αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οδηγώντας στη σίγηση του²⁶. Στο 80% των όγκων βρέθηκαν μη σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA γεγονός που το καθιστά πιθανό θεραπευτικό στόχο²⁸. Επιπλέον μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο ARID1A, που συμμετέχει μέσω αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στην ενεργοποίηση της έκφρασης, στο αντι-αποπτωτικό γονίδιο BCOR, και σπανιότερα στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53. Αυξημένη έκφραση, λόγω γονιδιωματικής ενίσχυσης, παρατηρήθηκε στα γονίδια JAK2, που συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και PD-L1/2, τα οποία λειτουργούν ως ανοσοκαταστολείς. Αυτά τα ευρήματα μπορούν να αποτελέσουν αφορμή για την χρήση αναστολέων έναντι του JAK2 και αντισωμάτων έναντι των PD-L1/2 για την αντιμετώπιση των EBV θετικών όγκων^{29,30}.

Όγκοι μικροδορυφορικά ασταθείς (MSI)

Οι όγκοι MSI εμφανίζονται σε ποσοστό 20% των γαστρικών καρκίνων, σε άτομα ηλικίας ανώτερης των 59 ετών και κυρίως στο άντρο του στομάχου ενώ είναι πιο συχνό σε γυναίκες. Οι όγκοι αυτοί χαρακτηρίζονται από αυξημένη μεθυλίωση των νησίδων CpG σε διαφορετικό όμως επίπεδο από ότι οι EBV όγκοι²⁷. Οι διαφορές των προφίλ μεθυλίωσης στους όγκους EBV και στους όγκους MSI αντικατοπτρίζουν διαφορές στο φάσμα των μεταλλάξεων και την γονιδιακή έκφραση^{31,32}. Χαρακτηριστικό παράδειγμα για τον MSI είναι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MLH1 που κωδικοποιεί για ένα ένζυμο επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων³³. Λόγω της σίγησης του γονιδίου επιδιόρθωσης στον συγκεκριμένο υπότυπο έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων και πολλές φορές υπάρχει

μεταστροφή C σε T ή αντίστροφα²⁷. Από αυτόν τον υπότυπο συνήθως απουσιάζουν γονιδιωματικά ενισχυμένα γονίδια ενώ είναι συχνές μεταλλάξεις στα γονίδια PIK3CA, ERBB3, ERBB2, EGFR που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αποτελούν γνωστούς θεραπευτικούς στόχους σε πολλούς τύπους καρκίνου³⁴.

Όγκοι γονιδιωματικά σταθεροί (GS)

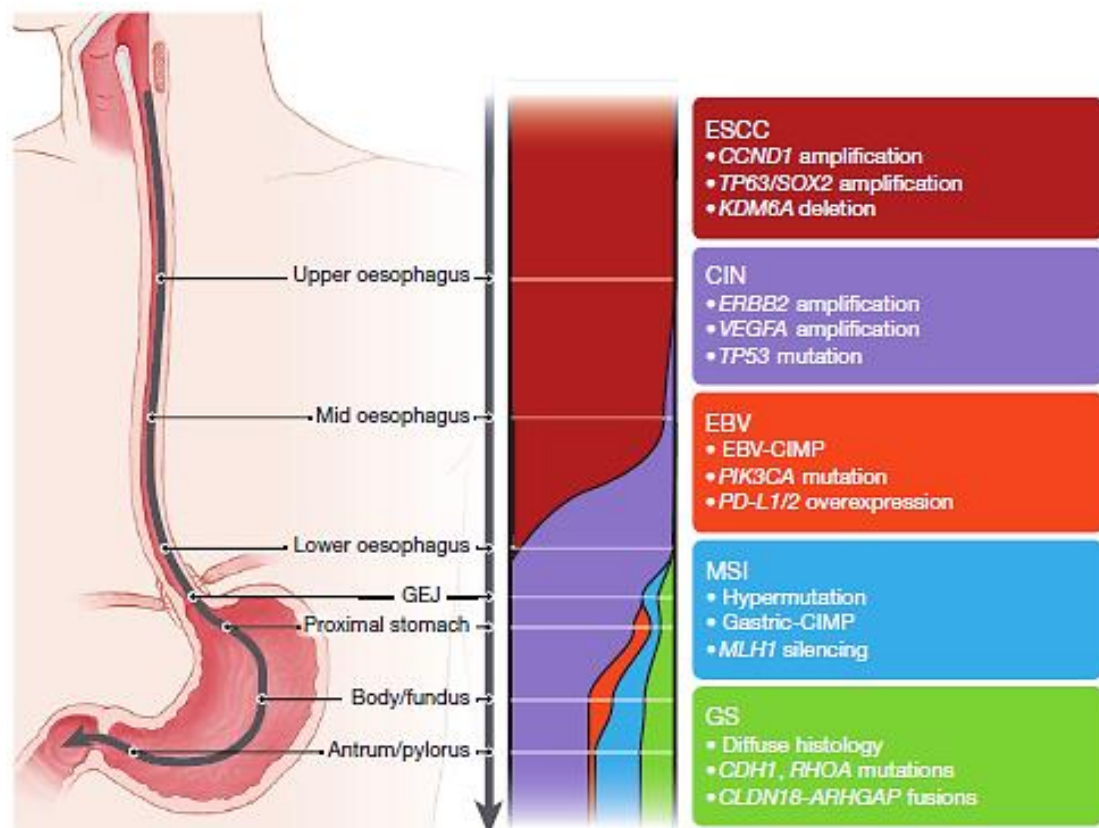
Οι όγκοι GS έχουν ιστολογία όμοια με αυτή του διάχυτου υπότυπου καρκίνου. Εμφανίζονται με συχνότητα 20% και η διάγνωση γίνεται σε άτομα ηλικίας 59 ετών κατά μέσο όρο. Σε αυτό τον υπότυπο είναι συχνές οι σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου CDH1 που κωδικοποιεί για το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης E-καδερίνη. Μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο RHOA που κωδικοποιεί για μια G πρωτεΐνη η οποία μέσω των τελεστών της συμμετέχει στη σύσπαση, τον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση των κυττάρων. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια RHOA και CDH1 μπορεί να επηρεάσουν την κυτταρική προσκόλληση μειώνοντας την και επιτρέποντας την εισβολή του όγκου σε άλλους ιστούς, όπως συμβαίνει στους όγκους διάχυτου υπότυπου. Έχει παρατηρηθεί επίσης μια διαχρωμοσωμική μετατόπιση μεταξύ του γονιδίου CLDN18, που αποτελεί συστατικό μόριο κυτταρικής προσκόλλησης και του γονιδίου ARHGAP26 που αποτελεί μια πρωτεΐνη που συμβάλλει στην ανταλλαγή GDP/GTP στις G πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη που προκύπτει από αυτή τη σύντηξη μπορεί να μεταβάλλει τη λειτουργία και των δύο αρχικών μορίων, μεταβάλλοντας την κινητικότητα των κυττάρων είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω ρύθμισης της RHOA από την ARHGAP26^{26,33}.

Όγκοι χρωμοσωμικά ασταθείς (CIN)

Οι όγκοι CIN αποτελούν τον πιο συχνό από τους τέσσερις μοριακούς υπότυπους με ποσοστό 50% και η πλειοψηφία τους τοποθετείται στο γαστροοισοφαγικό σφιγκτήρα ή την καρδιά. Ιστολογικά οι όγκοι CIN φαίνεται να ομοιάζουν με τον εντερικό τύπο. Η χρωμοσωμική αστάθεια μπορεί να αποτελεί μια μεταβολή στο αριθμό των χρωμοσωμάτων, ο οποίος μπορεί να είναι μειωμένος ή ενισχυμένος με αποτέλεσμα να υπάρχει ανευπλοειδία. Επίσης συχνά πρόκειται για ενίσχυση, έλλειψη, μετατόπιση ενός μέρους του χρωμοσώματος ή για απώλεια ενός αλληλομόρφου³⁵. Στην πλειοψηφία των όγκων CIN (71%) βρέθηκαν μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 αλλά και αυξημένη έκφραση του p53 που εξηγείται από την ανευπλοειδία του CIN²⁶.

Σε γονιδιωματική ενίσχυση έχουν ταυτοποιηθεί και γονίδια των σηματοδοτικών μονοπατιών RTK/RAS³⁶. Τα γονίδια RTKs κωδικοποιούν για υποδοχείς κινασών τυροσίνης και στους προσδέτες τους συμπεριλαμβάνονται και αυξητικοί παράγοντες. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης λόγω ενίσχυσης έχουν ανιχνευθεί για τα γονίδια υποδοχέων EGFR, MET αλλά και για το γονίδιο του προσδέτη VEGFA που συμμετέχει στην αγγειογένεση. Πρόσφατα βρέθηκε και το γονίδιο FGFR2 σε πολλαπλά αντίγραφα στον γαστρικό καρκίνο ενώ η ύπαρξη τόσο του FGFR2 όσο και γονιδίων RAS σε ενίσχυση έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση σε σχέση με όγκους που δεν βρέθηκαν αυτά τα γονίδια ενισχυμένα³⁷. Ένα ακόμη γονίδιο που έχει βρεθεί σε γονιδιωματική ενίσχυση είναι το γονίδιο HER2 (ERBB2)³⁸. Πολλοί υποδοχείς από αυτούς που αναφέρθηκαν ήδη εξετάζονται ως θεραπευτικοί στόχοι μέσω αντισωμάτων³⁴.

Συχνά σε ενίσχυση έχουν βρεθεί τα γονίδια CCNE1, CCND1, CDK6 που αποτελούν ενδιάμεσα μόρια της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Εκτός από γονίδια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, σε ενίσχυση έχουν ταυτοποιηθεί και γονίδια που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες. Συχνά στον καρκίνο έχει ταυτοποιηθεί σε πολλαπλά αντίγραφα και το γονίδιο MYC που αποτελεί γνωστό πρωτο-ογκογονίδιο. Στο γαστρικό καρκίνο αλλά και σε καρκίνους μόνο του γαστρεντερικού συστήματος έχουν βρεθεί σε γονιδιωματική ενίσχυση τα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων KLF5, GATA4, GATA6. Εκτός από ενίσχυση σε αριθμό αντιγράφων τα τρία αυτά γονίδια φαίνεται να συνεκφράζονται στο γαστρικό καρκίνο και να έχουν ρόλο στην προώθηση και τον πολλαπλασιασμό του όγκου μέσω σχηματισμού ρυθμιστικών συμπλόκων είτε μεταξύ τους είτε με την συμμετοχή άλλων μεταγραφικών παραγόντων³⁷.



Εικόνα 4 Στο σχήμα απεικονίζονται οι υπότυποι του γαστροοισοφαγικού καρκίνου. Στα πλαίσια συνοψίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά του κάθε υπότυπου. Τα χρώματα αντιστοιχούν σε διαφορετικό υπότυπο ενώ το πλάτος σε διαφορετική αναλογία εμφάνισης κατά μήκος του οισοφάγου και του στομάχου. (ESCC-squamous cell carcinoma)³⁹.

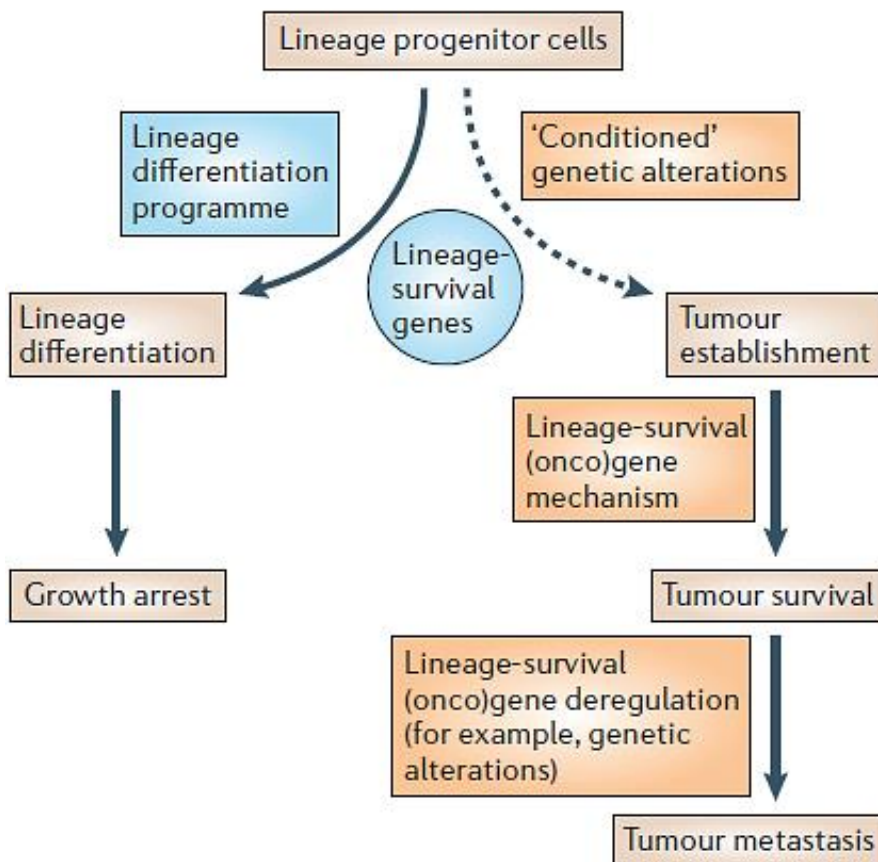
1.3 Ογκογονίδια προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας

Για πολλά χρόνια έχει επικρατήσει η άποψη ότι η πολύπλοκη διαδικασία της ανάπτυξης και προόδου του καρκίνου είναι αποτέλεσμα γενετικών μεταβολών που οδηγούν στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων και στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο σήματα από τα καρκινικά κύτταρα που απουσιάζουν από το φυσιολογικό ιστό προκαλούν ανώμαλο πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν την απόπτωση. Με αυτό τον τρόπο καθίστανται τα κύτταρα του όγκου εξαρτημένα από τα ογκογονίδια (oncogene-addiction)⁴⁰. Παράδειγμα που υποστηρίζει αυτό το μοντέλο αφορά μελέτες που έγιναν με το πρωτο-ογκογονίδιο MYC. Σύμφωνα με τις μελέτες που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια η επαγόμενη έκφραση του MYC οδηγούσε σε ογκογένεση ενώ η απενεργοποίηση της έκφρασης του μείωνε τον πολλαπλασιασμό και οδηγούσε σε διαφοροποίηση και απόπτωση των κυττάρων^{41,42}.

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ένα άλλο μοντέλο για την προαγωγή της ογκογένεσης, το επονομαζόμενο μοντέλο εξάρτησης από τη γενεαλογία των κυττάρων (lineage-addiction)^{43,44}. Σε αντίθεση με το εξαρτώμενο από ογκογονίδια μοντέλο, σε αυτή την περίπτωση δεν υφίσταται κέρδος λειτουργίας ογκογονιδίων αλλά διατήρηση και απορρύθμιση κρίσιμων μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την επιβίωση μιας γενεαλογίας. Αυτό σημαίνει ότι η προαγωγή της ογκογένεσης εξαρτάται από μηχανισμούς πολύ καλά προγραμματισμένους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε προγονικά κύτταρα που όμως έχουν αποκτήσει επίκτητες μεταβολές και έχουν χάσει τη ρυθμισμένη έκφρασή τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται λόγος για τα ογκογονίδια προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας (lineage survival oncogenes)⁴⁵. Συνήθως πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση μιας γενεαλογίας κυττάρων κατά την ανάπτυξη. Στον καρκίνο τα γονίδια αυτών των μεταγραφικών παραγόντων φέρουν γενετικές μεταβολές, όπως ενίσχυση των γενετικών τόπων σε αριθμό αντιγράφων, που έχουν ως συνέπεια την απορρύθμιση της έκφρασής τους, συνθήκη που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόοδο της ογκογένεσης (**Εικόνα 5**).

Ένα παράδειγμα γονιδίου που έχει ενταχθεί στην κατηγορία των ογκογονιδίων προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας είναι ο μεταγραφικός παράγοντας MITF (Microphthalmia-associated transcription factor). Ο MITF είναι υπεύθυνος για την διαφοροποίηση και την διατήρηση της γενεαλογίας των μελανοκυττάρων ενώ στο μελάνωμα έχει βρεθεί γονιδιωματικά ενισχυμένος και έχει συσχετισθεί με μετάσταση και δυσμενή πρόγνωση^{44,46}. Ως ογκογονίδιο προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας έχει ταυτοποιηθεί και ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6. Όπως και ο MITF, ο GATA6 έχει καθοριστικό ρόλο κατά την ανάπτυξη στην διαφοροποίηση και διατήρηση γενεαλογίας κυττάρων πολλών οργάνων όπως η καρδιά, το ήπαρ, το έντερο, το πάγκρεας και ο στόμαχος. Στην περίπτωση του καρκίνου έχει βρεθεί σε γονιδιωματική ενίσχυση σε περιπτώσεις που περιορίζονται μόνο στο γαστρεντερικό σύστημα όπως σε καρκίνους στον οισοφάγο, το πάγκρεας και τον στόμαχο^{37,47,48}.

Η τόσο σημαντική συνεισφορά των γονιδίων αυτών στην καρκινογένεση θα μπορούσε να οδηγήσει στην στόχευση τους ως ένα πιθανό τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου. Όμως η στόχευση τους δεν θα επηρέαζε μόνο τα καρκινικά κύτταρα που θα ήταν το επιθυμητό αλλά και τα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία εκφράζονται και δρουν αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες. Έτσι μέσω της ταυτοποίησης των ογκογονιδίων προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας είναι προτιμότερο να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με αυτά, ρυθμίζονται από αυτά, συμμετέχουν σε καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια, ωστόσο εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ιστοειδικότητα ή/και καρκινοειδικότητα^{45,48}.



Εικόνα 5 Στο σχήμα συνοψίζεται ο ρόλος των *lineage survival oncogenes*. Στο αριστερό μέρος φαίνεται η δράση των γονιδίων για τον καθορισμό της γενεαλογίας κυττάρων ενώ στα δεξιά φαίνεται η διαφοροποιημένη δράση και συνεισφορά στον καρκίνο λόγω γενετικών μεταβολών⁴⁵.

1.4 Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA

Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA συνθέτουν μια οικογένεια συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Διαθέτουν μια συντηρημένη επικράτεια η οποία αποτελείται από ένα μοτίβο δύο δακτύλων ψευδαργύρου μέσω του οποίου αναγνωρίζουν και προσδένονται στην αλληλουχία (A/T)GATA(A/G)⁴⁹, από την οποία έλαβαν και το όνομά τους. Σύμφωνα με τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης που εμφανίζουν στους διαφορετικούς ιστούς χωρίζονται σε δύο υπό-οικογένειες τους GATA1-2-3 και τους GATA4-5-6. Οι GATA1-2-3 εκφράζονται κυρίως σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα έχοντας κρίσιμο ρόλο στην διαφοροποίηση τους ενώ η απουσία τους έχει βρεθεί ότι προκαλεί σοβαρή αναιμία^{50,51}. Επιπλέον μεταλλάξεις των GATA1-2-3 έχουν βρεθεί να έχουν ρόλο στον καρκίνο όπως στην λευχαιμία, το λέμφωμα Τ-κυττάρων⁵²⁻⁵⁴. Οι GATA4-5-6 σε πολλές περιπτώσεις έχουν ένα επικαλυπτόμενο πρότυπο έκφρασης και συμμετέχουν στην διαφοροποίηση ιστών που προέρχονται από το ενδόδερμα και το μεσόδερμα όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο στόμαχος, το έντερο και οι γονάδες και έχουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης^{49,55,56}. Έχει γίνει λόγος και για τον ρόλο των GATA4-5-6 στον καρκίνο και φαίνεται ότι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως ογκοπροαγωγείς σε κάποιες περιπτώσεις και ως ογκοκαταστολείς σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, ανάλογα με τον ιστό και τον κυτταρικό τύπο. Παρόλα αυτά στον καρκίνο του στομάχου φαίνεται να έχουν επαγωγικό ρόλο στην ογκογένεση^{52,57-59}.

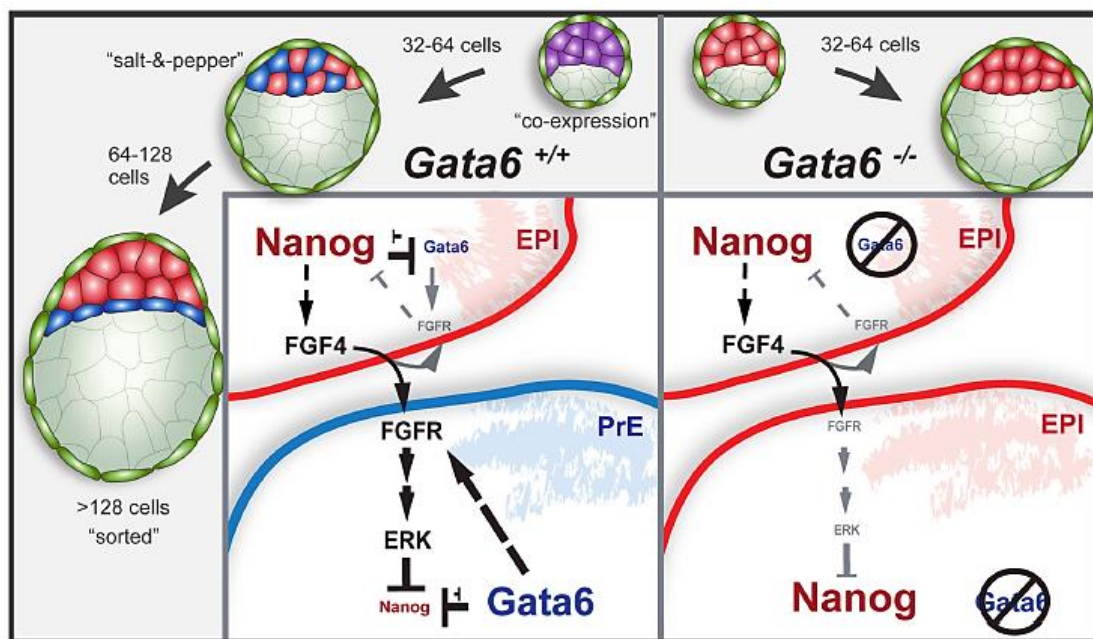
1.4.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 στην εμβρυική ανάπτυξη

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 έχει αξιοσημείωτο ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων τόσο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου όσο και στα επιμέρους όργανα του ενήλικου ατόμου. Κατά την προεμφυτευτική περίοδο η βλαστοκύστη, όπως ονομάζεται το έμβρυο, αποτελείται από μια εξωτερική στιβάδα κυττάρων, το τροφοεξώδερμα (trophoectoderm) η οποία περιβάλλει την εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass, ICM). Τα κύτταρα της ICM διαφοροποιούνται σε δύο κυτταρικές γενεαλογίες, την επιβλάστη (EPI) και το πρωτογενές ενδόδερμα (PrE). Από το πρωτογενές ενδόδερμα προκύπτουν το τοιχωματικό ενδόδερμα (parietal endoderm) και το σπλαχνικό ενδόδερμα (visceral endoderm) που συμβάλλουν σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς⁶⁰.

Ο GATA6 αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη γενεαλογία κυττάρων του πρωτογενούς ενδοδέρματος και κύριο δείκτη της διαφοροποίησης του. Για την γενεαλογία των κυττάρων της επιβλάστης καθοριστικό ρόλο έχει ο παράγοντας Nanog. Το ποια κύτταρα θα δώσουν πρωτογενές ενδόδερμα ή επιβλάστη φαίνεται να αποτελεί ένα τυχαίο γεγονός με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μωσαϊκό μοτίβο ('salt & pepper'). Σε έμβρυα ποντικών που απουσίαζε ο GATA6 (knock out), υπήρχε έκφραση του NANOG στο σύνολο των κυττάρων της εσωτερικής μάζας με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται όλα προς επιβλάστη και να μην σχηματίζεται

πρωτογενές ενδόδερμα, κάτι που υποδηλώνει ότι όπου εκφράζεται ο GATA6 ανταγωνίζεται και εκτοπίζει τον NANOG. Μελέτες έδειξαν ότι δεν απαιτείται μόνο ο GATA6 για τον καθορισμό του πρωτογενούς ενδοδέρματος και κατά συνέπεια την καταστολή του Nanog αλλά σε αυτή συμβάλλει και η αυξημένη σηματοδότηση των FGF/ERK μέσω του FGF4 που παράγεται από την επιβλάστη και του FGFR που αυξάνεται από τον GATA6^{61,62} (Εικόνα 6).

Η έκφραση του GATA6 σε συνδυασμό με την σηματοδότηση από τον FGF4 οδηγούν στην έκφραση δευτερογενών δεικτών του ενδοδέρματος όπως SOX17 και GATA4⁶¹. Σε ποντίκια που ο GATA6 απουσίαζε δεν βρέθηκαν να εκφράζονται οι SOX17 και GATA4, επιβεβαιώνοντας ότι απουσία του GATA6 δεν οριστικοποιείται το πρωτογενές ενδόδερμα. Η διασταύρωση ποντικών ετερόζυγων για το GATA6 δεν οδήγησε σε γέννηση ποντικών από τα οποία απουσίαζε ο GATA6. Όπως βρέθηκε τα έμβρυα των ποντικών από τα οποία απουσιάζει ο GATA6 επιβιώνουν έως την ημέρα 5,5 περίπου και αυτό αποδίδεται στην αδυναμία διαφοροποίησης του πρωτογενούς ενδοδέρματος και κατά συνέπεια ανάπτυξης εξωεμβρυϊκών ιστών, στις οποίες ο GATA6 έχει πρωταγωνιστικό ρόλο⁶³. Σε έμβρυα ποντικών ετερόζυγα για τον GATA6 παρατηρήθηκε καθυστέρηση στη διαφοροποίηση του πρωτογενούς ενδοδέρματος και μικρότερος αριθμός κυττάρων αυτής της γενεαλογίας, γεγονός που υποδεικνύει ότι η συγκέντρωση του GATA6 είναι σημαντική για την οριστικοποίηση του πρωτογενούς ενδοδέρματος^{62,64}.



Εικόνα 6 Διαφοροποίηση της εσωτερικής μάζας κυττάρων προς επιβλάστη και πρωτογενές ενδόδερμα. Στα αριστερά η παρουσία του Nanog στα κύτταρα της επιβλάστης (κόκκινο) και του GATA6 στα κύτταρα του πρωτογενούς ενδοδέρματος (μπλε) υποδεικνύουν την επιτυχή διαφοροποίηση σε αντίθεση με την εικόνα δεξιά⁶².

