



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

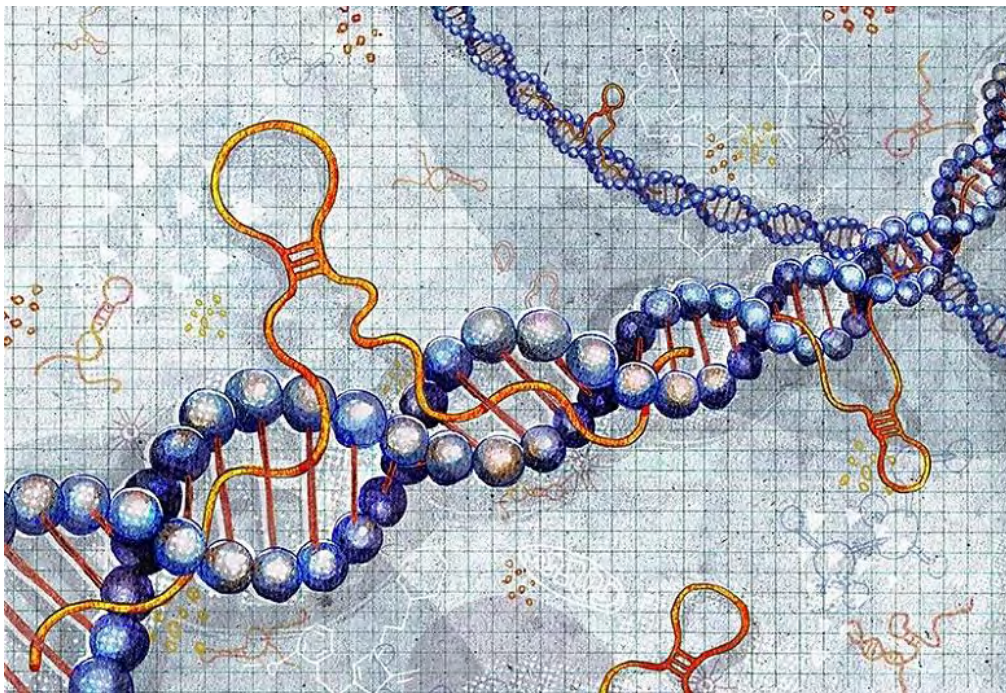
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ  
lncRNA GREIT4-1 ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ  
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ»**



Όνοματεπώνυμο: Μονάντερου Όλγα

Πατρώνυμο: Φώτιος

Ακαδημαϊκό έτος: 2020

Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

**Τριμελής Επιτροπή:**

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

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

**Ψαρρά Άννα-Μαρία:** Επίκουρος Καθηγήτρια Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## Περιεχόμενα

Τριμελής επιτροπή.....	2
1.Εισαγωγή .....	8
1.1 Ο καρκίνος του στομάχου.....	9
1.1.1 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά .....	9
1.1.2 Διάγνωση της ασθένειας.....	10
1.1.3 Αίτια εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου .....	10
1.1.4 Μη κοινές μορφές του καρκίνου του στομάχου .....	11
1.1.5 Καρκίνος του στομάχου και μετάσταση.....	11
1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου.....	13
1.2.1 Κατηγοριοποίηση σύμφωνα με το WHO και τα κλινικά χαρακτηριστικά.....	13
1.2.2 Ιστολογική ταξινόμηση.....	14
1.2.3 Μοριακή ταξινόμηση .....	15
1.3 Κόστος του καρκίνου του στομάχου .....	18
1.4 Μεταγραφικός παράγοντας GATA4 .....	19
1.4.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA .....	19
1.4.2 Ο ρόλος των GATA .....	19
1.4.3 Ο φυσιολογικός ρόλος του GATA4 σε περιφερειακούς ιστούς .....	20
1.4.4 Ο ρόλος του GATA4 στο γαστρεντερικό σύστημα .....	21
1.4.5 Μηχανισμός δράσης του GATA4.....	22
1.4.6 Ο ρόλος του GATA4 στον καρκίνο .....	23
1.4.7 Στόχοι και λειτουργίες των lineage survival oncogenes στον καρκίνο.....	24
1.4.8 Στόχοι και λειτουργίες του GATA4 στον καρκίνο.....	25
1.5 LncRNAs.....	27
1.5.1 Γενικά για τα ncRNAs και τα lncRNAs.....	27
1.5.2 Κατηγοριοποίηση των lncRNAs .....	28
1.5.3 Χαρακτηριστικά των lncRNAs .....	28
1.5.4 Μηχανισμός δράσης των lncRNAs.....	29
1.5.5 LncRNAs και καρκίνος.....	32
2. Σκοπός της εργασίας .....	36
3. Υλικά και μέθοδοι.....	38
3.1 Υλικά .....	39
3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς .....	39
3.1.2 Αντιδραστήρια.....	39
3.1.3 Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών .....	40
3.2 Μέθοδοι.....	40
3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση .....	40
3.2.1.1 Ανάλυση κωδικού δυναμικού του lncRNA.....	40

<b>3.2.1.2</b> Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και του GATA4 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	41
<b>3.2.1.3</b> Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και μεταγραφικών παραγόντων σε βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών .....	41
<b>3.2.1.4</b> Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 σε βιοψίες Κορεατών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών .....	42
<b>3.2.1.5</b> Ανάλυση συνταινίας-συνέκφρασης στον ποντικό .....	43
<b>3.2.2</b> Δημιουργία δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων των shRNA (annealing) και αντίδραση λιγάσης (ligation) .....	43
<b>3.2.3</b> Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και εξαγωγή πλασμιδιακού DNA.....	44
<b>3.2.4</b> Διαγνωστικές πέψεις και ηλεκτροφόρηση .....	45
<b>3.2.5</b> Glycerol stock .....	45
<b>3.2.6</b> Αλληλούχηση .....	46
<b>3.2.7</b> RNA extraction.....	46
<b>3.2.8</b> DNase treatment.....	46
<b>3.2.9</b> cDNA synthesis (Reversal Transcription) .....	47
<b>3.2.10</b> Ποσοτική PCR (qPCR) .....	48
<b>3.2.11</b> RNA gel .....	49
<b>3.2.12</b> Χαρακτηρισμός του μεταγράφου του GREIT4-1 .....	49
<b>3.2.12.1</b> Επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 στα δείγματα καρκινικών κυτταρικών σειρών .....	49
<b>3.2.12.2</b> Υποκυτταρική κλασμάτωση (Subcellular fractionation) .....	50
<b>3.2.12.3</b> Μεταγραφική σταθερότητα (Transcriptional Stability) .....	50
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	51
<b>4.1</b> Βιοπληροφορική ανάλυση .....	52
<b>4.1.1</b> Ανάλυση του κωδικοποιητικού δυναμικού του lncRNA GREIT4-1 .....	52
<b>4.1.2</b> Ανάλυση συνταινίας- συνέκφρασης στον ποντικό .....	54
<b>4.1.3</b> Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και του GATA4 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	54
<b>4.1.4</b> Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και μεταγραφικών παραγόντων σε βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών .....	57
<b>4.1.5</b> Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 σε βιοψίες Κορεατών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών .....	60
<b>4.2</b> Πειραματικά αποτελέσματα .....	62
<b>4.2.1</b> RNA gel και ηλεκτροφόρηση .....	62
<b>4.2.2</b> Επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 σε κυτταρικές σειρές .....	62
<b>4.2.3</b> Υποκυτταρική κλασμάτωση.....	64
<b>4.2.4</b> Μεταγραφική σταθερότητα .....	67
<b>4.2.5</b> Έλεγχος της έκφρασης των GREIT4-1 και GATA4 από την καταστολή μεταγραφικών παραγόντων.....	68
<b>4.2.6</b> Διαγνωστική πέψη .....	69

<b>4.2.7 Έλεγχος της έκφρασης των GREIT4-1 υπό την καταστολή αυτού του lncRNA σε κύτταρα AGS.....</b>	<b>71</b>
<b>5. Συμπεράσματα και Συζήτηση.....</b>	<b>72</b>
<b>6. Παράρτημα.....</b>	<b>78</b>
<b>6.1 Ανατομία του στομάχου.....</b>	<b>79</b>
<b>6.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες υπεύθυνοι για την εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου.....</b>	<b>80</b>
<b>6.3 Correa pathway.....</b>	<b>80</b>
<b>6.4 Χρωμοσωμική αστάθεια (CIN).....</b>	<b>81</b>
<b>6.5 Χρωμοσωμική αναδιαμόρφωση.....</b>	<b>82</b>
<b>6.6 Ο ρόλος του GATA στο γαστρεντερικό σύστημα.....</b>	<b>82</b>
<b>6.7 GATA και καρκίνος.....</b>	<b>82</b>
<b>6.8 Παραδείγματα των lncRNA και δράσεις αυτών.....</b>	<b>83</b>
<b>6.9 Υποπερίπτωση της <i>Cis</i> δράσης των lncRNA.....</b>	<b>83</b>
<b>7. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>84</b>

## Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου παρουσιάζει υψηλά ποσοστά εμφάνισης, θνησιμότητας και θνητότητας σε παγκόσμιο επίπεδο ενώ παράλληλα χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των ασθενών. Η ασθένεια δεν διαγιγνώσκεται στα αρχικά στάδια και επίσης το κόστος των θεραπειών στα προχωρημένα στάδια της νόσου αυξάνεται επιβαρύνοντας οικονομικά τους ασθενείς. Συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάγκη της διάγνωσης της νόσου σε πρώιμα στάδια με την χρήση μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων. Γι' αυτό το λόγο διεξάγονται έρευνες για γονίδια, όπως είναι ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4, η έκφραση των οποίων μεταβάλλεται στον καρκίνο του στομάχου. Ο παράγοντας GATA4 φυσιολογικά συμβάλλει στη διατήρηση ορισμένων κυτταρικών τύπων και στην ρύθμιση αναπτυξιακών διεργασιών ενώ στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου ενισχύεται η έκφραση του και δρα ως ογκογονίδιο οδηγώντας στην ανάπτυξη του όγκου (lineage survival oncogene). Ωστόσο ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας έχει φυσιολογικές λειτουργίες τόσο στο στόμαχο όσο και σε άλλους ιστούς οπότε δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως άμεσος θεραπευτικός στόχος. Επομένως, το ενδιαφέρον στρέφεται στους μοριακούς στόχους του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και συγκεκριμένα στα lncRNAs. Αυτή η κατηγορία των RNAs, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τον παράγοντα GATA4, χαρακτηρίζεται από ιστο- και καρκινοειδικότητα και άρα εξειδικεύει την δράση του μεταγραφικού παράγοντα. Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της ρύθμισης του lncRNA GREIT4-1 από τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4 στον καρκίνο του στομάχου. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού πραγματοποιήθηκαν βιοπληροφορικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας δεδομένα από κυτταρικές σειρές και βιοψίες ασθενών. Ακόμη, σε πειραματικό επίπεδο μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της σίγησης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και του lncRNA GREIT4-1, η οποία επιτεύχθηκε με την κλωνοποίηση των shRNA σε πλασμιδιακό φορέα. Μελλοντικός στόχος της μελέτης αυτής είναι η χρήση των lncRNA ως βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου και για την πρόβλεψη της απόκρισης στην θεραπεία ενώ επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως άμεσοι θεραπευτικοί στόχοι.

## **Abstract**

Gastric cancer has high rates of incidence and mortality worldwide while it is characterized by high heterogeneity among patients. The disease is not diagnosed in early stages and also the cost of treatments in the advanced stages of the disease increases burdening the patients financially. Therefore, the need to diagnose the disease at an early stage using non-invasive diagnostic methods is imperative. That is why research is being done on genes such as the transcription factor GATA4, whose expression is modified in gastric cancer. The factor GATA4 normally contributes to the maintenance of certain cell types and the regulation of growth processes, while in the case of gastric cancer its expression is enhanced and acts as an oncogene leading to the growth of the tumor (lineage survival oncogene). However, this transcription factor has normal functions in both the stomach and other tissues so it cannot be used as a direct therapeutic target. Therefore, the focus is on the molecular targets of the transcription factor GATA4 and specifically on lncRNAs. This class of RNAs, the expression of which is regulated by the GATA4 factor, is characterized by tissue- and carcinogenicity and therefore specifies the action of the transcription factor. The purpose of this thesis is to study the regulation of lncRNA GREIT4-1 of the transcription factor GATA4 in gastric cancer. To achieve this, bioinformatics analyzes were performed using data from cell lines and patient biopsies. Furthermore, experimentally studied the results of silencing of transcription factor GATA4 and lncRNA GREIT4-1, which was accomplished by cloning the shRNA into a plasmid vector. The future goal of this study is to use lncRNAs as biomarkers for the early diagnosis of cancer and to predict the response to treatment and can also be used as direct therapeutic targets.

# 1.Εισαγωγή

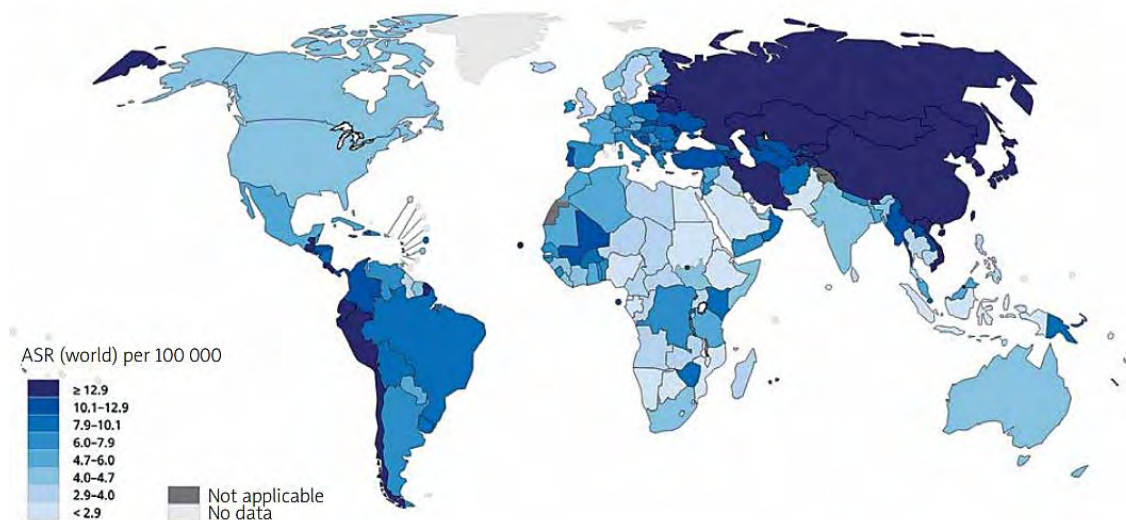


## 1.1 Ο καρκίνος του στομάχου

### 1.1.1 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά

Ο καρκίνος του στομάχου κατατάσσεται στον πέμπτο πιο συχνό τύπο καρκίνου παγκοσμίως [1] έπειτα από τους καρκίνους του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη [2]. Επιπλέον, 1 εκατομμύριο άτομα ετησίως πάσχουν από καρκίνο του στομάχου ενώ είναι η τρίτη αιτία θνησιμότητας από καρκίνο παγκοσμίως [3]. Ειδικότερα, καταγράφονται 783.000 θάνατοι ετησίως, δηλαδή θνητότητα που αντιστοιχεί περίπου στο 80% των ατόμων που εμφανίζουν τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου [4]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το υψηλό ποσοστό θνητότητας οφείλεται στο ότι η νόσος δεν ανιχνεύεται συχνά στα αρχικά στάδια [5], διότι δεν παρατηρούνται κλινικά συμπτώματα δυσχεραίνοντας με αυτόν τον τρόπο την έγκαιρη διάγνωση καθώς και την εφαρμογή μιας πιο αποτελεσματικής θεραπείας για βελτίωση της πρόγνωσης του ασθενούς [6]. Γενικά όταν η διάγνωση γίνεται στα πρόωρα στάδια της νόσου παρατηρείται αυξημένο ποσοστό επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με το αν γίνεται στα όψιμα στάδια της νόσου [7]. Επομένως, το ποσοστό επιβίωσης εξαρτάται από τα κλινικά στάδια της νόσου [8]. Ενδεικτικό χαρακτηριστικό της δυσκολίας έγκαιρης διάγνωσης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου είναι ότι ιστολογικά σε πρώιμο στάδιο ομοιάζει με το καλοήθεσ πεπτικό έλκος [9],[10]. Είναι επίσης, απαραίτητο να τονιστεί ότι για την υψηλή θνησιμότητα ευθύνονται η βιολογική και γενετική ετερογένεια που εμφανίζει η νόσος συνδυαστικά με την σιωπηλή φύση του καρκίνου, και την καθυστερημένη εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων [11].

Η συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου διαφοροποιείται μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών με το μεγαλύτερο ποσοστό να εντοπίζεται στην Ασία [12]. Πιο αναλυτικά, ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού που πάσχει από την ασθένεια αυτή βρίσκεται σε χώρες της Ανατολικής Ασίας, όπως Κίνα και Ιαπωνία [13],[265] ενώ όσον αφορά την Ευρώπη το υψηλότερο ποσοστό ατόμων που πάσχουν από καρκίνο του στομάχου εντοπίζεται στην Ανατολική Ευρώπη, το οποίο αντικατοπτρίζει τις γεωγραφικές επιδράσεις στην επιδημιολογία της ασθένειας [14]. Αντίθετα έχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στις Ηνωμένες Πολιτείες (συχνότητα 5,6 ανά 100.000 άτομα) και την Αφρική (συχνότητα 4,7 ανά 100.000 άτομα) αλλά υψηλή στην Νότια Αμερική (**Εικόνα 1**) [15]. Αξίζει, επίσης να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη νόσος έχει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες - και συγκεκριμένα διπλάσια συχνότητα - σε σύγκριση με τις γυναίκες λόγω της προστατευτικής δράσης των οιστρογόνων στις γυναίκες [16],[17].



**Εικόνα 1.** Συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου το 2018 παγκοσμίως. Το πιο έντονο χρώμα υποδεικνύει τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. [4]

Συγκεκριμένα στην Κορέα ο καρκίνος του στομάχου είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος καρκίνου συγκριτικά με το 20,8% που αντιστοιχεί στις υπόλοιπες μορφές της νόσου ενώ μαζί με την Ιαπωνία έχουν τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης της συγκεκριμένης ασθένειας σε όλο τον κόσμο [18]. Επίσης, στην Κορέα ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου εμφανίζει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και συγκεκριμένα εξαπλάσια συχνότητα σε σχέση με τις Ηνωμένες Πολιτείες [19]. Ακόμη, στις δυτικές χώρες η πλειοψηφία των βιοψιών αφορά όγκους στο εγγύς τμήμα του στομάχου (proximal/cardia gastric cancers) και το ποσοστό της συγκεκριμένης περίπτωσης συνεχίζει να αυξάνεται τα τελευταία χρόνια [20].