Το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα είναι οι τρεις βλαστικές στιβάδες από τις οποίες θα προκύψουν όλοι οι ιστοί του εμβρύου. Κατά την γαστριδίωση

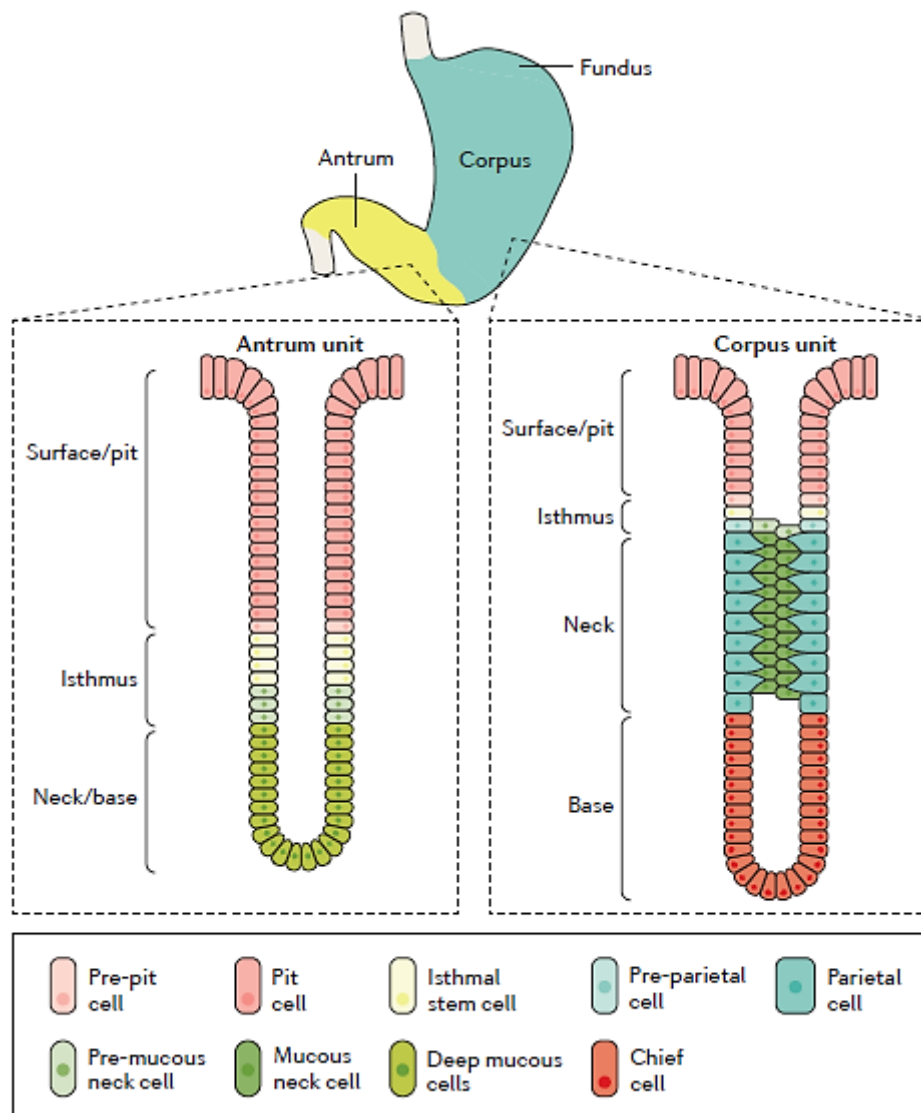
σχηματίζεται το ενδόδερμα που αποτελεί την ενδότερη από τις τρεις βλαστικές στιβάδες. Μια σειρά μορφογενετικών κινήσεων που λαμβάνει χώρα μετά τη γαστριδίωση οδηγούν στο σχηματισμό του αρχέγονου γαστρεντερικού σωλήνα, ο οποίος περιβάλλεται από μεσόδερμα. Το εμπρόσθιο αρχέντερο (foregut) θα σχηματίσει τον οισοφάγο, την τραχεία, το στόμαχο, τους πνεύμονες, τον θυρεοειδή, το ήπαρ και το πάγκρεας ενώ το μέσο αρχέντερο (midgut) θα σχηματίσει το λεπτό έντερο και το οπίσθιο αρχέντερο (hindgut) θα σχηματίσει το παχύ έντερο⁶⁵. Για την εξειδίκευση των ξεχωριστών τμημάτων του αρχέγονου γαστρεντερικού σωλήνα είναι υπεύθυνοι διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες. Ο SOX2 φαίνεται να εκφράζεται σε όλο το μήκος του εμπρόσθιου αρχέντερου από το ανώτερο τμήμα του φάρυγγα έως το κατώτερο τμήμα του στομάχου, έχοντας καθοριστικό ρόλο στο στόμαχο²¹. Ο PDX1 συμβάλλει στην διαφοροποίηση του οπίσθιου τμήματος του στομάχου αλλά και στο δωδεκαδάκτυλο και το πάγκρεας⁶⁶. Από την άλλη πλευρά η σηματοδότηση Wnt/FGF είναι υψηλότερη και συμβάλλει στην εξειδίκευση του οπίσθιου αρχέντερου ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 εκφράζεται στο μέσο αρχέντερο και καθορίζει το όριο έναρξης του λεπτού εντέρου μετά το δωδεκαδάκτυλο⁶⁷. Επίσης στο ενδόδερμα και πιο συγκεκριμένα στο εμπρόσθιο αρχέντερο εκφράζονται οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και GATA6 με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του στομάχου^{63,65}.

1.4.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 στο φυσιολογικό στόμαχο

Μετά τον σχηματισμό του στομάχου, το γαστρικό επιθήλιο αποκτά μια όλο και πιο σύνθετη μορφή ώστε να δημιουργηθεί μια δομή με υψηλή οργάνωση που θα διαφοροποιηθεί τελικά στον ώριμο στόμαχο. Όπως έχει αναφερθεί η εσωτερική επιφάνεια του στομάχου σχηματίζει εγκοιλώσεις, το αρχικό τμήμα των οποίων σχηματίζει το γαστρικό βοθρίο (pit) και η βάση τους τον αδένα (gland). Η αδενική μοίρα μπορεί να διαιρεθεί στον ισθμό (isthmus) και τον αυχένα/βάση (neck/base). Στο βοθρίο εντοπίζονται βλεννοπαραγωγά κύτταρα (pit/mucous cells) που παράγουν βλέννα. Στον ισθμό εντοπίζονται βλαστοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε όλους τους υπόλοιπους κυτταρικούς τύπους. Στον αυχένα/βάση του σώματος (corpus) εντοπίζονται θεμέλια κύτταρα (chief cells) που παράγουν πεψινογόνο, τοιχωματικά κύτταρα (parietal cells) που παράγουν υδροχλωρικό οξύ και κάποια βλεννοπαραγωγά κύτταρα (neck mucous cells). Στον αυχένα/βάση του άντρου εντοπίζονται ενδοκρινή κύτταρα (endocrine/deep mucous cells) που παράγουν ισταμίνη και ορμόνες όπως η γαστρίνη, η σωματοστατίνη⁶⁸.

Από τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα στο βοθρίο κυρίως και σε μικρότερο βαθμό στον αυχένα παράγεται βλέννα που είναι απαραίτητη καθώς προστατεύει από μηχανικό (τα περιεχόμενα της τροφής) ή χημικό (υδροχλωρικό οξύ, τα πεπτικά ένζυμα) τραυματισμό. Ο GATA6 έχει βρεθεί ότι επάγει την έκφραση των TFF1 και TFF2 (Trefoil Factor). Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν πεπτίδια τα οποία εκκρίνονται και αλληλεπιδρούν με την παραγόμενη βλέννα, έχοντας προστατευτικό ρόλο ως προς τον

γαστρικό βλεννογόνο⁶⁹. Επιπλέον έκφραση του GATA6 έχει εντοπιστεί και στην βάση της αδενικής μοίρας του γαστρικού βλεννογόνου. Έχει διαπιστωθεί ότι ο GATA6 εκφράζεται στα ενδοκρινή κύτταρα του στομάχου, τα οποία εκκρίνουν μόρια που σχετίζονται με την απόκριση στην κατανάλωση τροφής και ρυθμίζουν την έκκριση γαστρικών υγρών όπως γαστρίνη, ισταμίνη, σωματοστατίνη. Σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, που δεν είχαν τραφεί για 48 ώρες, τα επίπεδα του GATA6 έδειξαν να αυξάνονται μετά την κατανάλωση τροφής⁷⁰. Μοτίβο για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 και κατά συνέπεια την ρύθμιση γονιδίων έχει εντοπισθεί και στα τοιχωματικά κύτταρα. Τα τοιχωματικά κύτταρα εκκρίνουν υδροχλωρικό οξύ το οποίο συμβάλλει στη διάσπαση της τροφής, στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και την καταστροφή των μικροοργανισμών που περιέχει η τροφή. Σε αυτά τα κύτταρα ο GATA6 επάγει την έκφραση της αντλίας μεταφοράς $H^+ - K^+$ ATPάση, η οποία μεταφέρει με κατανάλωση ATP στο εσωτερικό των κυττάρων K^+ και εκκρίνει H^+ το οποίο θα σχηματίσει μαζί με Cl^- το υδροχλωρικό οξύ⁷¹.



Εικόνα 7 Αρχιτεκτονική και οργάνωση των εγκολπώσεων του στομάχου στο σώμα και στο άντρο⁷².

1.4.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 στον καρκίνο του στομάχου

Ο στόμαχος, όπως και το έντερο, έχει την ικανότητα ανάπλασης και ανανέωσης των διαφορετικών τύπων κυττάρων του βλεννογόνου του ώστε να αντιμετωπίζονται πιθανοί μηχανικοί ή χημικοί τραυματισμοί. Παρόλο που αυτή η ιδιότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική, οι αλληπάλληλοι κύκλοι διαφοροποίησης και απο-διαφοροποίησης συμβάλλουν στη συσσώρευση μεταλλάξεων, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου. Στον ισθμό εντοπίζονται τα λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα με τη μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιούνται, δίνοντας όλους τους τύπους κυττάρων, μεταφερόμενα τόσο προς το βοθρίο όσο και προς τη βάση των γαστρικών εμβλαθύνσεων. Επιπλέον έχουν βρεθεί κύτταρα προς τη βάση της αδενικής μοίρας που μπορούν να πολλαπλασιάζονται^{65,73}. Αντίθετα τα τοιχωματικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες όμως έχει αναφερθεί συμμετοχή τους σε μεταπλασίες⁷⁴. Η χρόνια γαστρεντερική φλεγμονή, σε περιπτώσεις όπως η ατροφική γαστρίτιδα που συνοδεύεται από απώλεια κυττάρων της αδενικής μοίρας (achlorhydria), οδηγεί σε μη φυσιολογική ανάπλαση των κυττάρων του γαστρικού βλεννογόνου και νεοπλασία σε τελικό στάδιο⁷⁵. Σε αυτή τη μη φυσιολογική αναγέννηση των κυττάρων συνεισφέρουν τα βλαστοκύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου που πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε μεταπλαστικά κύτταρα⁷⁶. Στην ενδοκρινική και την εντερική μεταπλασία τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 αλλά και του GATA4 έχουν βρεθεί αυξημένα, υποδεικνύοντας συμμετοχή των παραγόντων αυτών στα προκαρκινικά στάδια του γαστρικού καρκίνου⁷⁷.

Εκτός από την παρουσία και συμμετοχή του GATA6 σε προκαρκινικές αλλοιώσεις, έχει ταυτοποιηθεί και ο σημαντικός του ρόλος στο γαστρικό καρκίνο. Η χρωμοσωμική αστάθεια είναι η πιο συχνή μοριακή διαφοροποίηση που παρατηρείται στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και ο GATA6 αποτελεί ένα από τα πιο συχνά γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί σε γονιδιωματική ενίσχυση στο γαστρικό καρκίνο³⁷. Σε πολλές περιπτώσεις γαστρικών όγκων έχει παρατηρηθεί η παρουσία τόσο του GATA6 όσο και των GATA4 και KLF5 σε πολλαπλά γονιδιωματικά αντίγραφα. Πειράματα που έγιναν σε γαστρικές καρκινικές σειρές στις οποίες σιγήθηκαν οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες, έδειξαν μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων γεγονός που υποδεικνύει μια συνεργασία για την προαγωγή της ανάπτυξης του όγκου. Η ανοσοκατακρήμνιση και αλληλούχηση του DNA στο οποίο προσδένονται οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες, έδειξαν ότι είναι πιθανό οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες να συνεργάζονται και να ρυθμίζουν κοινούς γονιδιακούς στόχους. Το κοινό μεταγραφικό δίκτυο που σχηματίζουν οι GATA4, GATA6 και KLF5 στοχεύοντας την προαγωγή του όγκου οδήγησε στο να θεωρηθούν αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ογκογονίδια προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας⁷⁸.

Σε άλλες περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 στο γαστρικό καρκίνο με τον μεταγραφικό παράγοντα GATA2, ο οποίος έχει σημαντικό ρόλο στην αιμοποιητική κυτταρική

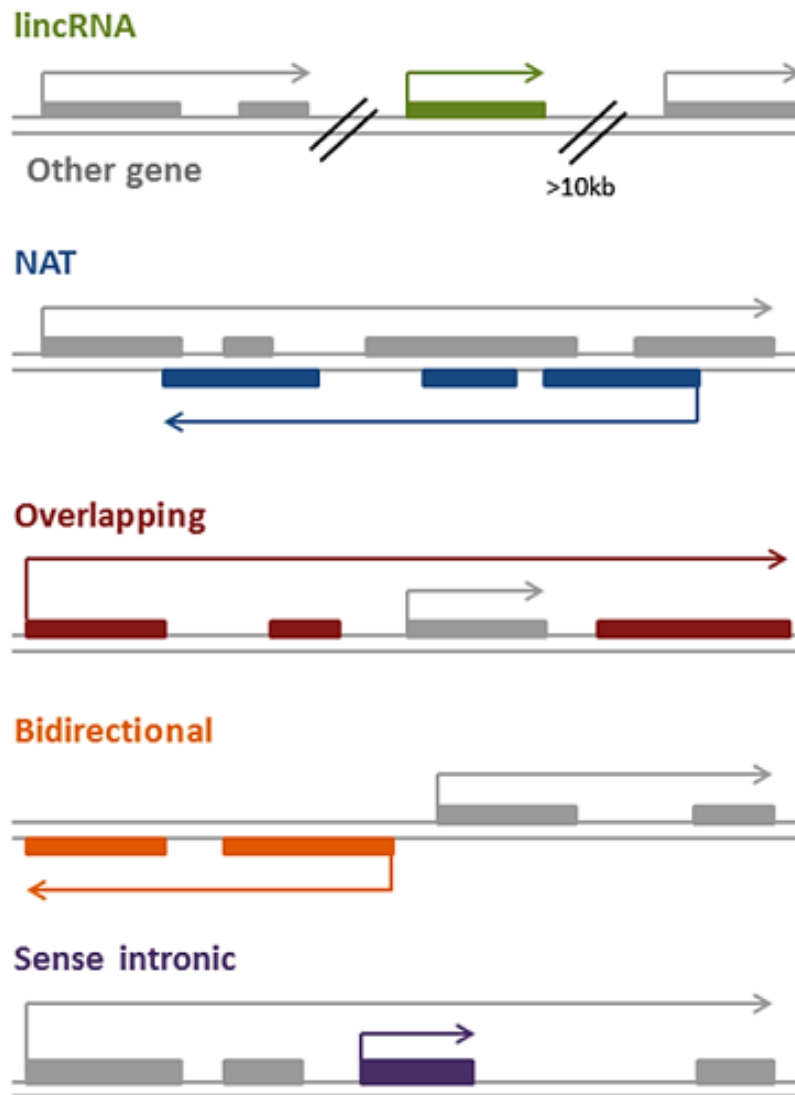
γενεαλογία. Σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα που ο GATA6 δεν εκφραζόταν, εντοπίστηκε συσσώρευση GATA2 και SUZ12, συστατικού του PRC2 συμπλέγματος μεθυλοτρανσφερασών των ιστονών, στο γενετικό τόπο του GATA6. Όπως διαπίστωσαν η υπερέκφραση του GATA2 μείωνε την έκφραση του GATA6 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η μεταγραφική σίγηση του GATA6 ήταν αποτέλεσμα της μεθυλίωσης που διέγειρε ο GATA2. Στην περίπτωση του καρκίνου όπου παρατηρείται αυξημένη έκφραση του GATA6 φαίνεται να προηγείται μεταγραφική σίγηση του GATA2 μέσω μεθυλίωσης σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης⁷⁹.

Όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω αποδεικνύουν την εξαιρετική σημασία που έχει η έκφραση και κατά συνέπεια η ρύθμιση που ασκεί ο GATA6 από τις πρώτες ημέρες της εμβρυικής ζωής έως την ενήλικη ζωή. Η παράλληλη δράση του GATA6 σε φυσιολογικά αλλά και σε καρκινικά κύτταρα του στομάχου οδηγεί στην αφαίρεση του GATA6 από τους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους καθώς με μια τέτοια στόχευση δεν θα μπορούσε να αποφευχθεί και η επιρροή έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Με αυτή την προϋπόθεση, η αναζήτηση θεραπευτικών στόχων και προγνωστικών δεικτών προσανατολίζεται σε μόρια με εξειδικευμένη έκφραση σε επίπεδο κυττάρων, ιστών και ασθενειών που όμως θα ρυθμίζονται από τον GATA6. Μόρια που να διαθέτουν αυτά τα χαρακτηριστικά είναι και τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (Long Non-Coding RNAs - lncRNAs).

1.5 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (Long non-coding RNAs)

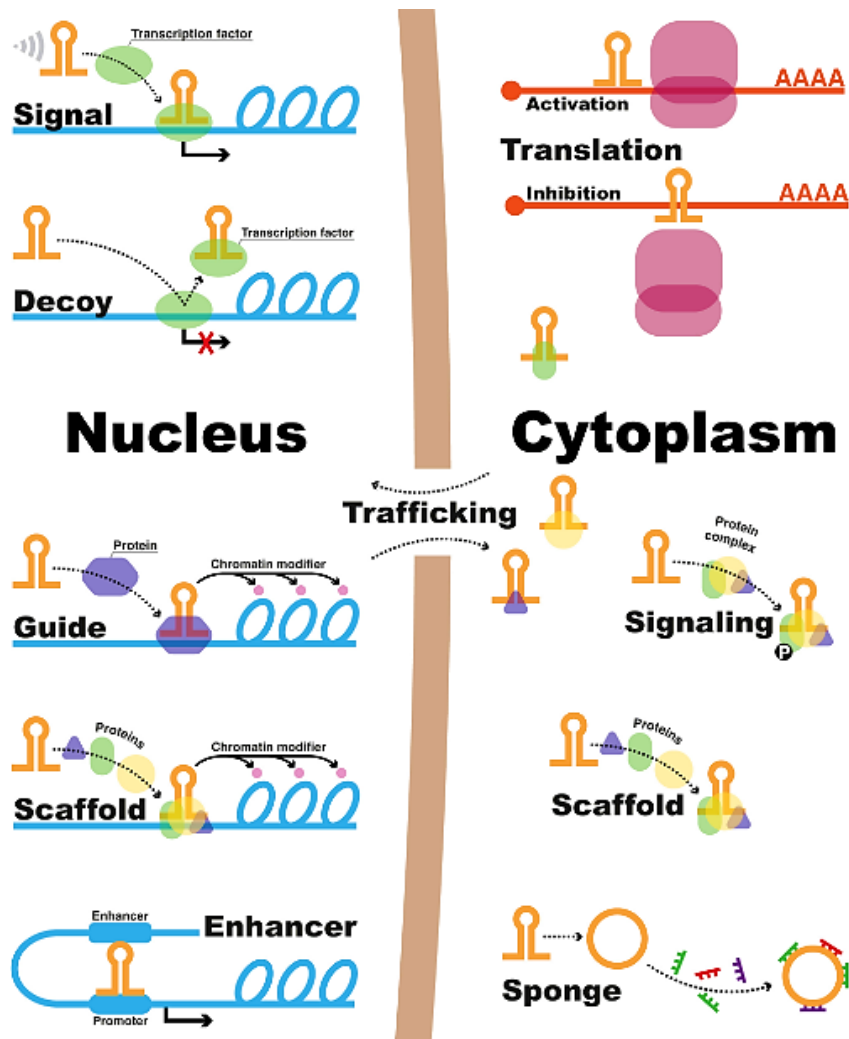
Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει τα μετάγραφα που παράγονται από τα κύτταρα του ανθρώπου καλύπτουν ένα μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου γονιδιώματος της τάξεως του 85%, ενώ εξόνια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη αντιστοιχούν σε ποσοστό 1% του γονιδιώματος^{80,81}. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των μεταγράφων αντιστοιχεί σε μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τα μικρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (small non-coding RNAs-sncRNAs) και τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (long non-coding RNA-lncRNAs)⁸². Τα lncRNAs είναι μετάγραφα με μήκος που υπερβαίνει τα διακόσια νουκλεοτίδια, χαρακτηριστικό που τα διαχωρίζει από τα sncRNAs. Η μεταγραφή τους πραγματοποιείται από το ένζυμο RNA πολυμεράση II ενώ τα περισσότερα υφίστανται μάτισμα, φέρουν 5' μεθυμελιωμένη καλύπτρα καθώς και πολυ-αδενυλιωμένη ουρά όπως τα mRNAs^{83,84}. Ανάλογα με την θέση τους στο γονιδίωμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε lncRNAs που βρίσκονται σε μεσογονιδιακό χώρο και δεν επικαλύπτονται με άλλα γονίδια (Long Intergenic ncRNAs-lincRNAs), σε lncRNAs που βρίσκονται στο ιντρόνιο ενός γονιδίου πρωτεΐνης (Intronic lncRNAs), σε lncRNAs που ένα τμήμα τους επικαλύπτεται με ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη (Overlapping), σε lncRNAs που μεταγράφονται με αντίθετη κατεύθυνση από τη μη κωδική αλυσίδα του DNA (Natural Antisense Transcripts) και lncRNAs που ξεκινά η

μεταγραφή τους από τον υποκινητή ενός γονιδίου πρωτεύινης προς την αντίθετη κατεύθυνση (Bidirectional/Divergent lncRNAs)⁸⁵ (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 Κατηγοριοποίηση των lncRNAs σύμφωνα με τη θέση τους στο γονιδίωμα⁸⁶.

Τα lncRNAs έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο εξειδικεύοντας τη δράση τους ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τη βιολογική διεργασία. Έτσι ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης των lncRNAs είναι βάση της υποκυτταρικής τους θέσης κατά την οποία διακρίνονται σε πυρηνικά lncRNAs και κυτταροπλασματικά lncRNAs⁸⁷(Εικόνα 9).



Εικόνα 9 Σύνοψη της δράσης των lncRNAs σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα⁸⁸

Τα πυρηνικά lncRNAs μπορούν να δράσουν σαν σήματα ή καθοδηγητές (signals/guides) μεταγραφικών παραγόντων ή χρωματινικών συμπλόκων ώστε να ρυθμιστεί η γονιδιακή έκφραση ως προς το χρόνο και το χώρο. Ένα παράδειγμα αυτών των lncRNAs είναι το Xist το οποίο κατά την ανάπτυξη των θηλυκών μεταγράφεται από το χρωμόσωμα X και το καλύπτει οδηγώντας στην απενεργοποίησή του⁸⁹. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνεται και το HOTAIR το οποίο αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο μεθυλοτρανσφερασών PRC2 με στόχο τη σίγηση του γενετικού τόπου HOXD⁹⁰. Άλλα lncRNAs δρουν σαν δολώματα (decoys), τα οποία μετά τη μεταγραφή τους προσδένονται σε ρυθμιστικά μόρια όπως μεταγραφικούς παράγοντες και χρωματινικούς τροποποιητές, εμποδίζοντας τη δράση τους. Ένα lncRNA δόλωμα είναι το Gas5 που μιμείται τη θέση πρόσδεσης στο DNA και συμπλέκεται με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, εμποδίζοντας την επαγωγή γονιδίων από αυτόν⁹¹. Επιπλέον τα lncRNAs μπορεί να αποτελούν ικριώματα (scaffolds) για την πρόσδεση πρωτεϊνών που προσδέουν RNA ή DNA. Παράδειγμα αποτελεί το MALAT1 που αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων αυτών που συμμετέχουν στο εναλλακτικό μάτισμα mRNA⁹². lncRNAs όπως το NEAT είναι δυνατό να συμμετέχουν σε σύμπλοκα RNA-πρωτεϊνών, τα λεγόμενα paraspeckles που συμμετέχουν στη μεταγραφή⁹³. Άλλη μια κατηγορία

πυρηνικών lncRNAs είναι τα e-lncRNAs (enhancer lncRNAs) τα οποία προκύπτουν από τη μεταγραφή ενισχυτών και συμβάλλουν στην έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από τον ενισχυτή αποτελώντας συνδετικό κρίκο μεταξύ ενισχυτών και υποκινητών⁹⁴. Τα πυρηνικά lncRNAs υποδιαιρούνται ακόμα περισσότερο ανάλογα με την απόσταση τους από το γονίδιο-στόχο. Έτσι κάποια από τα πυρηνικά lncRNAs επιδρούν ρυθμιστικά *in cis* δηλαδή σε γειτονικά τους γονίδια (*cis acting*) ενώ άλλα δρουν σε απομακρυσμένα γονίδια του πυρήνα ή/και στο κυτταρόπλασμα (*trans acting*)⁹⁵. Υπάρχουν περιπτώσεις που το ίδιο lncRNA μπορεί να δρα *in cis* ρυθμίζοντας το γειτονικό του γονίδιο σε κάποιους ιστούς και *in trans* ρυθμίζοντας απομακρυσμένα γονίδια σε άλλα κυτταρικά περιβάλλοντα.

Αναφορικά με τα κυτταροπλασματικά lncRNAs συνήθως μεταγράφονται στον πυρήνα και σπανιότατα στα μιτοχόνδρια⁹⁶. Επίσης σπανίως αυτά τα lncRNAs μεταφράζονται παράγοντας μικρά πεπτίδια (<50 aa) ο ρόλος των οποίων σε μερικές περιπτώσεις φαίνεται να είναι ρυθμιστικός. Τα κυτταροπλασματικά lncRNAs μπορούν να εμποδίσουν τη μετάφραση των mRNAs στα ριβοσώματα έπειτα από πρόσδεση τους σε αυτά ή λειτουργώντας σαν δολώματα, προσδένοντας ενεργοποιητές^{97,98}. Παράλληλα μπορούν να προσδεθούν σε mRNAs και να τα σταθεροποιήσουν^{97,98}. Επίσης μπορεί να επηρεάσουν τη σταθερότητα των mRNA, οδηγώντας τα στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση. Έχει βρεθεί πως τα lncRNA μπορούν να προσδένουν σηματοδοτικά μόρια και να μεταβάλλουν τη φωσφορυλίωσή τους (*signaling*) αλλά και ότι προσελκύουν miRNAs αποτρέποντας την πρόσδεσή τους στο mRNA στόχο (*sponges*)⁹⁹. Εν κατακλείδι, τα lncRNAs εμφανίζουν διακριτούς και ποικίλους τρόπους ρύθμισης των mRNA ανάλογα με το που εντοπίζονται μέσα στο κύτταρο.

Παρόλο που τα lncRNAs μπορεί να παρουσιάζουν ορισμένες ομοιότητες με τα mRNAs, υπάρχουν κάποια χαρακτηριστικά που διαφέρουν μεταξύ των δύο τάξεων RNA. Τα εξόνια των lncRNAs εμφανίζουν χαμηλότερη συντήρηση σε σύγκριση με τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, όμως εμφανίζουν υψηλότερη συντήρηση από επαναλαμβανόμενες προγονικές αλληλουχίες (*Ancestral Repeat-AR*). Από την άλλη οι υποκινητές των lncRNAs εμφανίζουν κατά μέσο όρο υψηλότερη συντήρηση από τα εξόνια αυτών, ενώ εμφανίζουν συντήρηση σε παρόμοια επίπεδα με τους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες^{100,101}. Τα lncRNAs τείνουν να εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι τα mRNAs ενώ εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα σε αντίθεση με τα mRNA που εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα^{84,100}. Επιπλέον ο μέσος χρόνος ζωής των lncRNAs ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών lncRNAs και είναι χαμηλότερος από τον μέσο χρόνο ζωής των mRNAs¹⁰². Πιο συγκεκριμένα τα πυρηνικά lncRNAs φαίνεται να είναι περισσότερο ασταθή σε σχέση με τα κυτταροπλασματικά lncRNAs. Γενικότερα τα lncRNAs εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης τους σε σχέση με τα mRNAs. Όπως έχει διαπιστωθεί, η έκφραση των lncRNAs διαφέρει και εξειδικεύεται ως προς τον κυτταρικό τύπο, τον ιστό, το στάδιο της ανάπτυξης αλλά και τις ασθένειες^{103,104}.

1.5.1 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα στον καρκίνο

Τα lncRNAs εκτός από τον ρυθμιστικό ρόλο που ασκούν κατά την ανάπτυξη των ενήλικων ιστών, έχει διαπιστωθεί ότι εκφράζονται και συμμετέχουν ρυθμιστικά σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου^{103,105}. Η απορρύθμιση των lncRNAs στον καρκίνο έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζονται τα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία βρίσκονται υπό τον έλεγχο τους. Παρόλα αυτά, τα lncRNAs στον καρκίνο, δρουν με παρόμοιο τρόπο όπως στα φυσιολογικά κύτταρα ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων, αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες, χρωματινικά σύμπλοκα κ.α. Όπως και στην περίπτωση των κωδικοποιητικών γονιδίων στον καρκίνο, έτσι και στους γενετικούς τόπους των lncRNAs έχουν ταυτοποιηθεί γονιδιωματικές μεταβολές. Συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί περιπτώσεις γονιδίων lncRNAs που βρίσκονται σε γονιδιωματική ενίσχυση αλλά και περιπτώσεις σημειακών πολυμορφισμών (SNP) σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων ή και στα ίδια τα γονίδια των lncRNAs που επηρεάζουν την έκφραση και κατ' επέκταση την ανάπτυξη και εξέλιξη της ασθένειας¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Στον καρκίνο κάποια lncRNAs φαίνεται να προωθούν και να εγκαθιδρύουν την έναρξη και ανάπτυξη του όγκου δηλαδή να δρουν σαν ογκογονίδια ενώ άλλα δρουν σαν ογκοκαταστολείς αναστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου. Η παρουσία των lncRNAs και ο τρόπος με τον οποίο συμβάλλουν στον καρκίνο ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών ιστών και κατά συνέπεια μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου. Για παράδειγμα το lncRNA HOTAIR που εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς, έχει εντοπισθεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης στον καρκίνο του μαστού, του παγκρέατος, του ήπατος και του παχέος εντέρου και έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση¹⁰⁹⁻¹¹¹. Το HOTAIR στρατολογεί το σύμπλοκο μεθυλοτρανσφερασών PRC2 και στοχεύουν ογκοκατασταλτικά γονίδια, με αποτέλεσμα τη σίγηση τους. Έτσι αυξάνει την πιθανότητα διήθησης και μετάστασης του όγκου και γι' αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη και θεραπευτικό στόχο¹¹². Από την άλλη πλευρά το lncRNA GAS5 έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αποτελεί ογκοκαταστολέα. Το GAS5 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει απόπτωση. Σε πολλά είδη καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρεντερικού συστήματος, το GAS5 φαίνεται να υποεκφράζεται ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας¹¹³.

Πρόσφατα διαπιστώθηκε πως το lncRNA FIRRE (Functional Intergenic Repeating RNA Element) έχει ογκοπροαγωγικό ρόλο στο διάχυτο λέμφωμα μεγάλων B-κυττάρων (Diffuse Large B-Cell Lymphoma - DLBCL)¹¹⁴. Πιο συγκεκριμένα, το FIRRE βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε κύτταρα και ιστούς λεμφώματος DLBCL. Το FIRRE προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνης, συμβάλλοντας στη μετατόπιση της β -κατενίνης στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν επίσης πως στη μεταγραφική ενεργοποίηση και κατ' επέκταση υπερέκφραση του FIRRE συμβάλλει το πρωτοογκογονίδιο MYC. Ένα ακόμη lncRNA που βρέθηκε να υπερεκφράζεται στη λευχαιμία T-κυττάρων αλλά και στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι το LUNAR1 (Leukemia-

induced Noncoding Activator RNA-1)^{115,116}. Το LUNAR1 ενεργοποιείται μέσω της σηματοδότησης Notch και δρα *in cis*, μέσω ενός χρωμοσωμικού βρόχου, ενεργοποιώντας την έκφραση του IGFR1. Το LUNAR1 φαίνεται πως αποτελεί ένα ογκογονίδιο που έχει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου, ιδιότητα που το καθιστά πιθανό βιοδείκτη ή/και θεραπευτικό στόχο.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι lncRNAs έχουν ανιχνευθεί εκτός από τις βιοψίες και στο αίμα, τα ούρα και το γαστρικό υγρό, γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία λήψης δείγματος χωρίς να πραγματοποιείται επέμβαση σε σύγκριση με τη βιοψία από τον καρκινικό ιστό. Αυτές οι ιδιότητες των lncRNAs σε συνδυασμό με την εξειδικευμένη και ιστοειδική έκφρασή τους, τα καθιστούν μόρια που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση τη ασθένειας, την επιλογή στρατηγικής για την αντιμετώπιση του όγκου, την πρόγνωση της εξέλιξης της ασθένειας, την εκτίμηση αποτελεσματικότητας της θεραπείας αλλά και ως θεραπευτικοί στόχοι¹¹⁷. Ένα παράδειγμα lncRNA βιοδείκτη του οποίου η χρήση έχει εγκριθεί από τον FDA είναι το PCA3. Το συγκεκριμένο lncRNA φαίνεται να υπερεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη ενώ είναι εύκολο να προσδιοριστεί από δείγμα ούρων^{105,118}.

Στον καρκίνο του στομάχου πολλά lncRNAs έχει παρατηρηθεί ότι υπερεκφράζονται και έχουν ρόλο στην πρόοδο του όγκου και την μετάσταση. Παράδειγμα ενός lncRNA που δρα σαν ικρίωμα και υπερεκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου είναι το LINC00673. Η σίγηση του LINC00673 (knock down) οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού και επαγωγή απόπτωσης. Ο μεταγραφικός παράγοντας SP1, ο οποίος συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες μεταξύ αυτών και την ανάπτυξη, επάγει την έκφραση του LINC00673. Το LINC00673 μπορεί λειτουργώντας σαν ικρίωμα να αλληλεπιδράσει με ένζυμα που μεταβάλουν τη διαμόρφωση της χρωματίνης όπως EZH2 (συστατικό του συμπλόκου PRC2) και LSD1 και να οδηγήσει στη σίγηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως KLF2, LATS2¹¹⁹. Ένα ακόμη lncRNA το οποίο εμφανίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης στον καρκίνο του στομάχου είναι το PVT1. Το PVT1 έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση και έχει προταθεί ως προγνωστικός δείκτης ενώ το δίκτυο στο οποίο συμμετέχει θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό θεραπευτικό στόχο. Το PVT1 έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα FOXM1, σταθεροποιώντας τον, ενώ ο FOXM1 προσδέεται και επάγει την έκφραση του PVT1 δημιουργώντας ένα δίκτυο θετικής ανατροφοδότησης¹²⁰. Επιπλέον το PVT1 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα EZH2 (συστατικό του συμπλόκου PRC2) και οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p15 και p16 προάγοντας την ανάπτυξη του όγκου¹²¹. Έχει επίσης αναφερθεί πως το PVT1 αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3, ο οποίος αποτελεί στόχο του FOXM1. Το PVT1 αλληλεπιδρά με τον STAT3, σταθεροποιώντας τον και αποτρέποντας την αποικοδόμησή του ενώ ο STAT3 ενισχύει την έκφραση του PVT1, δημιουργώντας ένα δίκτυο θετικής ανατροφοδότησης παρόμοιο με αυτό του PVT1-FOXM1. Η ενισχυμένη σηματοδότηση του STAT3 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα VEGFA και κατά συνέπεια στην επαγωγή της αγγειογένεσης και τη δυσμενή εξέλιξη της ασθένειας¹²².

Ένα άλλο lncRNA το οποίο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον καρκίνο του στομάχου είναι το H19 το οποίο συμμετέχει στην ανάπτυξη του όγκου ενώ έχει συσχετισθεί και με μετάσταση. Αυτό το lncRNA έχει βρεθεί πως μπορεί να επάγεται από τον c-Myc και να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες όπως ISM1 (αναστολέας αγγειογένεσης) αλλά και να παράγει miRNA (miR-675)^{123,124}. Το H19 ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα στο πλάσμα του αίματος ασθενών με γαστρικό καρκίνο σε σχέση με μη ασθενείς ενώ σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αφαίρεση του όγκου τα επίπεδα του μειώθηκαν. Η παρουσία του H19 στο πλάσμα και η διαφορική του έκφραση στο γαστρικό καρκίνο καθιστούν το H19 ένα πιθανό βιοδείκτη για την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου¹²⁵. Το GAPLINC αποτελεί ένα παράδειγμα κυτταροπλασματικού lncRNA που λειτουργεί ως microRNA sponge. Συγκεκριμένα το GAPLINC έχει βρεθεί πως προσδένεται στο miR211-3p, αποτρέποντας το από το να συνδεθεί στο στόχο του, το mRNA της CD44. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η ποσότητα του mRNA της CD44 που μεταφράζεται και έτσι η CD44 μπορεί να συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και τη μετάσταση του όγκου¹²⁶.

Οι ιδιότητες που διαθέτουν τα lncRNAs προσελκύουν το ενδιαφέρον για την εφαρμογή τους στη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου. Αξιοσημείωτη ιδιότητα των lncRNAs είναι η παρουσία τους στον ορό, το αίμα άλλα και βιολογικά υγρά όπως τα ούρα, το σάλιο και το γαστρικό υγρό^{127,128}. Τα lncRNAs που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του όγκου στην κυκλοφορία, βρίσκονται είτε σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες είτε στο εσωτερικό εξωκυτταρικών κυστιδίων όπως τα εξωσώματα και τα αποπτωτικά σωμάτια, μορφές προστατευμένες από την αποικοδόμηση. Το γεγονός αυτό διευκολύνει, επιταχύνει και καθιστά μη επεμβατική τη λήψη βιοψίας¹²⁹. Επιπλέον τα lncRNAs έχει διαπιστωθεί ότι εκφράζονται σε διαφορετικά επίπεδα μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης και προαγωγής του όγκου. Έτσι είναι δυνατό να διαμορφωθεί ένα προφίλ lncRNAs για τα διάφορα στάδια του εκάστοτε τύπου καρκίνου, ενώ κάποια lncRNAs μπορεί να αποτελέσουν διαγνωστικούς ή/και προγνωστικούς δείκτες¹³⁰. Η διαφορική αλλά παράλληλα ιστοειδική έκφραση των lncRNAs σε συνδυασμό με τη σταθερή και ανιχνεύσιμη παρουσία τους στα βιολογικά υγρά καθιστούν επιτακτική τη μελέτη τους ως θεραπευτικούς και διαγνωστικούς δείκτες. Όσα αναφέρθηκαν παραπάνω αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα lncRNAs στον καρκίνο μέσω της πολλαπλής και ταυτόχρονα εξειδικευμένης δράσης τους, στους διάφορους τύπους καρκίνου.

2.Σκοπός

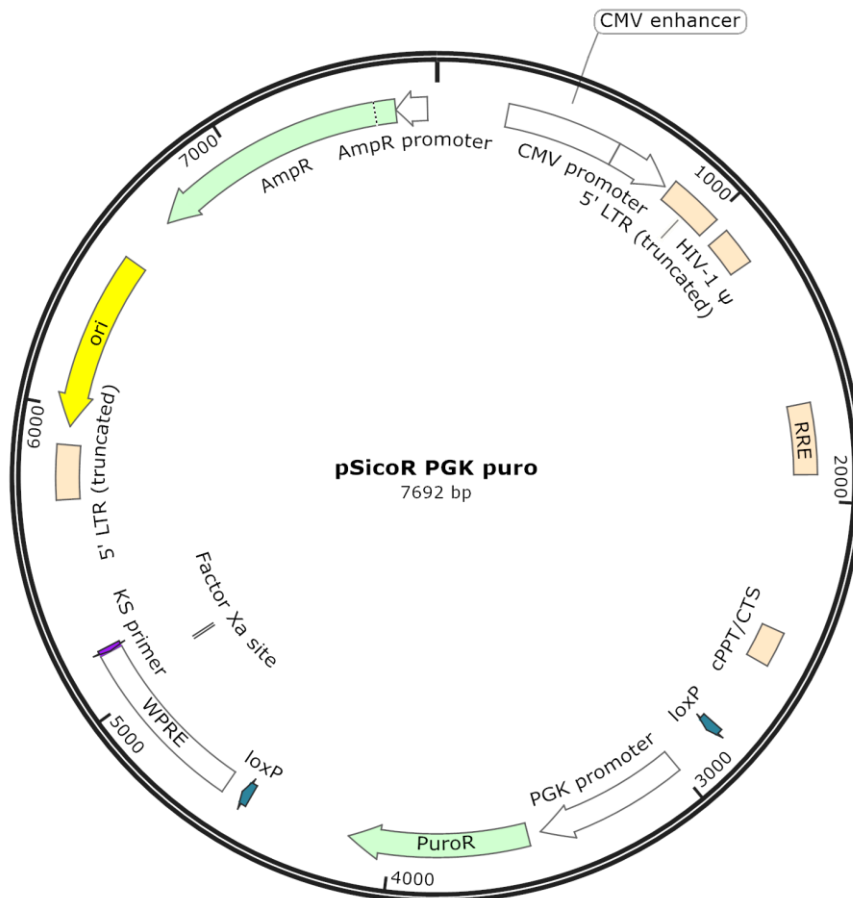
Η ανάγκη ανάπτυξης νέων βιοδεικτών, για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου και νέων θεραπευτικών στόχων, για την βελτιστοποίηση της θεραπείας στρέφουν το ενδιαφέρον στη διεύρυνση της μοριακής εργαλειοθήκης του καρκίνου του στομάχου. Το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 αποτελεί ένα από τα πιο συχνά γονίδια που βρίσκονται σε γονιδιωματική ενίσχυση στον καρκίνο του στομάχου. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας έχει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση των κυτταρικών γενεαλογιών, κατά την εμβρυική ανάπτυξη, ενώ ρυθμίζει και γονίδια σε ενήλικους ιστούς. Η υπερέκφραση του ογκοεπαγωγικού GATA6 στον καρκίνο του στομάχου, σε συνδυασμό με τη ρυθμιστική του δράση κατά την εμβρυική ανάπτυξη εντάσσουν τον GATA6 στα ογκογονίδια προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας. Ωστόσο, η παράλληλη δράση του σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς εμποδίζει τη θεραπευτική του στόχευση. Έτσι, έχοντας ως προϋπόθεση την εξειδικευμένη έκφραση, ως προς τον κυτταρικό τύπο και τον ιστό, αλλά και τη διαφορική έκφραση στον καρκίνο, οι μελέτες προσανατολίζονται σε γονίδια-στόχους του GATA6, όπως τα lncRNAs. Τα lncRNAs αποτελούν μια ανερχόμενη τάξη μορίων, τα οποία λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους μπορούν να αξιοποιηθούν τόσο ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες όσο και ως θεραπευτικοί στόχοι. Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία λοιπόν, έχει ως σκοπό το χαρακτηρισμό του lncRNA GREAT6-1 (**GATA REgulated lncRNA GasTric**), που ρυθμίζεται από ογκοεπαγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον καρκίνο. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση δεδομένων αλληλούχησης RNA για το GREAT6-1 και για τον GATA6, τόσο από καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και από βιοψίες ασθενών με καρκίνο του στομάχου. Ακολούθως διεξήχθησαν πειράματα για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, για τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής του θέσης και για την εκτίμηση της σταθερότητάς του. Επίσης shRNAs κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puco, με απώτερο σκοπό τη σίγηση του GREAT6-1.

3.Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Πλασμιδιακός φορέας pSicoR PGK puro

Ο φορέας pSicoR PGK puro μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων από λεντιούς με σκοπό την παροδική έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε αυτά τα κύτταρα. Ο pSicoR PGK puro έχει μέγεθος 7692 bp και διαθέτει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη, για την επιλογή των ευκαρυωτικών κυττάρων που διαμολύνθηκαν, καθώς και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη για την επιλογή των βακτηρίων που μετασηματίστηκαν. Επίσης μέσω του συστήματος Cre-loxP και των αλληλουχιών P υπάρχει δυνατότητα να αφαιρεθεί το ένθεμα και κατ' επέκταση να διακοπεί η έκφραση του shRNA¹³¹. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο pSicoR χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση shRNA σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, το οποίο στοχεύει και οδηγεί στη σίγηση του επιθυμητού μεταγράφου (RNAi).



Εικόνα 10 Ο χάρτης του πλασμιδίου pSicoR PGK puro (Addgene).

3.1.2 Κυτταρικές σειρές

Για τη διεξαγωγή πειραμάτων στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ανθρώπινες κυτταρικές σειρές:

- HFE: φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου
- AGS: πρωτεύον γαστρικό αδеноκαρκίνωμα
- MKN45: μεταστατικός καρκίνος στο ήπαρ από γαστρικό αδеноκαρκίνωμα
- NUGC4: μεταστατικός καρκίνος στους παραγαστρικούς λεμφαδένες από γαστρικό αδеноκαρκίνωμα
- KATOIII: μεταστατικός καρκίνος στα πλευρά από γαστρικό αδеноκαρκίνωμα
- HT29: αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου
- HCT116: καρκίνωμα παχέος εντέρου
- MCF7: μεταστατικός καρκίνος στα πλευρά από αδеноκαρκίνωμα μαστού
- SKBR3: μεταστατικός καρκίνος στα πλευρά από αδеноκαρκίνωμα μαστικού αδένα/μαστού

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Για τον προσδιορισμό του κωδικοποιητικού δυναμικού lncRNAs καθώς και κωδικοποιητικών γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν το λογισμικό CPC2 και το λογισμικό CPAT^{132,133}. Πιο συγκεκριμένα η ανάλυση κωδικοποιητικού δυναμικού πραγματοποιήθηκε για τα κωδικοποιητικά μετάγραφα ACTB, GAPDH, RPLP1 και τα lncRNAs NEAT1, LINC01234, HOTAIR, HOTTIP, MALAT1, GAS5 και GREAT6-1.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα RNA seq για την απεικόνιση σε διαγράμματα των επιπέδων έκφρασης τόσο του lncRNA GREAT6-1, όσο και του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς. Πρόκειται για δεδομένα RNA seq από 1019 καρκινικές κυτταρικές σειρές καθώς και βιοψίες από ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για βιοψίες από 375 Ευρωπαίους και Αμερικανούς ασθενείς και 34 Ασιάτες ασθενείς τόσο από καρκινικό ιστό όσο και από παρακαρκινικό ιστό αλλά και βιοψίες στομάχου προκαρκινικών σταδίων. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από 55 φυσιολογικούς ιστούς, όπου οι τιμές για τον κάθε ιστό αποτελούν μέσο όρο τιμών από 100 ανθρώπους μη-ασθενείς.

3.2.2 Δημιουργία shRNA και κλωνοποίηση αυτού στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puro

Για τη δημιουργία του shRNA που θα στοχεύει το επιθυμητό μετάγραφο αναμειγνύονται 2 μl sense oligos (100 μM), 2 μl antisense oligos (100 μM) και 96 μl annealing buffer [50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH=8), 1 mM EDTA (pH=8)]. Τα δείγματα βράζουν για 5 λεπτά και έπειτα αφήνονται έως ότου η θερμοκρασία μειωθεί στους 30°C. Ακολουθεί η αντίδραση λιγάσης κατά την οποία το παραπάνω shRNA ενσωματώνεται στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puro, η σύσταση της οποίας παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1**). Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή για 16 ώρες στους 16°C. Στα δείγματα συμπεριλαμβάνεται και ένας αρνητικός μάρτυρας (self-ligation), στον οποίο συμπληρώνεται ddH₂O αντί του ενθέματος. Το ένθεμα έχει σχεδιαστεί με τρόπο που τα άκρα του να είναι συμπληρωματικά με τα άκρα του φορέα. Ο πλασμιδιακός φορέας φέρει τα κατάλληλα και συμπληρωματικά άκρα για να συνδεθεί με το ένθεμα έπειτα από πέψη που πραγματοποιήθηκε με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

Πίνακας 1 Σύσταση μείγματος για την αντίδραση λιγάσης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
Buffer (10x) (T4 ligase NEB)	2 μl
Πλασμιδιακός φορέας pSicoR (50 ng/μl)	1 μl
Ένθεμα (ds oligos)	4 μl
T4 Λιγάση (NEB)	1 μl
ddH ₂ O	έως 20 μl

3.2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puro

Οι πλασμιδιακοί φορείς pSicoR PGK puro που φέρουν το ένθεμα-shRNA από την προηγούμενη αντίδραση εισήχθησαν σε βακτήρια E.coli του στελέχους XL1-Blue, το οποίο αποτρέπει τους πλασμιδιακούς ανασυνδυασμούς. Για το σκοπό αυτό βακτήρια XL1-Blue αναμειγνύονται με το πλασμιδιακό DNA και παραμένουν στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ (heat shock) για 5 δευτερόλεπτα στους 42°C και έπειτα παραμονή για 2 λεπτά στον πάγο. Έπειτα προστίθενται 920 μl θρεπτικού μέσου SOB, το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικό και τοποθετούνται σε αναδευόμενο επωαστήρα (160 rpm) στους 37°C για 50 λεπτά. Στη συνέχεια ορισμένη ποσότητα βακτηρίων επιστρώνεται σε τρυβλία LB άγαρ, που περιέχουν αμπικιλίνη και τοποθετούνται σε επωαστήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα. Την επόμενη ημέρα επιλέγονται μοναδιαίες αποικίες και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες μαζί με 3 ml υγρό θρεπτικό LB που περιέχει αμπικιλίνη. Ακολουθεί επώαση σε αναδευόμενο επωαστήρα (210 rpm) στους 37°C για όλη τη νύχτα. Την επόμενη ημέρα αφού προηγηθεί φυγοκέντρηση για

2 λεπτά στους 4°C / 11.000 rpm, πραγματοποιείται απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρήση kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Macherey-Nagel (NucleoSpin Plasmid, Plasmid DNA purification).

3.2.4 Διαγνωστική πέψη

Με σκοπό να εξετασθεί αν η ένθεση του ενθέματος-shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR PGK puco είναι επιτυχής πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη. Αφού προστεθούν τα απαιτούμενα συστατικά, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 2**), τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστίθενται στα δείγματα 10 µl χρωστικής Loading Dye και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (2%). Εκτός από τα δείγματα που εξετάζονταν, για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας που είχε επιβεβαιωθεί ότι έχει λάβει ένθεμα και ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας που δεν είχε λάβει ένθεμα (self-ligation). Η διαγνωστική πέψη πραγματοποιήθηκε δύο φορές, χρησιμοποιώντας διαφορετικά ένζυμα περιορισμού της εταιρείας Minotech. Η πρώτη πέψη πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα XbaI και SmaI (ισοσχιζομερές του XhoI) ενώ η δεύτερη πέψη πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα XbaI και BamHI.

Πίνακας 2 Σύσταση αντίδρασης για τη διαγνωστική πέψη.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (µl)
Buffer K (10x)	10 µl
Ένζυμο XbaI	2 µl
Ένζυμο BamHI	2 µl
Πλασμίδιο-pSicoR (500 ng)	3 µl
ddH ₂ O	έως 50 µl

Έπειτα από την πέψη και την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία η ένθεση αποστέλλονται για αλληλούχηση ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της ένθεσης. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CeMIA.

Οι πλασμιδιακοί φορείς που έχει επιβεβαιωθεί ότι έλαβαν το ένθεμα χρησιμοποιούνται στο σύστημα διαμόλυνσης καρκινικών κυτταρικών σειρών στομάχου με λεντιούς. Η διαμόλυνση των κυττάρων από τους λεντιούς θα έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του shRNA και κατ' επέκταση τη σίγηση του μεταγράφου-στόχου. Η αποτελεσματικότητα της σίγησης ελέγχεται με την απομόνωση RNA και την πραγματοποίηση ποσοτικής PCR (qPCR).

3.2.5 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA σε κύτταρα από την κυτταροκαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών που αναφέρθηκαν, προστίθενται 1000 μl τριζόλης και τα δείγματα παραμένουν για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια μεταφέρονται στον πάγο όπου προστίθενται 200 μl χλωροφόρμιο και πραγματοποιείται vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 4°C / 14.000 rpm, μετά το πέρας της οποίας αφαιρείται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο 1,5 ml tube. Στο υπερκείμενο προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλης, πραγματοποιείται ανακίνηση 1-2 φορές, επώαση για 10 λεπτά και φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 4°C / 14.000 rpm. Έπειτα απορρίπτεται το υπερκείμενο από τα δείγματα και προστίθενται 500 μl παγωμένης αιθανόλης (70%). Ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 4°C / 14.000 rpm και απόρριψη του υπερκείμενου. Τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτά καπάκια για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη και να απομείνει μόνο το ίζημα. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 μl RNase free H₂O και τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 65°C. Έπειτα πραγματοποιείται vortex και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του συνολικού RNA προσδιορίσθηκε χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000.

3.2.6 Επεξεργασία με DNάση

Η επεξεργασία με δεσοξυριβονουκλεάση (DNάση-DNase) στοχεύει στην απομάκρυνση μορίων DNA, που μπορεί να υπάρχουν από την απομόνωση RNA που προηγήθηκε. Αρχικά δημιουργείται ένα μείγμα, η σύσταση του οποίου παρατίθεται στον πίνακα (**Πίνακας 3**). Από το παραπάνω μείγμα προστίθενται 5 μl σε όγκο 25 μl από καθένα δείγμα RNA, το οποίο έχει προκύψει από το προηγούμενο μέρος. Ακολουθεί vortex για 3 δευτερόλεπτα, σύντομη φυγοκέντριση και επώαση στο υδατόλουτρο 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και προστίθενται 40 μl οξικού νατρίου (3M, pH=5,6) και 330 μl ddH₂O. Ακολούθως προστίθενται σε κάθε δείγμα 400 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο και πραγματοποιείται vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντριση για 5 λεπτά στους 4°C / 14.000 rpm. Έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο 1,5 ml tube, στο οποίο προστίθενται 1000 μl παγωμένης αιθανόλης (100%). Πραγματοποιείται ανακίνηση των δειγμάτων και αποθήκευση στους -80°C για 1 ώρα. Μετά από 1 ώρα, πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 30 λεπτά στους 4°C / 14.000 rpm. Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 500 μl παγωμένης αιθανόλης (70%) και πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 5 λεπτά στους 4°C / 14.000 rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτά καπάκια για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη και να απομείνει μόνο το ίζημα. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 25 μl ddH₂O και τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά

στους 65°C. Έπειτα πραγματοποιείται vortex, spin, vortex και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του συνολικού RNA προσδιορίσθηκε χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής απομόνωση RNA.

Πίνακας 3 Σύσταση μείγματος για την αντίδραση επεξεργασίας με DNάση.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
Buffer (10x)	3 μl
DNase	1 μl
RNase out	1 μl

3.2.7 Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση cDNA απαιτείται 1 μg (1000 ng) RNA σε τελικό όγκο 10 μl. Σύμφωνα με τις μετρήσεις που έγιναν στο προηγούμενο στάδιο από κάθε δείγμα RNA λαμβάνεται ο απαραίτητος όγκος και συμπληρώνεται με ddH₂O έως τα 10 μl. Ακολούθως σε κάθε δείγμα προστίθενται 2 μl του μείγματος I που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4**) και τα δείγματα επωάζονται στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 65°C. Στη συνέχεια πραγματοποιείται vortex και spin και προστίθενται 8 μl του μείγματος II που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 5**). Τα δείγματα επωάζονται στο υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η ενζυμική αντίδραση της σύνθεσης cDNA. Έπειτα από το πέρας των 2 ωρών, προστίθενται 380 μl ddH₂O στα δείγματα και αποθηκεύονται στους -20°C.

Πίνακας 4 Σύσταση μείγματος I για την αντίδραση σύνθεσης cDNA.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
εκκινητές oligodT (10 mM)	1 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl

Πίνακας 5 Σύσταση μείγματος II για την αντίδραση σύνθεσης cDNA.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
Buffer (5x)	4 μl
DTT (100 mM)	2 μl
RNase out	1 μl
MMLV	1 μl

3.2.8 Ποσοτική PCR (qPCR)

Η ποσοτική PCR (qPCR) παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων-στόχων. Η SYBR είναι μια πράσινη φθορίζουσα χρωστική, η οποία προσδένεται στο δίκλωνο DNA και χρησιμοποιείται για να ποσοτικοποιεί την ενίσχυση του DNA κατά την ποσοτική PCR. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση ποσοτικής PCR ήταν της εταιρείας Bio-Rad και το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν το Bio-Rad CFX Manager. Για την κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης των γονιδίων-στόχων χρησιμοποιήθηκαν τα ιδιοσυστάτα γονίδια GAPDH και RPLP1. Η σύσταση της αντίδρασης για την ποσοτική PCR, με τελικό όγκο 20 μ l, παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6 Σύσταση αντίδρασης ποσοτικής PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
SYBR (KAPA SYBR qPCR Master Mix kit)	10 μ l
Forward primer	1 μ l
Reverse primer	1 μ l
Template (cDNA)	4 μ l
ddH₂O	4 μ l

4. Αποτελέσματα

4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

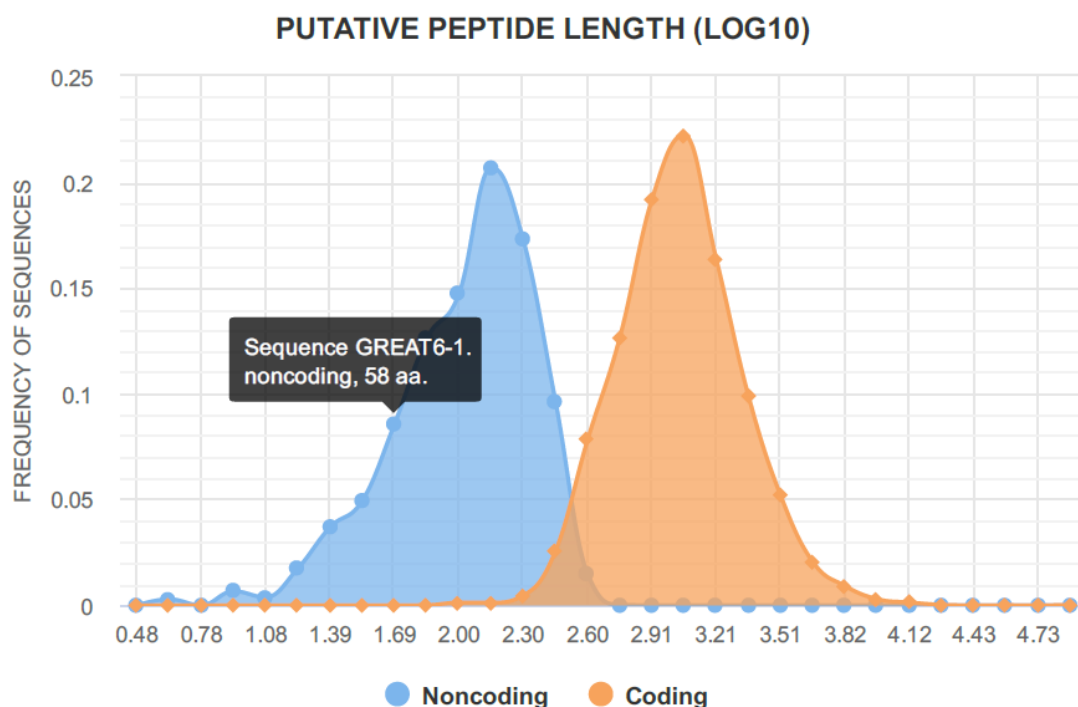
4.1.1 Προσδιορισμός κωδικοποιητικού δυναμικού

Για να επιβεβαιωθεί ότι το GREAT6-1 αποτελεί ένα μη κωδικοποιητικό μετάγραφο πραγματοποιήθηκε ανάλυση κωδικοποιητικού δυναμικού με τη χρήση του λογισμικού CPC2. Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη χρήση του λογισμικού CPAT, η οποία είχε παρόμοια αποτελέσματα (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν γνωστά γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και γονίδια πειραματικά αποδεδειγμένων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα (**Εικόνα 11**), η κωδικοποιητική πιθανότητα των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη κυμαίνεται από 0,9 έως 1 (90-100%). Αντίθετα η κωδικοποιητική πιθανότητα των επιβεβαιωμένων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων κυμαίνεται από 0,01 έως 0,2 (1-20%). Το εξεταζόμενο GREAT6-1, με κωδικοποιητική πιθανότητα 0,03 ομαδοποιείται με τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα.