### 1.1.2 Διάγνωση της ασθένειας

Η τυπική ηλικία, στην οποία διαγιγνώσκεται η συγκεκριμένη νόσος είναι τα 60 έτη, ενώ τα τελευταία χρόνια αυξάνονται συνεχώς οι περιπτώσεις διάγνωσης της ασθένειας σε ηλικία 40-50 ετών [21]. Πιο αναλυτικά, προκειμένου να ανιχνευθεί ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου οι ασθενείς υποβάλλονται σε γαστροσκόπηση, η οποία δίνει την δυνατότητα να παρατηρηθεί η περιοχή του στομάχου και αν εντοπιστούν μη φυσιολογικές περιοχές λαμβάνεται βιοψία [22]. Επίσης, σε χώρες όπως η Κορέα και η Ιαπωνία έχει τεθεί σε εφαρμογή ένα εθνικό πρόγραμμα προληπτικού ελέγχου του πληθυσμού, το οποίο περιλαμβάνει γαστροσκόπηση, με σκοπό την ανίχνευση της νόσου σε πρώιμα στάδια περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις θεραπείες που απαιτούνται για την αντιμετώπιση. Παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός των περιπτώσεων που ανιχνεύονται έγκαιρα και στην συνέχεια θεραπεύονται οπότε μειώνεται η θνησιμότητα [23]. Ωστόσο η γαστροσκόπηση έχει αυξημένο κόστος επιβαρύνοντας οικονομικά τον ασθενή, συνοδεύεται από δυσφορία κατά την εκτέλεση και δεν είναι κατάλληλη για παρακολούθηση του γενικού πληθυσμού σε επίπεδο διάγνωσης ρουτίνας [24] ενώ επίσης μπορεί σε μικρό ποσοστό να επιφέρει επιπλοκές [25]. Συνεπώς, δεν είναι η πλέον εύκολη ούτε οικονομικά συμφέρουσα διαγνωστική μέθοδος για ευρεία εφαρμογή στον πληθυσμό. Γι' αυτό μελετήθηκε η χρήση αντισωμάτων έναντι του βακτηρίου *Helicobacter pylori* που ευθύνεται για την εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου ως βιοδείκτες με σκοπό την διάγνωση της ασθένειας [26]. Ωστόσο η χρήση μόνο του συγκεκριμένου βιοδείκτη για την διάγνωση της νόσου έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι αξιόπιστη σε άτομα ηλικίας άνω των 40 ετών που εμφανίζουν δυσπεψία [27].

### 1.1.3 Αίτια εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ένας συμπαγής όγκος, [28] ο οποίος εμφανίζεται όταν κύτταρα του στομάχου αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και σχηματίζουν όγκους που μπορούν να εισβάλλουν σε φυσιολογικούς ιστούς [29]. Η κληρονομικότητα από μόνη της συμβάλει στην ανάπτυξη του καρκίνου σε ποσοστό μικρότερο από 3%, με αποτέλεσμα οι περισσότεροι γαστρικοί καρκίνοι να καθορίζονται σποραδικοί [30] συνδυαστικά τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το *Helicobacter pylori*, η διατροφή, η παχυσαρκία και το κάπνισμα όσο και από γενετικούς παράγοντες [31].

Στον καρκίνο του στομάχου οι περισσότερες γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται σχετίζονται με χρωμοσωμική αστάθεια, αστάθεια μικροδορυφόρων, αλλαγές στο επιγενετικό προφίλ, μεταλλάξεις σωματικών γονιδίων ή λειτουργικών πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου [32]. Παραδείγματα επιγενετικών τροποποιήσεων αποτελούν η υπερμεθυλίωση ή υπομεθυλίωση του DNA στις νησίδες CpG σε υποκινητές γονιδίων που αποτελούν καταστολείς όγκου ή ογκογόνα γονίδια, οι τροποποιήσεις της ιστόνης μέσω μεθυλίωσης, ακετυλίωσης και φωσφορυλίωσης, και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [33]. Επίσης, σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την ογκογένεση

όπως p53, K-RAS, E2F, Wnt/  $\beta$ -catenin καθώς και μονοπάτια που συμμετέχουν στην μίτωση και την κυτταρική μετανάστευση παρουσιάζουν ποικίλες τροποποιήσεις στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου [34]. Ειδικότερα, τα γονίδια, τα οποία ενισχύονται, είναι τα ογκογονίδια, για παράδειγμα τα ογκογόνα γονίδια MYC, EGFR (Epidermal growth factor receptor), GATA4, και GATA6 ενώ στα γονίδια καταστολής όγκου, όπως τα γονίδια PTEN (Phosphatase and tensin homolog), SMAD4, APC και ARID1A παρατηρούνται ελλείψεις [35],[36],[37]. Συνολικά, ο συνδυασμός των περιβαλλοντικών παραγόντων -κυρίως το *Helicobacter pylori*- και των γενετικών παραγόντων αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου.

#### 1.1.4 Μη κοινές μορφές του καρκίνου του στομάχου

Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα στον παγκόσμιο πληθυσμό με τη μορφή του αδενοκαρκινώματος [38]. Ωστόσο υπάρχουν και άλλοι τύποι της συγκεκριμένης νόσου που δεν είναι τόσο συχνοί και είναι οι εξής:

**Οικογενείς γαστρικοί καρκίνοι (Hereditary Diffuse Gastric Cancer HDGC)** → Ένα ποσοστό μικρότερο από 10% των ασθενών με καρκίνο του στομάχου ανήκουν στην κατηγορία των διάχυτων κληρονομικών όγκων (HDGC). Ο HDGC ακολουθεί ένα πρότυπο αυτοσωμικής κυριαρχίας και παρατηρείται σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διάχυτου τύπου [39],[40]. Οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με κληρονομικό καρκίνο στομάχου έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο CDH1 που είναι ένα γονίδιο καταστολής όγκου και κωδικοποιεί την E-καντερίνη (epithelial cadherin) [41].

**Μεσεγχυματικοί όγκοι** → Ο γαστρεντερικός στρωματικός όγκος (GIST) αν και μπορεί να δημιουργηθεί οπουδήποτε στο γαστρεντερικό σύστημα, εμφανίζεται κυρίως στο στόμαχο (σε ποσοστό 60%) [42]. Επίσης, εντοπίζονται μεταλλάξεις σε πρωτοογκογονίδια – συγκεκριμένα στα γονίδια KIT και PDGFRA (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha) που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 4 και κωδικοποιούν το καθένα για έναν υποδοχέα κινάση τυροσίνης – με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του υποδοχέα αυτού και στη συνέχεια την μη ελεγχόμενη ενεργοποίηση των καθοδικών μορίων. Ακόμη, η ενεργοποίηση του γονιδίου KIT οδηγεί στον μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κυττάρων [43].

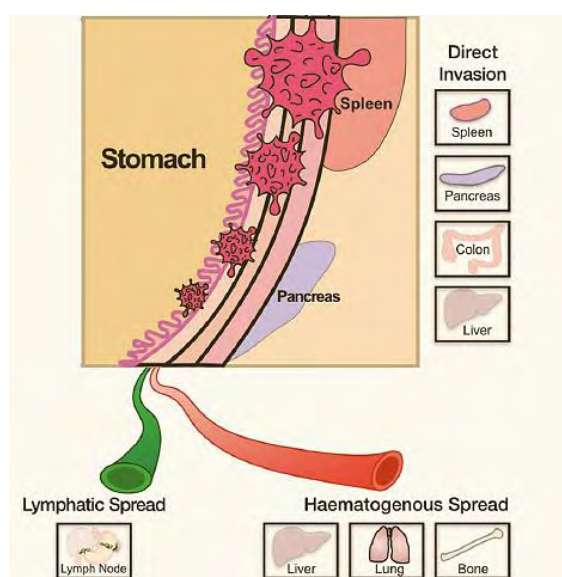
**Λεμφοπολλαπλασιαστικοί όγκοι** → είναι λεμφώματα υψηλού βαθμού διάχυτων μεγάλων κυττάρων ή λεμφοειδής ιστός σχετιζόμενος με το βλεννογόνο που προκαλείται από *Helicobacter pylori* ενώ επίσης είναι σπάνιοι όγκοι [44].

**Νευροενδοκρινικοί όγκοι (NET)** → στο στόμαχο είναι σπάνιοι και προκαλούνται από χρόνια φλεγμονή και συγκεκριμένα λόγω χρόνιας ατροφικής γαστρίτιδας [45].

#### 1.1.5 Καρκίνος του στομάχου και μετάσταση

Μετάσταση ορίζεται η διάδοση των καρκινικών κυττάρων από την αρχική θέση σε σημείο που είναι ανατομικά πιο απομακρυσμένο [46]. Η μετάσταση έχει ως αποτέλεσμα απουσία φυσιολογικής ομοιόστασης ενώ συχνά είναι θανατηφόρος [47]. Συγκεκριμένα, δεν αντιμετωπίζεται εύκολα με τις υπάρχουσες θεραπείες, γι' αυτό και στους ασθενείς που εντοπίζεται μετάσταση παρατηρείται μικρότερη περίοδος επιβίωσης. Ακόμη, τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι ασθενείς με καρκίνο του στομάχου, στους οποίους παρατηρείται μετάσταση, η εμφάνιση της οποίας εξαρτάται τόσο από την ηλικία όσο και από το στάδιο της ανίχνευσης του καρκίνου του στομάχου [48],[49]. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι η μετάσταση οφείλεται σε αλλαγές του

γονιδιώματος που συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης, ενώ παράλληλα στα πρώιμα στάδια μπορεί να πραγματοποιηθεί και η διάδοση της μετάστασης [50]. Στον καρκίνο του στομάχου παρατηρείται μετάσταση στο ήπαρ, στο περιτόναιο, στους πνεύμονες, στα οστά και στους λεμφαδένες με μεγαλύτερο ποσοστό στο ήπαρ (κοντά στο 50%) και ακολούθως στο περιτόναιο [51]. Πιο αναλυτικά μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με άμεση εισβολή σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς είτε με πιο απομακρυσμένη εισβολή μέσω της κυκλοφορίας προς τους πνεύμονες, μέσω του λεμφικού συστήματος και της ενδοπεριτοναϊκής εξάπλωσης. Όσον αφορά την πρώτη περίπτωση τα όργανα που συμπεριλαμβάνονται είναι κυρίως το παχύ έντερο, το ήπαρ, το πάγκρεας, και η χολή, ενώ μέσω του λεμφικού συστήματος εξαπλώνεται στους λεμφικούς αδένες (**Εικόνα 2**). Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται εισβολή στο στρώμα του στομάχου και στη συνέχεια μέσω των αγγείων ή μέσω της ενδοπεριτοναϊκής κυκλοφορίας μεταφέρονται τα καρκινικά κύτταρα σε μακρινά όργανα όπου αποικίζουν και πολλαπλασιάζονται για τον σχηματισμό ανιχνεύσιμων μεταστάσεων [52].



**Εικόνα 2.** Διαδρομές που ακολουθούνται για την επίτευξη της μετάστασης και τα όργανα στα οποία παρατηρείται μετάσταση στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου. [52]

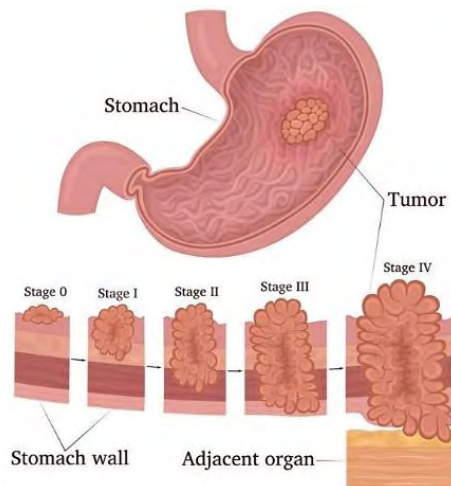
Επιπλέον, σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην προαγωγή της μετάστασης είναι η διαδικασία μετάπτωσης από επιθήλιο σε μεσεγχυματικό (EMT), το οποίο ενισχύεται μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt / β-κατενίνη [53]. Επίσης, εξωσώματα που προέρχονται από τον καρκίνο του στομάχου μπορούν να συμβάλλουν στον προ-μεταναστευτικό σχηματισμό [54]. Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι η απορρύθμιση μικρών μη κωδικοποιητικών RNAs καθώς και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) συμμετέχουν στην μετάσταση των όγκων [55]. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα οι λειτουργίες των οποίων ρυθμίζονται από πολυδύναμους μεταγραφικούς παράγοντες όπως OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), Sox2, Nanog, KLF4 και MYC, έχουν ρόλο στην μετάσταση και συγκεκριμένα λόγω της μεταφοράς τους από το αρχικό σημείο του όγκου μέσω των αιμοφόρων και των λεμφικών αγγείων [56]. Είναι επίσης, σημαντικό να αναφερθεί ότι ο ρυθμός μετάστασης των λεμφαδένων σχετίζεται με την ποσότητα των λεμφικών αγγείων κοντά στους αρχικούς όγκους και η λεμφική μετάσταση είναι βασικός παράγοντας για την πρόγνωση και τη σταδιοποίηση των όγκων στην πλειονότητα των καρκίνων [57].

## 1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου

### 1.2.1 Κατηγοριοποίηση σύμφωνα με το WHO και τα κλινικά χαρακτηριστικά

Αρχικά, υπάρχουν ποικίλοι τρόποι με τους οποίους μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε και να χαρακτηρίσουμε τον καρκίνο του στομάχου. Ειδικότερα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) κατηγοριοποιεί τον καρκίνο του στομάχου σε έξι ιστολογικούς υπότυπους : σωληνοειδή (tubular), θυλοειδή (papillary), χαμηλής συνεκτικότητας (cohesive), βλενώδη (mucinous), μεικτό και σε ένα υπότυπο μη συχνών ιστολογικών χαρακτηριστικών [58]. Οι δύο πρώτοι είναι οι πιο κοινοί ιστολογικοί υπότυποι που σημειώνονται στο πρώιμο στάδιο του καρκίνου του στομάχου και συμπεριλαμβάνονται στον εντερικό υπότυπο, ενώ το μειωμένης συνεκτικότητας εντάσσεται στο διάχυτο τύπο που όπως θα δούμε στην συνέχεια αφορά την κατηγοριοποίηση κατά Laurén. Η περίπτωση του βλενώδους αδενοκαρκινώματος αντιπροσωπεύει το 10% του γαστρικού καρκίνου [59].

Επιπλέον, από την άποψη της κλινικής εικόνας του ασθενή ο καρκίνος του στομάχου κατατάσσεται σε πρώιμο και προχωρημένου σταδίου της ασθένειας. Το πρώιμο στάδιο της ασθένειας εντοπίζεται στον βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο και διαχωρίζεται σε επιμέρους στάδια της ασθένειας τον τύπο I (protruding growth), τύπο II (superficial growth), τύπο III (excavating growth), και τύπο IV που σχετίζονται με την ανάπτυξη του όγκου (**Εικόνα 3**). Αξίζει να σημειωθεί ότι στο στάδιο IV παρατηρείται διήθηση και εξάπλωση σε γειτονικούς ιστούς. Επίσης, στην περίπτωση του πρώιμου σταδίου του καρκίνου του στομάχου η πιθανότητα πενταετούς επιβίωσης είναι σε ποσοστό 90% σε αντίθεση με το όψιμο στάδιο που είναι λιγότερο από 60% καταδεικνύοντας την ανάγκη έγκαιρης διάγνωσης [60].



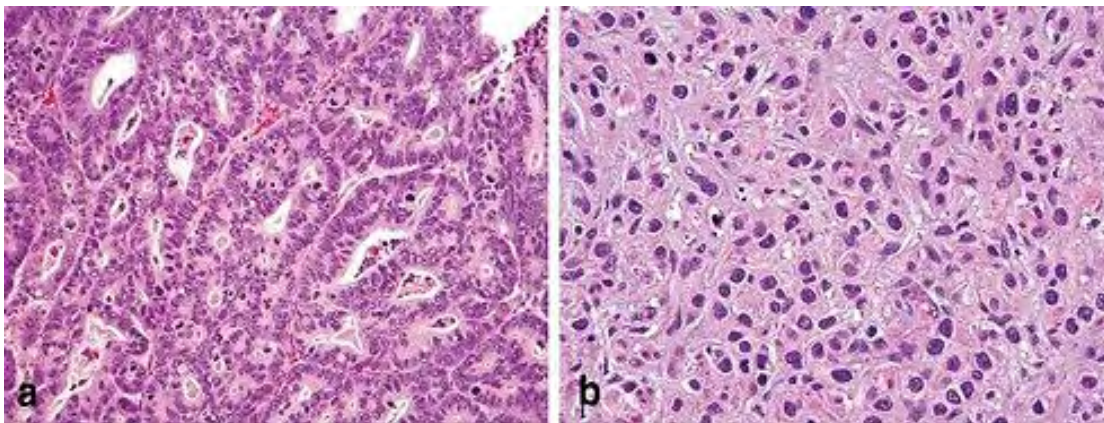
**Εικόνα 3.** Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου σύμφωνα με την κλινική εικόνα του ασθενή σε τέσσερα στάδια. [<https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/stages-of-stomach-cancer-vector-22037059>]



### 1.2.2 Ιστολογική ταξινόμηση

Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (GAC) είναι ένας κοινός ιστολογικός τύπος (περίπου 95%) του γαστρικού καρκίνου και γενικά αφορά κακοήθειες που προέρχονται από το στόμαχο και προκύπτουν από αδένες του πιο επιφανειακού στρώματος ή του βλεννογόνου του στομάχου [61],[62]. Οι δύο κύριες θέσεις όγκου του γαστρικού αδενοκαρκινώματος είναι εγγύς (καρδία) και άπω (μη καρδιακή) [63]. Η πρώτη περίπτωση συνορεύει με τον οισοφαγικό-γαστρικό κόμβο ενώ η δεύτερη περίπτωση που είναι γνωστή και ως παρακαίμενος καρκίνος του στομάχου είναι πιο συχνή και εντοπίζεται στο κατώτερο τμήμα του στομάχου [64]. Επίσης, είναι μια ασθένεια που εμφανίζει ετερογένεια σε γονοτυπικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά.