Εικόνα 11 Διάγραμμα απεικόνισης της κωδικοποιητικής πιθανότητας των γονιδίων ACTB, GAPDH, RPLP1, NEAT1, LINC01234, HOTAIR, HOTTIP, MALAT1, GREAT6-1 και GAS5. Η κωδικοποιητική πιθανότητα του GREAT6-1 αντιστοιχεί στην κόκκινη στήλη ενώ η κωδικοποιητική πιθανότητα για καθένα από τα υπόλοιπα γονίδια αντιστοιχεί στις μπλε στήλες.

Εκτός από την κωδικοποιητική πιθανότητα, πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση για το πιθανό μήκος ενός πεπτιδίου που θα μπορούσε να προκύψει τόσο από κωδικοποιητικά όσο και από μη κωδικοποιητικά γονίδια. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα (Εικόνα 12), το πεπτίδιο που θα μπορούσε να προκύψει από το GREAT6-1 έχει μήκος 58 αμινοξέων. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο ομαδοποιείται μαζί με τα υπόλοιπα πιθανά πεπτίδια από μη κωδικοποιητικά γονίδια και έχει μήκος πολύ μικρότερο από πεπτίδια λειτουργικών πρωτεϊνών.

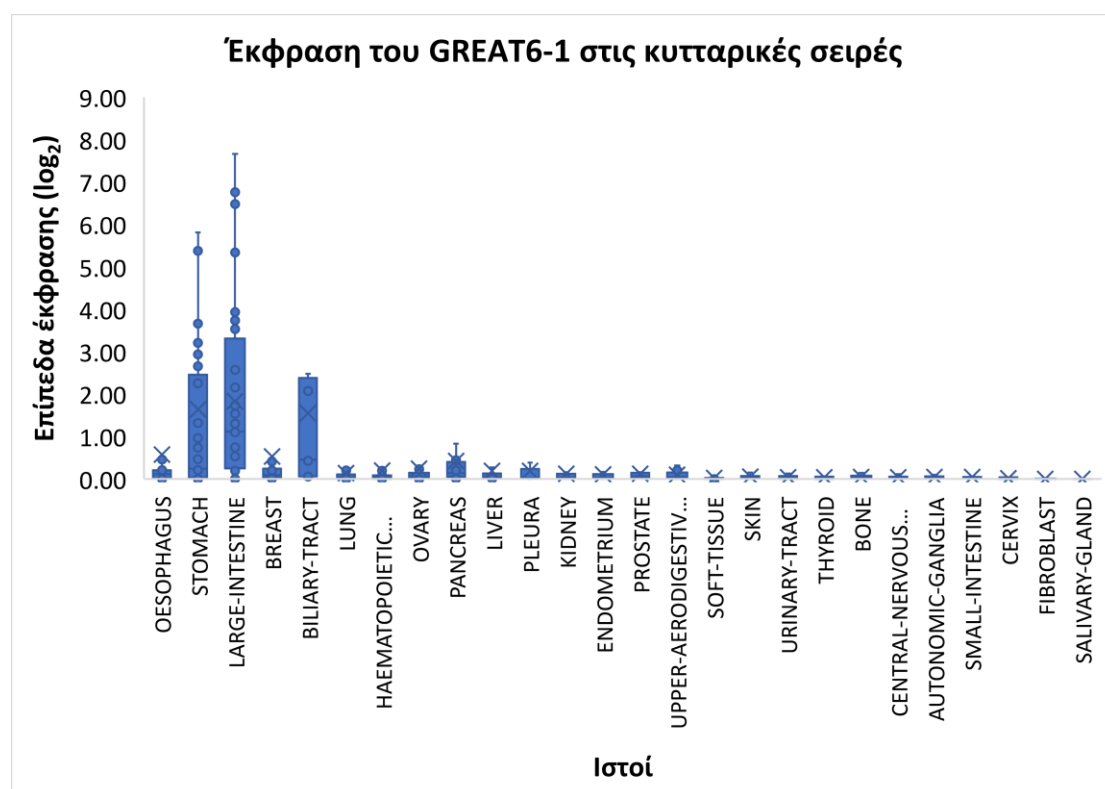


Εικόνα 12 Διάγραμμα που απεικονίζει το μήκος πιθανών πεπτιδίων που προκύπτουν από κωδικοποιητικά και μη κωδικοποιητικά γονίδια σε σχέση με τη συχνότητα των αλληλουχιών. Τα πεπτίδια που προκύπτουν από μη γονίδια αποτελούν τη μπλε κατανομή ενώ τα πεπτίδια από κωδικοποιητικά γονίδια ομαδοποιούνται στην πορτοκαλί κατανομή. Το μήκος ενός πιθανού πεπτιδίου του GREAT6-1 φαίνεται στο μαύρο πλαίσιο.

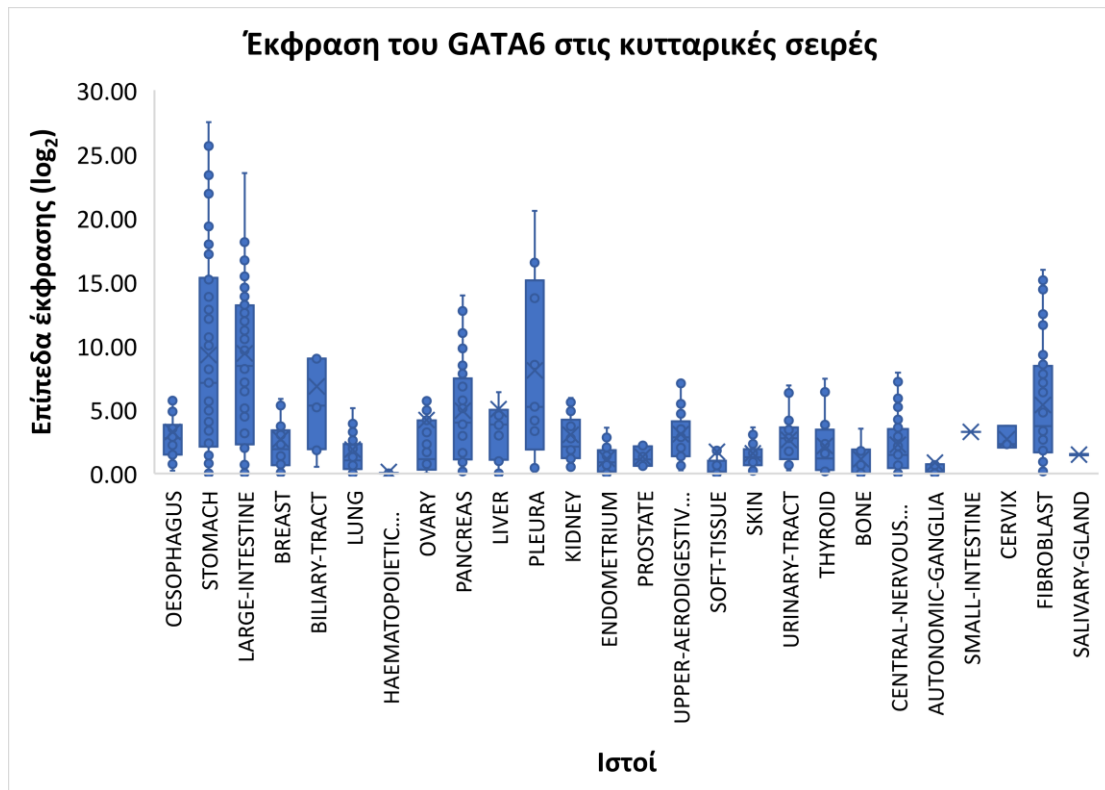
4.1.2 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA για το GREAT6-1 και τον GATA6

Η ανάλυση δεδομένων από την αλληλούχηση RNA αφορά το lncRNA GREAT6-1 και τον μεταγραφικό παράγοντα GATA6. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά σύνολα δεδομένων που προέρχονταν από καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και βιοψίες από μων ασθενών και μη ασθενών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 και του GATA6 σε 1019 καρκινικές κυτταρικές σειρές που αντιστοιχούν στο σύνολο των ιστών του ανθρώπινου οργανισμού. Όπως φαίνεται από το box-plot (**Εικόνα 13**) τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 απεικονίζονται αρκετά υψηλότερα στο στομάχο και το παχύ έντερο, ακολουθεί ο χοληδόχος πόρος και σε αρκετά χαμηλότερα επίπεδα απεικονίζεται το σύνολο των υπόλοιπων ιστών. Στο διάγραμμα που απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 για το σύνολο των κυτταρικών σειρών (**Εικόνα 14**), ο GATA6 φαίνεται να εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο στομάχο. Ακολουθούν το παχύ έντερο και τα πλευρά, με παρόμοια επίπεδα έκφρασης και στη συνέχεια με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης οι υπόλοιποι ιστοί.

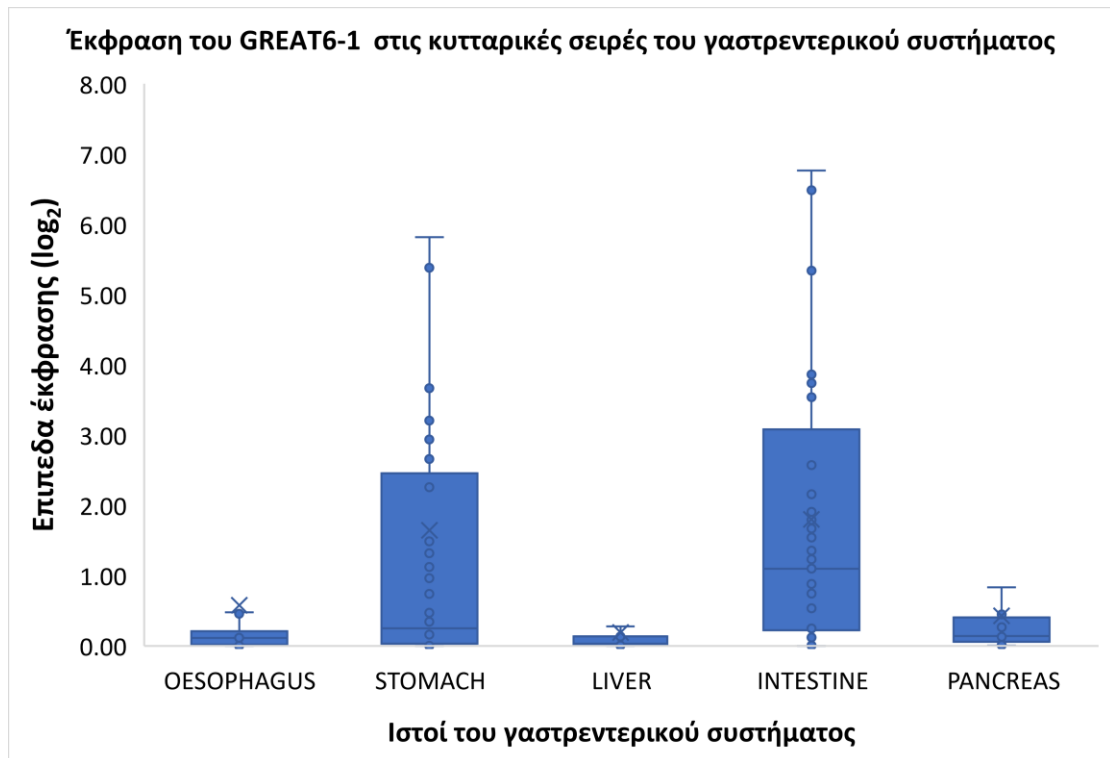


Εικόνα 13 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 για το σύνολο των κυτταρικών σειρών. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

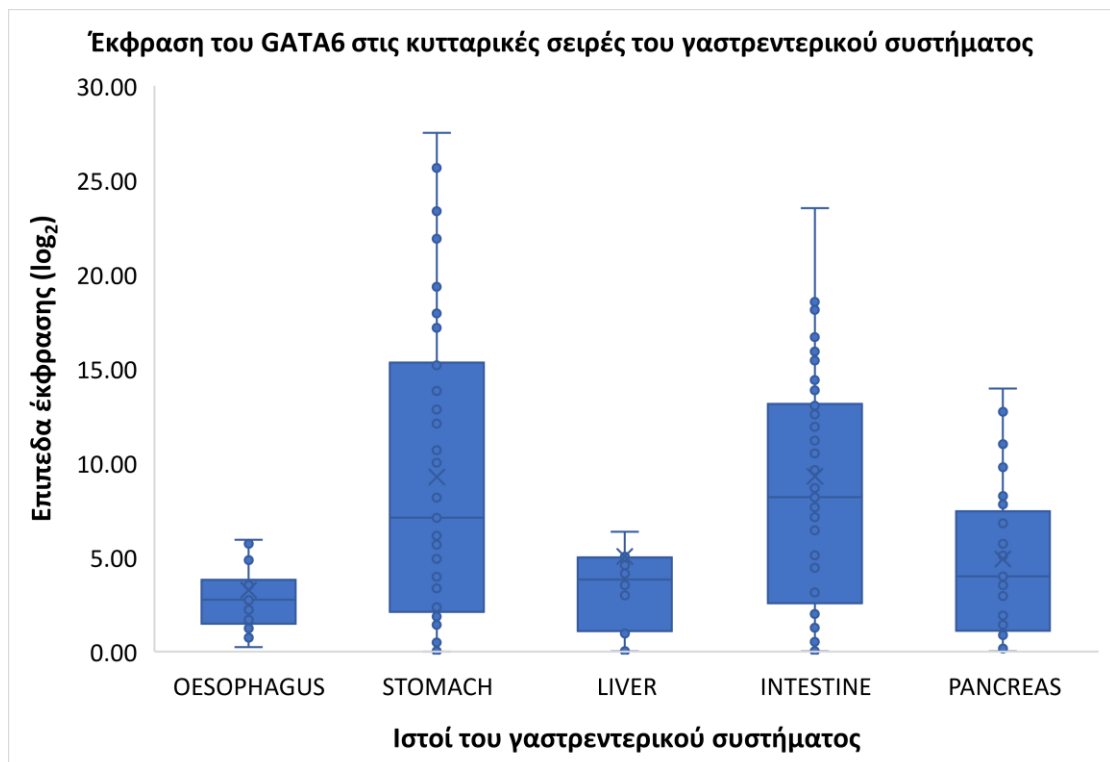


Εικόνα 14 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GATA6 για το σύνολο των κυτταρικών σειρών. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

Από το σύνολο των κυτταρικών σειρών που προαναφέρθηκαν, επιλέχθηκαν οι κυτταρικές σειρές των ιστών του γαστρεντερικού συστήματος και πραγματοποιήθηκε μια νέα απεικόνιση για τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 και του GATA6 σε αυτές. Σύμφωνα με τα διαγράμματα που προέκυψαν, το GREAT6-1 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο στομάχο και το έντερο, σε αντίθεση με τον οισοφάγο, το ήπαρ και το πάγκρεας, όπου η έκφραση είναι σχεδόν μηδενική (**Εικόνα 15**). Τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 είναι υψηλά στο στομάχο και στο έντερο ενώ στον οισοφάγο, το ήπαρ και το πάγκρεας είναι ανιχνεύσιμα (**Εικόνα 16**).

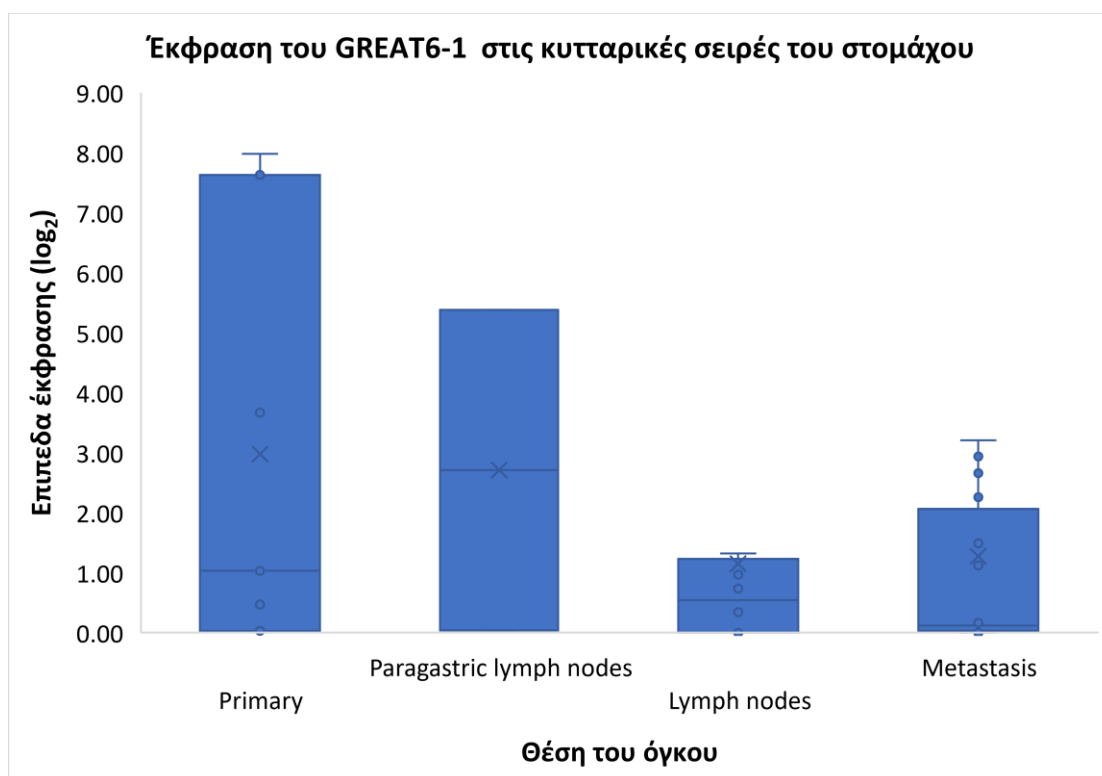


Εικόνα 15 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 για τις κυτταρικές σειρές του γαστρεντερικού συστήματος. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

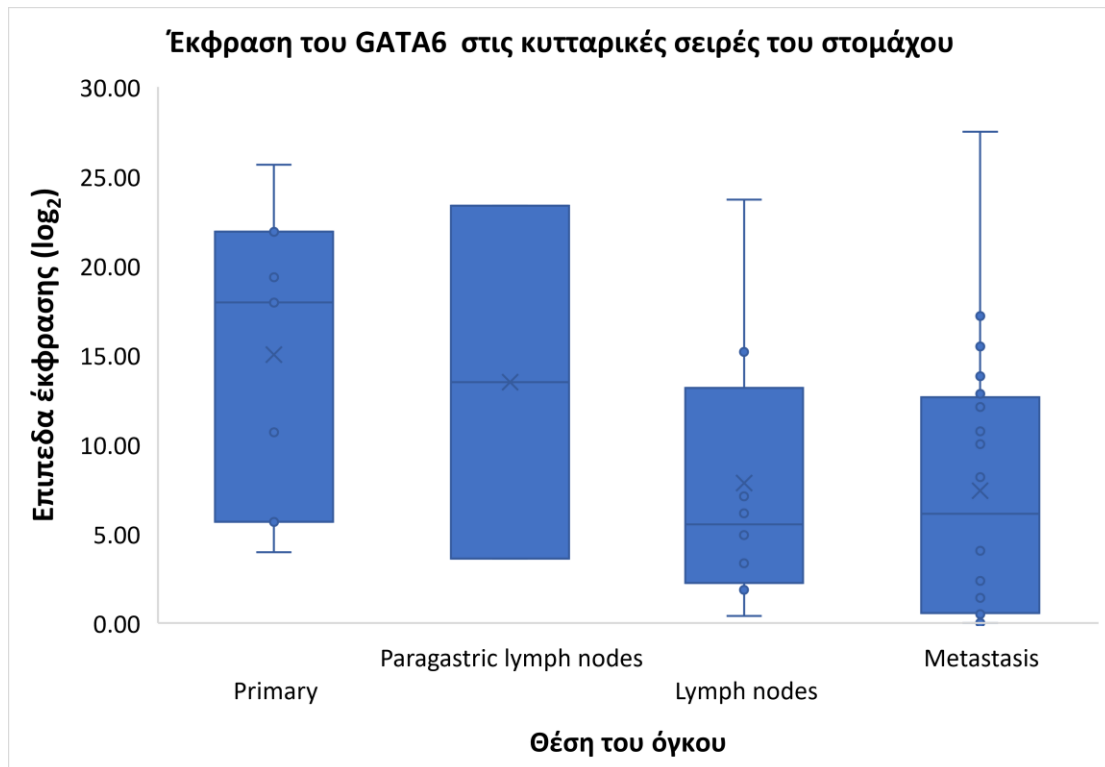


Εικόνα 16 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GATA6 για τις κυτταρικές σειρές του γαστρεντερικού συστήματος. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

Οι κυτταρικές σειρές του στομάχου κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω ανάλογα με το αν ο όγκος είναι πρωτεύων, διηθητικός στους παραγαστρικούς λεμφαδένες, διηθητικός στους λεμφαδένες γενικότερα ή μεταστατικός. Σύμφωνα με αυτή την κατηγοριοποίηση δημιουργήθηκαν δύο νέα διαγράμματα, ένα για το GREAT6-1 και ένα για τον GATA6. Τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 φαίνεται πως βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στους πρωτεύοντες γαστρικούς όγκους και τους διηθητικούς στους παραγαστρικούς λεμφαδένες γαστρικούς όγκους, ενώ στους διηθητικούς στους λεμφαδένες και τους μεταστατικούς γαστρικούς όγκους τα επίπεδα έκφρασης είναι πολύ χαμηλότερα (**Εικόνα 17**). Σε αντίθεση με το GREAT6-1, τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 είναι αυξημένα στους πρωτεύοντες και διηθητικούς στους παραγαστρικούς λεμφαδένες γαστρικούς όγκους, χωρίς όμως να διαφέρουν ιδιαίτερα από τους διηθητικούς στους λεμφαδένες και τους μεταστατικούς γαστρικούς όγκους (**Εικόνα 18**).



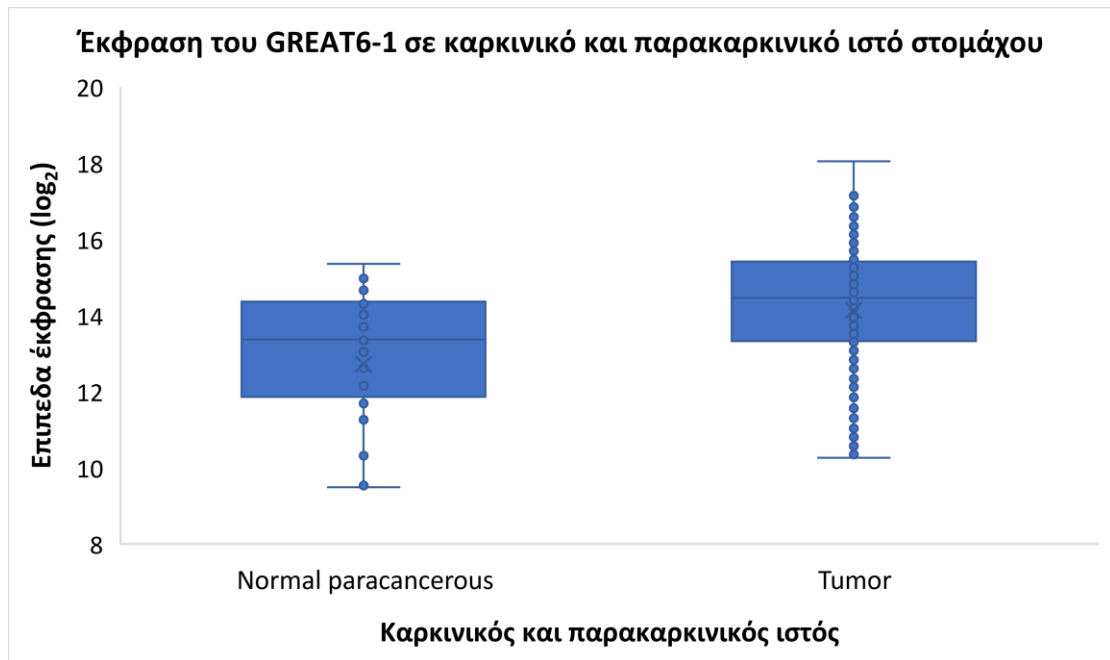
Εικόνα 17 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 για τις κυτταρικές σειρές του στομάχου. Οι κυτταρικές σειρές έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τη θέση του όγκου. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.



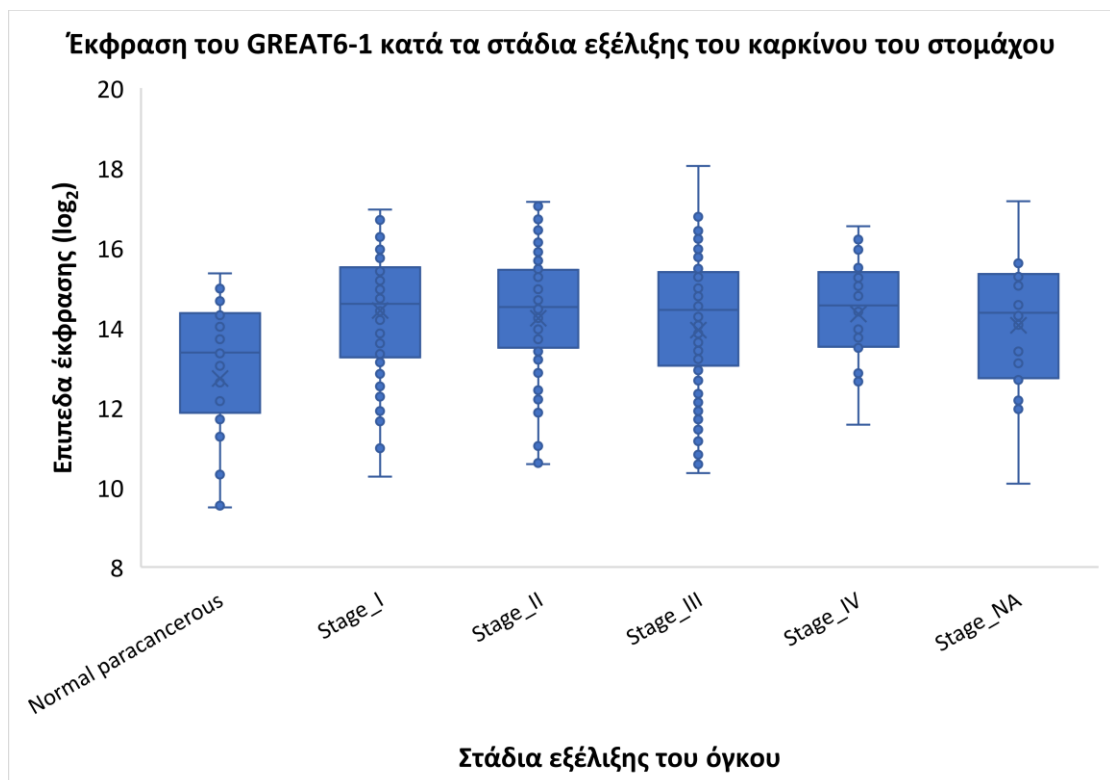
Εικόνα 18 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GATA6 για τις κυτταρικές σειρές του στομάχου. Οι κυτταρικές σειρές έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τη θέση του όγκου. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

Για την ακόλουθη απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών τόσο από καρκινικό όσο και από φυσιολογικό-παρακαρκινικό ιστό στομάχου. Τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 στο φυσιολογικό-παρακαρκινικό ιστό και στον καρκινικό ιστό κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα, με μια μικρή αύξηση όσον αφορά τον καρκινικό ιστό (**Εικόνα 19**).