Τα αδενοκαρκινώματα κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με Laurén σε τρεις ιστολογικούς τύπους: διάχυτος (G-DIF), εντερικός (G-INT) και μείγμα αυτών [65] που διαφοροποιούνται επιδημιολογικά και με τον τρόπο με τον οποίο διακρίνονται στο μικροσκόπιο ενώ έχουν διαφορετικά μοριακά προφίλ και τα αναπτυξιακά τους μονοπάτια είναι διακριτά [66]. Πιο αναλυτικά, ο εντερικός υπότυπος του καρκίνου του στομάχου είναι συχνότερος (σε ποσοστό 54%) και σχετίζεται με απομακρυσμένους ή μη καρδιακούς όγκους, επάγεται σταδιακά μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως εντερική μεταπλασία και εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία κυρίως στους άνδρες. Αντίθετα οι διάχυτοι γαστρικοί όγκοι είναι λιγότερο συχνοί, αναπτύσσονται σε μικρότερη ηλικία και κυρίως στις γυναίκες, σχετίζονται με καρδιακούς όγκους και επίσης με την ενδοπεριτοναϊκή μετάσταση [67],[68]. Επιπλέον, άτομα με εντερικό υπότυπο καρκίνου έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τα άτομα που έχουν διάχυτο υπότυπο καρκίνου [69]. Συγκεκριμένα, στον εντερικό τύπο παρατηρείται καλά διαφοροποιημένη ιστολογία, ενώ στο διάχυτο τύπο λόγω της απώλειας μορίων προσκόλλησης εντοπίζονται κακώς συνεκτικά καρκινικά κύτταρα και λόγω της απορρύθμισης του TGF-β (Transforming growth factor beta-1) παρατηρείται πλούσιο στρώμα (**Εικόνα 5**). Ακόμη, ο διάχυτος τύπος συσχετίζεται συχνά θετικά με γενετικούς παράγοντες σε αντίθεση με τον G-INT, το οποίο σχετίζεται θετικά με το *Helicobacter pylori* [70]. Επιπρόσθετα, τα γονίδια που υπερεκφράζονται στον εντερικό υπότυπο σχετίζονται με τον μεταβολισμό υδατανθράκων και πρωτεϊνών όπως το γονίδιο FUT2, και την κυτταρική προσκόλληση όπως το γονίδιο CDH17. Στον υπότυπο G-DIF ενισχύονται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων [34],[71] ενώ επίσης δεν εκφράζεται το γονίδιο της E-cadherin, το οποίο συμμετέχει στην οργάνωση του κυττάρου [72].



**Εικόνα 4.** Ιστολογικά χαρακτηριστικά των τύπων καρκίνου του στομάχου σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Laurén. a) Εντερικού τύπου αδενοκαρκίνωμα, b) Διάχυτου τύπου αδενοκαρκίνωμα. [<https://abdominalkey.com/pathology-of-gastric-cancer/>]

Ακόμη είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα χρησιμοποιούνται τα επίπεδα έκφρασης του HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και εντοπίζεται μεγαλύτερη έκφραση του στον εντερικό τύπο καρκίνου, ως βιοδείκτη με σκοπό την πρόγνωση της ασθένειας και την ανταπόκριση στην θεραπεία [73].

### 1.2.3 Μοριακή ταξινόμηση

Σε μοριακό επίπεδο υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους μπορούμε να ταξινομήσουμε τον καρκίνο του στομάχου σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του, η ανάλυση από την ερευνητική κοινοπραξία 'Asian Cancer Research Group'(ACRG) και η ανάλυση από την ερευνητική κοινοπραξία 'The Cancer Genome Atlas'(TCGA). Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με την TCGA κοινοπραξία καθιερώνονται 4 υποτύποι του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου: Όγκοι σχετιζόμενοι με τον ιό EBV (EBVaGC), αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI), γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (GS) και όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) [74]. Η συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση σε 4 υποτύπους βασίστηκε στις εξής 6 μοριακές αναλύσεις καρκίνων του γαστρικού συστήματος που δεν είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία [75]: ανάλυση παραλλαγής αριθμού αντιγράφων (CNV), αλληλούχηση εξονίων, προφίλ μεθυλίωσης DNA, αλληλούχηση RNA, μικρο-RNA (miRNA) καθώς και ανάλυση πρωτεϊνών [76].

**Θετικοί στον EBV (EBV+, Epstein-Barr virus):** ορίζεται ως η μόλυνση του οργανισμού με τον ιό EBV, και αντιπροσωπεύει το 9% όλων των γαστρικών καρκίνων. Ανατομικά εντοπίζεται στο γαστρικό υπόστρωμα ή στρώμα και εμφανίζεται σε υψηλότερο ποσοστό σε άνδρες ασθενείς (81%) [77]. Στον συγκεκριμένο υπότυπο πραγματοποιούνται ορισμένες γενετικές και επιγενετικές μεταβολές. Ειδικότερα, παρατηρείται εκτεταμένη υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου CDKN2A και γενικά εντοπίζονται μεθυλίωσεις σε νησίδες CpG σε ογκοκατασταλτικά γονίδια με αποτέλεσμα την μεταγραφική τους απενεργοποίηση στα αρχικά στάδια του γαστρικού καρκίνου [66]. Επιπρόσθετα, εμφανίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA (κινάση 3 φωσφατιδυλinoσιτόλης), το οποίο κωδικοποιεί ένα συστατικό της PI3 κινάσης σε ποσοστό 80%. Συνεπώς καθίσταται σημαντική η μελέτη της χρήσης των αναστολέων της PI3K ως θεραπευτικοί στόχοι. Επίσης, εντοπίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο ARID1A, το οποίο συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, σε ποσοστό 55% και στο γονίδιο BCOR σε ποσοστό 34%. Αξίζει ακόμη να αναφερθεί ότι σε αυτή την κατηγορία ενισχύεται η έκφραση των γονιδίων PDL1, PDL2 (programmed death ligand-1/2), τα οποία αναστέλλουν την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράλληλα παρατηρείται αυξημένη έκφραση στα γονίδια JAK2 (Janus-associated kinase 2), και ERBB2 που κωδικοποιεί ένα υποδοχέα κινάση τυροσίνης [78], [79], [80].

**Αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI):** Τα επίπεδα των MSI στους γαστρικούς καρκίνους είναι περίπου στο 20%. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου σε γονίδια του μονοπατιού Wnt, όπως στα γονίδια AXIN2 και TCF7L2 (Transcription factor 7-like 2). Γενικά οι συχνές μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίων σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA έχουν ως αποτέλεσμα να απενεργοποιούνται μεταλλάξεις γονιδίων που είναι καταστολείς όγκων με αποτέλεσμα την εξέλιξη του όγκου [81], [82]. Επίσης, παρατηρείται αυξημένος ρυθμός μεταλλάξεων σε ογκογόνα γονίδια, οι οποίες τα ενεργοποιούν συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην πρόοδο της νόσου [83]. Επιπλέον, εντοπίζονται σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια επισκευής αναντιστοιχιών βάσεων όπως στο MLH1 ενώ σε κάποιες μελέτες σημειώνεται η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του συγκεκριμένου γονιδίου, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυτού και

οδηγώντας σε μια μορφή γενωμικής αστάθειας γνωστής ως αστάθεια μικροδορυφόρων [84]. Είναι επίσης σημαντικό να τονιστεί ότι η συγκεκριμένη περίπτωση συνδέεται με εντερική μεταπλασία και προσβολή από το *Helicobacter pylori* (HP) και συνοδεύεται και από μεθυλίωση σε νησίδες CpG [85].

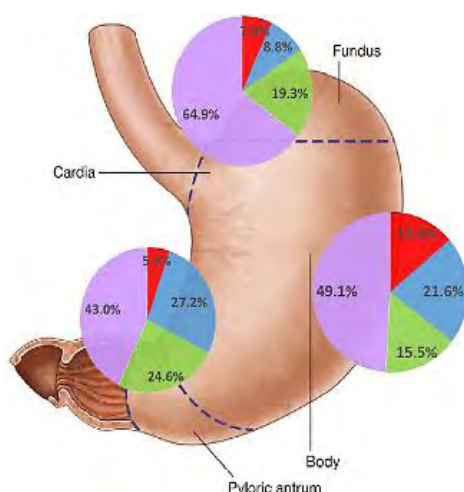
**Γονιδιακά σταθεροί όγκοι (GS):** Αντιπροσωπεύουν το 20% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου και ανιχνεύονται με την ίδια συχνότητα σε γυναίκες και άνδρες. Ειδικότερα αυτός ο υπότυπος χαρακτηρίζεται από περιορισμένες αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων (somatic copy number aberrations). Αρχικά σημειώνεται ότι οι γονιδιακά σταθεροί όγκοι έχουν έναν διάχυτο ιστολογικό φαινότυπο σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση κατά Laurén και αυξημένη έκφραση μορίων στις οδούς προσκόλλησης κυττάρων και σε μονοπάτια που σχετίζονται με την αγγειογένεση, όπως επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις της E-καντερίνης (CDH1), καθώς και σε μέλη της οικογένειας ομολόγου Ras (RHOA) ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική διεισδυτικότητα, διαταράσσοντας τη διακυτταρική συνοχή, και συμβάλλοντας στη διάχυτη ιστολογία που εντοπίζεται στο 73% αυτού του υποτύπου [86],[87],[77]. Επίσης, το γονίδιο CDH1 έχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των επιθηλιακών καρκίνων και ειδικότερα μεθυλίωση στον υποκινητή του εντοπίζεται στον κληρονομικό διάχυτο καρκίνο του στομάχου [88]. Ακόμη, εντοπίζονται μεταλλάξεις σε γονίδια που καταστέλλουν τον όγκο όπως τα TP53 και BRCA2 και τα οποία συμβάλλουν στην επιδιόρθωση του DNA [89].

**Χρωμοσωμική αστάθεια (CIN):** Αποτελεί χαρακτηριστικό της κακοήθειας και μπορεί να εμφανιστεί τόσο πρόωρα όσο και σε καθυστερημένα στάδια της νόσου [90]. Πιο αναλυτικά, συνιστά υποκατηγορία της γονιδιωματικής αστάθειας, δηλαδή των γονιδιωματικών αλλοιώσεων και συγκεκριμένα των συσσωρευμένων μεταλλάξεων που εντοπίζονται στον καρκίνο του στομάχου. Ακόμη, οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια έχουν υψηλό βαθμό παραλλαγής σωματικού αριθμού αντιγράφων (ανευπλοειδία) [91]. Συγκεκριμένα, η χρωμοσωμική αστάθεια αφορά αλλαγή στο περιεχόμενο του DNA, το οποίο συμβαίνει λόγω απώλειας ή απόκτησης ολόκληρων χρωμοσωμάτων. Δεν πρέπει να παραλειφθεί ότι η αστάθεια σχετίζεται και με δομικές ανωμαλίες σε ορισμένες χρωμοσωμικές περιοχές και συγκεκριμένα μετατόπιση, ενίσχυση, διαγραφή ή απώλεια ορισμένων γονιδίων [92] όπως για παράδειγμα γονίδια που εμπλέκονται σε σημεία επιδιόρθωσης DNA και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Παράλληλα, σημειώνεται αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων των ογκογονιδίων, και απώλεια της λειτουργίας των γονιδίων που έχουν ρόλο στην καταστολή του όγκου [93]. Ωστόσο, η χρωμοσωμική αστάθεια δεν χαρακτηρίζει μόνο την μεταβολή στον αριθμό των αντιγράφων ή των χρωμοσωμάτων αλλά κυρίως τον ρυθμό με τον οποίο συμβαίνουν, ο οποίος αυξάνεται στην περίπτωση του καρκίνου. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι η αστάθεια του γονιδιώματος διαφέρει ανάλογα με την θέση του γονιδίου και επηρεάζεται από τις αλληλεπιδράσεις γονιδίου και περιβάλλοντος [94]. Επιπλέον, μέχρι στιγμής χρησιμοποιούνται ως δείκτες η ενίσχυση του υποδοχέα κινάση τυροσίνης στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου [96]. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα με σκοπό την εύρεση διαγνωστικών εργαλείων για τον εντοπισμό καρκίνων του στομάχου με χρωμοσωμική αστάθεια.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι στον καρκίνο του στομάχου όπου παρατηρείται χρωμοσωμική αστάθεια ενισχύεται η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, όπως το γονίδιο CDK6 (Cyclin Dependent Kinase 6), ενώ αυξάνεται και ο αριθμός των αντιγράφων των γονιδίων GATA4 και GATA6, τα οποία



κωδικοποιούν για δύο μεταγραφικούς παράγοντες που διατηρούν συγκεκριμένες κυτταρικές γενεολογίες στο γαστρεντερικό σύστημα, προδιαθέτουν για καρκίνο του στομάχου και συνιστούν επίκεντρο της συγκεκριμένης εργασίας [95],[96].



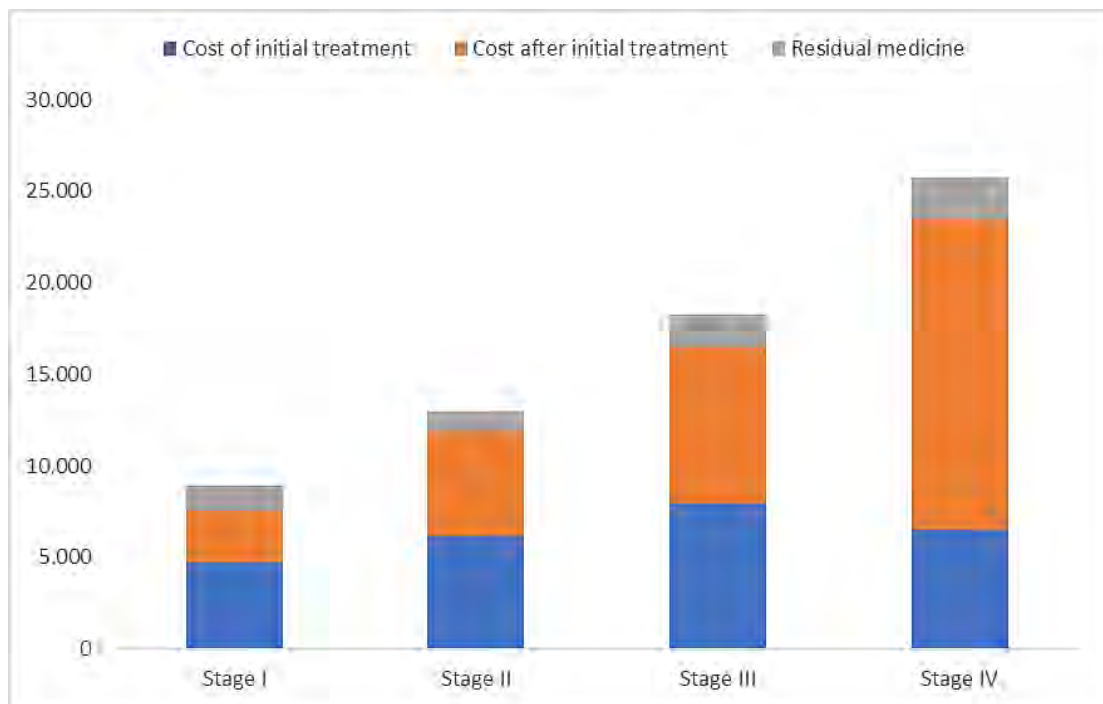
**Εικόνα 5.** Ποσοστό εμφάνισης των τεσσάρων υποτύπων σύμφωνα με την ανάλυση TCGA στα διάφορα τμήματα του στομάχου. Τα τμήματα του στομάχου είναι η καρδιά, ο θόλος, το σώμα, το άντρο και ο πυλωρός. Το μωβ χρώμα αντιστοιχεί στο CIN, το κόκκινο στο EBV+, το μπλε στο MSI, και το πράσινο στο GS [75].

Subtypes	EBV-positive	MSI	GS	CIN
Frequency	8.8%	21.7%	19.7%	49.8%
Demographic	Male patients (81%)	Old age (median 72 years)	Young age (median 59 years)	No special
Histology			Diffuse histology	Intestinal histology
Main location	Fundus or body (62%)			Gastro-esophageal junction/cardia (65%)
Molecular alterations	EBV-CpG island methylator phenotype (CIMP) <i>PD-L1/2, JAK2</i> overexpression Mutation in <i>PIK3CA, ARID1A, BCOR</i> <i>CDKN2A</i> silencing Immune cell signaling Rare <i>TP53</i> mutations	Gastric-CIMP Hypermethylation in <i>TP53, PIK3CA, ERBB3, ARID1A</i> <i>MLH1</i> silencing Mitotic pathways activation Commune changes in the genes of CMHI	<i>CDH1, RHOA</i> mutation <i>CLDN18-ARHGAP</i> fusion Cell adhesion, angiogenesis pathways enriched Rare <i>TP53</i> mutations	<i>TP53</i> mutation RTK-RAS activation Mutations of <i>SMAD4</i> and <i>APC</i>
Potential targets	<i>PIK3CA, JAK2, PD-L1/PD-L2</i>	<i>PIK3CA, ERBB2/3, EGFR, PD-L1, MLH1</i> silencing	<i>RHOA, CLDN18</i>	RTKs, EGFR, VEGFA, CCNE1, CCND1, CDK6
Treatment reaction		No respond to adjuvant chemotherapy		

**Εικόνα 6.** Χαρακτηριστικά των τεσσάρων υποτύπων EBV-positive, MSI (microsatellite instability), GS (genomical stability), CIN (chromosomal instability) σύμφωνα με την ανάλυση TCGA (The Cancer Genome Atlas) [77].

### 1.3 Κόστος του καρκίνου του στομάχου

Γενικά η οικονομική επιβάρυνση λόγω των θεραπειών που απαιτεί η νόσος είναι πολύ σημαντική για τους ασθενείς με καρκίνο. Συγκεκριμένα, έπειτα από έρευνα στην Αμερική σημειώθηκε αύξηση του κόστους για την εισαγωγή των ατόμων που πάσχουν από την συγκεκριμένη νόσο στο νοσοκομείο κατά 21,2% μεταξύ των ετών 2003 - 2014 και συγκεκριμένα από \$ 75.341 το 2003 σε \$ 91.385 το 2014 παρά την μείωση στο χρόνο παραμονής των ασθενών στο νοσοκομείο. Το κόστος αυτό σχετίζεται με τις θεραπείες – όπως είναι οι χημειοθεραπείες- που απαιτούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου του στομάχου σε ασθενείς που πάσχουν καθώς και με επιπλοκές που εντοπίζονται σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας λόγω της εξέλιξης της νόσου και οι οποίες πρέπει να αντιμετωπιστούν [97]. Παράλληλα έχει διαπιστωθεί ότι με την εξέλιξη της νόσου αυξάνεται το κόστος των θεραπειών στα μετέπειτα στάδια της ασθένειας(Εικόνα 7) [98].



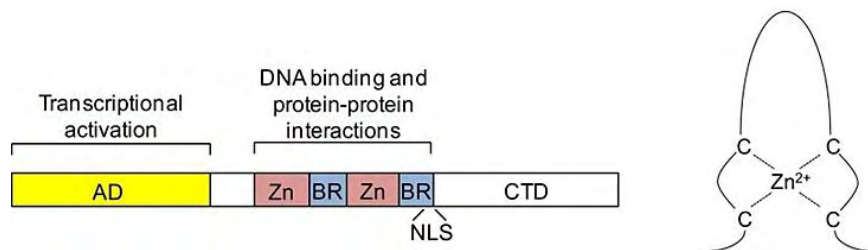
**Εικόνα 7.** Κόστος ιατρικής φροντίδας ανά στάδιο στον καρκίνο του στομάχου. Εντοπίζεται σημαντική αύξηση του κόστους της αρχικής θεραπείας (χημειοθεραπεία, χειρουργική επέμβαση) στο στάδιο IV (τροποποιημένο) [98].

Επομένως, η υψηλή συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου σε πολλές χώρες, η υψηλή θνησιμότητα που ευθύνεται σε αυτόν τον τύπο καρκίνου, καθώς και η καθυστερημένη πρόγνωση επιβαρύνουν συνδυαστικά τα εθνικά προγράμματα υγείας και ασφάλισης χωρίς να οδηγούν σε απτά αποτελέσματα για τον ασθενή, κάνοντας έτσι επιτακτική την αυξημένη αναγκαιότητα για έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου με τη χρήση βιώσιμων, μοριακών και μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων τόσο για να μπορεί να διαγνωστεί σε πρόωρο στάδιο η νόσος μαζικά στον πληθυσμό όσο και για να περιοριστεί το κόστος που συνεπάγονται οι θεραπείες τόσο για τους ασθενείς όσο και για τα εθνικά συστήματα υγείας των χωρών που πλήττονται.

## 1.4 Μεταγραφικός παράγοντας GATA4

### 1.4.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA

Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA (GATA Binding Protein) αποτελούνται από 2 εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές ψευδαργύρου (ZNI και ZNII), ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), και τις λιγότερο συντηρημένες C-τελικές και N-τελικές περιοχές. Στην N-τελική περιοχή συμπεριλαμβάνονται και οι επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης (TAD) [99]. Το όνομα των μεταγραφικών αυτών προϊόντων προήλθε από το μοτίβο της αλληλουχίας στην οποία προσδένονται 5'-(A / T) GATA (A / G)-3' [100]. Το συγκεκριμένο μοτίβο εντοπίζεται στους υποκινητές των γονιδίων που ρυθμίζονται από τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες [101]. Η αλληλουχία αυτή αναγνωρίζεται από τις κοινές σε όλες τις GATA περιοχές των δακτύλων Zn προσδίδοντας με αυτόν τον τρόπο την σταθερή αναγνώριση και πρόσδεση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA. Συνήθως ο ένας δάκτυλος ψευδαργύρου προσδένεται στο DNA στις αντίστοιχες αλληλουχίες ενώ ο άλλος είναι απαραίτητος για την επίτευξη σταθερότητας [102]. Ωστόσο και οι δύο περιοχές ψευδαργύρου απαιτούνται για την αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Σε αντίθεση με τους δακτύλους Zn, οι C-τελικές, N-τελικές περιοχές και οι τομείς μεταγραφικής ενεργοποίησης (AD) που ανήκουν στην τελευταία διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών GATA μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 8) [103].



**Εικόνα 8.** Γενική δομή των μεταγραφικών παραγόντων GATA. Αποτελούνται από δύο δάκτυλα ψευδαργύρου, μία περιοχή πυρηνικού εντοπισμού, μία περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης και ένα καρβοξυτελικό άκρο. Η εικόνα δεξιά αντιστοιχεί στη δομή των δακτύλων ψευδαργύρου [324].

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA αποτελείται από έξι μεταγραφικούς παράγοντες GATA και διαιρείται σε δύο υποκατηγορίες βάση αλληλουχίας αλλά και έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων [104]. Πιο συγκεκριμένα, μέλη της οικογένειας GATA (GATA1/2/3) εκφράζονται στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα ενώ τα υπόλοιπα μέλη (GATA4/5/6) εντοπίζονται σε ιστούς μεσοδερμικής και ενδοδερμικής προέλευσης που διαφοροποιείται σε γαστρεντερικό επιθήλιο σε ενήλικα άτομα [105],[106].

### 1.4.2 Ο ρόλος των GATA

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια GATA έχουν ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στην ομοίωση, μορφογένεση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη των ενδοδερμικών και μεσοδερμικών ιστών, όπως είναι το ήπαρ, το δέρμα, τα αιμοποιητικά και καρδιαγγειακά συστήματα [107]. Ειδικότερα, παρατηρείται έκφραση τους στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των οργάνων σε διάφορους ιστούς ρυθμίζοντας την έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων-στόχων σε κάθε ιστό είτε δρώντας μόνοι τους είτε μαζί με άλλους παράγοντες [108].

Επομένως, συμμετέχουν ως ρυθμιστές στην διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων, ώστε να ωριμάσουν τα κύτταρα και να αποκτήσουν εξειδικευμένη κυτταρική γενεαλογία [109].

Εστιάζοντας στην δεύτερη κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων (GATA4/5/6) έχει παρατηρηθεί ότι οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες εντοπίζονται στο στάδιο της διαφοροποίησης εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων και ειδικότερα του εντέρου, του ήπατος, των πνευμόνων και της καρδιάς [110]. Επιπρόσθετα, υπερεκφράζουν το γονίδιο *Muc5ac* έπειτα από πρόσδεση τους στον υποκινητή αυτού του γονιδίου, το οποίο συμμετέχει στην έκκριση βλέννας και στην διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων κυρίως στο εμβρυϊκό στόμαχο [111].

### 1.4.3 Ο φυσιολογικός ρόλος του GATA4 σε περιφερειακούς ιστούς

Ειδικότερα, ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8p23.1 [112]. Το γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για τον GATA4, αποτελείται από έξι εξόνια και έχει μήκος 1329 νουκλεοτίδια [113].

Σε φυσιολογικά ενήλικα άτομα η έκφραση του GATA4 εντοπίζεται στο: στόμαχο, πνεύμονα, ήπαρ, πάγκρεας, έντερο, καρδιά, και ωοθήκη (**Εικόνα 9**). Έχει δειχθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων προς εμβρυϊκό ενδόδερμα, το οποίο παρατηρείται στα αρχικά στάδια της κυτταρικής διαφοροποίησης. Επιπλέον, συμβάλλει στην ανάπτυξη των οργάνων που αναφέρθηκαν προηγουμένως ενώ επίσης συμμετέχει στην μορφογένεση των ιστών μέσω της εξειδίκευσης των κυττάρων σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο [114], [115]. Έχει ακόμη παρατηρηθεί ότι ο GATA4 εντοπίζεται και στα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το μεσόδερμα και διαφοροποιούνται σε μυοκαρδιακά κύτταρα, και οστεοβλάστες [116],[117],[118].

GATA factor	Mouse phenotype	Localization	Biological roles
GATA4	Embryonic lethal at E7–E9.5	- CNS - Heart - Intestines - Liver - Lung - Ovaries - Pancreas - Stomach - Testes	- Astrocyte proliferation and apoptosis - Cardiomyocyte proliferation, differentiation, and hypertrophy - Endocardial cell proliferation - Jejunal–ileal homeostasis - Hepatocyte differentiation - Pulmonary development - Gonadogenesis - Pancreatic endoderm specification - Gastric epithelial development

**Εικόνα 9.** Ρόλος του GATA4 σε συγκεκριμένα όργανα [112].

Ειδικότερα στην καρδιά ο GATA4 συνεργάζεται με τον παράγοντα Nkx2.5 και Tbx5 [119] και επίσης, συμμετέχει σε μονοπάτια Wnt και FGF με σκοπό την διαφοροποίηση του συγκεκριμένου ιστού [120]. Παράλληλα αλληλεπιδρώντας με τον παράγοντα VEGF (Vascular endothelial growth factor) επάγει καρδιακή αγγειογένεση [121]. Γενικά ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 θεωρείται πρώιμος δείκτης της καρδιάς [122].

#### 1.4.4 Ο ρόλος του GATA4 στο γαστρεντερικό σύστημα

Αρχικά από το ενδόδερμα προκύπτουν τρία τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα ένα εκ των οποίων είναι το πρόσθιο έντερο που περιλαμβάνει το τμήμα από την στοματική κοιλότητα μέχρι και το αρχικό τμήμα του δωδεκαδαχτύλου και από το οποίο θα σχηματιστεί το στομάχι. Ακόμη προκύπτουν και άλλα όργανα του γαστρεντερικού όπως το έντερο, το ήπαρ, το πάγκρεας αλλά και άλλα όπως οι πνεύμονες και ο προστάτης [123],[124]. Ειδικότερα, τα στάδια που μεσολαβούν κατά την ανάπτυξη του στομάχου είναι η διαφοροποίηση του ενδοδέρματος, το οποίο διαφοροποιείται σε επιθηλιακή μονοστοιβάδα με μεγάλο αριθμό πτυχών, η εξειδίκευση του πρωτεύοντος εντερικού σωλήνα καθώς και η μορφογένεση των κυτταρικών σειρών, η οποία υλοποιείται στα όψιμα εμβρυϊκά στάδια [125]. Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 σε συνεργασία με άλλους παράγοντες (π.χ. HNF-3) εντοπίζεται σε πολλούς οργανισμούς κατά το στάδιο της διαφοροποίησης του ενδοδέρματος, όπου και επάγει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων με σκοπό την διαφοροποίηση και εν συνεχεία διατήρηση συγκεκριμένης κυτταρικής γενεαλογίας (survival of cell lineage) και την παραγωγή των αντίστοιχων οργάνων. Επίσης, ο παράγοντας GATA4 συμμετέχει ως ρυθμιστής στην διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων στο γαστρεντερικό σύστημα και ειδικότερα εντοπίζεται στο πρόσθιο τμήμα της πεπτικής οδού που αποτελεί το μελλοντικό όριο του στομάχου [126],[127]. Επιπρόσθετα, ανιχνεύεται στο αδενικό επιθήλιο του στομάχου [118] ενώ απουσιάζει πλήρως από το πλακώδες επιθήλιο του οισοφάγου. Ακόμη, εντοπίζεται στο οπίσθιο τελικό νεύρο, από το οποίο προκύπτει το γαστρικό επιθήλιο. Η εξειδίκευση του γαστρικού επιθηλίου επιτυγχάνεται από την δράση του παράγοντα GATA4 και του παράγοντα TGF- $\beta$  [128]. Επιπρόσθετα ο GATA4 διατηρεί την έκφραση του τόσο στο εμβρυϊκό όσο και στο ώριμο επιθήλιο του στομάχου [129].

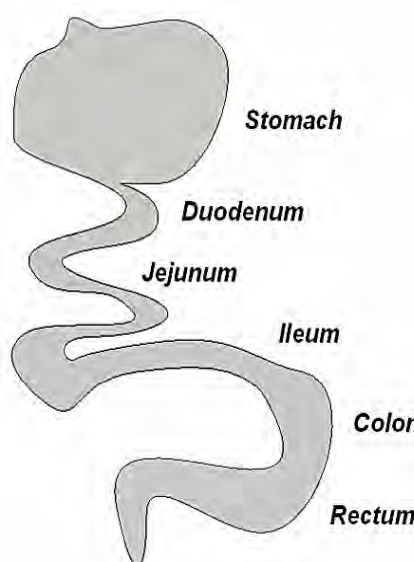
Η συμβολή του GATA4 στην ανάπτυξη του στομάχου, επιβεβαιώθηκε με πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια από τα οποία απενεργοποιήθηκε με μεθόδους γενετικής τροποποίησης το γονίδιο GATA4. Παρατηρήθηκε ότι τα GATA4<sup>-/-</sup> ποντίκια δεν επιβιώνουν πέραν του σταδίου ανάπτυξης του στομάχου [130]. Για να προσδιοριστεί τι προκαλεί η έλλειψη του GATA4<sup>-/-</sup> δημιουργήσαν χιμαιρικά ποντίκια, στα οποία τα GATA4<sup>+/+</sup> κύτταρα περιορίστηκαν σε ορισμένα τμήματα του πρόσθιου (foregut) και του οπίσθιου (hindgut) ενδοδέρματος αλλά διαγράφηκαν σε όλα τα άλλα κύτταρα του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Από το πείραμα αυτό παρατήρησαν ότι παρά την απουσία GATA4 σε όλα τα άλλα κύτταρα του αναπτυσσόμενου εμβρύου εκτός από ορισμένα τμήματα του ενδοδέρματος, εντοπίζεται σχηματισμός του πρόσθιου εντέρου συμπεραίνοντας ότι απαιτείται έκφραση του GATA4 στο ενδόδερμα για να σχηματιστεί το πρόσθιο έντερο. [324],[130]. Αξίζει, επίσης να σημειωθεί ότι για την εύρεση των μηχανισμών διαμόρφωσης των οργάνων και την συμβολή του GATA4 σε αυτό, χρησιμοποιούνται πλέον οργανοειδή, τα οποία είναι τρισδιάστατες καλλιέργειες πολλαπλών κυτταρικών τύπων που φέρουν βασικά χαρακτηριστικά των οργάνων προέλευσης τους. Αυτό συμβαίνει, γιατί τα *in vivo* συστήματα είναι πολύπλοκα ενώ παράλληλα χαρακτηρίζονται από μειωμένη προσβασιμότητα για παρατήρηση, περιορισμένη απόδοση και χρησιμότητα, αυξημένο κόστος ενώ δεν υπάρχει πάντοτε αντιστοιχία των ζωικών μοντέλων με την ανθρώπινη βιολογία [131],[132], [133],[134].

Αρκετά από τα γονίδια-στόχους του GATA4 συμμετέχουν σε πεπτικές λειτουργίες. Δύο παραδείγματα τέτοιων γονιδίων-στόχων είναι η υδρολάση λακτάση γλοριζίνης (LPH) και η πρωτεΐνη που δεσμεύει λιπαρά οξέα (FABP) [135]. Επιπλέον, εντοπίζεται θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 9 kb ανοδικά του γονιδίου Nanog, η έκφραση του οποίου αναστέλλεται μετά την πρόσδεση του GATA4 σε εμβρυϊκά



βλαστοκύτταρα. Επομένως, μείωση της έκφρασης του παράγοντα GATA4 έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του Nanog. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι τα κύτταρα που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του Nanog δεν μπορούν να ολοκληρώσουν τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, το οποίο ενισχύει την άποψη ότι το GATA4 επάγει την διαφοροποίηση των κυττάρων [136]. Επιπρόσθετα, ο παράγοντας GATA4 συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων H + / K + -ATPάσης στα βρεγματικά κύτταρα του στομάχου (**Εικόνα 10**) [137].

Γενικά σημειώνεται ότι ο παράγοντας GATA4 έχει δράση στα στάδια μορφογένεσης του στομάχου καθώς και στο εγγύς τμήμα του εντέρου συμμετέχοντας στην διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό και στον προσδιορισμό της γενεαλογίας τόσο των κυττάρων του λεπτού εντέρου όσο και του στομάχου [138].



<b>GATA-4</b>	Tissue	Cell type	GATA-4
+++	Stomach Corpus	Surface epithelial cells	++
		Neck cells	+++
		Parietal cells	+++
		Neuroendocrine cells	-
+++	Antrum	Surface epithelial cells	++
		Neck cells	+++
		Glandular cells	++
		Neuroendocrine cells	-
ND	Duodenum	Villus enterocytes	+++
		Crypt enterocytes	++
		Neuroendocrine cells	-
		Goblet cells	-
-	Colon	Paneth cells	-
		Surface colonocytes	-
		Crypt cells	-
		Goblet cells	-
-	Colon	Neuroendocrine cells	-
		Surface colonocytes	-
		Crypt cells	-
		Goblet cells	-

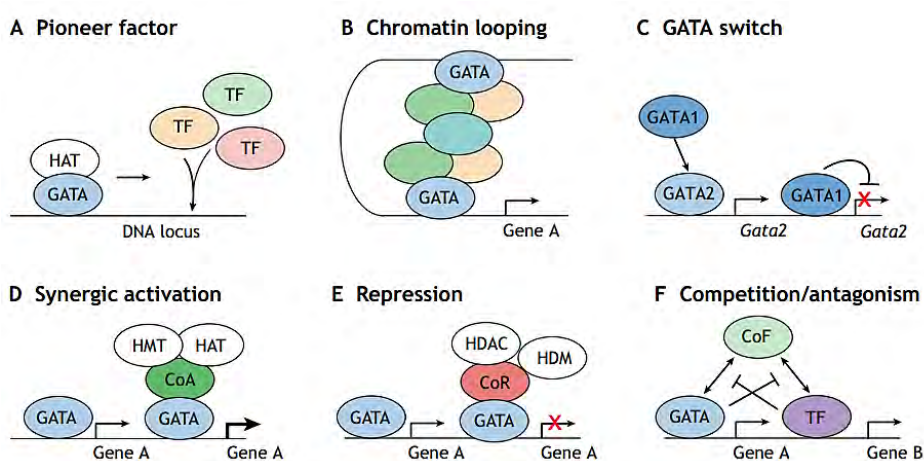
**Εικόνα 10.** Στην εικόνα αριστερά περιγράφεται η έκφραση του GATA4 στο γαστρεντερικό σύστημα. Η έκφραση εντοπίζεται κυρίως στο στόμαχο και στο δωδεκαδάχτυλο. Στην εικόνα δεξιά περιγράφεται η έκφραση του GATA4 στους διάφορους κυτταρικούς τύπους των οργάνων του γαστρεντερικού συστήματος. – όχι έκφραση, + χαμηλή έκφραση <20%, ++ μέτρια έκφραση 20–60%, +++ υψηλή έκφραση >60% [135].

#### 1.4.5 Μηχανισμός δράσης του GATA4

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 αλληλεπιδρά με τους παράγοντες FOG (Friend of GATA) στον N- τελικό δάκτυλο ψευδαργύρου του GATA4 και συγκεκριμένα συνεργάζεται με τον FOG1 και με αυτόν τον τρόπο καταστέλλουν την μοίρα του ειλεού ενώ ο GATA4 δρα ανεξάρτητα από το FOG1 για να ενεργοποιήσει τα γονίδια του εγγύς τμήματος του εντέρου [139]. Ακόμη, αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA6 και KLF5 που ανιχνεύονται στον αναπτυσσόμενο και φυσιολογικό στομάχι [140]. Ειδικότερα, θέσεις πρόσδεσης και των τριών μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται με υψηλότερη ένταση προσδιορίζονται σε υποκινητές γονιδίων σε αντίθεση με θέσεις πρόσδεσης του κάθε μεταγραφικού χωριστά που εστιάζονται σε

θέσεις ιντρονίων και ενισχυτών [141]. Επιπρόσθετα κοντά σε περιοχές πρόσδεσης των GATA διαπιστώθηκαν μοτίβα πρόσδεσης του KLF5 και αντίστροφα [141]. Επιπλέον, ο GATA4 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα HNF1 (hepatocyte nuclear factor 1) με σκοπό την ενεργοποίηση γονιδίων που επάγουν την απορρόφηση σε εντεροκύτταρα καθώς και γονίδια που εκφράζονται στο εγγύς τμήμα του εντέρου και όχι στον απομακρυσμένο ειλεό [142],[143].