Οι παραπάνω βιοψίες καρκινικού γαστρικού ιστού ταξινομήθηκαν με βάση τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά σε 5 στάδια. Τα στάδια I-IV αντιπροσωπεύουν το βαθμό στον οποίο έχει αναπτυχθεί και έχει επεκταθεί ο όγκος στον οργανισμό, με το στάδιο I να περιλαμβάνει όγκους εστιασμένους στο στομάχο, τα στάδια II και III να περιλαμβάνουν όγκους που έχουν διεισδύσει στους λεμφαδένες και το στάδιο IV να περιλαμβάνει μεταστατικούς όγκους σε απομακρυσμένα όργανα. Το στάδιο NA περιλαμβάνει όγκους που με βάση τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά δεν ήταν δυνατό να καταταγούν σε κάποιο από τα υπόλοιπα 4 στάδια. Στο διάγραμμα που προέκυψε για το GREAT6-1, τα επίπεδα έκφρασής του φαίνεται να είναι αυξημένα σε παρόμοια επίπεδα, στα στάδια I-IV και NA σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στο φυσιολογικό-παρακαρκινικό ιστό, χωρίς ωστόσο να υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των σταδίων I-IV και NA (**Εικόνα 20**).

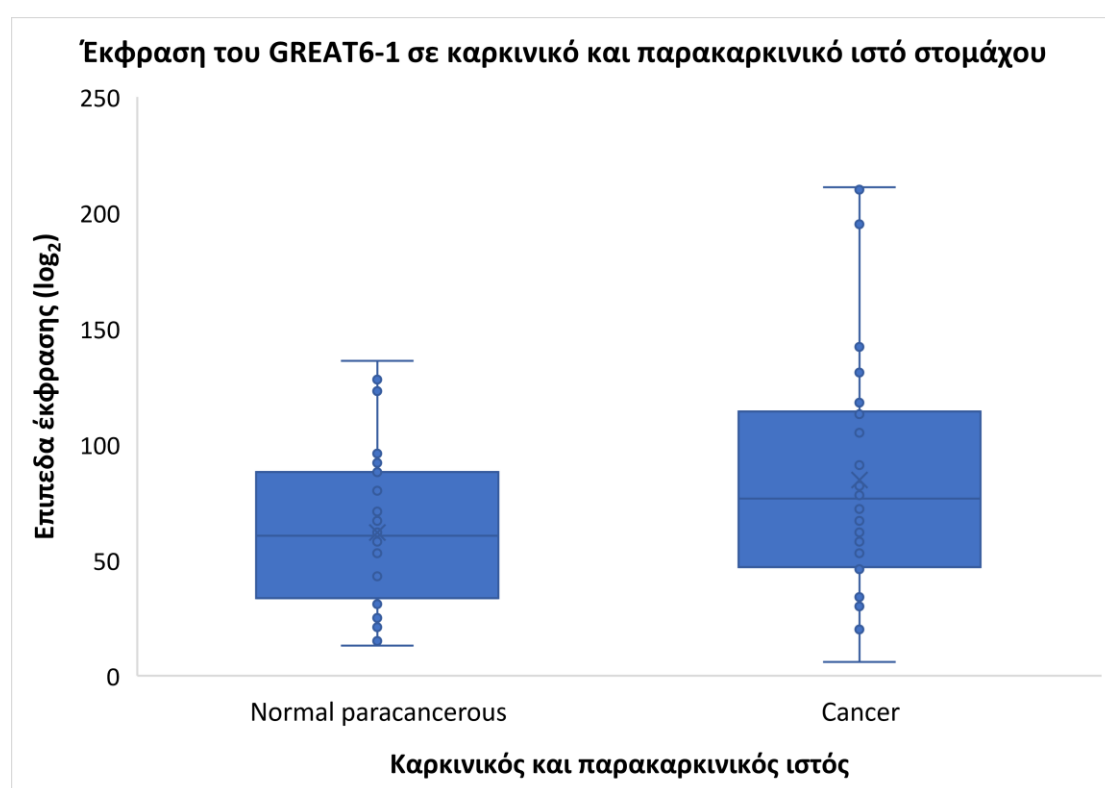


Εικόνα 19 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 σε φυσιολογικό-παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό στομάχου από βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

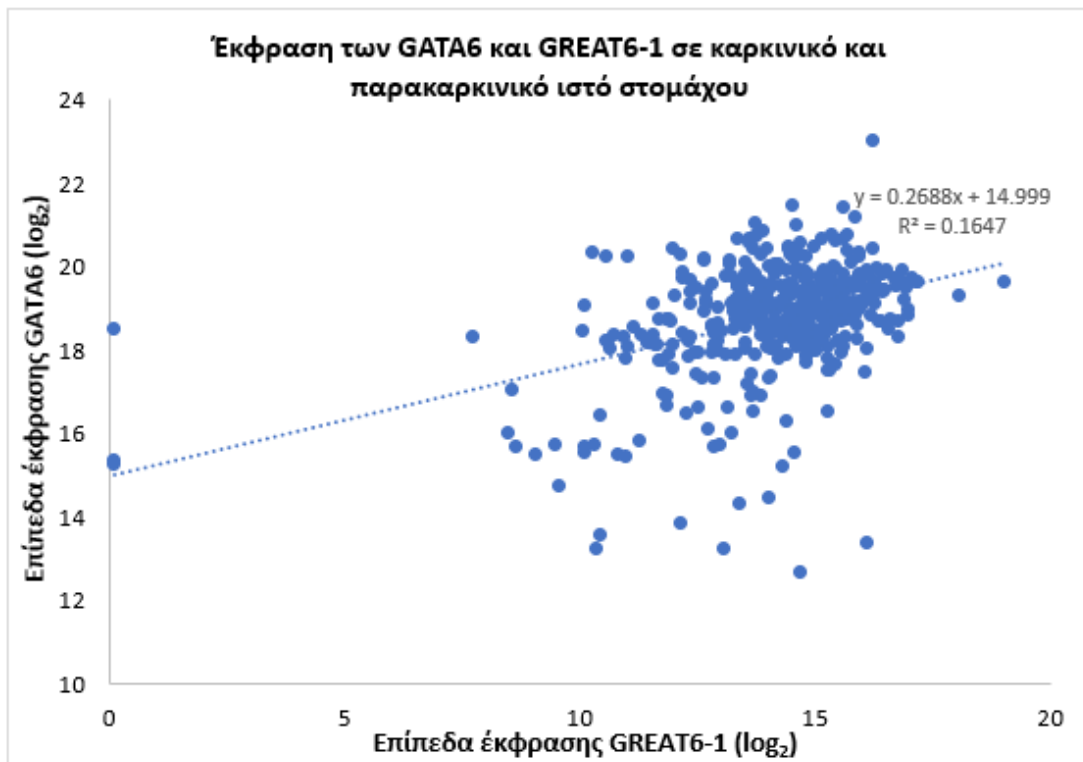


Εικόνα 20 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 σε φυσιολογικό-παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό στομάχου από βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών. Οι βιοψίες καρκινικού ιστού έχουν κατηγοριοποιηθεί στα στάδια εξέλιξης I-IV και NA. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

Κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν επίσης δεδομένα από βιοψίες Ασιατών ασθενών, τόσο από καρκινικό όσο και από φυσιολογικό-παρακαρκινικό ιστό στομάχου. Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 σε φυσιολογικό-παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό στομάχου. Όπως φαίνεται τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 εμφανίζουν ιδιαίτερα σημαντική αύξηση στον καρκινικό ιστό σε σύγκριση με τον φυσιολογικό-παρακαρκινικό ιστό (**Εικόνα 21**). Στο επόμενο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 σε σύγκριση με επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 για το σύνολο των βιοψιών γαστρικού ιστού από ασθενείς (φυσιολογικού-παρακαρκινικού και καρκινικού ιστού). Στο συγκεκριμένο διάγραμμα φαίνεται να υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ του GATA6 και του GREAT6-1 (**Εικόνα 22**).

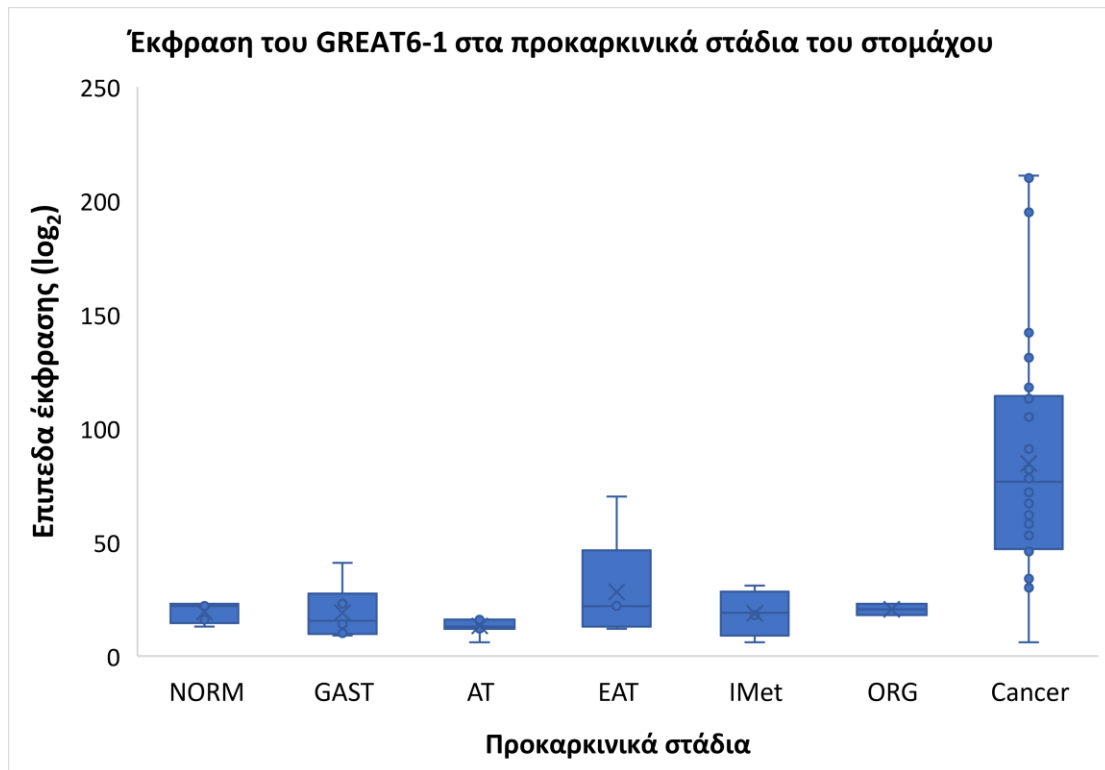


Εικόνα 21 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 σε φυσιολογικό-παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό στομάχου από βιοψίες Ασιατών ασθενών. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.



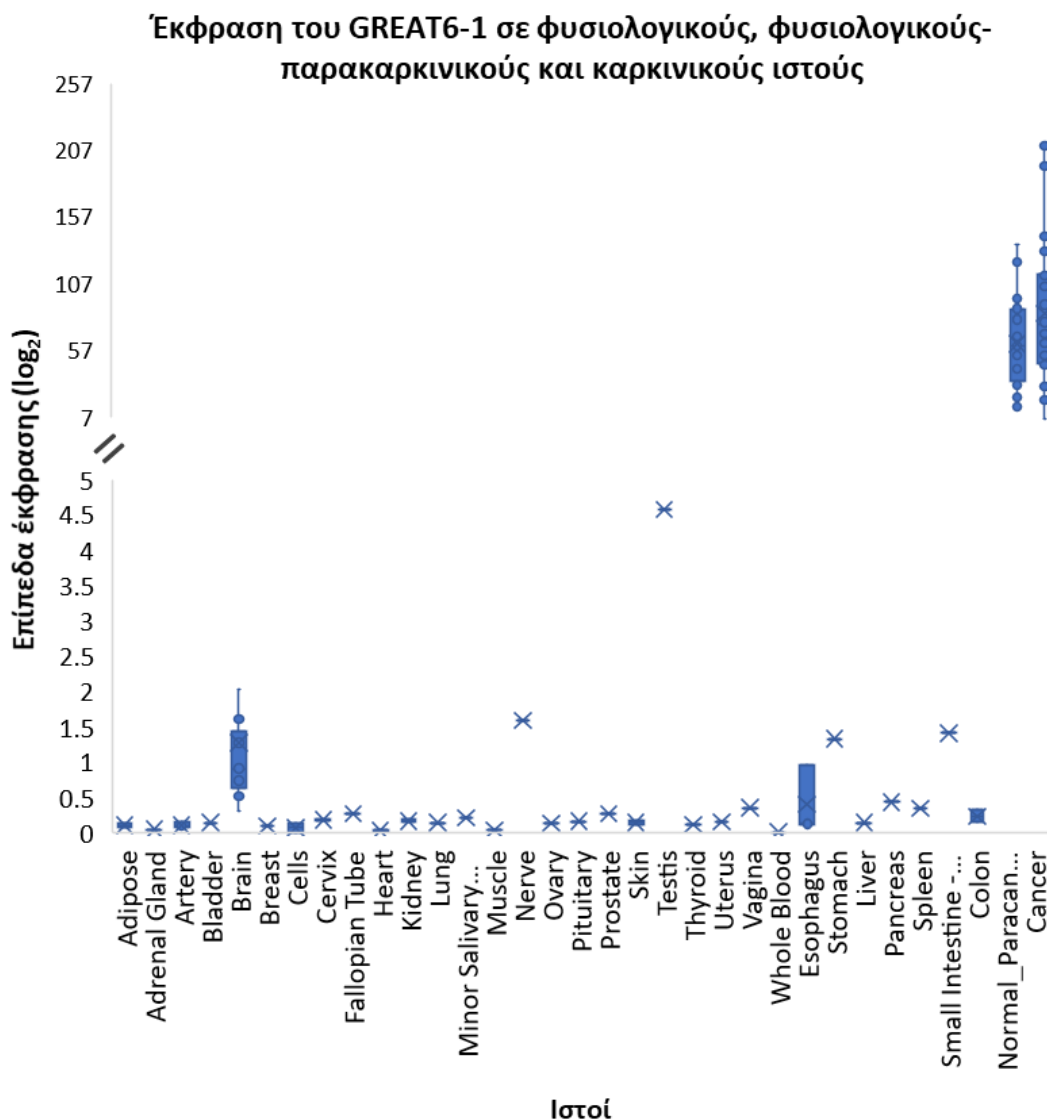
Εικόνα 22 Διάγραμμα διασποράς (scatter-plot) των επιπέδων έκφρασης του GATA6 σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 για το σύνολο των βιοψιών. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 σε βιοψίες ασθενών κατά τα προκαρκινικά στάδια, με την εξέλιξη των οποίων αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (Ενότητα 1.2.3/Εικόνα 3), αρχίζοντας από την γαστρίτιδα, έπειτα την ατροφική γαστρίτιδα, την εκτεταμένη ατροφική γαστρίτιδα και την εντερική μεταπλασία ολοκληρώνεται ένα προκαρκινικό μονοπάτι που είναι πιθανό να οδηγήσει στον εντερικό υπότυπο του γαστρικού καρκίνου. Στο διάγραμμα απεικονίζονται επίσης δεδομένα από οργανοειδή, μικροσκοπικές δομές τριών διαστάσεων που αναπτύσσονται από βλαστοκύτταρα και προσομοιάζουν δομικά και λειτουργικά τα μοντέλα του καρκίνου. Από το διάγραμμα είναι εμφανής η υπερέκφραση του GREAT6-1 στον καρκίνο του στομάχου, σε αντίθεση με τα προκαρκινικά στάδια, όπου τα επίπεδα έκφρασης κυμαίνονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 23 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 στα προκαρκινικά στάδια και τελικά στον καρκίνο του στομάχου. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

Στο τελευταίο διάγραμμα αυτής της ανάλυσης, απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 για τους φυσιολογικούς ιστούς και συγκρίνονται με τα επίπεδα έκφρασης του φυσιολογικού-παρακαρκινικού και του καρκινικού ιστού στομάχου. Παρατηρώντας μόνο τους φυσιολογικούς ιστούς, τα επίπεδα έκφρασης κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα, με τους όρχεις και τον εγκέφαλο να έχουν τα υψηλότερα επίπεδα και ακολουθούν τα νεύρα, το λεπτό έντερο, ο οισοφάγος και ο στομάχος. Αν όμως τα επίπεδα έκφρασης στους φυσιολογικούς ιστούς συγκριθούν με τα επίπεδα έκφρασης στον φυσιολογικό-παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό στομάχου, είναι ευδιάκριτη η υπερέκφραση του GREAT6-1 στον καρκίνο του στομάχου (**Εικόνα 24**).



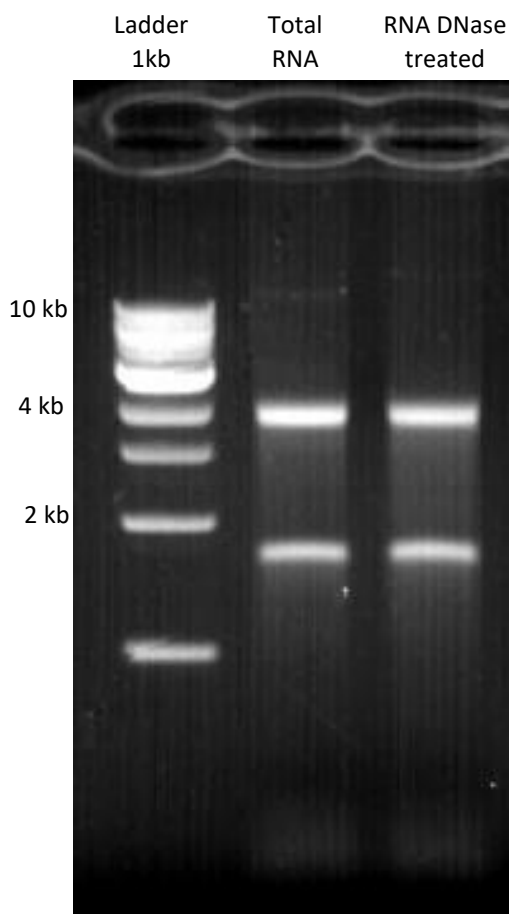
Εικόνα 24 Διάγραμμα (Box-plot) των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 σε φυσιολογικούς ιστούς, φυσιολογικό-παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό στομάχου. Τα επίπεδα έκφρασης είναι σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2.

4.2 Πειραματικά αποτελέσματα

4.2.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA αποτελεί ένα από τα πιο βασικά και σημαντικά πρωτόκολλα που απαιτούνται για τη μελέτη των μεταγράφων μεταγραφικών παραγόντων και των lncRNAs. Σε μια περίπτωση απομόνωσης RNA πραγματοποιήθηκε ενδεικτικά ηλεκτροφόρηση δύο δειγμάτων, σε πήκτωμα αγαρόζης (1%), ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία απομόνωσης του RNA καθώς και η ακεραιότητά του. Τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν ήταν ένα δείγμα ολικού RNA (total RNA) καθώς και ένα δείγμα RNA έπειτα από επεξεργασία με DNάση (RNA-DNase treated). Στη φωτογραφία για

τα δύο δείγματα, total RNA και RNA-DNase treated, φαίνονται να υπάρχουν δύο έντονες ζώνες (**Εικόνα 25**). Η ζώνη κοντά στις 2 kb αντιστοιχεί στο 18S rRNA, ενώ η ζώνη κοντά στις 4 kb αντιστοιχεί στο 28S rRNA. Στο total RNA υπάρχει μια αχνή ζώνη στις 10 kb περίπου, η οποία θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε γονιδιωματικό DNA, όμως μετά την επεξεργασία με DNάση δεν υφίσταται. Η απουσία ζωνών μικρότερου των 2 kb μεγέθους επιβεβαιώνει την ακεραιότητα του RNA. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως το RNA ακέραιο και χωρίς προσμίξεις, μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί με αξιόπιστα αποτελέσματα.

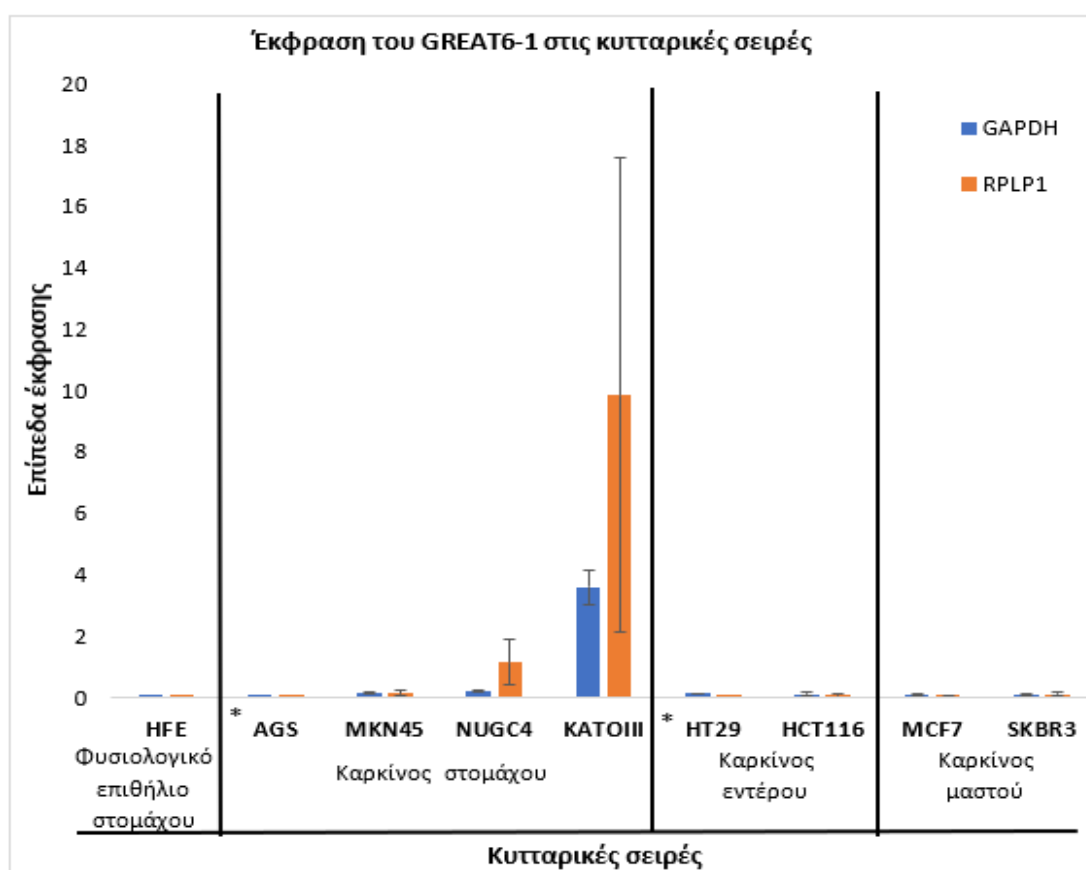


Εικόνα 25 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) δειγμάτων που προέκυψαν από την απομόνωση RNA. Απεικονίζονται κατά σειρά ο ladder 1kb, το total RNA δείγμα και το RNA-DNase treated δείγμα. Η ζώνη στις 4 kb αντιστοιχεί στο 28S rRNA και η ζώνη στις 2 kb αντιστοιχεί στο 18S rRNA.

4.2.2 Έκφραση του GREAT6-1 στις κυτταρικές σειρές

Έχοντας ως στόχο την μελέτη του GREAT6-1 στον καρκίνο, το πρώτο πείραμα που πραγματοποιήθηκε ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές μέσω ποσοτικής PCR (qPCR). Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τις κυτταρικές σειρές και στη συνέχεια επεξεργασία με DNάση και σύνθεση cDNA. Για την qPCR χρησιμοποιήθηκαν δείγματα

cDNA από δύο βιολογικές επαναλήψεις για όλες τις κυτταρικές σειρές (εκτός των AGS και HT29), ώστε να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της ίδιας κυτταρικής σειράς οφείλεται στη διαφορά των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των ιδιοσυστατων γονιδίων GAPDH και RPLP1, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 συναντώνται κατά σειρά στις κυτταρικές σειρές του στομάχου KATOIII, NUGC4 και MKN45. Στις κυτταρικές σειρές του καρκίνου του εντέρου και του μαστού τα επίπεδα έκφρασης είναι χαμηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα των κυτταρικών σειρών του στομάχου, αλλά παραμένουν ανιχνεύσιμα. Τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης έχουν οι κυτταρικές σειρές στομάχου AGS και HFE, ωστόσο στην AGS είναι υψηλότερα τα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με την HFE (**Εικόνα 26**). Με βάση τα επίπεδα έκφρασης που προσδιορίστηκαν στο παρόν πείραμα, για τα επόμενα περάματα χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές στομάχου AGS, MKN45 και NUGC4. Παρόλο που τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στην κυτταρική σειρά KATOIII, η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν χρησιμοποιήθηκε λόγω της δύσκολης διαχείρισης της κατά την κυτταροκαλλιέργεια.

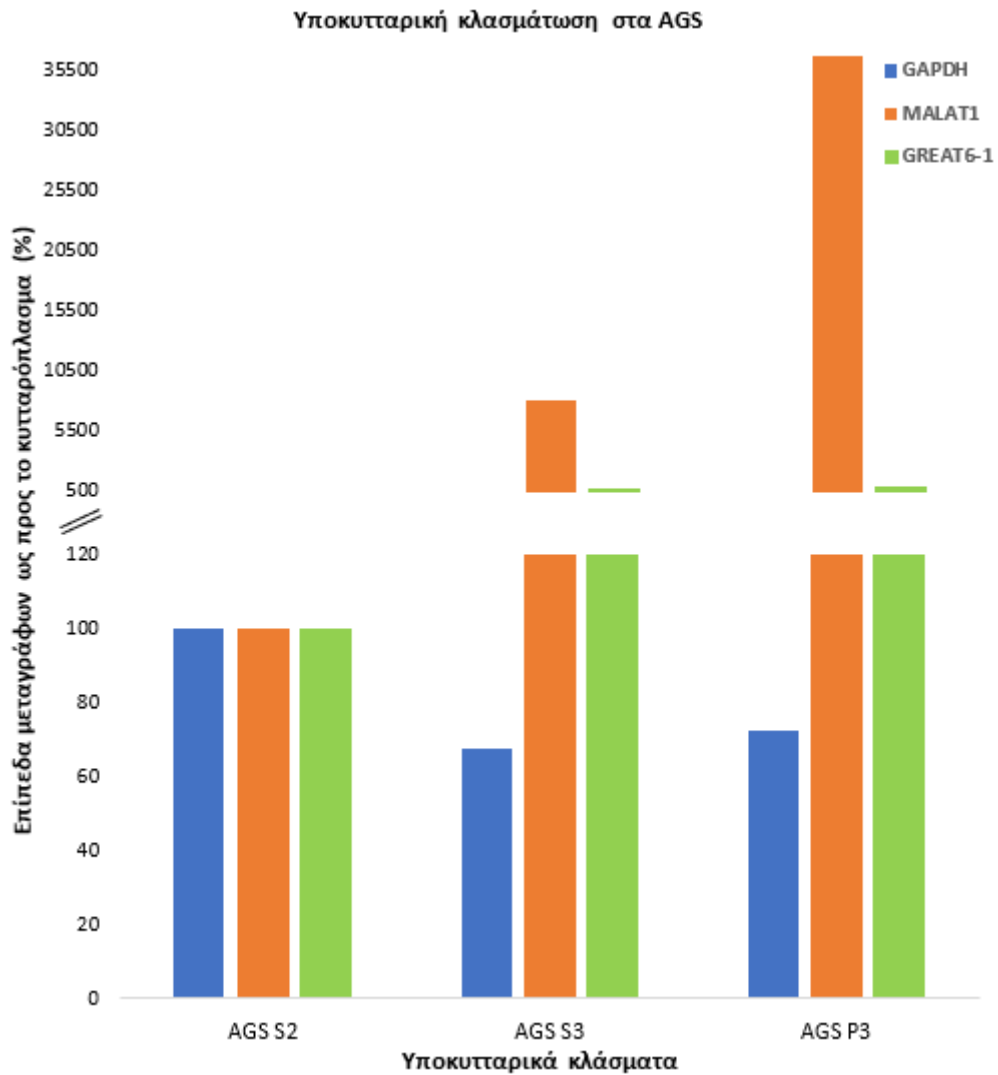


Εικόνα 26 Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 στις κυτταρικές σειρές, που έχουν ομαδοποιηθεί ανά κυτταρικό τύπο. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης που έχουν κανονικοποιηθεί με το GAPDH ενώ το πορτοκαλί αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης που έχουν κανονικοποιηθεί με το RPLP1. Τα επίπεδα έκφρασης είναι μέσος όρος 2 βιολογικών επαναλήψεων. Το '*' αντιστοιχεί σε μία βιολογική επανάληψη.