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 είναι από τους πρώτους μεταγραφικούς παράγοντες που στρατολογούνται σε ετεροχρωματίνη με σκοπό η τελευταία να γίνει προσβάσιμη και για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [144]. Ακόμη, δεν πρέπει να παραλειφθεί ότι η συνεργασία με άλλους παράγοντες (π.χ. LDB1, MED1, BRG1) που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία χρωματινικής λούπας μέσω της επαφής των στοιχείων του υποκινητή και του ενισχυτή ρυθμίζει την έκφραση ενός γονιδίου [145]. Επίσης, κάθε μεταγραφικός παράγοντας GATA ρυθμίζει την έκφραση των άλλων μελών της οικογένειας GATA ώστε να δρουν διαδοχικά στα γονίδια στόχους (GATA switch) και να προσδώσουν συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο στα βλαστικά κύτταρα. Παράλληλα, μπορούν να ανταγωνιστούν με μεταγραφικούς παράγοντες για την πρόσδεση ενός συμπαραγόντα. Επιπλέον, ο GATA4 ρυθμίζει την έκφραση ορισμένων γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασης με παράγοντες που δρουν ως ενεργοποιητές ή καταστολείς της έκφρασης γονιδίων. Συγκεκριμένα, στρατολογούνται είτε μεθυλ-, και ακετυλο- τρανσφεράσες ιστόνης στην περίπτωση της ενεργοποίησης του γονιδίου είτε διμεθυλάσες ή ακετυλάσες ιστόνης στην περίπτωση της καταστολής του γονιδίου (**Εικόνα 11**) [146]. Επιπρόσθετα, έχει προσδιοριστεί ότι ο GATA4 προκειμένου να επάγει την ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων έκτος από τους τρόπους που αναφέρθηκαν, συμβάλλει ακόμη στην αναδιαμόρφωση χρωματίνης με σκοπό να είναι τα γονίδια προσβάσιμα από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [147]. Συγκεκριμένα, για την επαγωγή της γονιδιακής ενεργοποίησης η GATA4 πρωτεΐνη στρατολογεί συνενεργοποιητές (π.χ. ARID1A, SMARCA1, ARID2, SMARCA4), επιτυγχάνοντας πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στα καθοδικά γονίδια-στόχους [148].



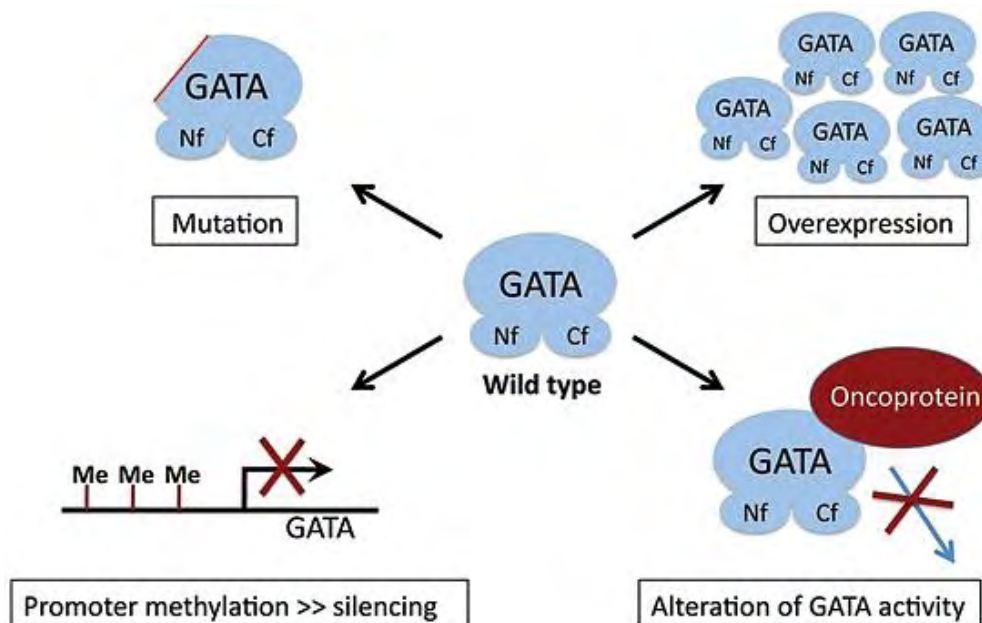
**Εικόνα 11.** Οι μηχανισμοί δράσης των μεταγραφικών παραγόντων GATA [146].

#### 1.4.6 Ο ρόλος του GATA4 στον καρκίνο

Η δράση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 ενισχύεται στην καρκινογένεση λόγω σημαντικής μεταβολής στα επίπεδα έκφρασης του στους ιστούς όπου έχει φυσιολογική δράση (**Εικόνα 12**). Για παράδειγμα, μεταβολές στην έκφραση του GATA4 οδηγούν σε μη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού συστήματος και σε

κακοήθεια στον βλεννογόνο του εντέρου [149]. Γενικά μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην αλληλουχία του GATA4 και συγκεκριμένα στις θέσεις αλληλεπίδρασης με άλλους παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ενεργότητα και την πρόσδεση του οδηγώντας στην σύνδεση και σε άλλους υποκινητές και αλλάζοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση αρκετών γονιδίων [150], [151]. Για παράδειγμα μία μετάλλαξη στο 1<sup>ο</sup> δάκτυλο ψευδαργύρου που επηρεάζει τη ενεργότητα του GATA4 αλλά όχι την πρόσδεση στο DNA, μειώνει την ενεργοποίηση των γονιδίων που ρυθμίζονται από το GATA4 [113]. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι πολλοί GATA4 στόχοι είναι πρωτο-ογκοπρωτείνες συνεπώς η αύξηση της έκφρασης του GATA4 στον καρκίνο του στομάχου ενισχύει την έκφραση τους [152].

Ενίσχυση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 εντοπίζεται στον καρκίνο του οισοφάγου [153] του παγκρέατος [154], του στομάχου [223] καθώς και στο νευροβλάστωμα [154] όπου δρα ως ογκογονίδιο κυρίως όμως, ανιχνεύεται σε καρκίνους του πεπτικού συστήματος [167] και σε γαστροοισοφαγικά αδενοκαρκινώματα, όπου εντοπίζονται σε ποσοστό 30% αυτών [155], [156]. Επομένως, συνιστά ένα ογκογονίδιο που ενώ έχει ως φυσιολογικό ρόλο την ρύθμιση αναπτυξιακών διεργασιών και τον καθορισμό της γαστρεντερικής κυτταρικής γενεαλογίας (lineage survival oncogene), η υπερέκφραση του σε ορισμένους τύπους καρκίνου οδηγεί στην παθολογική ενεργοποίηση έκτοπων αναπτυξιακών προγραμμάτων στους συγκεκριμένους ιστούς [141].



**Εικόνα 12.** Μεταβολή της δραστικότητας των παραγόντων GATA στην καρκινογένεση λόγω μετάλλαξης, υπερέκφρασης, απώλειας έκφρασης ή πρόσδεσης με πρωτεΐνες [152].

Γενικά η δράση του GATA4 ως ογκο-επαγωγικό ή ογκο-κατασταλτικό γονίδιο εξαρτάται από τον ιστό που εκφράζεται, χαρακτηριστικό που είναι κοινό σε άλλα γονίδια διατήρησης της κυτταρικής γενεολογίας [157].

#### 1.4.7. Στόχοι και λειτουργίες των lineage survival oncogenes στον καρκίνο

Εκτός από τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4 υπάρχουν και άλλα γονίδια που συμβάλλουν στην διατήρηση εξειδικευμένης κυτταρικής γενεαλογίας, ενώ παράλληλα προωθούν την ογκογένεση ενεργοποιώντας μηχανισμούς, οι οποίοι φυσιολογικά



λειτουργούν στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (lineage survival oncogenes). Παραδείγματα γονιδίων που δρουν ως ογκογονίδια και ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το MITF [158], TITF1/NKX2.1 και το SOX2, τα οποία συναντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων [159]. Πιο αναλυτικά, ο μεταγραφικός παράγοντας MITF (microphthalmia-associated transcription factor) δρα ως ρυθμιστής της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των μελανοκυττάρων και συμμετέχει στην διατήρηση της κυτταρικής τους γενεαλογίας. Στην περίπτωση του μελανώματος παρατηρείται αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου. Ειδικότερα, ο MITF ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων -όπως το γονίδιο TBX2- που επάγουν τον πολλαπλασιασμό και καταστέλλουν την γήρανση. Επίσης, ελέγχει την έκφραση των γονιδίων CDK2 και BCL2, τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη του μελανώματος και στην αναστολή της απόπτωσης αντίστοιχα [160], [161]. Ένα άλλο ογκογονίδιο της κατηγορίας αυτή είναι ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 (SRY-box 2), το οποίο σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκινώματος πλακωδών κυττάρων σε ιστούς όπως ο οισοφάγος και ο πνεύμονας. Ο SOX2 ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων, όπως είναι το c-myc, το οποίο προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το WNT2, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του οισοφάγου και το TGF-β που ελέγχει την εξέλιξη του καρκίνου και την μετάσταση [162],[163]. Τέλος ο μεταγραφικός παράγοντας TITF1 (thyroid transcription factor-1) γνωστός και ως Nkx2-1 (Nkx homeobox-1 gene) εμφανίζει αυξημένη έκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα. Ορισμένα γονίδια η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από το TITF1 είναι το E2f3, το οποίο ελέγχει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, καθώς και οι κυκλίνες Ccnb1 και Ccnb2, οι οποίες ρυθμίζουν την μετάβαση της φάσης G2/M του κυτταρικού κύκλου [164], [165].

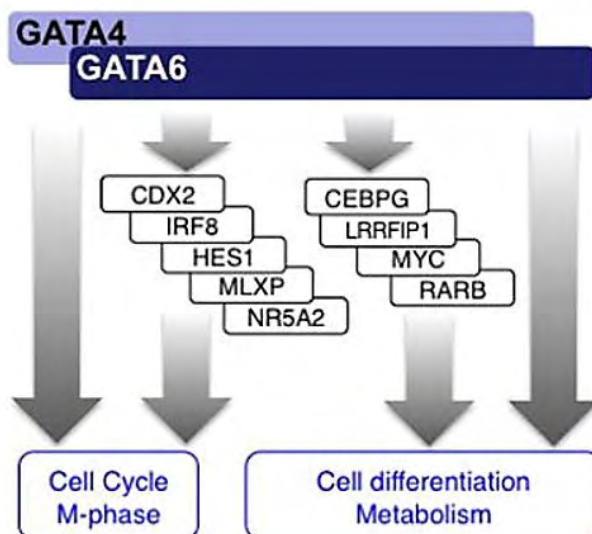
#### **1.4.8 Στόχοι και λειτουργίες του GATA4 στον καρκίνο**

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παγκρέατος και η έκφραση του σχετίζεται θετικά με την σοβαρότητα της νόσου. Επίσης, η ενισχυμένη έκφραση του GATA4 στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ορισμένα από τα γονίδια η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από το συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα, συμμετέχουν στις οδούς σηματοδότησης MAPK, και JAK-STAT [167]. Συγκεκριμένα, τα γονίδια της οδού σηματοδότησης MAPK – συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου p53- συσχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση [166]. Αντίθετα τα γονίδια του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK-STAT συσχετίζονται με την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο [167]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι αυξημένα επίπεδα του GATA4 ανιχνεύονται και στην περίπτωση του όγκου της κοκκιώδους στοιβάδας της ωοθήκης όπου ο GATA4 επάγει την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2 και της κυκλίνης D2. Επομένως, με αυτόν τον τρόπο συμβάλλει στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου τύπου όγκου [168]. Ακόμη, υψηλή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 εντοπίζεται και στον καρκίνο του οισοφάγου (Barrett's esophagus) [135]. Στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου ο GATA4 προσδένεται στον υποκινητή του MUC2 και ρυθμίζει την έκφραση του [169]. Το γονίδιο MUC2 ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων βλέννης και έχει αυξημένη έκφραση στον καρκίνο του οισοφάγου [170]. Επίσης, το MUC2 συνιστά δείκτη της εντερικής μεταπλασίας του επιθηλίου, το οποίο παρατηρείται στην συγκεκριμένη νόσο (Barrett's esophagus) και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο κακοήθειας [171], [172].

Επιπλέον, ο GATA4 εμπλέκεται σε γαστρικές παθήσεις και συγκεκριμένα προάγει την καρκινογένεση του στομάχου ενεργοποιώντας πρώιμα αναπτυξιακά συστήματα [312].

Ειδικότερα αυξάνεται η έκφραση του στην περίπτωση της εντερικής μεταπλασίας του στομάχου [130] ενώ επίσης επάγει προγονικές και πολλαπλασιαστικές ιδιότητες του εντερικού αδένου σε επιθηλιακά κύτταρα στομάχου [175]. Ακόμη, ο GATA4 είναι ένα ογκογονίδιο που συμβάλλει στην διατήρηση της γαστρεντερικής κυτταρικής γενεαλογίας και, το οποίο σε συνεργασία με το KLF5 και το GATA6 ενισχύει την ανάπτυξη του καρκίνου του στομάχου [173] ρυθμίζοντας από κοινού υποκινητές γονιδίων-στόχων (όπως ο HNF4a), συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση όγκων με ενισχυμένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6 και KLF5, παρατηρείται αυξημένη έκφραση των γονιδίων NCOA3 (Nuclear Receptor Coactivator 3), HNF4Aa, PRMT1 (Protein Arginine Methyltransferase 1), FN1 και SPTBN1 (Spectrin Beta Non-Erythrocytic 1). Τα δύο πρώτα γονίδια συνιστούν παράγοντες μεταγραφής και συγκεκριμένα ο HNF4Aa συμμετέχει στην ανάπτυξη σπλαχνικού ενδοδέρματος ενώ η έκφραση του αναστέλλεται έμμεσα με την ενεργοποίηση της σηματοδότησης AMPK. Το γονίδιο PRMT1 συμμετέχει σε επιγενετικές διεργασίες ενώ τα γονίδια FN1 και SPTBN1 σχετίζονται με την προσκόλληση κυττάρων. Αντίθετα η έκφραση των γονιδίων SOX2, MLL και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων CDKN1A και SYNE1 μειώθηκε στην περίπτωση των όγκων όπου εντοπίζεται αυξημένη έκφραση των GATA4, GATA6 και KLF5 [141].

Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι επειδή οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και GATA6 έχουν κοινά μοτίβα πρόσδεσης, και οι δύο παράγοντες ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση, στον μεταβολισμό και στην M-φάση του κυτταρικού κύκλου στον καρκίνο του στομάχου. Ορισμένα από αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται άμεσα από τους παράγοντες GATA4 και GATA6 ενώ άλλα έμμεσα μέσω της ρύθμισης τους από ενδιάμεσους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το CEBPG, LRRFIP1, NR5A2, MLXP, MYC, IRF8 (Interferon Regulatory Factor 8), RARB (Retinoic acid receptor beta), HES1 (Hairy and Enhancer of Split 1) και το CDX2, το οποίο συμμετέχει στην εντερική διαφοροποίηση. Η έκφραση των ενδιάμεσων αυτών μεταγραφικών παραγόντων ελέγχεται από τους παράγοντες GATA4/6 [175]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες MYC και NR5A2 συμμετέχουν σε δίκτυα αυτοανανέωσης και πολυδυναμίας [174]. Επιπλέον, αξίζει να τονιστεί ότι το γονίδιο HES1 συνιστά μεταγραφικό στόχο της σηματοδότησης Notch, η οποία έχει ρόλο στην δραστηριότητα των προγονικών και βλαστικών κυττάρων του στομάχου (Εικόνα 13) [175], [176].



**Εικόνα 13.** Λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/6 στον καρκίνο του στομάχου. Ρυθμίζουν άμεσα ή έμμεσα γονίδια που έχουν ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση ή στην M-φάση του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, παρατηρείται εν μέρει αλληλοεπικάλυψη ως προς την δράση των παραγόντων GATA4 και GATA6 [175].

Οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του GATA4 αξιοποιούνται ως διαγνωστικοί βιοδείκτες των διαφόρων τύπου καρκίνου ανάλογα αν παρατηρείται μείωση ή αύξηση στην έκφραση και μέσω αυτού εξετάζεται κατά πόσον το άτομο αποκρίνεται στην θεραπεία [112]. Ωστόσο, είναι αναγκαία η εκτενέστερη μελέτη των λειτουργιών του GATA4 σε μοριακό επίπεδο, εστιάζοντας μεταξύ άλλων και στον τρόπο με τον οποίο αυτός δρα σε εμβρυικούς ιστούς ώστε να γίνει καλύτερα κατανοητή η συμβολή του στην καρκινογένεση [177]. Ειδικότερα, ο προσδιορισμός του ρόλου του στο στάδιο του καθορισμού του ενδοδέρματος στο γαστρικό περιβάλλον θα διευκολύνει τις θεραπείες που βασίζονται στην αναγέννηση των κυττάρων [129]. Παρ' όλη όμως, την σημασία του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 για την νόσο στο στομάχι, η άμεση θεραπευτική του στόχευση δεν είναι εφικτή λόγω της φυσιολογικής του δράσης. Συνεπώς είναι αναγκαία η μελέτη μοριακών στόχων με μεγαλύτερη ιστο- και καρκινοειδικότητα, όπως τα long non coding RNAs.

## 1.5 LncRNAs

### 1.5.1 Γενικά για τα ncRNAs και τα lncRNAs

Τα μεγαλομοριακά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, γνωστά ως long non coding RNAs (lncRNAs), αποτελούν μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (ncRNAs) που έχουν μήκος μεγαλύτερο από 200nt [178],[179]. Η κατηγορία των lncRNA συμπεριλαμβάνει τα μεγαλομοριακά διαγονιδιακά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (lincRNAs), τα μετάγραφα υπερ-συντηρημένων περιοχών (T-UCRs) και άλλου τύπου lncRNAs (**Εικόνα 14**). Στην ομάδα των ncRNAs ανήκουν επίσης τα μικρά ncRNAs [όπως είναι τα miRNAs, PIWI-interacting RNAs (piRNAs), και τα RNAs που περιέχονται σε τελομερική επανάληψη (tiRNAs)], τα μεσαία ncRNAs [για παράδειγμα μικρά πυρηνικά RNAs (snoRNAs), μικρά RNAs που σχετίζονται με τον υποκινητή (PASRs), TSS-associated RNAs (TSSa-RNAs) και τα μετάγραφα ανοδικά του υποκινητή (PROMPTs)], [180] τα κυκλικά RNA (circRNAs) [181],[182] και τα ιδιοσυστάτα (housekeeping) ncRNAs [183]. Γενικά, τα ncRNAs διαφέρουν ως προς το μήκος του μεταγράφου, την υποκυτταρική τοποθέτησή τους, αλλά και ως προς τον τρόπο πρόσδεσης στο DNA [184],[256].

Long ncRNAs (> 200 bp in size)	Long or large intergenic ncRNAs
	Transcribed ultraconserved regions
	Pseudogenes
	Enhancer RNAs
	Repeat-associated ncRNAs
	Long intronic ncRNAs
	Antisense RNAs
	Promoter-associated long RNAs
	Long stress-induced noncoding transcripts

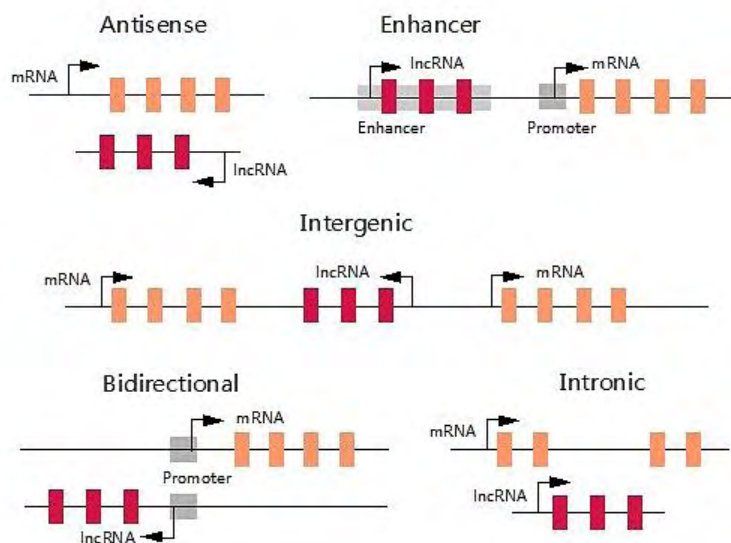
**Εικόνα 14.** Κατηγορία των lncRNAs [188].