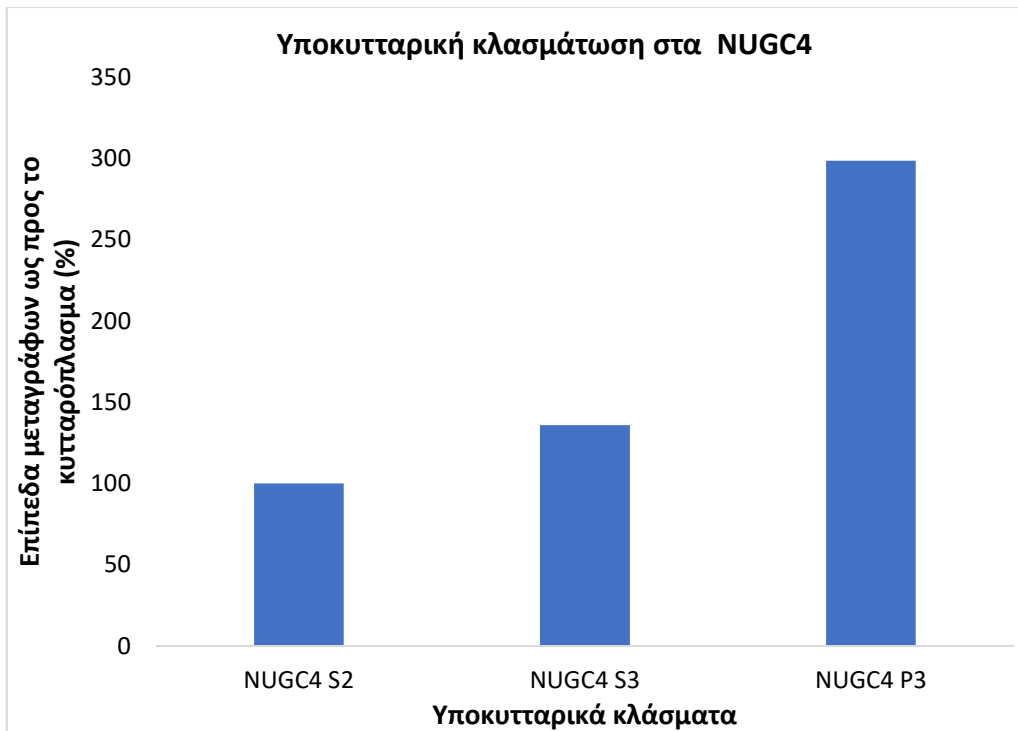
4.2.3 Υποκυτταρική κλασμάτωση

Η υποκυτταρική κλασμάτωση πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα AGS, MKN45 και NUGC4 και είχε ως στόχο τον υποκυτταρικό εντοπισμό του GREAT6-1. Από την υποκυτταρική κλασμάτωση προέκυψαν τα εξής τρία υποκυτταρικά κλάσματα: το κυτταρόπλασμα (S2), το πυρηνόπλασμα (S3) και η αδιάλυτη χρωματίνη (P3). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, επεξεργασία με DNάση, σύνθεση cDNA και qPCR, μέσω της οποίας προσδιορίζεται η υποκυτταρική θέση του μεταγράφου-στόχου. Στα κύτταρα AGS εκτός από την υποκυτταρική θέση του GREAT6-1, προσδιορίστηκε και η υποκυτταρική θέση των GAPDH και MALAT1. Τα δύο αυτά μετάγραφα χρησιμοποιήθηκαν για να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία του πειράματος, καθώς είναι πειραματικά αποδεδειγμένη η υποκυτταρική τους θέση. Το GAPDH αποτελεί ένα μετάγραφο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη και γι' αυτό στην πλειοψηφία του εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Από την άλλη πλευρά το MALAT1 αποτελεί ένα lncRNA που εντοπίζεται και δρα στον πυρήνα. Τα δεδομένα που απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα έχουν προκύψει ως μέσος όρος δύο βιολογικών επαναλήψεων. Τα επίπεδα των μεταγράφων είναι εκφρασμένα ως προς την παρουσία των μεταγράφων στο κυτταρόπλασμα.

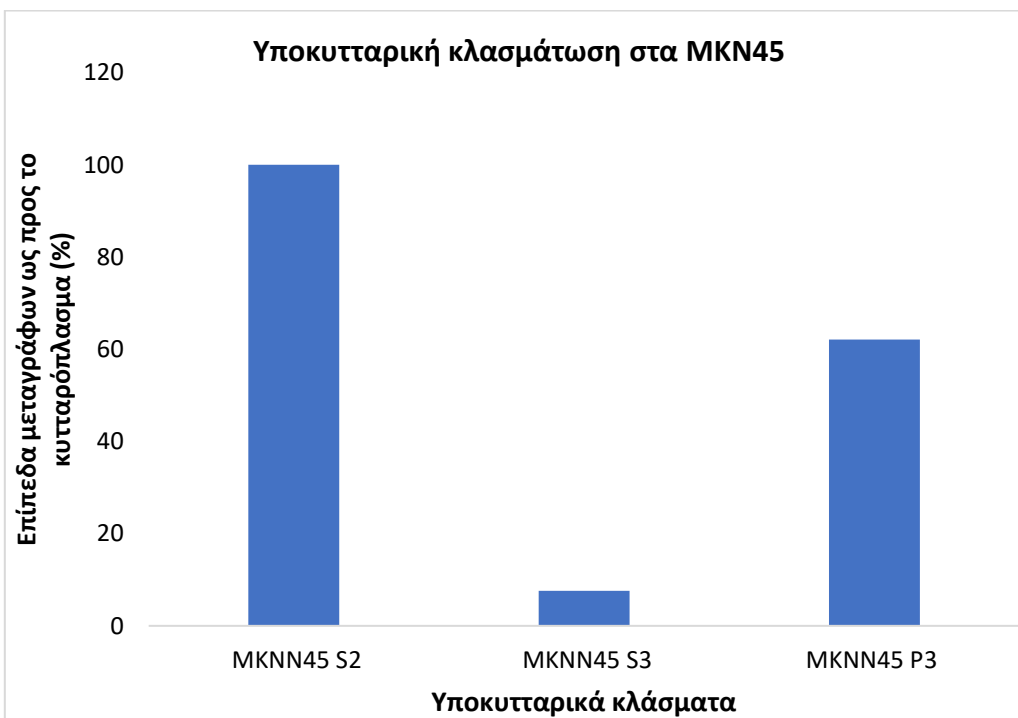
Από το διάγραμμα της υποκυτταρικής κλασμάτωσης στα AGS φαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του GAPDH εντοπίζεται στο κλάσμα του κυτταροπλάσματος, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό του MALAT1 εντοπίζεται στο κλάσμα της αδιάλυτης χρωματίνης, όπως αναμενόταν. Στο ίδιο διάγραμμα, το μεγαλύτερο ποσοστό του GREAT6-1 εντοπίζεται στο κλάσμα της αδιάλυτης χρωματίνης (**Εικόνα 27**). Παρόμοια με το προηγούμενο διάγραμμα, στο διάγραμμα υποκυτταρικής κλασμάτωσης στην κυτταρική σειρά NUGC4, το GREAT6-1 εντοπίζεται σε πολύ υψηλό ποσοστό στο κλάσμα της αδιάλυτης χρωματίνης (**Εικόνα 28**). Αντίθετα με τις προηγούμενες περιπτώσεις, στο διάγραμμα υποκυτταρικής κλασμάτωσης στην κυτταρική σειρά MKN45 το GREAT6-1 εντοπίζεται μοιρασμένο μεταξύ του κυτταροπλάσματος και της αδιάλυτης χρωματίνης (**Εικόνα 29**). Συνολικά από τα πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης στις κυτταρικές σειρές AGS, NUGC4, και MKN45 συμπεραίνεται ότι το GREAT6-1 είναι παρόν ως επί το πλείστον στη χρωματίνη, σε επίπεδα που μεταβάλλονται ανάλογα με την κυτταρική σειρά.



Εικόνα 27 Διάγραμμα απεικόνισης της υποκυτταρικής θέσης των μεταγράφων GAPDH, MALAT1 και GREAT6-1 στα κύτταρα AGS. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στα μεταγράφα του GAPDH, το πορτοκαλί χρώμα αντιστοιχεί στο MALAT1 και το πράσινο χρώμα στο GREAT6-1. Τα επίπεδα του άξονα y αντιστοιχούν στο λόγο (%) της παρουσίας του μεταγράφου στο εκάστοτε κλάσμα προς την παρουσία του στο κλάσμα του κυτταροπλάσματος.



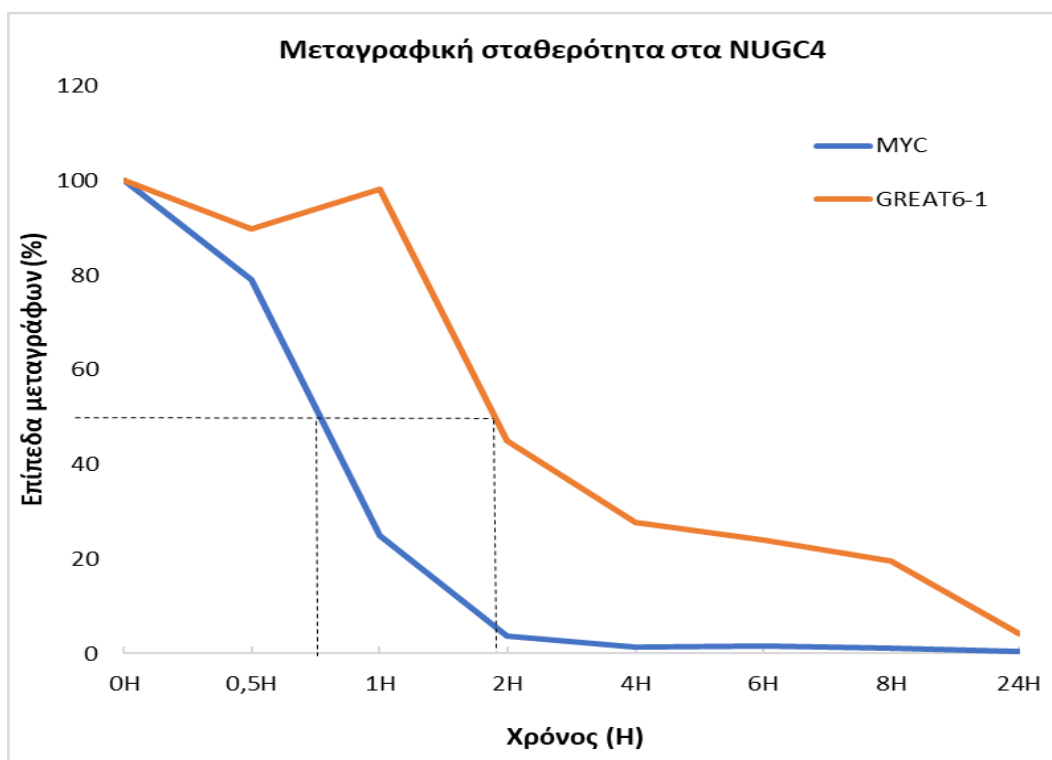
Εικόνα 28 Διάγραμμα απεικόνισης της υποκυτταρικής θέσης του μεταγράφου GREAT6-1 στα κύτταρα NUGC4. Τα επίπεδα του άξονα y αντιστοιχούν στο λόγο (%) της παρουσίας του μεταγράφου στο εκάστοτε κλάσμα προς την παρουσία του στο κλάσμα του κυτταροπλάσματος.



Εικόνα 29 Διάγραμμα απεικόνισης της υποκυτταρικής θέσης του μεταγράφου GREAT6-1 στα κύτταρα MKN45. Τα επίπεδα του άξονα y αντιστοιχούν στο λόγο (%) της παρουσίας του μεταγράφου στο εκάστοτε κλάσμα προς την παρουσία του στο κλάσμα του κυτταροπλάσματος.

4.2.4 Μεταγραφική σταθερότητα

Το πείραμα μεταγραφικής σταθερότητας πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα NUGC4 και αποσκοπούσε στον προσδιορισμό του χρόνου που απαιτείται ώστε η αρχική ποσότητα των μεταγράφων να μειωθεί κατά 50%. Ο χρόνος που χρειάζεται ώστε να μειωθούν κατά 50% τα μεταγραφα αντικατοπτρίζει το ρυθμιστικό ρόλο που μπορεί να έχουν αυτά. Στην qPCR εκτός από τα επίπεδα των μεταγράφων του GREAT6-1, προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα των μεταγράφων του MYC, που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου. Τα επίπεδα των μεταγράφων προσδιορίστηκαν για τα χρονικά διαστήματα 0h, 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h και 24h μετά την προσθήκη ακτινομυκίνης-D. Τα μεταγραφα που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη με ρόλο μεταγραφικού παράγοντα, όπως του MYC, χρειάζονται μικρό χρονικό διάστημα για να αποικοδομηθούν κατά 50%, ενώ μη κωδικοποιητικά μεταγραφα που δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και προστατεύονται από RNάσες παραμένουν σταθερά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Από το διάγραμμα που προέκυψε φαίνεται ότι τα μεταγραφα του MYC αποικοδομούνται με αρκετά γρήγορο ρυθμό, μειώνονται κατά 50% μεταξύ 0,5 και 1 ώρας, ενώ στις 2 ώρες έχουν σχεδόν μηδενιστεί. Από την άλλη πλευρά, τα μεταγραφα του GREAT6-1 παρουσιάζουν πιο αργό ρυθμό αποικοδόμησης και μειώνονται κατά 50% σε λιγότερο από 2 ώρες. Μετά το πέρας των 2 ωρών συνεχίζουν να αποικοδομούνται με μικρότερο και σχετικά σταθερό ρυθμό, ενώ έπειτα από 24 ώρες έχουν σχεδόν εκμηδενιστεί (**Εικόνα 30**).

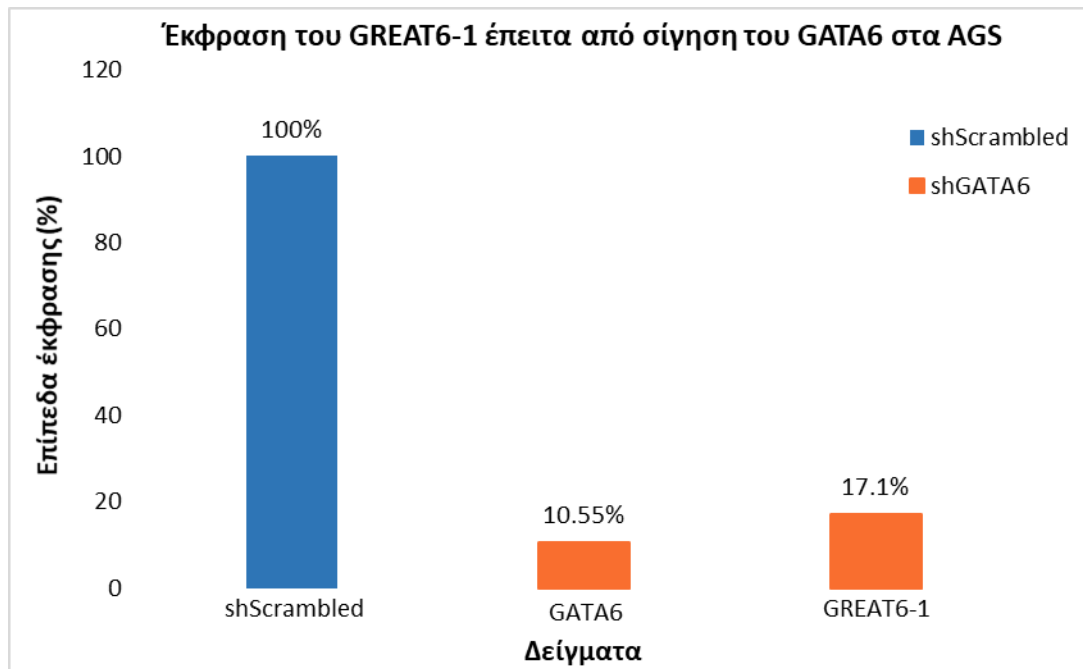


Εικόνα 30 Διάγραμμα απεικόνισης της μεταβολής των επιπέδων των μεταγράφων GREAT6-1 και MYC, λόγω αποικοδόμησης τους, σε συνάρτηση με το χρόνο στα κύτταρα NUGC4. Τα επίπεδα του άξονα y αντιστοιχούν στο λόγο (%) της παρουσίας των μεταγράφων την εκάστοτε χρονική στιγμή στα κύτταρα προς την παρουσία τους την χρονική στιγμή 0.

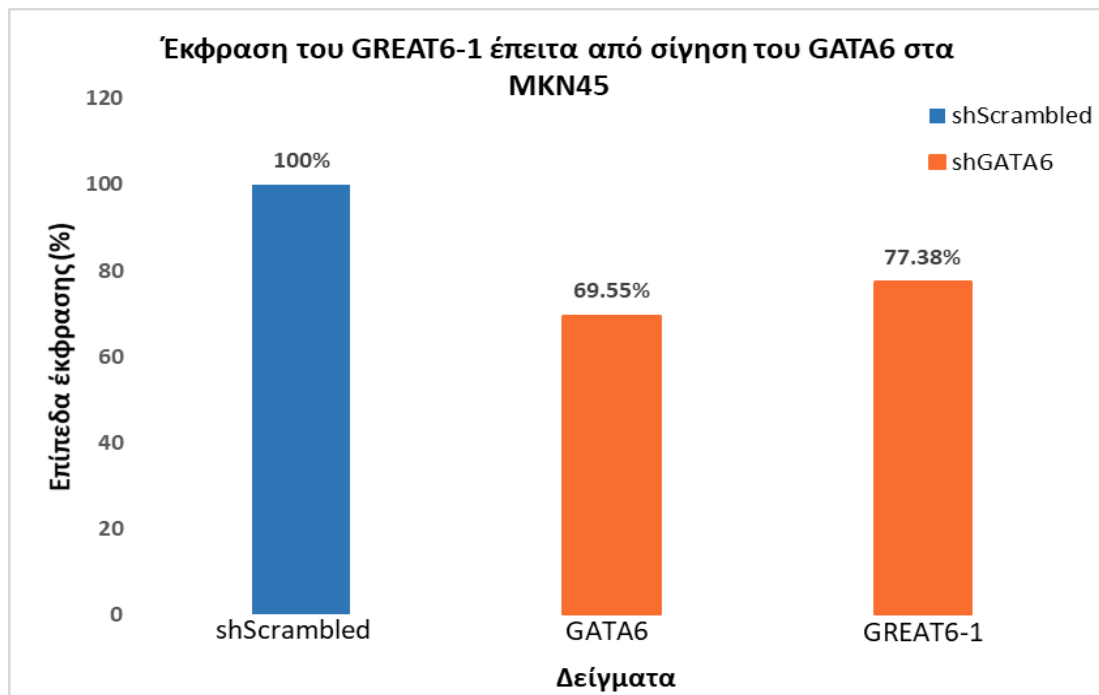
4.2.5 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 έπειτα από μεταγραφική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6, KLF5

Τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 προσδιορίστηκαν μέσω qPCR σε κύτταρα AGS, στα οποία είχε προηγηθεί μεταγραφική σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 και στα κύτταρα MKN45, στα οποία είχε προηγηθεί σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6 και KLF5. Το συγκεκριμένο πείραμα έχει ως σκοπό να ελέγξει τη θετική ρύθμιση του GREAT6-1 από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4, GATA6 και KLF5 στον καρκίνο. Ως εκ τούτου, shRNAs έναντι των μεταγράφων των μεταγραφικών παραγόντων εκφράστηκαν στα κύτταρα AGS και MKN45. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, επεξεργασία με DNάση, σύνθεση cDNA και qPCR. Το δείγμα shScrambled χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου (control) στο οποίο δεν είχε πραγματοποιηθεί σίγηση, καθώς το shRNA περιλάμβανε μια αλληλουχία που δεν στόχευε πουθενά στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Τα επίπεδα έκφρασης των GATA6 και GREAT6-1 έχουν κανονικοποιηθεί με βάση τα επίπεδα έκφρασης του ιδιόσυστατου γονιδίου RPLP1.

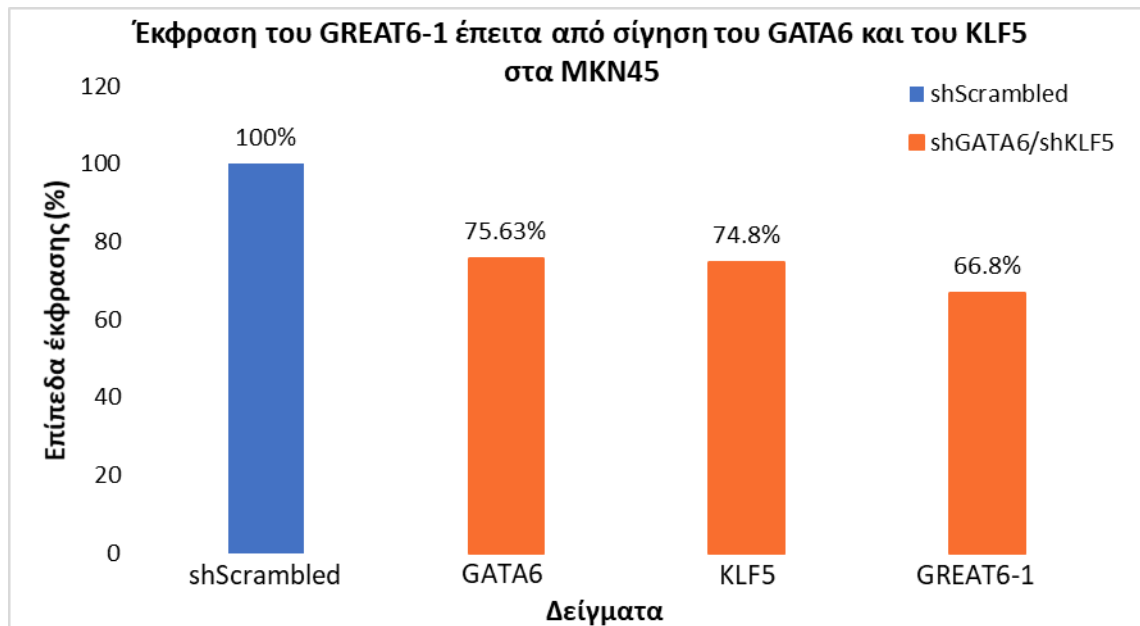
Το πρώτο διάγραμμα αυτής της υποενότητας προέκυψε από δείγματα κυττάρων AGS, στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μεταγραφική σίγηση του GATA6. Τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 μειώθηκαν κατά 89,45%, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά 82,9% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 31**). Το δεύτερο διάγραμμα προέκυψε από δείγματα κυττάρων MKN45, στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μεταγραφική σίγηση του GATA6. Σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 μειώθηκαν κατά 30,45%, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά 22,62% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 32**). Το τρίτο διάγραμμα προέκυψε από δείγματα κυττάρων MKN45, στα οποία είχε πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα μεταγραφική σίγηση του GATA6 και του KLF5. Η ταυτόχρονη σίγηση GATA6/KLF5 οδήγησε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης του GATA6 κατά 24,37%, μείωση των επιπέδων έκφρασης του KLF5 κατά 25,2% και μείωση των επιπέδων του GREAT6-1 κατά 33,2% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 33**). Στο τέταρτο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης που προέκυψαν έπειτα από ταυτόχρονη μεταγραφική σίγηση του GATA4 και του GATA6 στα κύτταρα MKN45. Η ταυτόχρονη σίγηση των GATA4/GATA6 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του GATA4 κατά 37,56%, τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του GATA6 κατά 30% και τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 κατά 53,2% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 34**). Συνολικά από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται πως όταν μειώνονται τα επίπεδα των ογκοεπαγωγικών μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6/KLF5, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, μειώνονται και τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1, σε ποσοστά που μεταβάλλονται κάθε φορά. Το γεγονός αυτό αυξάνει την πιθανότητα να ισχύει η υπόθεση της θετικής ρύθμισης του GREAT6-1 από ογκοεπαγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον καρκίνο.



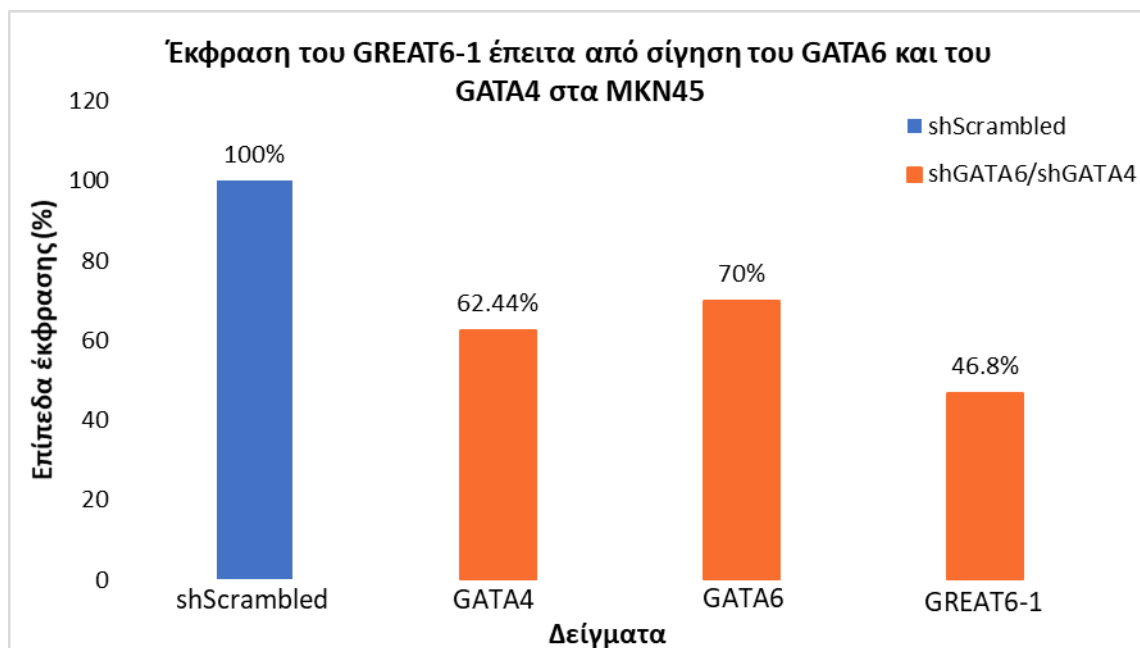
Εικόνα 31 Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του GATA6 και του GREAT6-1 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (shScrambled), έπειτα από μεταγραφική σίγηση του GATA6 στα κύτταρα AGS. Με μπλε απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του δείγματος ελέγχου, ενώ με πορτοκαλί απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 και του GREAT6-1. Τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 μειώθηκαν κατά 89,45%, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά 82,9% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου.



Εικόνα 32 Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του GATA6 και του GREAT6-1 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (shScrambled), έπειτα από μεταγραφική σίγηση του GATA6 στα κύτταρα MKN45. Με μπλε απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του δείγματος ελέγχου, ενώ με πορτοκαλί απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 και του GREAT6-1. Τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 μειώθηκαν κατά 30,45%, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά 22,62% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου.



Εικόνα 33 Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του GATA6, του KLF5 και του GREAT6-1 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (shScrambled), έπειτα από μεταγραφική σίγηση των GATA6/KLF5 στα κύτταρα MKN45. Με μπλε απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του δείγματος ελέγχου, ενώ με πορτοκαλί απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GATA6, του KLF5 και του GREAT6-1. Τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 μειώθηκαν κατά 24,37%, του KLF5 μειώθηκαν κατά 25,2% και του GREAT6-1 κατά 33,2% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου.

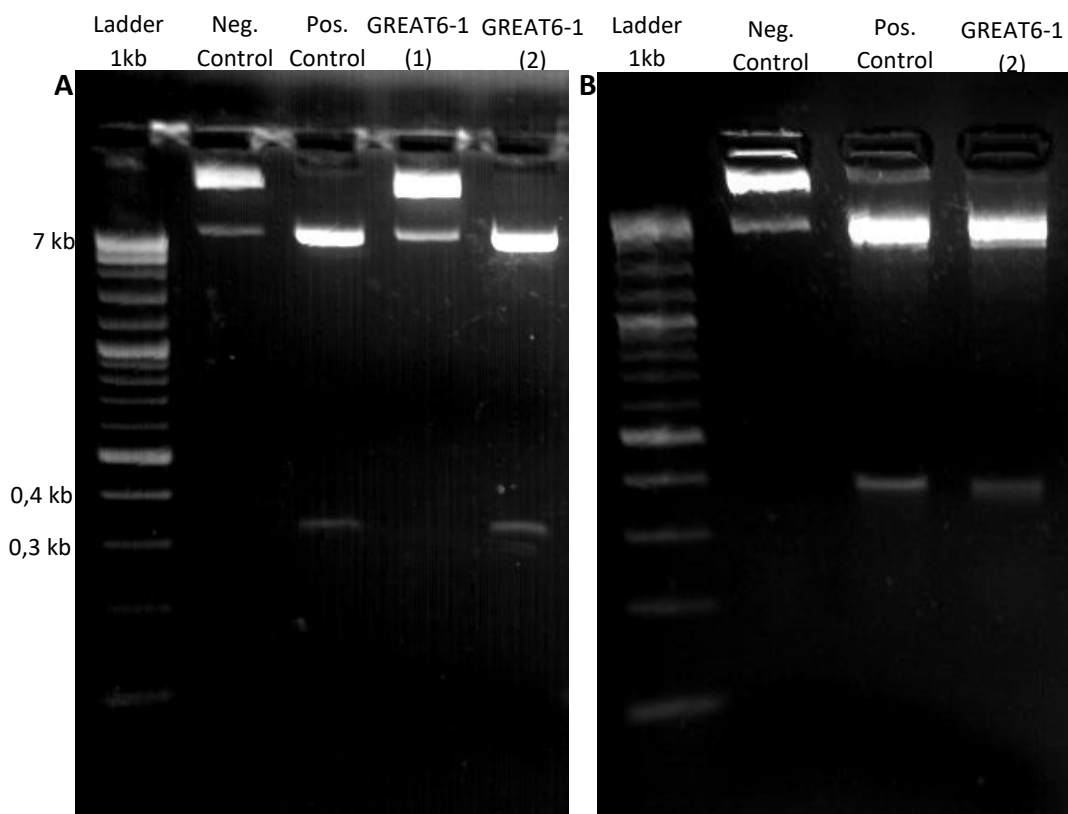


Εικόνα 34 Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του GATA4, του GATA6 και του GREAT6-1 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (shScrambled), έπειτα από μεταγραφική σίγηση των GATA6 και GATA4 στα κύτταρα MKN45. Με μπλε απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του δείγματος ελέγχου, ενώ με πορτοκαλί απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GATA6, του GATA4 και του GREAT6-1. Τα επίπεδα έκφρασης του GATA4 μειώθηκαν κατά 37,56%, του GATA6 μειώθηκαν κατά 30%, ενώ του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά 53,2% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου.

4.2.6 Διαγνωστική πέψη

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της ένθεσης του shRNA, που στοχεύει το GREAT6-1, στον pSicoR, πραγματοποιήθηκε εις διπλούν διαγνωστική πέψη και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2%). Η διαφορά μεταξύ των δύο διαγνωστικών πέψεων εντοπίζεται στη χρήση διαφορετικών ενζύμων περιορισμού. Ο πλασμιδιακός φορέας pSicoR είχε κοπεί με τα ένζυμα περιορισμού SmaI (ισοσχιζομερές XhoI) και BamHI. Η πρώτη διαγνωστική πέψη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού XbaI και SmaI ενώ η δεύτερη διαγνωστική πέψη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων XbaI και BamHI. Και στις δύο περιπτώσεις κατά την ηλεκτροφόρηση, από τους φορείς που έχουν λάβει επιτυχώς το ένθεμα προκύπτουν δύο ζώνες ενώ από φορείς που δεν έχουν λάβει ένθεμα προκύπτει μια ζώνη. Ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας (positive / negative control) που χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις είναι οι ίδιοι.

Όπως φαίνεται στη φωτογραφία για την πρώτη διαγνωστική πέψη, από τον αρνητικό μάρτυρα προέκυψε μια ζώνη περίπου στις 7,6 kb. Από το θετικό μάρτυρα προέκυψαν δύο ζώνες, η μία βρίσκεται κοντά στις 7,4 kb και η άλλη βρίσκεται στις 0,33 kb. Το δείγμα GREAT6-1(1) έχει μια ζώνη με μέγεθος παρόμοιο με του αρνητικού μάρτυρα, ενώ το δείγμα GREAT6-1(2) έχει δύο ζώνες με μέγεθος παρόμοιο του θετικού μάρτυρα (**Εικόνα 35A**). Συνεπώς, στο δείγμα GREAT6-1(1) ο φορέας δεν έχει λάβει ένθεμα, σε αντίθεση με το δείγμα GREAT6-1(2), όπου ο φορέας έχει λάβει επιτυχώς το ένθεμα. Έτσι, για την δεύτερη διαγνωστική πέψη χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι μάρτυρες και το δείγμα GREAT6-1(2). Όπως φαίνεται στη φωτογραφία για τη δεύτερη διαγνωστική πέψη, από τον αρνητικό μάρτυρα προέκυψε μια ζώνη περίπου στις 7,6 kb. Από το θετικό μάρτυρα προέκυψαν δύο ζώνες, η μία βρίσκεται κοντά στις 7,3 kb και η άλλη βρίσκεται στις 0,39 kb. Για το δείγμα GREAT6-1(2) προέκυψαν δύο ζώνες, παρόμοιου μεγέθους με του θετικού μάρτυρα (**Εικόνα 35B**). Για την επιβεβαίωση της ορθής ένθεσης βάση προς βάση και με απώτερο στόχο τη σίγηση συγκεκριμένου lncRNA το δείγμα GREAT6-1(2) στάλθηκε για αλληλούχηση.

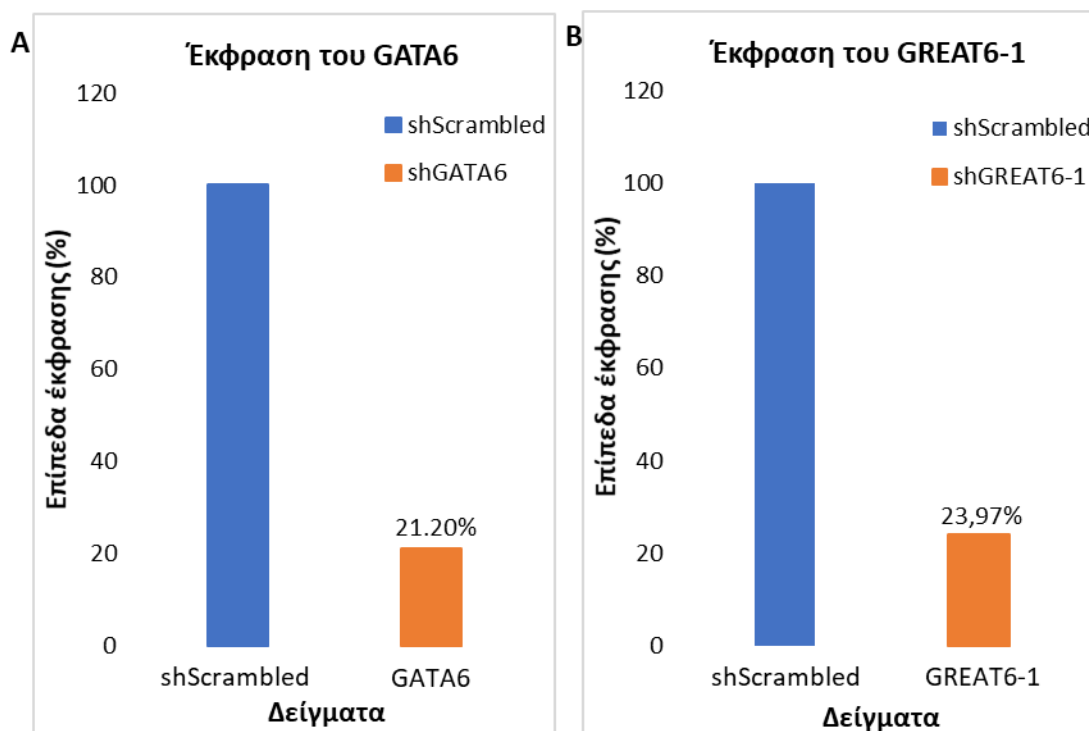


Εικόνα 35 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2%) δειγμάτων που προέκυψαν από δύο διαγνωστικές πέψεις. Α) Αποτελέσματα πρώτης διαγνωστικής πέψης. Κατά σειρά απεικονίζονται ο ladder 1kb plus, ο αρνητικός μάρτυρας, ο θετικός μάρτυρας και τα δείγματα GREAT6-1 (1) και GREAT6-1 (2). Β) Αποτελέσματα δεύτερης διαγνωστικής πέψης. Κατά σειρά απεικονίζονται ο ladder 1kb plus, ο αρνητικός μάρτυρας, ο θετικός μάρτυρας και το δείγμα GREAT6-1 (2).

4.2.7 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του GATA6 και του GREAT6-1 έπειτα από μεταγραφική σίγηση τους στα κύτταρα AGS

Στο συγκεκριμένο πείραμα προσδιορίστηκαν μέσω qPCR τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 και του GREAT6-1, έπειτα από μεταγραφική σίγηση των συγκεκριμένων μορίων στα κύτταρα AGS. Για τη σίγηση του GREAT6-1 χρησιμοποιήθηκαν λεντιοί που έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα pSicoR/shGREAT6-1(2), που αναφέρθηκε προηγουμένως. Έτσι σε κύτταρα AGS προστέθηκαν λεντιοί που έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα pSicoR/shGREAT6-1(2), ενώ σε άλλα κύτταρα AGS προστέθηκαν λεντιοί που έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα pSicoR/shGATA6, σαν βιολογική επανάληψη του πειράματος της εικόνας 31. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, επεξεργασία με DNάση, σύνθεση cDNA και qPCR. Το δείγμα shScrambled χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου (control) στο οποίο δεν είχε πραγματοποιηθεί σίγηση, καθώς το shRNA περιλάμβανε μια αλληλουχία που δεν στόχευε πουθενά στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Τα επίπεδα έκφρασης των GATA6 και GREAT6-1 έχουν κανονικοποιηθεί με βάση τα επίπεδα έκφρασης του ιδιοσυστάτου

γονιδίου RPLP1. Το πρώτο διάγραμμα αυτής της υποενότητας προέκυψε από δείγματα κυττάρων AGS, στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μεταγραφική σίγηση του GATA6. Τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 μειώθηκαν κατά 78,8% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου(Εικόνα 36A). Το δεύτερο διάγραμμα προέκυψε από δείγματα κυττάρων AGS, στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μεταγραφική σίγηση του GREAT6-1. Τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά 76,03% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (Εικόνα 36B).



Εικόνα 36 Α Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του GATA6 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (shScrambled), έπειτα από μεταγραφική σίγηση του στα κύτταρα AGS. Με μπλε απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του δείγματος ελέγχου, ενώ με πορτοκαλί απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GATA6. Τα επίπεδα έκφρασης του GATA6 μειώθηκαν κατά 78,8% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. **Β** Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (shScrambled), έπειτα από μεταγραφική σίγηση του στα κύτταρα AGS. Με μπλε απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του δείγματος ελέγχου, ενώ με πορτοκαλί απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1. Τα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-1 μειώθηκαν κατά 76,03% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου.

5. Συμπεράσματα και Συζήτηση

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα υγείας και κατατάσσεται ανάμεσα στους πέντε πιο συχνούς τύπους καρκίνου παγκοσμίως. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου ευθύνεται για το 8.2% του συνόλου των θανάτων από καρκίνο σε παγκόσμιο επίπεδο¹. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η διάγνωση πραγματοποιείται σε προχωρημένα στάδια, εξαιτίας της απουσίας συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια της νόσου, με αποτέλεσμα η πρόγνωση για τους ασθενείς να είναι δυσμενής⁶. Επιπλέον η γαστροσκόπηση, η πιο συχνή και αποτελεσματική μέθοδος διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου, λόγω της επεμβατικότητας και του υψηλού κόστους της, δεν μπορεί να αποτελέσει μια μέθοδο ρουτίνας. Για την αντιμετώπιση του καρκίνου του στομάχου ως τώρα πραγματοποιούνται χειρουργικές επεμβάσεις και χημειοθεραπείες, οι οποίες όμως δεν είναι αποτελεσματικές για το σύνολο των ασθενών¹³⁴. Για όλους αυτούς τους λόγους κρίνεται επιτακτική η ταυτοποίηση νέων, μη-επεμβατικών βιοδεικτών που θα αξιοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση και την αποτελεσματική θεραπεία του γαστρικού καρκίνου.

Με σκοπό λοιπόν την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση του γαστρικού καρκίνου, ενδιαφέρον προσελκύουν τα lncRNAs, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων που αυτά διαθέτουν¹³⁵⁻¹³⁷. Τα lncRNAs αποτελούν μια ανερχόμενη τάξη μορίων, που εκτός από την ποικίλη δράση τους σε φυσιολογικούς ιστούς, έχει βρεθεί πως εκφράζονται διαφορετικά στον καρκίνο. Έχει διαπιστωθεί πως τα lncRNAs έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την προαγωγή ή/και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, σε διάφορους τύπους καρκίνου¹³⁸. Μια σημαντική ιδιότητα των lncRNAs που τα καθιστά ιδανικά ως δείκτες και θεραπευτικούς στόχους, είναι η εξειδικευμένη έκφραση τους ως προς τον τύπο του καρκίνου, τον κυτταρικό τύπο, τον ιστό αλλά και τη χρονική στιγμή¹³⁹. Επιπλέον η παρουσία τους στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά διευκολύνει τον εντοπισμό τους, χωρίς τη χρήση επεμβατικών μεθόδων¹³⁶.

Πρόσφατα, η εκτεταμένη γονιδιωματική ανάλυση μέσω της αλληλούχησης οδήγησε σε μια νέα μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου. Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση προκύπτουν οι εξής τέσσερις μοριακοί υπότυποι: όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (positive for Epstein-Barr virus, EBV), όγκοι μικροδορυφορικά ασταθείς (microsatellite unstable tumours, MSI), όγκοι γονιδιωματικά σταθεροί (genomically stable tumours, GS) και όγκοι χρωμοσωμικά ασταθείς (chromosomal instability, CIN)²⁶. Η πλειοψηφία των γαστρικών όγκων (50%) κατηγοριοποιείται στους όγκους CIN. Στα γονίδια που βρίσκονται σε γονιδιωματική ενίσχυση στον καρκίνο του στομάχου συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6 και KLF5. Οι τρεις αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι πιθανό να σχηματίζουν ένα δίκτυο συνεργασίας μέσω του οποίου ρυθμίζουν κοινά γονιδια-στόχους, με σκοπό την προαγωγή της ογκογένεσης⁷⁸. Μάλιστα ο καθοριστικός ρόλος που διαδραματίζουν τόσο κατά την ανάπτυξη των φυσιολογικών ιστών όσο και κατά

την ανάπτυξη του όγκου, οδήγησε στο να θεωρηθούν οι GATA4, GATA6 και KLF5 γονίδια προαγωγής της γαστρικής κυτταρικής γενεαλογίας.

Σε μελέτη που αποσκοπούσε στην εύρεση γονιδίων που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα GATA6 στον καρκίνο του στομάχου, διαπιστώθηκε πως γονίδια που ρυθμίζονται από τον GATA6 σχετίζονται με την διαίρεση, την ανανέωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε πως στην πλειοψηφία τους τα σημεία πρόσδεσης του GATA6 βρίσκονταν σε μεσογονιδιακό χώρο, που δεν επικαλυπτόταν με άλλα γονίδια ή σε ιντρόνια γονιδίων¹⁴⁰. Στα γονίδια-στόχους που ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας, όπως αποδεικνύεται και από τη βιβλιογραφία, περιλαμβάνονται και γονίδια lncRNAs. Ένα παράδειγμα lncRNA που ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας KLF5 και MYC στο γαστρικό καρκίνο, είναι το LINC00346¹⁴¹. Το συγκεκριμένο lncRNA έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται στο γαστρικό καρκίνο, καθώς βρίσκεται σε γονιδιωματική ενίσχυση, ενώ έχει συσχετισθεί με όγκους προχωρημένου σταδίου και με δυσμενή πρόγνωση για τους ασθενείς. Το LINC00346 δρα κυρίως στο κυτταρόπλασμα, όπου προσδένεται στο miR-34a-5p, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα των NOTCH1, CD44, AXL, που αποτελούν στόχους του miR-34a-5p.

Ένα lncRNA που έχει ογκογόνο δράση στον καρκίνο του οισοφάγου (esophageal squamous cell carcinoma) είναι το LINC01503¹⁴². Η υπερέκφραση του LINC01503, επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα TP63 και έχει συσχετισθεί με την προαγωγή της ανάπτυξης και της διήθησης του όγκου. Μάλιστα το LINC01503 έχει προταθεί ως ένας βιοδείκτης για τους επιθετικούς όγκους. Το LINC01503 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα όπου προσδένεται στην ERK2, αποτρέποντας την αποφωσφορλίωσή της και οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών. Επίσης προσδένεται στην EBP-1, εμποδίζοντας την ουβικιτινίωσή της PI3K, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PI3K/Akt σηματοδότησης. Στην πλειοψηφία των μελανωμάτων (90%) έχει ανιχνευθεί να υπερεκφράζεται το lncRNA SAMMSON, που επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα SOX10¹⁴³. Το SAMMSON εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και ειδικότερα στα μιτοχόνδρια. Στα μιτοχόνδρια αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p32, η οποία αποτελεί ρυθμιστή της ομοιόστασης και του μεταβολισμού των μιτοχονδρίων, καθώς συμμετέχει στην ωρίμανση του μιτοχονδριακού 16S rRNA. Η μεταγραφική σίγηση του SAMMSON οδήγησε στην μείωση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων και για το λόγο αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση του μελανώματος.

Στο πλαίσιο όλων των παραπάνω εντάσσεται και η παρούσα πτυχιακή εργασία, που αποσκοπεί στο χαρακτηρισμό του lncRNA GREAT6-1, το οποίο ρυθμίζεται από ογκοεπαγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον καρκίνο. Από την βιοπληροφορική ανάλυση, όσον αφορά το σύνολο των κυτταρικών σειρών αλλά και τις κυτταρικές σειρές του γαστρεντερικού συστήματος, φαίνεται ότι τόσο το GREAT6-1 όσο και ο GATA6 εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο στόμαχο και το

παχύ έντερο (**Εικόνα 13-16**). Επιπλέον από την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στις κυτταρικές σειρές του στομάχου, διαπιστώνεται η εξειδικευμένη έκφραση του GREAT6-1 στο στόμαχο, καθώς η έκφραση του είναι υψηλότερη στους όγκους του στομάχου και τους διηθητικούς όγκους στους παραγαστρικούς λεμφαδένες σε αντίθεση με τους μεταστατικούς όγκους στους πιο απομακρυσμένους ιστούς (**Εικόνα 17**). Αντίθετα αν και τα επίπεδα του GATA6 είναι υψηλά, δεν διαφέρουν ιδιαίτερα ανάμεσα στους πρωταρχικούς όγκους του στομάχου και τους διηθητικούς ή μεταστατικούς όγκους (**Εικόνα 18**). Η πτώση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 και όχι του GATA6 κατά την διήθηση του όγκου στους λεμφαδένες και τη μετάσταση του, καθιστά το GREAT6-1 ένα πιθανό δείκτη για την πρόγνωση της ασθένειας. Από τα δείγματα φυσιολογικών ιστών και τις βιοψίες ασθενών παρακαρκινικού και καρκινικού ιστού στομάχου, είναι εμφανής η υπερέκφραση του GREAT6-1 στον καρκίνο του στομάχου (**Εικόνα 19, 21, 24**). Ωστόσο δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των σταδίων του καρκίνου, ώστε να χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο lncRNA κάποιο στάδιο (**Εικόνα 20**), γεγονός που ενισχύει το ρόλο του συγκεκριμένου lncRNA στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου ακόμα και σε αρχικά στάδια της νόσου. Σε αντίθεση με τον καρκίνο του στομάχου, δεν παρατηρείται υπερέκφραση του GREAT6-1 κατά τα προκαρκινικά στάδια (**Εικόνα 23**). Το γεγονός αυτό μειώνει τις πιθανότητες να αποτελέσει το GREAT6-1 ένα προκαρκινικό βιοδείκτη. Παρόλα αυτά η ισχυρή θετική συσχέτιση που παρατηρείται στο διάγραμμα σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των GATA6 και GREAT6-1, αποτελεί σημαντική ένδειξη της ρύθμισης του GREAT6-1 από τον GATA6 στον καρκίνο του στομάχου (**Εικόνα 22**).

Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου, έδειξε ότι τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης συναντώνται στις καρκινικές σειρές του στομάχου KATOIII, NUGC4, MKN45, AGS έναντι της φυσιολογικής αθανατοποιημένης σειράς γαστρικού επιθηλίου HFE145 (**Εικόνα 26**). Έτσι για τα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές αλλά και η κυτταρική σειρά AGS, στην οποία το GREAT6-1 εκφράζεται σε χαμηλότερα αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα. Από τα πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης διαπιστώθηκε πως ο υποκυτταρικός εντοπισμός του GREAT6-1 είναι παρόμοιος με του MALAT1, ένα lncRNA που δρα επιβεβαιωμένα στον πυρήνα¹⁴⁴. Πιο συγκεκριμένα, το GREAT6-1 φαίνεται ότι και στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές (AGS, NUGC4, MKN45) βρίσκεται στο υποκυτταρικό κλάσμα της χρωματίνης σε επίπεδα που μεταβάλλονται μεταξύ των κυτταρικών σειρών (**Εικόνα 27-29**). Αυτό υποδεικνύει ότι το GREAT6-1 μπορεί να βρίσκεται στον πυρήνα και να δρα σε σύμπλοκα με μεταγραφικούς παράγοντες, με χρωματινικούς τροποποιητές ή να αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη. Από το πείραμα μεταγραφικής σταθερότητας διαπιστώθηκε πως το GREAT6-1 αποτελεί ένα σχετικά ασταθές lncRNA, καθώς απαιτούνται λιγότερο από 2 ώρες για να μειωθεί η ποσότητα των μεταγράφων του κατά 50% (**Εικόνα 30**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα lncRNAs που έχουν ρυθμιστικό ρόλο συνήθως είναι ασταθή και απαιτούν λιγότερο από 4 ώρες για να μειωθούν κατά 50%¹⁴⁵. Έτσι, ο σύντομος χρόνος που απαιτείται για την

αποικοδόμηση του GREAT6-1 υποδεικνύει τον ρυθμιστικό ρόλο που μπορεί να έχει το συγκεκριμένο lncRNA στον καρκίνο.

Από την βιοπληροφορική ανάλυση υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις για τη ρύθμιση του GREAT6-1 από τον GATA6, οι οποίες επιβεβαιώνονται και πειραματικά. Η σίγηση του GATA6 κατά 89,45% στην κυτταρική σειρά AGS αλλά και κατά 30,45% στην κυτταρική σειρά MKN45 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 κατά 82,9% και 22,62%, αντίστοιχα **(Εικόνα 31, 32)**. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την θετική ρύθμιση του GREAT6-1 από τον GATA6. Παράλληλα η ταυτόχρονη σίγηση του KLF5 κατά 25,2% και του GATA6 κατά 24,37% οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 κατά 33,2% **(Εικόνα 33)** ενώ η ταυτόχρονη σίγηση του GATA4 κατά 37,56% και του GATA6 κατά 30% οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 κατά 53,2% **(Εικόνα 34)**. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης του GREAT6-1 σε μεταβαλλόμενα επίπεδα, έπειτα από την σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6 και KLF5 αυξάνει τις πιθανότητες ρύθμισης του GREAT6-1 από τους συγκεκριμένους ογκοεπαγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες, στον καρκίνο.

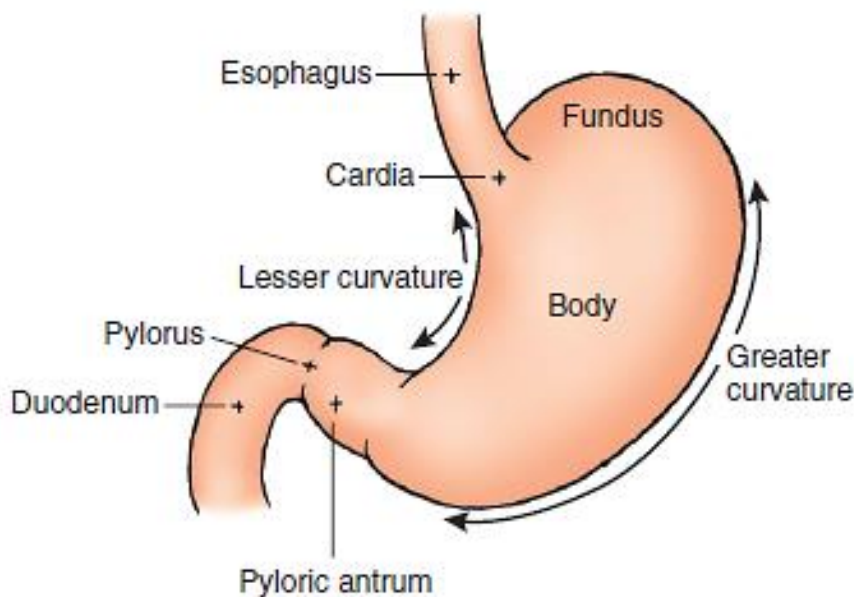
Μέσω του συστήματος διαμόλυνσης με λεντιούς επιτεύχθηκε σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 στα κύτταρα AGS κατά 78.8% **(Εικόνα 36A)**. Στο σύστημα διαμόλυνσης με λεντιούς χρησιμοποιήθηκε και ο φορέας pSicoR/GREAT6-1(2) στον οποίο κλωνοποιήθηκε με επιτυχία το shRNA έναντι του GREAT6-1, όπως διαπιστώθηκε από τη διαγνωστική πέψη **(Εικόνα 35)**. Η έκφραση του shRNA στα κύτταρα AGS είχε ως αποτέλεσμα την επιτυχή σίγηση του GREAT6-1 σε ποσοστό 76.03% **(Εικόνα 36B)**.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προσελκύουν το ενδιαφέρον για την περαιτέρω μελέτη της δράσης και της ρύθμισης του lncRNA GREAT6-1 στον καρκίνο. Έτσι στους μελλοντικούς στόχους περιλαμβάνονται πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και αλληλούχηση νέας γενιάς (ChIP-seq), για να επιβεβαιωθεί ποιοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν το GREAT6-1. Η επιτυχής σίγηση του GREAT6-1 θέτει τη βάση για τη μελέτη σε επόμενη φάση, του φαινοτύπου και των μεταβολών που προκαλούνται από αυτή τη σίγηση. Επιπλέον χρειάζεται να πραγματοποιηθούν πειράματα RNA pull down, ώστε να διαπιστωθεί με ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρά το GREAT6-1. Τέλος θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί επαγόμενη υπερέκφραση του GREAT6-1 σε κύτταρα που δεν υπερεκφράζεται το συγκεκριμένο lncRNA, ώστε να παρατηρηθούν οι μεταβολές που προκαλούνται από αυτή την υπερέκφραση.

6. Παράρτημα

6.1 Η ανατομία του στομάχου

Ο στομάχος είναι ένα όργανο που συμβάλλει τόσο στην μερική πέψη της τροφής και την βαθμιαία προώθηση της στο λεπτό έντερο αλλά προστατεύει και από τους μικροοργανισμούς που προσλαμβάνονται με την τροφή. Ο στομάχος μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα με βάση δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Η καρδιά (cardia), που είναι το πιο κοντινό σημείο ως προς τον γαστροοισοφαγικό σφιγκτήρα. Ο θόλος (fundus), ο οποίος εντοπίζεται πιο πάνω από την καρδιά και αποτελεί το υψηλότερο σημείο του στομάχου. Ακολουθεί το σώμα (body), που αποτελεί το κύριο τμήμα του στομάχου και στη συνέχεια το άντρο (antrum) που φτάνει ως τον πυλωρικό σφιγκτήρα που συνδέει τον στομάχο με το δωδεκαδάκτυλο⁶⁸ (Εικόνα 37).