### 1.5.2 Κατηγοριοποίηση των lncRNAs

Γενικά, όσον αφορά τον εντοπισμό των lncRNAs στο γονιδίωμα αυτά κατηγοριοποιούνται σε: διαγονιδιακά (lincRNAs), ιντρονικά, αντινοσηματικά ή αλληλεπικαλυπτόμενα με γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη, RNA ενισχυτών (eRNAs) καθώς και σε RNA σχετιζόμενα με υποκινητές.[185],[186].

Αναλυτικότερα όσον αφορά την ταξινόμηση τους ανάλογα με τις γονιδιωματικές θέσεις τα διαγονιδιακά lncRNAs δεν βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνη. Τα αντινοσηματικά lncRNAs μεταγράφονται από τον αντινοσηματικό κλώνο και επικαλύπτονται με μέρος ενός γονιδίου που κωδικοποιούν πρωτεΐνη. Αντίστοιχα υπάρχουν και τα lncRNAs που μεταγράφονται από τον νοσηματικό κλώνο. Τα ενισχυτικά lncRNAs εντοπίζονται σε περιοχές ενισχυτή. Επίσης, τα ιντρονικά lncRNAs προέρχονται από ένα ιντρόνιο ενός γονιδίου που οδηγεί στην παραγωγή πρωτεΐνης. Ακόμη υπάρχει και μια κατηγορία lncRNAs τα αμφίδρομα lncRNAs, τα οποία μεταγράφονται από τον αντίθετο κλώνο από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη και σε απόσταση μικρότερη από 1kb σε σχέση με το γονίδιο που παράγει πρωτεΐνη (**Εικόνα 15**) [187],[188], [189],[190].

Δομικά, τα lncRNAs ταξινομούνται στα γραμμικά και στα κυκλικά ενώ σε σχέση με το που εντοπίζεται το γονίδιο στόχος τους διαχωρίζονται στα *Cis*-, *Trans* - δραστικά lncRNAs, καθώς και σε αυτά που συνιστούν ενδογενή δραστικά RNA. Μια ακόμη κατηγοριοποίηση των lncRNAs βασίζεται στους τύπους των αλληλεπιδράσεων και συγκεκριμένα στα lncRNAs που αλληλεπιδρούν με DNA/χρωματίνη, με άλλα μόρια RNA αλλά και με πρωτεΐνες [191].



**Εικόνα 15.** Ταξινόμηση των lncRNAs με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα. [<https://www.arraystar.com/reviews/functional-lncrna-pcr-panel-from-the-unknown-to-biological-significance/>]

### 1.5.3 Χαρακτηριστικά των lncRNAs

Σε σύγκριση με τα mRNA τα lncRNAs έχουν μικρότερο μήκος, λιγότερα εξόνια, ενώ είναι λιγότερο συντηρημένα [192]. Επίσης, η εξειδίκευση της έκφρασης σε επίπεδο κυττάρων, ιστών αλλά και είδους χαρακτηρίζει ιδιαίτερα τα lncRNAs σε σχέση με τα κωδικοποιητικά μετάγραφα [193]. Αυτό προϋποθέτει αυστηρότερη ρύθμιση των lncRNAs σε σχέση με τα mRNA. Στον έλεγχο της μεταγραφής των lncRNAs συμβάλλουν τόσο οι επιγενετικές τροποποιήσεις των υποκινητών όσο και οι

μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται και επάγουν την παραγωγή αυτών [194],[195]. Επιπλέον, σημειώνεται ότι από το σύνολο όλων των μεταγράφων το 98% αντιστοιχεί στα μη κωδικοποιητικά [196] αν και τα μέσα επίπεδα έκφρασης τους είναι μικρότερα σε σχέση με τα κωδικοποιητικά γονίδια [197].

Συγκεκριμένα τα lncRNAs αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα των μη κωδικοποιητικών κυρίως πολυαδενυλιωμένων αλλά και μη πολύ-αδενυλιωμένων μεταγράφων στους οργανισμούς [198]. Μετά την έκφραση τους τα lncRNA εντοπίζονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα [199]. Επιπλέον, περιέχουν περιοχές μικρού μήκους που μπορούν να εκφραστούν σε πρωτεΐνη καθώς έχουν περιοχή ORF χωρίς όμως να μεταφράζονται απαραίτητα σε κάθε κυτταρικό επίπεδο. Παρόλο που έχει αποδειχθεί η λειτουργικότητα κάποιων μικροπεπτιδίων που προκύπτουν από lncRNA σε μερικά κύτταρα [200] συνήθως παραγόμενα πολυπεπτίδια μικρότερα από 100 αμινοξέα δεν είναι λειτουργικά [201]. Ακόμη, τα lncRNAs μεταγράφονται από την RNA pol II ενώ επίσης οι παράγοντες Oct3/4, Nanog, CREB, NF-kB προσδένονται στον υποκινητή των lncRNAs ρυθμίζοντας την έκφραση τους [202].

Έχει παρατηρηθεί ότι τα lncRNAs έχουν σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστές στην εμβρυογένεση συμμετέχοντας στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την συμμετοχή τους στον έλεγχο και εξειδίκευση της έκφρασης γονιδίων-στόχων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους [203],[204]. Τα lncRNAs χαρακτηρίζονται ως διακόπτες της γονιδιακής έκφρασης συμμετέχοντας σε όλα τα στάδια της διαδικασίας αυτής ενώ έχει παρατηρηθεί ότι δρουν για μικρό χρονικό διάστημα [205],[206]. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι αποκρίνονται σε ποικίλα σήματα και ρυθμίζουν διάφορα σήματα, καθώς εκφραζόμενα σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και στάδιο της ανάπτυξης του ατόμου ελέγχουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων και επάγουν ειδικά αναπτυξιακά στοιχεία σε κάθε περίπτωση [207]. Έχει ακόμη, αποδειχθεί ότι είναι ανεξάρτητα μετάγραφα και όχι τυχαία παραπροϊόντα της μεταγραφής [208]. Αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι τα lncRNAs αποτελούν εναλλακτικά μετάγραφα τονίζοντας την ακρίβεια στην ρύθμιση και επεξεργασία της έκφραση τους [209].

#### **1.5.4 Μηχανισμός δράσης των lncRNAs**

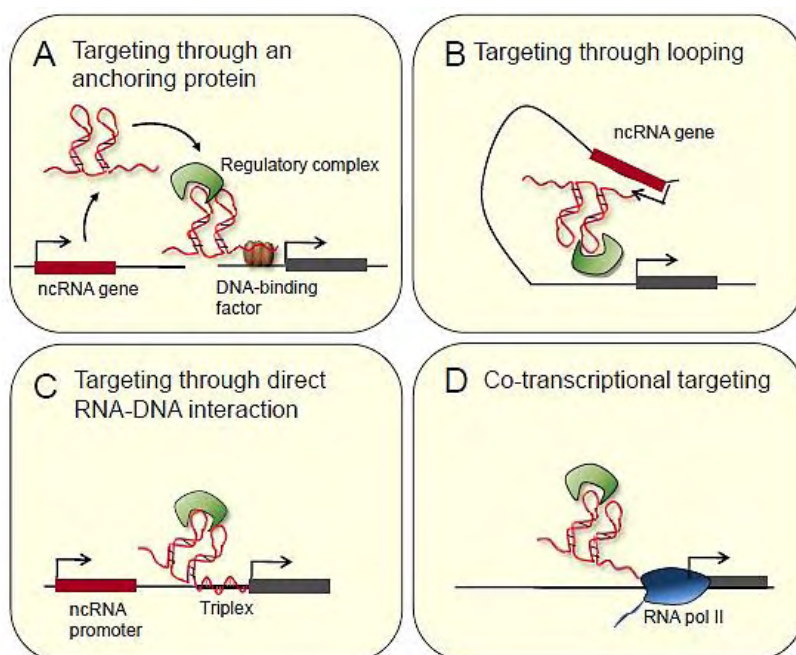
Τα lncRNAs συμμετέχουν σε πολλές διεργασίες του κυττάρου έχοντας ρυθμιστικό και δομικό ρόλο. Βασικός παράγοντας που υποδηλώνει τον μηχανισμό δράσης των lncRNA είναι ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός. Γενικά τα πυρηνικά lncRNA προσδένονται στην χρωματίνη, είτε απευθείας μέσω αλληλεπιδράσεων με το DNA είτε έμμεσα μέσω σχηματισμού συμπλόκων με μεταγραφικούς παράγοντες ενώ σημαντικός χαρακτηρίζεται ο ρόλος τους στην συγκρότηση της δομής της χρωματίνης [210]. Ειδικότερα σημειώνεται ο ρόλος τους στην απενεργοποίηση χρωμοσωμάτων, στην τροποποίηση των διαμορφώσεων της χρωματίνης και των ιστονών καθώς και στις επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA [211]. Η τροποποίηση της διαμόρφωσης της χρωματίνης επιτυγχάνεται με την στρατολόγηση παραγόντων που μεταβάλλουν την δομή της σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος,[212],[213] ενώ μέσω της αλληλεπίδρασης τους με μόρια lncRNA ειδικεύεται η πρόσδεση τους στην χρωματίνη [214], [215]. Η αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων μέσω lncRNA μεταβάλλει την προσβασιμότητα από τους μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση γονιδίων-στόχων [216],[217].

Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων επιτυγχάνεται και μέσω άλλων επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως η μεθυλίωση, η ακετυλίωση[218] καταστέλλοντας ή ενεργοποιώντας την έκφραση ορισμένων γονιδιωματικών περιοχών συγκεκριμένων



για τον κάθε κυτταρικό τύπο αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την συμβολή των lncRNAs στον καθορισμό της κυτταρικής γενεαλογίας [219]. Παραδείγματα lncRNAs που εμφανίζουν τον συγκεκριμένο τρόπο δράσης αποτελούν τα AIR, HOTAIR (HOX Transcript Antisense RNA), KCNQ1OT1 και XIST [220]. Επιπλέον, lncRNAs, τα οποία εκφράζονται κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης συμπλοκοποιούνται με τις πρωτεΐνες WDR5/MLL καθορίζοντας την έκφραση ορισμένων γονιδίων και κατ' επέκταση την κυτταρική γενεαλογία [221].

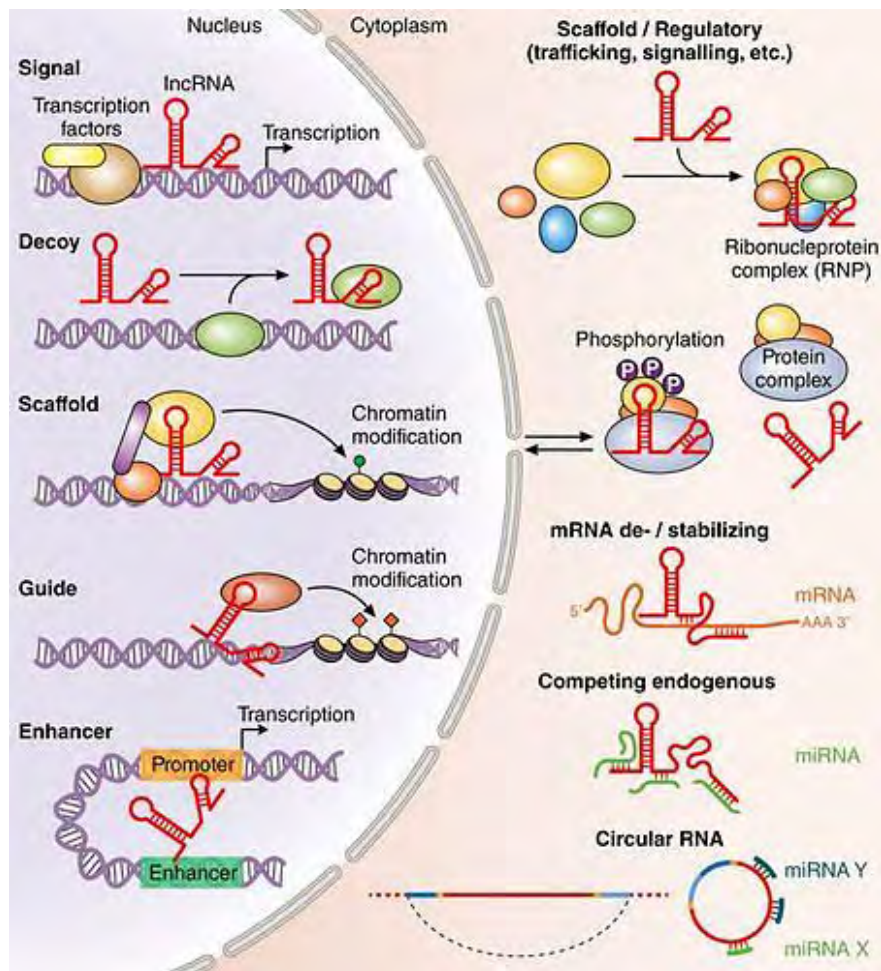
Συνεπώς τα lncRNAs αποκρίνονται σε εξωγενή σηματοδότηση και με την σειρά τους ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που είναι εξειδικευμένα ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Συγκεκριμένα, τα αντινοσηματικά lncRNAs ελέγχουν την έκφραση των κωδικοποιητικών γονιδίων, με τα οποία έχουν συμπληρωματική αλληλουχία [222]. Επίσης, πολλά lncRNAs δρουν ως συμπαραγόντες ρυθμίζοντας την ενεργότητα ενός μεταγραφικού παράγοντα κατευθύνοντας τον σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, όπως σε υποκινητές ορισμένων γονιδίων με σκοπό την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων [223],[224],[225]. Αντίστοιχα, ρυθμίζουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων μέσω της πρόσδεση τους σε ενισχυτές και ειδικότερα μέσω της συμβολής τους στην αλληλεπίδραση μεταξύ ενισχυτή και υποκινητή σταθεροποιώντας βρόγχους χρωματίνης [223]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι πρόσδεση κάποιων lncRNA σε μεταγραφικούς παράγοντες αναστέλλει την δράση τους και κατ' επέκταση την έκφραση των γονιδίων-στόχων [224],[225],[226] ενώ άλλα lncRNA συμμετέχουν σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των mRNA, όπως το μάτισμα, ή η σταθερότητα του ώριμου mRNA [227], [228].



**Εικόνα 16.** Μηχανισμοί ρύθμισης γονιδίων μέσω δημιουργίας συμπλόκου που αποτελείται από παράγοντες ελέγχου της χρωματίνης και lncRNA. Α) Ρύθμιση του γονιδίου μέσω πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης που συνδέεται στο DNA, Β) Μέσω δημιουργίας βρόχου χρωματίνης, Γ) άμεση αλληλεπίδραση DNA-RNA, Δ) Μέσω μεταφοράς πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την μεταγραφή σε ανάλογες θέσεις [225].

Στο κυτταρόπλασμα τα lncRNAs προσδένονται τόσο στο mRNA όσο και στην πρωτεΐνη επηρεάζοντας την σταθερότητα τους και αναστέλλοντας την περαιτέρω

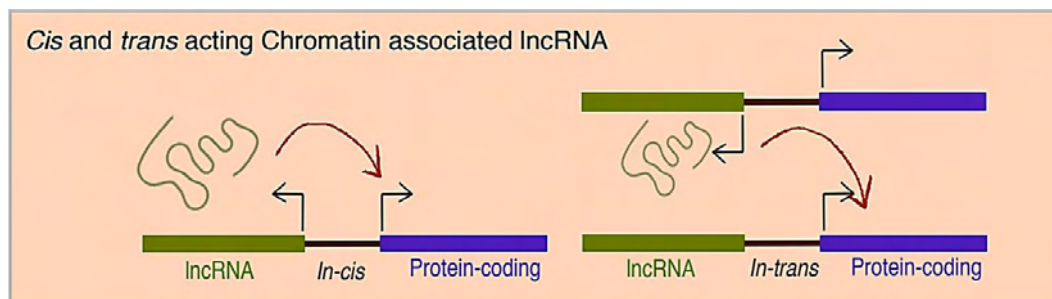
έκφραση τους. Ακόμη, στο κυτταρόπλασμα τα ceRNAs (competing endogenous), τα οποία περιλαμβάνουν τα circRNAs, και τα ψευδογονίδια, συνιστούν lncRNAs και περιέχουν κοινές περιοχές με mRNA που αναγνωρίζονται από miRNA [229], [230]. Συγκεκριμένα, τα ψευδογονίδια ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης τους μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στο γονιδίωμα του κυτάρου, καθώς και τα δύο αναγνωρίζονται από τα ίδια miRNA. Επίσης, miRNA στοχεύουν τα lncRNAs με σκοπό να παραχθούν siRNA, τα οποία στη συνέχεια θα στοχεύσουν άλλα RNA. Αυτό υποδεικνύει επίσης, ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των lncRNAs (Εικόνα 17) [231], [232].



**Εικόνα 17.** Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών λειτουργιών των lncRNAs. Το πυρηνικό lncRNA ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων με τους εξής μηχανισμούς: αποκρίνεται σε ερεθίσματα (signal), δρα ως σκαλωσιά προσδένοντας μέσω χαλαρής σύνδεσης σύμπλοκα πρωτεϊνών (scaffold), κατευθύνει μεταγραφικούς παράγοντες σε συγκεκριμένα γονίδια (guide), αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες αναστέλλοντας την έκφραση γονιδίων (decoy) και συμβάλλει στην αλληλεπίδραση του ενισχυτή και του υποκινητή μέσω χρωμοσωμικού βρόχου (enhancer). Το κυτταροπλασματικό lncRNA σταθεροποιεί τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και ρυθμίζει την σταθερότητα του mRNA [228].

Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί δεκάδες χιλιάδες lncRNAs μερικά από τα οποία, όπως τα HOX, H19, AIR, και KCNQ1OT1 έχουν *Cis* ρυθμιστική δράση ελέγχοντας την έκφραση γειτονικών γονιδίων σε αντιδιαστολή με την *Trans* ρυθμιστική δράση μέσω της οποίας ρυθμίζονται απομακρυσμένα γονίδια (Εικόνα 18) [233],[188]. Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σε απομακρυσμένες θέσεις από τα lncRNAs ή ακόμη και

σε διαφορετικό χρωμόσωμα είναι εφικτή μέσω της συμπληρωματικότητας DNA-RNA ή μέσω της δομής τριών αλυσίδων RNA-DNA [234] ή έπειτα από αλληλεπίδραση συμπλόκων τροποποίησης χρωματίνης, μεταγραφικών παραγόντων και γενικά πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στις οποίες το lncRNA δρα ως σκαλωσιά [235], [236], [237].