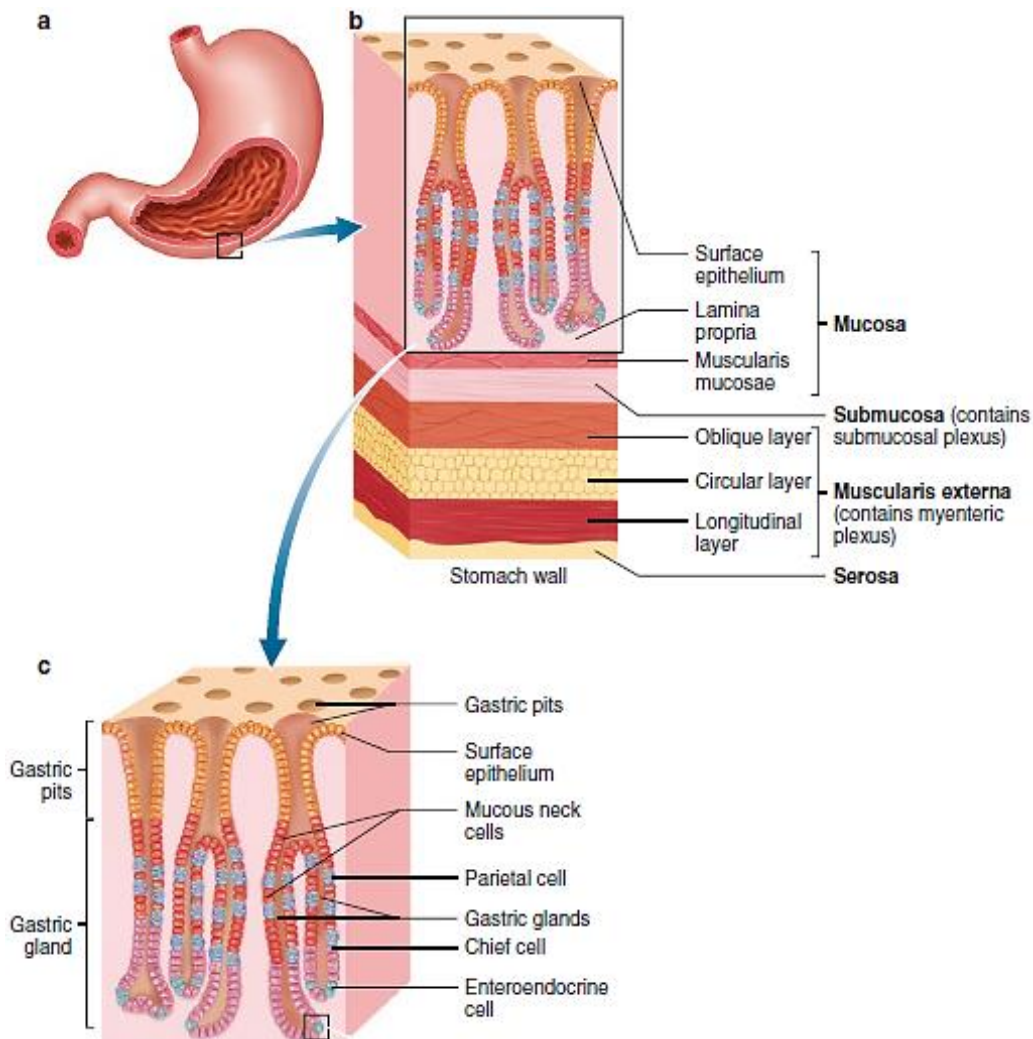
Εικόνα 37 Οι περιοχές στις οποίες διαιρείται ο στομάχος¹⁴⁶.

Το τοίχωμα του στομάχου αποτελείται από τέσσερις κύριες στιβάδες:

- Ο βλεννογόνος (mucosa) είναι η πιο εσωτερική στιβάδα η οποία έρχεται σε επαφή με το περιεχόμενο. Σε αυτή τη στιβάδα βρίσκονται τα περισσότερα εκκριτικά στοιχεία του στομάχου και πολλά αιμοφόρα αγγεία.
- Ο υποβλεννογόνος χιτώνας (submucosa), μια στιβάδα συνδετικού ιστού που προσδίδει στο στομάχο διατασιμότητα και ελαστικότητα. Επίσης περιέχει ένα νευρικό δίκτυο, το υποβλεννογόνιο πλέγμα.
- Η εξωτερική μυϊκή στιβάδα (muscularis externa) Οι λείες μυϊκές ίνες σε συνεργασία με το μυεντερικό πλέγμα φροντίζουν για την συνδυασμένη συστολή που προκαλεί τις κινήσεις προώθησης και ανάμειξης.

- Ο ορογόνος χιτώνας (serosa) εκκρίνει ένα υδαρές υγρό που μειώνει την τριβή με τα γειτονικά όργανα.

Στην εσωτερική επιφάνεια του στομάχου δημιουργούνται εγκολπώσεις, το αρχικό τμήμα των οποίων αποτελεί το γαστρικό βοθρίο (gastric pit) ενώ η βάση τον γαστρικό αδένα (gastric gland). Τις εγκολπώσεις επενδύει μια ποικιλία διαφορετικών τύπων κυττάρων με σημαντικές λειτουργίες για την προστασία του βλεννογόνου και την επεξεργασία της τροφής⁶⁸ (**Εικόνα 38**).



Εικόνα 38 Εστιασμένη απεικόνιση περιοχής του στομάχου όπου απεικονίζονται οι στιβάδες του τοιχώματός του και τα εκκριτικά κύτταρα που επενδύουν το γαστρικό βλεννογόνο¹⁴⁷.

7.Βιβλιογραφία

- 1 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).
- 2 Ferlay J., E. M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*, <<https://gco.iarc.fr/today>> (2018).
- 3 Fang, X. *et al.* Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer* **51**, 2820-2832, doi:10.1016/j.ejca.2015.09.010 (2015).
- 4 de Martel, C. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* **13**, 607-615, doi:10.1016/S1470-2045(12)70137-7 (2012).
- 5 Plummer, M., Franceschi, S., Vignat, J., Forman, D. & de Martel, C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer* **136**, 487-490, doi:10.1002/ijc.28999 (2015).
- 6 Maconi, G., Manes, G. & Porro, G. B. Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer. *World J Gastroenterol* **14**, 1149-1155, doi:10.3748/wjg.14.1149 (2008).
- 7 Hamashima, C., Shabana, M., Okada, K., Okamoto, M. & Osaki, Y. Mortality reduction from gastric cancer by endoscopic and radiographic screening. *Cancer Sci* **106**, 1744-1749, doi:10.1111/cas.12829 (2015).
- 8 Hamashima, C., Shabana, M., Okamoto, M., Osaki, Y. & Kishimoto, T. Survival analysis of patients with interval cancer undergoing gastric cancer screening by endoscopy. *PLoS One* **10**, e0126796, doi:10.1371/journal.pone.0126796 (2015).
- 9 Takahashi, T., Saikawa, Y. & Kitagawa, Y. Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment. *Cancers (Basel)* **5**, 48-63, doi:10.3390/cancers5010048 (2013).
- 10 Leung, W. K. *et al.* Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. *Lancet Oncol* **9**, 279-287, doi:10.1016/S1470-2045(08)70072-X (2008).
- 11 Casamayor, M., Morlock, R., Maeda, H. & Ajani, J. Targeted literature review of the global burden of gastric cancer. *Ecancermedicalscience* **12**, 883, doi:10.3332/ecancer.2018.883 (2018).
- 12 Saumoy, M. *et al.* Cost Effectiveness of Gastric Cancer Screening According to Race and Ethnicity. *Gastroenterology* **155**, 648-660, doi:10.1053/j.gastro.2018.05.026 (2018).
- 13 Matsuoka, T. & Yashiro, M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. *World J Gastroenterol* **24**, 2818-2832, doi:10.3748/wjg.v24.i26.2818 (2018).
- 14 Ajani, J. A. *et al.* Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17036, doi:10.1038/nrdp.2017.36 (2017).
- 15 Van Cutsem, E., Sagaert, X., Topal, B., Haustermans, K. & Prenen, H. Gastric cancer. *Lancet* **388**, 2654-2664, doi:10.1016/S0140-6736(16)30354-3 (2016).
- 16 Lauren, P. 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 (1965).
- 17 Cislo, M. *et al.* Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology. *Oncotarget* **9**, 19427-19442, doi:10.18632/oncotarget.24827 (2018).
- 18 Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tannenbaum, S. & Archer, M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* **2**, 58-60, doi:10.1016/s0140-6736(75)90498-5 (1975).

- 19 Correa, P. & Piazuelo, M. B. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis* **13**, 2-9, doi:10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x (2012).
- 20 Asano, N. *et al.* Cdx2 Expression and Intestinal Metaplasia Induced by H. pylori Infection of Gastric Cells Is Regulated by NOD1-Mediated Innate Immune Responses. *Cancer Res* **76**, 1135-1145, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2272 (2016).
- 21 Oue, N., Sentani, K., Sakamoto, N., Uraoka, N. & Yasui, W. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells. *Int J Clin Oncol* **24**, 771-778, doi:10.1007/s10147-019-01443-9 (2019).
- 22 O'Connor, A., O'Morain, C. A. & Ford, A. C. Population screening and treatment of Helicobacter pylori infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 230-240, doi:10.1038/nrgastro.2016.195 (2017).
- 23 Waldum, H. L. & Fossmark, R. Types of Gastric Carcinomas. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19124109 (2018).
- 24 Machado, J. C. *et al.* E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* **20**, 1525-1528, doi:10.1038/sj.onc.1204234 (2001).
- 25 Ueki, T., Koji, T., Tamiya, S., Nakane, P. K. & Tsuneyoshi, M. Expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor in advanced gastric carcinoma. *J Pathol* **177**, 353-361, doi:10.1002/path.1711770405 (1995).
- 26 Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**, 202-209, doi:10.1038/nature13480 (2014).
- 27 Wang, K. *et al.* Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet* **46**, 573-582, doi:10.1038/ng.2983 (2014).
- 28 Sukawa, Y. *et al.* Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol* **18**, 6577-6586, doi:10.3748/wjg.v18.i45.6577 (2012).
- 29 Gu, L. *et al.* PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **12**, e0182692, doi:10.1371/journal.pone.0182692 (2017).
- 30 Serra, O. *et al.* Comparison and applicability of molecular classifications for gastric cancer. *Cancer Treat Rev* **77**, 29-34, doi:10.1016/j.ctrv.2019.05.005 (2019).
- 31 Toyota, M. *et al.* Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* **59**, 5438-5442 (1999).
- 32 Matsusaka, K. *et al.* Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res* **71**, 7187-7197, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1349 (2011).
- 33 Yao, F. *et al.* Recurrent Fusion Genes in Gastric Cancer: CLDN18-ARHGAP26 Induces Loss of Epithelial Integrity. *Cell Rep* **12**, 272-285, doi:10.1016/j.celrep.2015.06.020 (2015).
- 34 Riquelme, I. *et al.* Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget* **6**, 24750-24779, doi:10.18632/oncotarget.4990 (2015).
- 35 Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649, doi:10.1038/25292 (1998).
- 36 Dulak, A. M. *et al.* Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res* **72**, 4383-4393, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3893 (2012).
- 37 Deng, N. *et al.* A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut* **61**, 673-684, doi:10.1136/gutjnl-2011-301839 (2012).

- 38 Gravalos, C. & Jimeno, A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel
therapeutic target. *Ann Oncol* **19**, 1523-1529, doi:10.1093/annonc/mdn169 (2008).
- 39 Cancer Genome Atlas Research, N. *et al.* Integrated genomic characterization of
oesophageal carcinoma. *Nature* **541**, 169-175, doi:10.1038/nature20805 (2017).
- 40 Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science*
297, 63-64, doi:10.1126/science.1073096 (2002).
- 41 Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G. & Evan, G. Reversible activation of c-
Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic
lesion. *Mol Cell* **3**, 565-577, doi:10.1016/s1097-2765(00)80350-0 (1999).
- 42 Felsher, D. W. & Bishop, J. M. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic
lineages. *Mol Cell* **4**, 199-207, doi:10.1016/s1097-2765(00)80367-6 (1999).
- 43 Garraway, L. A. & Sellers, W. R. From integrated genomics to tumor lineage
dependency. *Cancer Res* **66**, 2506-2508, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4604
(2006).
- 44 Garraway, L. A. *et al.* Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival
oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**, 117-122,
doi:10.1038/nature03664 (2005).
- 45 Garraway, L. A. & Sellers, W. R. Lineage dependency and lineage-survival oncogenes
in human cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 593-602, doi:10.1038/nrc1947 (2006).
- 46 Widlund, H. R. & Fisher, D. E. Microphthalmia-associated transcription factor: a
critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* **22**, 3035-
3041, doi:10.1038/sj.onc.1206443 (2003).
- 47 Alvarez, H. *et al.* Widespread hypomethylation occurs early and synergizes with gene
amplification during esophageal carcinogenesis. *PLoS Genet* **7**, e1001356,
doi:10.1371/journal.pgen.1001356 (2011).
- 48 Kwei, K. A. *et al.* Genomic profiling identifies GATA6 as a candidate oncogene
amplified in pancreaticobiliary cancer. *PLoS Genet* **4**, e1000081,
doi:10.1371/journal.pgen.1000081 (2008).
- 49 Molkenstin, J. D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6.
Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*
275, 38949-38952, doi:10.1074/jbc.R000029200 (2000).
- 50 Bresnick, E. H., Lee, H. Y., Fujiwara, T., Johnson, K. D. & Keles, S. GATA switches as
developmental drivers. *J Biol Chem* **285**, 31087-31093, doi:10.1074/jbc.R110.159079
(2010).
- 51 Frelin, C. *et al.* GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem
cells. *Nat Immunol* **14**, 1037-1044, doi:10.1038/ni.2692 (2013).
- 52 Zheng, R. & Blobel, G. A. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer* **1**,
1178-1188, doi:10.1177/1947601911404223 (2010).
- 53 Dorfman, D. M., Morgan, E. A., Pelton, A. & Unitt, C. T-cell transcription factor GATA-
3 is an immunophenotypic marker of acute leukemias with T-cell differentiation.
Hum Pathol **65**, 166-174, doi:10.1016/j.humpath.2017.05.009 (2017).
- 54 Bresnick, E. H., Katsumura, K. R., Lee, H. Y., Johnson, K. D. & Perkins, A. S. Master
regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to
hematologic malignancies. *Nucleic Acids Res* **40**, 5819-5831, doi:10.1093/nar/gks281
(2012).
- 55 Morrissey, E. E., Ip, H. S., Lu, M. M. & Parmacek, M. S. GATA-6: a zinc finger
transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral
mesoderm. *Dev Biol* **177**, 309-322, doi:10.1006/dbio.1996.0165 (1996).
- 56 Laverriere, A. C. *et al.* GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors
transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* **269**, 23177-23184 (1994).

- 57 Akiyama, Y. *et al.* GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* **23**, 8429-8439, doi:10.1128/mcb.23.23.8429-8439.2003 (2003).
- 58 Guo, M. *et al.* Hypermethylation of the GATA gene family in esophageal cancer. *Int J Cancer* **119**, 2078-2083, doi:10.1002/ijc.22092 (2006).
- 59 Kamnasaran, D., Qian, B., Hawkins, C., Stanford, W. L. & Guha, A. GATA6 is an astrocytoma tumor suppressor gene identified by gene trapping of mouse glioma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8053-8058, doi:10.1073/pnas.0611669104 (2007).
- 60 Chazaud, C. & Yamanaka, Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development* **143**, 1063-1074, doi:10.1242/dev.128314 (2016).
- 61 Frankenberger, S. *et al.* Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell* **21**, 1005-1013, doi:10.1016/j.devcel.2011.10.019 (2011).
- 62 Schrode, N., Saiz, N., Di Talia, S. & Hadjantonakis, A. K. GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Dev Cell* **29**, 454-467, doi:10.1016/j.devcel.2014.04.011 (2014).
- 63 Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R. & Grosveld, F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* **126**, 723-732 (1999).
- 64 Bessonard, S. *et al.* Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development* **141**, 3637-3648, doi:10.1242/dev.109678 (2014).
- 65 Willet, S. G. & Mills, J. C. Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: from Embryogenesis to Adult Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 546-559, doi:10.1016/j.jcmgh.2016.05.006 (2016).
- 66 Offield, M. F. *et al.* PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**, 983-995 (1996).
- 67 Kim, T. H. & Shivdasani, R. A. Stomach development, stem cells and disease. *Development* **143**, 554-565, doi:10.1242/dev.124891 (2016).
- 68 L., S. *Human Physiology from Cells to System*. 8 edn, (Cengage Learning, 2013).
- 69 Al-zazeh, E. D., Fegert, P., Blin, N. & Gott, P. Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim Biophys Acta* **1490**, 324-332, doi:10.1016/s0167-4781(00)00013-0 (2000).
- 70 Dimaline, R. *et al.* Regulated expression of GATA-6 transcription factor in gastric endocrine cells. *Gastroenterology* **112**, 1559-1567, doi:10.1016/s0016-5085(97)70037-4 (1997).
- 71 Nishi, T., Kubo, K., Hasebe, M., Maeda, M. & Futai, M. Transcriptional activation of H⁺/K⁺-ATPase genes by gastric GATA binding proteins. *J Biochem* **121**, 922-929, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021674 (1997).
- 72 Saenz, J. B. & Mills, J. C. Acid and the basis for cellular plasticity and reprogramming in gastric repair and cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 257-273, doi:10.1038/nrgastro.2018.5 (2018).
- 73 Han, S. *et al.* Defining the Identity and Dynamics of Adult Gastric Isthmus Stem Cells. *Cell Stem Cell* **25**, 342-356 e347, doi:10.1016/j.stem.2019.07.008 (2019).
- 74 Nam, K. T. *et al.* Mature chief cells are cryptic progenitors for metaplasia in the stomach. *Gastroenterology* **139**, 2028-2037 e2029, doi:10.1053/j.gastro.2010.09.005 (2010).
- 75 Correa, P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* **48**, 3554-3560 (1988).

- 76 Hayakawa, Y., Fox, J. G. & Wang, T. C. The Origins of Gastric Cancer From Gastric Stem Cells: Lessons From Mouse Models. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **3**, 331-338, doi:10.1016/j.jcmgh.2017.01.013 (2017).
- 77 Haveri, H. *et al.* Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa. *BMC Gastroenterol* **8**, 9, doi:10.1186/1471-230X-8-9 (2008).
- 78 Chia, N. Y. *et al.* Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development. *Gut* **64**, 707-719, doi:10.1136/gutjnl-2013-306596 (2015).
- 79 Song, S. H. *et al.* Aberrant GATA2 epigenetic dysregulation induces a GATA2/GATA6 switch in human gastric cancer. *Oncogene* **37**, 993-1004, doi:10.1038/onc.2017.397 (2018).
- 80 Consortium, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74, doi:10.1038/nature11247 (2012).
- 81 Hangauer, M. J., Vaughn, I. W. & McManus, M. T. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet* **9**, e1003569, doi:10.1371/journal.pgen.1003569 (2013).
- 82 Harrow, J. *et al.* GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res* **22**, 1760-1774, doi:10.1101/gr.135350.111 (2012).
- 83 Guttman, M. & Rinn, J. L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* **482**, 339-346, doi:10.1038/nature10887 (2012).
- 84 Cabili, M. N. *et al.* Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev* **25**, 1915-1927, doi:10.1101/gad.17446611 (2011).
- 85 Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* **81**, 145-166, doi:10.1146/annurev-biochem-051410-092902 (2012).
- 86 Knauss, J. L. & Sun, T. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs in vertebrate central nervous system development and function. *Neuroscience* **235**, 200-214, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.01.022 (2013).
- 87 Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* **43**, 904-914, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018 (2011).
- 88 Gomes, C. P. C. *et al.* The Function and Therapeutic Potential of Long Non-coding RNAs in Cardiovascular Development and Disease. *Mol Ther Nucleic Acids* **8**, 494-507, doi:10.1016/j.omtn.2017.07.014 (2017).
- 89 Pontier, D. B. & Gribnau, J. Xist regulation and function explored. *Hum Genet* **130**, 223-236, doi:10.1007/s00439-011-1008-7 (2011).
- 90 Rinn, J. L. *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311-1323, doi:10.1016/j.cell.2007.05.022 (2007).
- 91 Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N. & Chrousos, G. P. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal* **3**, ra8, doi:10.1126/scisignal.2000568 (2010).
- 92 Engreitz, J. M. *et al.* RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent Pre-mRNAs and chromatin sites. *Cell* **159**, 188-199, doi:10.1016/j.cell.2014.08.018 (2014).
- 93 Fox, A. H., Nakagawa, S., Hirose, T. & Bond, C. S. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem Sci* **43**, 124-135, doi:10.1016/j.tibs.2017.12.001 (2018).
- 94 Kim, T. K. *et al.* Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182-187, doi:10.1038/nature09033 (2010).

- 95 Gil, N. & Ulitsky, I. Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. *Nat Rev Genet* **21**, 102-117, doi:10.1038/s41576-019-0184-5 (2020).
- 96 Mercer, T. R. *et al.* The human mitochondrial transcriptome. *Cell* **146**, 645-658, doi:10.1016/j.cell.2011.06.051 (2011).
- 97 Yoon, J. H., Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J Mol Biol* **425**, 3723-3730, doi:10.1016/j.jmb.2012.11.024 (2013).
- 98 Rashid, F., Shah, A. & Shan, G. Long Non-coding RNAs in the Cytoplasm. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**, 73-80, doi:10.1016/j.gpb.2016.03.005 (2016).
- 99 Noh, J. H., Kim, K. M., McClusky, W. G., Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **9**, e1471, doi:10.1002/wrna.1471 (2018).
- 100 Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* **22**, 1775-1789, doi:10.1101/gr.132159.111 (2012).
- 101 Guttman, M. *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**, 223-227, doi:10.1038/nature07672 (2009).
- 102 Clark, M. B. *et al.* Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res* **22**, 885-898, doi:10.1101/gr.131037.111 (2012).
- 103 Batista, P. J. & Chang, H. Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* **152**, 1298-1307, doi:10.1016/j.cell.2013.02.012 (2013).
- 104 Flynn, R. A. & Chang, H. Y. Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 752-761, doi:10.1016/j.stem.2014.05.014 (2014).
- 105 Slack, F. J. & Chinnaiyan, A. M. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell* **179**, 1033-1055, doi:10.1016/j.cell.2019.10.017 (2019).
- 106 Hua, Q. *et al.* Genetic variants in lncRNA H19 are associated with the risk of bladder cancer in a Chinese population. *Mutagenesis* **31**, 531-538, doi:10.1093/mutage/gew018 (2016).
- 107 Tseng, Y. Y. *et al.* PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature* **512**, 82-86, doi:10.1038/nature13311 (2014).
- 108 Rheinbay, E. *et al.* Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer. *Nature* **547**, 55-60, doi:10.1038/nature22992 (2017).
- 109 Yang, Z. *et al.* Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann Surg Oncol* **18**, 1243-1250, doi:10.1245/s10434-011-1581-y (2011).
- 110 Kogo, R. *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res* **71**, 6320-6326, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1021 (2011).
- 111 Kim, K. *et al.* HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene* **32**, 1616-1625, doi:10.1038/onc.2012.193 (2013).
- 112 Gupta, R. A. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464**, 1071-1076, doi:10.1038/nature08975 (2010).
- 113 Pickard, M. R. & Williams, G. T. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 lncRNA. *Genes (Basel)* **6**, 484-499, doi:10.3390/genes6030484 (2015).

- 114 Shi, X. *et al.* LncRNA FIRRE is activated by MYC and promotes the development of
diffuse large B-cell lymphoma via Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Biochem*
Biophys Res Commun **510**, 594-600, doi:10.1016/j.bbrc.2019.01.105 (2019).
- 115 Zhang, Z. *et al.* The Novel Notch-induced Long Noncoding RNA LUNAR1 Determines
the Proliferation and Prognosis of Colorectal Cancer. *Sci Rep* **9**, 19915,
doi:10.1038/s41598-019-56536-2 (2019).
- 116 Trimarchi, T. *et al.* Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated
long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell* **158**, 593-606,
doi:10.1016/j.cell.2014.05.049 (2014).
- 117 Lin, C. & Yang, L. Long Noncoding RNA in Cancer: Wiring Signaling Circuitry. *Trends*
Cell Biol **28**, 287-301, doi:10.1016/j.tcb.2017.11.008 (2018).
- 118 de Kok, J. B. *et al.* DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate
tumors. *Cancer Res* **62**, 2695-2698 (2002).
- 119 Huang, M. *et al.* Long Noncoding RNA LINC00673 Is Activated by SP1 and Exerts
Oncogenic Properties by Interacting with LSD1 and EZH2 in Gastric Cancer. *Mol Ther*
25, 1014-1026, doi:10.1016/j.ymthe.2017.01.017 (2017).
- 120 Xu, M. D. *et al.* A Positive Feedback Loop of lncRNA-PVT1 and FOXM1 Facilitates
Gastric Cancer Growth and Invasion. *Clin Cancer Res* **23**, 2071-2080,
doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0742 (2017).
- 121 Kong, R. *et al.* Long noncoding RNA PVT1 indicates a poor prognosis of gastric cancer
and promotes cell proliferation through epigenetically regulating p15 and p16. *Mol*
Cancer **14**, 82, doi:10.1186/s12943-015-0355-8 (2015).
- 122 Zhao, J. *et al.* LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA
axis in gastric cancer. *Oncogene* **37**, 4094-4109, doi:10.1038/s41388-018-0250-z
(2018).
- 123 Zhang, E. B. *et al.* c-Myc-induced, long, noncoding H19 affects cell proliferation and
predicts a poor prognosis in patients with gastric cancer. *Med Oncol* **31**, 914,
doi:10.1007/s12032-014-0914-7 (2014).
- 124 Li, H. *et al.* Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis
of gastric cancer. *Oncotarget* **5**, 2318-2329, doi:10.18632/oncotarget.1913 (2014).
- 125 Zhou, X., Yin, C., Dang, Y., Ye, F. & Zhang, G. Identification of the long non-coding
RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Sci Rep* **5**,
11516, doi:10.1038/srep11516 (2015).
- 126 Hu, Y. *et al.* Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell
invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer. *Cancer Res* **74**,
6890-6902, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0686 (2014).
- 127 Sole, C., Arnaiz, E., Manterola, L., Otaegui, D. & Lawrie, C. H. The circulating
transcriptome as a source of cancer liquid biopsy biomarkers. *Semin Cancer Biol* **58**,
100-108, doi:10.1016/j.semcancer.2019.01.003 (2019).
- 128 Shao, Y. *et al.* Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for
screening gastric cancer. *Cancer* **120**, 3320-3328, doi:10.1002/cncr.28882 (2014).
- 129 Qi, P., Zhou, X. Y. & Du, X. Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status
and future perspectives. *Mol Cancer* **15**, 39, doi:10.1186/s12943-016-0524-4 (2016).
- 130 Galamb, O. *et al.* Diagnostic and prognostic potential of tissue and circulating long
non-coding RNAs in colorectal tumors. *World J Gastroenterol* **25**, 5026-5048,
doi:10.3748/wjg.v25.i34.5026 (2019).
- 131 Ventura, A. *et al.* Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes.
Proc Natl Acad Sci U S A **101**, 10380-10385, doi:10.1073/pnas.0403954101 (2004).
- 132 Wang, L. *et al.* CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free
logistic regression model. *Nucleic Acids Res* **41**, e74, doi:10.1093/nar/gkt006 (2013).

- 133 Kang, Y. J. *et al.* CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res* **45**, W12-W16, doi:10.1093/nar/gkx428 (2017).
- 134 Orditura, M. *et al.* Treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* **20**, 1635-1649, doi:10.3748/wjg.v20.i7.1635 (2014).
- 135 Arun, G., Diermeier, S. D. & Spector, D. L. Therapeutic Targeting of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Trends Mol Med* **24**, 257-277, doi:10.1016/j.molmed.2018.01.001 (2018).
- 136 Necula, L. *et al.* Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World J Gastroenterol* **25**, 2029-2044, doi:10.3748/wjg.v25.i17.2029 (2019).
- 137 Zhu, X. *et al.* A long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of gastric cancer. *Mol Cancer* **15**, 60, doi:10.1186/s12943-016-0544-0 (2016).
- 138 Gibb, E. A., Brown, C. J. & Lam, W. L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer* **10**, 38, doi:10.1186/1476-4598-10-38 (2011).
- 139 Quinn, J. J. & Chang, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* **17**, 47-62, doi:10.1038/nrg.2015.10 (2016).
- 140 Sulahian, R. *et al.* An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer. *Oncogene* **33**, 5637-5648, doi:10.1038/onc.2013.517 (2014).
- 141 Xu, T. P. *et al.* KLF5 and MYC modulated LINC00346 contributes to gastric cancer progression through acting as a competing endogenous RNA and indicates poor outcome. *Cell Death Differ* **26**, 2179-2193, doi:10.1038/s41418-018-0236-y (2019).
- 142 Xie, J. J. *et al.* Super-Enhancer-Driven Long Non-Coding RNA LINC01503, Regulated by TP63, Is Over-Expressed and Oncogenic in Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology* **154**, 2137-2151 e2131, doi:10.1053/j.gastro.2018.02.018 (2018).
- 143 Leucci, E. *et al.* Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature* **531**, 518-522, doi:10.1038/nature17161 (2016).
- 144 West, J. A. *et al.* The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites. *Mol Cell* **55**, 791-802, doi:10.1016/j.molcel.2014.07.012 (2014).
- 145 Tani, H. *et al.* Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res* **22**, 947-956, doi:10.1101/gr.130559.111 (2012).
- 146 Wilson R.L., S. C. E. in *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract* Vol. 2 Ch. 56, 634-646 (2019).
- 147 M., T. in *Esophageal and Gastric Disorders in Infancy and Childhood* (ed Thomson M. Till H., Foker J., Holcomb III G., Khan K.) Ch. 1253-1261, (Springer, 2017).