**Εικόνα 18.** Σχηματική αναπαράσταση της Cis και Trans δράσης των lncRNAs. [235].

Συγκεκριμένα, σε διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν το lincRNA-p21 επιβεβαιώθηκε ότι η απουσία αλληλεπίδρασης του συγκεκριμένου lncRNA με την πρωτεΐνη hnRNPK, ανέστειλε την πρόσδεση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε γονιδιωματικές συντεταγμένες-στόχους του DNA [238]. Επίσης, διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν το lncRNA HOTAIR εμφανίζουν αναπτυξιακά προβλήματα [239].

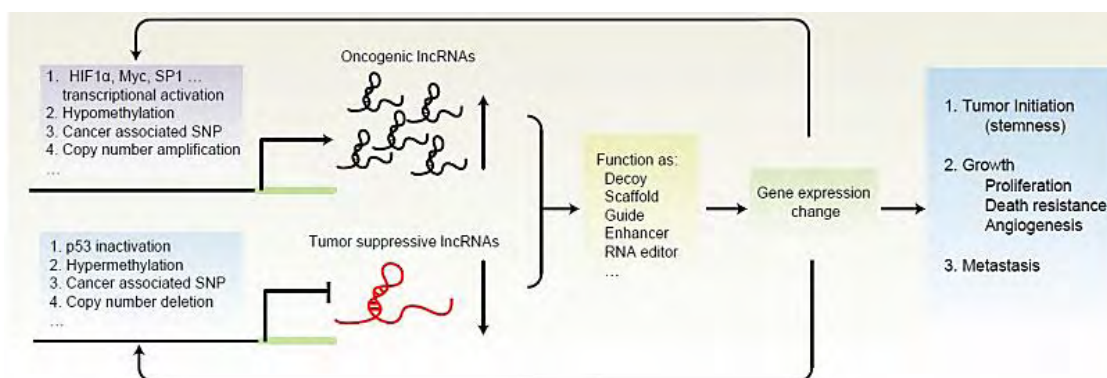
### 1.5.5 LncRNAs και καρκίνος

Όπως αναφέρθηκε τα lncRNAs, συχνά εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τον ιστό στον οποίο εκφράζονται, καθώς αποτελούν ρυθμιστές της κυτταρικής γενεαλογίας [240] και επομένως η μεταβολή της έκφρασης τους σε ενήλικους ιστούς συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου [241]. Ενώ λοιπόν, διαπιστώνεται η δράση τους σε ορισμένους φυσιολογικούς ιστούς, η έκφραση τους μπορεί να μεταβληθεί επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με καρκινικούς φαινότυπους όπως ο κυτταρικός κύκλος, ή η αναστολή της απόπτωσης [242]. Η αλλαγή στην έκφραση τους οφείλεται σε επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως μεθυλίωση του υποκινητή των lncRNAs, τροποποίηση της χρωματίνης στον γενετικό τόπο του lncRNA, ενώ σημαντικό ρόλο έχουν και τα miRNAs, τα οποία αναγνωρίζουν συμπληρωματικές περιοχές του lncRNA και το αποικοδομούν. Ακόμη, τα lncRNAs αποδεικνύεται ότι έχουν ρόλο σε καρκίνους που σχετίζονται με τους ιστούς που έχουν δράση [243]. Εξαιτίας λοιπόν της ιστοειδικότητας, ορισμένα lncRNAs συσχετίζονται με την εμφάνιση συγκεκριμένου υπότυπου καρκίνου [244], ενώ επίσης παρατηρείται εξειδίκευση και ως προς το στάδιο της ασθένειας. Αυτό σημαίνει ότι τα lncRNAs μπορεί να έχουν ρόλο σε ένα συγκεκριμένο υπότυπο καρκίνου, είτε ως καταστολείς όγκων είτε ως ογκογονίδια που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυτάρων (**Εικόνα 19**) [245],[246].

Πιο αναλυτικά, στον καρκίνο ενισχύεται η έκφραση των lncRNAs που έχουν ογκογόνο δράση, όπως είναι τα lncRNAs SRA, και PRNCR1 (Prostate Cancer Associated Non-Coding RNA 1), τα οποία αναστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που επάγουν απόπτωση και επάγουν την έκφραση αυτών που εντείνουν τον πολλαπλασιασμό των κυτάρων, ενώ τα lncRNAs που δρουν ως καταστολείς των όγκων έχουν περιορισμένη έκφραση στον καρκίνο [247]. Συγκεκριμένα, lncRNAs όπως το ANRIL που δρουν ως καταστολείς όγκου περιορίζουν την έκφραση γονιδίων – και συγκεκριμένα το γονίδιο CDKN2 [248] και το p15INK4B [249] - ενώ άλλα lncRNAs, όπως το MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) [250], συμβάλλουν στην



ογκογένεση ενεργοποιώντας αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια που ευθύνονται για την ανάπτυξη του καρκίνου και παράλληλα εμπλέκονται στην μετάσταση μαζί με άλλα ογκογόνα lncRNAs (όπως το HOTAIR) [251]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι και το lncRNA HOTAIR έχει ρόλο στον πρωτεύοντα καρκίνο του μαστού και ειδικότερα στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του μαστού ενώ υπερέκφραση αυτού μπορεί να οδηγήσει σε μετάσταση [252],[253]. Ειδικότερα, προσδένεται στο σύμπλοκο PRC2, το οποίο βρίσκεται σε άλλο χρωμόσωμα και συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου [254]. Επίσης, υψηλά επίπεδα του lncRNA HOTAIR έχουν εντοπιστεί σε μεταστάσεις στον καρκίνο του στομάχου, του ήπατος, του παχέος εντέρου και του οισοφάγου ενώ το MALAT1 (NEAT2) έχει ρόλο σε μεταστάσεις στον καρκίνο της ουροδόχου και του παχέος εντέρου και του πνεύμονα. Αντίθετα η απώλεια του HOTAIR αναστέλλει την εξέλιξη του καρκίνου. Αντίστοιχα το lncRNA HULC (Hepatocellular Carcinoma Up-Regulated Long Non-Coding RNA) έχει υψηλή έκφραση σε ηπατοκαρκινώματα [255], [216],[209],[256]. Ακόμη, άλλα lncRNAs, όπως το MEG3 (Maternally Expressed 3) δρουν ως καταστολείς όγκων, καθώς αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και δεν ανιχνεύονται σε περιπτώσεις όγκων [257]. Στον καρκίνο εντοπίζεται μεταβολή στην έκφραση του H19, το οποίο ανάλογα με τον παράγοντα που τον ρυθμίζει δρα είτε ως ογκογόνο είτε ως ογκοκατασταλτικό. Ειδικότερα, το lncRNA H19 έχει ρόλο στο γονιδιακό εντύπωμα [197] και παρατηρείται αυξημένη έκφραση του, στον καρκίνο του οισοφάγου, του παχέος εντέρου και του μεταστατικού ήπατος [258], [259]. Δεν πρέπει επίσης να παραλειφθεί το γεγονός ότι τα lncRNAs σχετίζονται με σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, όπως είναι τα μονοπάτια που ρυθμίζονται από το p53, τον NF- κB (Nuclear Factor Kappa B), καθώς η έκφραση των lncRNA επηρεάζει την έκφραση των παραγόντων [260],[261].



**Εικόνα 19.** Μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης λόγω απορρύθμισης της έκφρασης των lncRNAs, τα οποία μέσω διαφόρων μηχανισμών δράσης συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Η αλλαγή της έκφρασης των lncRNAs οφείλεται σε επιγενετικές και γενετικές τροποποιήσεις αυτών [259].

Παραδείγματα lncRNAs στον καρκίνο του στομάχου αποτελούν το lncRNA-p21 και το AFDN-DT, τα οποία μειορρυθμίζονται, ενώ επίσης η περιορισμένη έκφραση τους σχετίζεται και με τον υψηλό ρυθμό μετάστασης [262]. Ειδικότερα, όσον αφορά το lncRNA AFDN-DT υψηλή έκφραση αυτού έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της έκφρασης ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων FOS και JUN στον καρκίνο του στομάχου [263]. Αντίθετα στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου αυξήθηκε η έκφραση των ογκογόνων lncRNAs OIP5-AS1 και UCA1, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [264],[265]. Ακόμη, το lncRNA FENDRR μειορρυθμίζεται στον καρκίνο του στομάχου, και μπορεί να οδηγήσει σε μετάσταση. Επίσης, εντοπίζεται υψηλή έκφραση του ncRNA HOXA11-AS στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, το οποίο

δρα ως σκαλωσιά προσδένοντας διάφορες πρωτεΐνες, αναστέλλοντας την έκφραση ορισμένων γονιδίων με σκοπό την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [172]. Αυτό όμως δεν παρατηρείται στους άλλους τύπους καρκίνου ενισχύοντας έτσι την ειδικότητα των lncRNAs και σε επίπεδο ασθένειας. Ένα ακόμη lncRNA το οποίο αυξορρυθμίζεται στον καρκίνο του στομάχου είναι το MACC1-AS1, το οποίο σε καταστάσεις μεταβολικού στρες επιτρέπει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [182]. Επιπλέον, στην συγκεκριμένη νόσο εντοπίζεται υψηλή έκφραση του lncRNA PVT1, το οποίο φυσιολογικά έχει σημαντικό ρόλο στην πρόωμη ανάπτυξη κατά το στάδιο της εμβρυογένεσης [266] καθώς και του lncRNA AC093818.1, η αυξημένη έκφραση του οποίου προωθεί την μετάσταση στους πνεύμονες και στο ήπαρ [267].

Έχει διαπιστωθεί ότι η απορρύθμιση των lncRNAs σχετίζεται και με την αποτελεσματικότητα στην αντικαρκινική θεραπεία [268]. Παράδειγμα αποτελεί το lncRNA GAS5 (ογκοκατασταλτικό γονίδιο), το οποίο αποικοδομείται από τον παράγοντα m6A, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να είναι περισσότερα ανθεκτικά στην θεραπεία [269]. Ακόμη, το lncRNA MRUL (MDR-related and upregulated lncRNA) έχει υψηλή έκφραση στον καρκίνο του στομάχου και κυρίως στις σειρές, στις οποίες παρατηρήθηκε αντίσταση στην θεραπεία, και επομένως θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μελλοντικό στόχο για την αντιμετώπιση της ασθένειας αυτής [270].

Επίσης, αρκετά lncRNAs εντοπίζονται στον ορό και στο πλάσμα αφού εσωκλείονται σε εξωσώματα ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την άποψη ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες [253]. Παράδειγμα αποτελούν τα lncRNAs PCA3, PCGEM1, και PCNCR1 που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη [247].

Mechanistic Classification	LncRNA	Cancer/Cell Type	Functional Impact
	NEAT1	Prostate	Cell proliferation and invasion
	TUG1	Glioma	Maintenance of stemness features of Glioma Stem Cells (GSCs) through exon 1
	MEG3	Breast	Not well defined
<b>Histone methylation</b>	HOTAIR	Breast	Cell invasion and metastasis
	HOTTIP	Human Fibroblast	Gene Activation
	ANRIL	Fibroblast cell lines	Promotes cell proliferation
	LUCAT1	NSCLC	Cell proliferation
<b>Histone Acetylation</b>	lncPRESS1	Embryonic stem cells	ESCs differentiation process
<b>DNA methylation</b>	TARID	Head, neck, skin	Not well defined

Post-Translational modification	ANCR	Breast	Repression of breast cancer cells migration and invasion
	LUCAT1	Esophagus	Impact on Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) proliferation, migration and apoptosis
	MEG3	Gallbladder cancer (GBC)	Cell proliferation and apoptosis, Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) progression, cell invasion
Nuclear/Chromatin 3D architecture	ThymoD	T-cells	Lymphoid malignancy
	Promoter of PVT1	Breast	Cancer cell growth
	NEAT1	Paraspeckles	Liver cancer
Epigenetically regulated lncRNAs	NKILA	T cells	Tumor immune evasion
	TP53TG1	Colon	Chemoresistance

**Εικόνα 20.** *lncRNAs* που εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνου μέσω ρύθμισης της χρωματίνης και ποια είναι λειτουργικά η επίδραση τους στον καρκίνο [257].

Συνοψίζοντας, αρκετά *lncRNAs* σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου, του στομάχου, του ήπατος, του μαστού και του προστάτη, καθώς απορρυθμίζεται η έκφραση τους. Αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι τα *lncRNAs* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξειδικευμένοι βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου και την πρόβλεψη της απόκρισης στην θεραπεία ενώ ταυτόχρονα μελετώνται και ως θεραπευτικοί στόχοι. Επίσης, θεωρούνται καλοί θεραπευτικοί στόχοι, καθώς η έκφραση τους είναι εξειδικευμένη για ορισμένους τύπους καρκίνου και δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων. Συνεπώς, είναι αναπόδραστη η ανάγκη της περαιτέρω κατανόησης των *lncRNAs* ως προς την θέση τους στο γονιδίωμα, τις λειτουργίες τους, τους μηχανισμούς δράσης και τις δομές που δημιουργούν με πρωτεΐνες του κυττάρου τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όσο και στον καρκίνο.

## **2. Σκοπός της εργασίας**

Στον καρκίνο του στομάχου σημειώνεται αύξηση του κόστους των θεραπειών στα προχωρημένα στάδια της ασθένειας συγκριτικά με τα αρχικά στάδια της νόσου (Εικόνα 7). Επομένως, λόγω της αυξημένης ανάγκης για εύρεση νέων μη επεμβατικού τύπου διαγνωστικών μεθόδων έγκαιρης και εξειδικευμένης ανίχνευσης της νόσου, καθώς και νέων θεραπευτικών στόχων, μελετώνται τα lncRNAs, τα οποία ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων κατά το στάδιο της εμβρυογένεσης ενώ η έκφραση τους εμφανίζει ιστο- και καρκινοειδικότητα. Επίσης, συχνά η έκφραση τους απορρυθμίζεται στον καρκίνο λόγω της μεταβολής της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων που τα ρυθμίζουν.

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση lncRNA που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα GATA4 με σκοπό την ανάπτυξη βιώσιμων και εξειδικευμένων θεραπειών καθώς και μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων. Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 συνιστά ένα ογκογονίδιο, το οποίο έχει ρόλο στην ρύθμιση αναπτυξιακών διαδικασιών και στην διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών γενεαλογιών. Στο καρκινικό γονιδίωμα του στομάχου ο γενετικός τόπος ενισχύεται σε πολλαπλά αντίγραφα με αποτέλεσμα την υπερέκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του όγκου. Ωστόσο λόγω της συμμετοχής του GATA4 σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες στους ιστούς δεν μπορεί να αποτελέσει άμεσο θεραπευτικό στόχο. Γι' αυτό το λόγο στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θα μελετηθούν lncRNAs, τα οποία ρυθμίζονται μεταγραφικά από τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα και πιθανόν εξειδικεύουν την δράση του στον καρκίνο του στομάχου. Επίκεντρο της εργασίας είναι το lncRNA GREIT4-1 (Gata Regulated lincRNA Gastric), στον υποκινητή του οποίου προσδένεται η πρωτεΐνη GATA4 σε καρκινικά κύτταρα στομάχου. Επιπροσθέτως, το συγκεκριμένο lncRNA εμφανίζει εξειδίκευση της έκφρασης του ως προς τον ιστό και τον κυτταρικό τύπο, ενώ παρατηρείται αυξορρύθμιση του στον καρκίνο του στομάχου. Οι ιδιότητες αυτές συνδυαστικά καθιστούν ελκυστική την μελέτη της ρύθμισης του GREIT4-1 από το μεταγραφικό παράγοντα GATA4 και το συσχετισμό αυτής με τον καρκινικό φαινότυπο.

Στην παρούσα διατριβή, αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κωδικοποιητικού δυναμικού του GREIT4-1 ώστε να επιβεβαιωθεί ο μη κωδικοποιητικός του χαρακτήρας και στην συνέχεια μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης έχοντας RNA-seq δεδομένα από βιοψίες καρκινικές κυτταρικές σειρές και από φυσιολογικούς ιστούς ενήλικων ατόμων, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 και του GATA4 σε ιστούς στομάχου. Ακολούθησε πειραματικός υποκυτταρικός εντοπισμός του GREIT4-1 και καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου με σκοπό την πειραματική απόδειξη της ρύθμισης του GREIT4-1 από την πρωτεΐνη GATA4.

Απώτερος στόχος της πτυχιακής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση του GREIT4-1 ως πιθανού διαγνωστικού βιοδείκτη αλλά και θεραπευτικού στόχου για τον καρκίνο του στομάχου.

### **3. Υλικά και μέθοδοι**



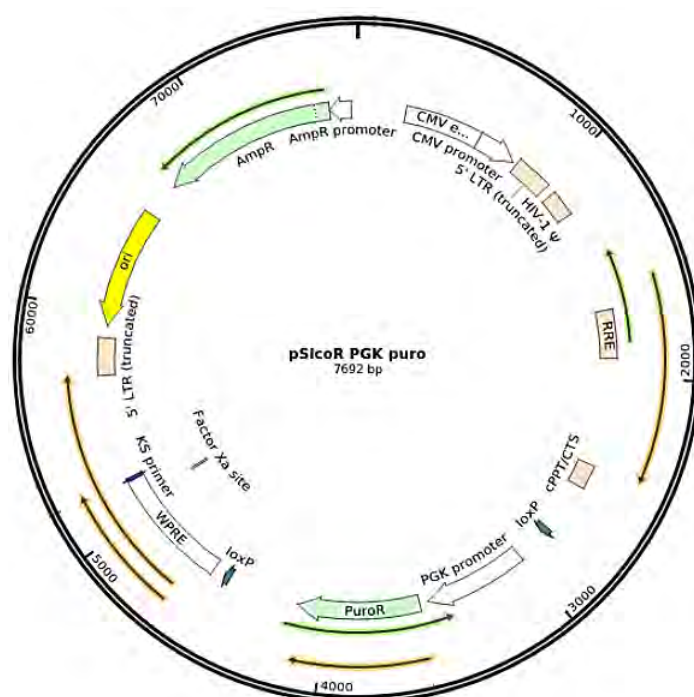
### 3.1 Υλικά

#### 3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς

Στην συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pSiCoR ώστε να ενσωματωθούν σε αυτόν shRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι του GREIT4-1 με σκοπό την σίγηση του συγκεκριμένου μεταγράφου. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν siRNA αλληλουχίες του GREIT4-1 και στην συνέχεια shRNA αυτού με κατάλληλα άκρα. Επομένως, με την εισαγωγή των πλασμιδιακών αυτών φορέων που φέρουν το ένθεμα αυτό επιτυγχάνεται σίγηση των μεταγράφων του GREIT4-1.

#### pSiCOR PGK puro

Ο πλασμιδιακός φορέας pSiCOR PGK puro έχει μέγεθος 7692 bp και έχει τα χαρακτηριστικά εκείνα που του επιτρέπουν να χρησιμοποιείται ως φορέας ένθεσης ενός ενθέματος. Συγκεκριμένα επιτρέπει την παροδική έκφραση shRNA και σε σύντομο χρονικό διάστημα (2-3 ημέρες) είναι εφικτή η παρατήρηση του φαινοτύπου λόγω της δράσης του shRNA. Επίσης, διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας σε πουρομυκίνη για την επιλογή των κυττάρων των θηλαστικών και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη για την επιλογή βακτηριακών κυττάρων. Επιπλέον, η πουρομυκίνη και το shRNA πλαισιώνονται από θέσεις LoxP, ενώ μετά την έκφραση της Cre ρεκομπινάσης απομακρύνονται τα γονίδια. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται η υπό συνθήκη σταθερή έκφραση του shRNA. Ωστόσο στην παρούσα εργασία δεν αξιοποιήθηκαν η Cre ρεκομπινάση και η πουρομυκίνη.



Εικόνα 21. Χάρτης του πλασμιδίου pSiCOR PGK puro (από την Addgene).

#### 3.1.2 Αντιδραστήρια

Σύσταση **annealing buffer 10X**: 1M NaCl και 100mMTris-HCl

### 3.1.3 Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών

Για την εύρεση των χαρακτηριστικών ανθρώπινων κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν οι εξής βάσεις δεδομένων: ATTC Cell Biology Collection, Cellosaurus, Cellbank, Dermap, Portal και Cosmic. Η αναζήτηση των πληροφοριών για τις κυτταρικές σειρές επιτυγχάνεται εισάγοντας το όνομα της κυτταρικής σειράς στις βάσεις δεδομένων. Αναλυτικά οι διαθέσιμες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας μελέτης, και τα χαρακτηριστικά αυτών βρίσκονται στον **Πίνακα 1**.

Κυτταρική σειρά	Ασθένεια	Πρωτεύων/Μεταστατικό	Ιστός προέλευσης
HFE	-	-	Φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου
AGS	Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα	Πρωτεύων	
KATOIII	Καρκίνος του στομάχου (Signet ring cell gastric adenocarcinoma)	Μεταστατικό	Πλευρική μετάσταση (pleural effusion and supraclavicular and axillary lymph nodes)
MKN45	Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα	Μεταστατικό	Ήπαρ
NUGC4	Καρκίνος του στομάχου (Signet ring cell gastric adenocarcinoma)	Μεταστατικό	Παραγαστρικός λεμφαδένας
HT29	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Πρωτεύων	
HCT116	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Πρωτεύων	
MCF7	Καρκίνος του μαστού	Μεταστατικό	Πλευρά (pleural effusion)
SKBR3	Αδενοκαρκίνωμα μαστού	Μεταστατικό	Πλευρά (pleural effusion)
HeLa 2	Human papillomavirus-related endocervical adenocarcinoma		

Πίνακας 1. Κυτταρικές σειρές που αξιοποιούνται στην παρούσα εργασία.

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

#### 3.2.1.1 Ανάλυση κωδικού δυναμικού του lncRNA

Για την ανάλυση του κωδικοποιητικού δυναμικού του lncRNA GREIT4-1, χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά προγράμματα Coding Potential Calculator 2 (CPC2) [271] και Coding-Potential Assessment Tool (CPAT) [272]. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του ώριμου μεταγράφου του GREIT4-1 σε FASTA μορφή, καθώς και οι αλληλουχίες ήδη γνωστών κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών γονιδίων. Πιο αναλυτικά ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των γονιδίων ACTIN-b, GAPDH, RPLP1, τα οποία αντιστοιχούν στα κωδικοποιητικά μετάγραφα, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν οι



αλληλουχίες των γονιδίων MALAT1, NEAT1, HOTAIR, HOTTIP, GAS5 και linc01234 που αντιστοιχούν στα γνωστά μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNAs). Προκειμένου να απεικονιστούν τα αποτελέσματα έγινε χρήση του προγράμματος Microsoft excel.

### **3.2.1.2 Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και του GATA4 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές**

Από RNA-seq δεδομένα 1020 καρκινικών κυτταρικών σειρών από όλους τους τύπους καρκίνου πραγματοποιήθηκε ανάλυση στο Microsoft excel με σκοπό τον σχηματισμό γραφημάτων. Συγκεκριμένα, πρόκειται για δεδομένα RPKM, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί λογαρίθμηση, και τα οποία αφορούν το γονίδιο GREIT4-1 και τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4. Ο αριθμός των 1020 καρκινικών κυτταρικών σειρών αντιστοιχεί στο κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Τα δεδομένα αυτά ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου. Έπειτα από την ομαδοποίηση των καρκινικών κυτταρικών σειρών με γνώμονα τον ιστό που εμφανίζεται ο καρκίνος, δημιουργήθηκαν θεκογράμματα (boxplots), στα οποία αναπαρίστανται τα επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 και του GATA4 στους διάφορους τύπους καρκίνου. Επιπλέον, κατασκευάστηκαν boxplots τόσο για το GATA4 όσο και για το GREIT4-1 εστιάζοντας στις κυτταρικές σειρές του γαστρεντερικού συστήματος και συγκεκριμένα του στομάχου, του οισοφάγου, του λεπτού και του παχέος εντέρου, καθώς και στις κυτταρικές σειρές του ήπατος και του παγκρέατος που είναι συγγενικοί με το γαστρεντερικό σύστημα. Συνολικά οι κυτταρικές σειρές για την συγκεκριμένη ανάλυση του καρκίνου του ευρύτερου γαστρεντερικού είναι 187.

Στην συνέχεια αξιοποιώντας μόνο τις καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου, οι οποίες αντιστοιχούν στις 37 από τις 1020 κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των δεδομένων ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας. Πιο συγκεκριμένα, έγινε διαχωρισμός ανάλογα με το αν είναι σε πρωταρχικό όγκο, αν έχουν προέλθει από μεταστατική θέση και ειδικότερα ως προς την μετάσταση έγινε η διάκριση, η οποία σχετίζεται με το αν είναι σε λεμφικούς αδένες και παραγαστρικούς λεμφικούς αδένες. Έτσι, με βάση αυτή την ομαδοποίηση των καρκινικών κυτταρικών σειρών του στομάχου δημιουργήθηκαν boxplots για το GREIT4-1 και για το GATA4 ώστε να γίνει δυνατή η μελέτη των επιπέδων έκφρασης αυτών των γονιδίων στα διαφορετικά στάδια της νόσου.

### **3.2.1.3 Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και μεταγραφικών παραγόντων σε βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών**

Από RNA-seq δεδομένα 375 Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και 40 φυσιολογικών παρακείμενων ιστών για το κάθε γονίδιο που μελετάται διεξήχθη ανάλυση σε Microsoft excel ώστε να κατασκευαστούν διαγράμματα. Πιο αναλυτικά, αυτά τα δεδομένα αφορούν το GREIT4-1, το GATA4, το KLF5 και το GATA6. Ο αριθμός των δεδομένων (375 από βιοψίες και 40 από παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς) αφορά το κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Επίσης, τα δεδομένα των 375 βιοψιών των ασθενών περιλαμβάνουν δεδομένα από όλα τα στάδια του καρκίνου του στομάχου, και συγκεκριμένα από τα εξής στάδια: Stage I, Stage II, Stage III, Stage IV, Stage NA. Το στάδιο NA αφορά βιοψίες που με ιστολογικά κριτήρια δεν επιτεύχθηκε η ταξινόμηση τους. Ακόμη τα δεδομένα από παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς αφορούν παρακείμενους ιστούς ασθενών δηλαδή σε ένα σημείο του στομάχου όπου δεν εντοπίζονται ιστολογικά ευρήματα. Τα RNA-seq δεδομένα για το GREIT4-1, και για

τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και GATA6, κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το αν αντιστοιχούν σε βιοψίες ατόμων που εμφάνισαν καρκίνο ή σε βιοψίες φυσιολογικού παρακείμενου ιστού. Έπειτα, δημιουργήθηκαν boxplots με σκοπό την ανάλυση της έκφρασης των GREIT4-1, GATA4, και GATA6.

Στην συνέχεια, τα δεδομένα για το GREIT4-1 ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου. Συγκεκριμένα, από τα 375 δεδομένα RNA-seq τα 53 αντιστοιχούν στο Stage I, τα 111 στο Stage II, τα 150 στο Stage III, τα 38 στο Stage IV, και τα 23 στο Stage NA. Επομένως, δημιουργήθηκαν boxplots με σκοπό την μελέτη της έκφρασης του GREIT4-1 για κάθε στάδιο της νόσου συγκριτικά με το φυσιολογικό παρακείμενο ιστό.

Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα RNA-seq 375 Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και 40 φυσιολογικών παρακείμενων ιστών κατασκευάστηκαν scatter plots. Από το συγκεκριμένο τύπο ανάλυσης είναι δυνατή η συσχέτιση της έκφρασης ενός γονιδίου με ένα άλλο. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη συσχετίστηκαν τα γονίδια GREIT4-1 και KLF5 ως προς την έκφραση τους τόσο στην περίπτωση του καρκίνου όσο και στους φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς. Αντίστοιχο scatter plot δημιουργήθηκε και για τα γονίδια GREIT4-1 και GATA4. Η ανάλυση της συσχέτισης προκύπτει από τον συντελεστή συσχέτισης R και το συντελεστή ισχύος  $R^2$  και τα αποτελέσματα των δύο γραφημάτων παρατίθενται σε επόμενη ενότητα.

#### **3.2.1.4 Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 σε βιοψίες Κορεατών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών**

Από RNA-seq δεδομένα 34 Κορεατών ασθενών και 34 φυσιολογικών παρακείμενων ιστών πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε Microsoft excel προς δημιουργία διαγραμμάτων. Τα δεδομένα αφορούν το γονίδιο GREIT4-1. Συγκεκριμένα, ομαδοποιώντας τα δεδομένα σε αυτά του φυσιολογικού παρακείμενου ιστού και σε αυτά που αντιστοιχούν στις βιοψίες ασθενών κατασκευάστηκαν boxplots με σκοπό την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του GREIT4-1 στον καρκίνο σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό στους Κορεάτες ασθενείς.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση από RNA-seq δεδομένα 34 Κορεατών ασθενών και Κορεατών που βρίσκονται σε προκαρκινικά στάδια με σκοπό την δημιουργία boxplots. Τα RPKM δεδομένα, τα οποία έχουν υποστεί λογαρίθμιση, αφορούν το γονίδιο GREIT4-1. Ειδικότερα, στην συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 5 δείγματα από φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, 6 δείγματα από άτομα που εμφανίζουν γαστρίτιδα, 9 δείγματα από άτομα με ατροφική γαστρίτιδα, 6 δείγματα από άτομα που με εκτεταμένη ατροφία, 3 δείγματα από άτομα με εντερική μεταπλασία, και 2 δείγματα από οργανοειδή. Έπειτα από ομαδοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με το προκαρκινικό στάδιο δημιουργήθηκαν boxplots με σκοπό την μελέτη της έκφρασης του GREIT4-1 στα προκαρκινικά στάδια συγκριτικά με το στάδιο της εμφάνισης του καρκίνου.

Ακολούθως, υλοποιήθηκε ανάλυση από RNA-seq δεδομένα 55 φυσιολογικών ενήλικων ιστών, 34 Κορεατών ασθενών και 34 φυσιολογικών παρακείμενων ιστών με στόχο την δημιουργία boxplots. Προκειμένου να κατασκευαστούν τα boxplots κατηγοριοποιήθηκαν τα δεδομένα, τα οποία αφορούν το GREIT4-1, ανάλογα με τον τύπο του φυσιολογικού ιστού ενώ παράλληλα ομαδοποιήθηκαν και τα δεδομένα που αντιστοιχούν στο φυσιολογικό παρακείμενο ιστό και στον καρκίνο. Με αυτόν τον τρόπο

είναι δυνατή η εκτίμηση των επιπέδων ανίχνευσης του GREIT4-1 στους φυσιολογικούς ιστούς συγκριτικά με την ασθένεια.

Τα συμπεράσματα των αναλύσεων των γραφημάτων (boxplots, scatter plots) παρατίθεται στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

### 3.2.1.5 Ανάλυση συνταινίας-συνέκφρασης στον ποντικό

Για το σκοπό αυτόν αξιοποιήθηκε ο φυλλομετρητής WashU και συγκεκριμένα το εργαλείο γονιδιωματικής στοίχισης.

### 3.2.2 Δημιουργία δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων των shRNA (annealing) και αντίδραση λιγάσης (ligation).

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η δημιουργία dsDNA (δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων) ώστε στην συνέχεια να πραγματοποιηθεί η αντίδραση λιγάσης με τον φορέα pSicoR. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία ο φορέας έχει υποστεί πέψη με κατάλληλα ένζυμα ενώ κατάλληλα προεξέχοντα άκρα έχουν και τα ολιγονουκλεοτίδια των shRNA ώστε να γίνει σωστά η ενσωμάτωση του ενθέματος στο φορέα. Από το dsDNA που έχει εισαχθεί στο πλασμίδιο, προκύπτει το shRNA, το οποίο στην συνέχεια θα καταστείλει το lncRNA GREIT4-1 σε κύτταρα AGS.

Αρχικά, πραγματοποιείται επαναδιάλυση των ολιγονουκλεοτιδίων σε ddH<sub>2</sub>O. Στην συνέχεια προκειμένου να υβριδιστούν η νοηματική (sense) και η μη νοηματική (antisense) αλληλουχία γίνεται ανάμειξη των συστατικών του **πίνακα 2**. Το annealing buffer περιέχει Tris-HCl για τη ρύθμιση του pH και NaCl, το οποίο συμβάλλει στον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδίων. Έπειτα ακολουθεί βρασμός στους 95°C για 5 λεπτά σε δοχείο με νερό, το οποίο έχει την απαιτούμενη θερμοκρασία με σκοπό την κατάργηση των δευτεροταγών δομών. Ακολούθως, αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να κατέβει αργά η θερμοκρασία. Με αυτόν τον τρόπο η sense αλληλουχία υβριδίζεται με την antisense αλληλουχία και δημιουργούνται τα δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια (dsDNAs).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Sense oligos (100μM)	2μL
Antisense oligos (100μM)	2μL
Annealing buffer (10x)	96μL

**Πίνακας 2.** Σύσταση της αντίδρασης δημιουργίας dsDNA .

Μόλις η θερμοκρασία κατέβει στους 30°C πραγματοποιείται η αντίδραση της λιγάσης. Συγκεκριμένα, τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή της αντίδρασης λιγάσης καθώς και οι ποσότητες αυτών υπάρχουν στον **πίνακα 3**. Επιπλέον, διεξάγεται και μια αντίδραση λιγάσης για τον αρνητικό μάρτυρα (self ligation). Στο συγκεκριμένο δείγμα αντί για 4μL ενθέματος προστίθενται 4μL H<sub>2</sub>O. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση λιγάσης τα δείγματα εισάγονται στον θερμοκυκλοποιητή. Η σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων με τον φορέα pSicoR διαρκεί 16 h στους 16 °C και στην συνέχεια τα δείγματα παραμένουν στους 4 °C.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer (10x)	2μL
T4 DNA ligase	1μL
Πλασμιδιακός φορέας pSicoR (50 ng/μl)	1μL
Ένθεμα (δίκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια των shRNA)	4μL
H <sub>2</sub> O	12μL
Τελικός όγκος	20μl

Πίνακας 3. Σύσταση της αντίδρασης λιγάσης.

Μετά το πέρας της αντίδρασης λιγάσης τα προϊόντα αυτής χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.

### 3.2.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και εξαγωγή πλασμιδιακού DNA

Ο ανασυνδυασμένος φορέας pSiCOR, ο οποίος περιέχει το ένθεμα shRNA που στοχεύει το GREIT4-1, εισέρχεται σε κύτταρα *E.coli*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται το βακτηριακό στέλεχος XL1Blue, το οποίο φέρει μεταλλάξεις που δεν επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό. Τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται αρχικά στους -80°C απ' όπου μεταφέρονται στον πάγο (4°C). Ακολούθως, γίνεται ανάμειξη 70μL βακτηριακών κυττάρων με 10μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης και επωάζονται στον πάγο για 20 λεπτά. Στην συνέχεια τα κύτταρα υφιστάνται θερμικό σοκ (heatshock) με επώαση για 50sec στο υδατόλουτρο στους 42°C και έπειτα τοποθετούνται για 2 λεπτά στον πάγο. Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης στον πάγο, γίνεται η προσθήκη 920μL θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικό (προστίθενται θρεπτικό μέχρι τελική ποσότητα 1ml). Έπειτα τοποθετείται στον επωαστήρα για 50 λεπτά στους 137°C και στις 167rpm. Ακολούθως, πραγματοποιείται η επίστρωση σε τριβλύα με LB άγαρ παρουσία 100ng/μL αμπικιλίνης και επωάζεται στους 37°C ολόκληρη την νύχτα (overnight) ώστε να μεγαλώσουν οι αποικίες. Ειδικότερα αξιοποιούνται 300μL από την καλλιέργεια για να επιτευχθεί η επίστρωση στο τριβλύο. Την επόμενη μέρα επιλέγεται μοναδιαίος κλώνος, ο οποίος εισάγεται σε 3 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία αμπικιλίνης και επωάζεται στους 37°C overnight στις 210rpm. Ακολουθεί η συλλογή των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 4.500 - 6.000g, στους 4°C. Τέλος πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA με πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης ενώ υπερκάθαρο πλασμίδιο από το θετικό κλώνο απομονώθηκε εκ νέου σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας Macherey Nagel που αφορά τα mini-grep πριν τον μετασχηματισμό σε κύτταρα θηλαστικών.

Τα προηγούμενα ισχύουν και για την απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας πλασμιδιακού DNA που πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας Macherey Nagel Xtra Plasmid purification kit MIDI protocol. Ωστόσο στην περίπτωση αυτή έπειτα από την overnight επώαση στους 37°C γίνεται μεταφορά σε 2mL LB παρουσία αντιβιοτικού για 6h στους 37°C, 210 rpm και τέλος μεταφέρεται σε κωνική με 150mL LB overnight στους 37°C στις 200rpm. Αμέσως μετά ξεκινά η διαδικασία των midi.

### 3.2.4 Διαγνωστικές πέψεις και ηλεκτροφόρηση

Προκειμένου να ελεγχθεί η ένθεση του shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pSiCOR πραγματοποιούνται διαγνωστικές πέψεις. Στην περίπτωση του pSiCOR η διαγνωστική πέψη διεξήχθη δύο φορές με την χρήση ζευγών ενζύμων περιορισμού. Συγκεκριμένα το ένα ζεύγος αντιστοιχεί στα ένζυμα XbaI και SmaI και το άλλο στα ένζυμα BamHI και XbaI. Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Plasmid DNA (pSiCOR)	2μL
Ένζυμο SmaI (MINOTECH)	2μL
Ένζυμο XbaI (MINOTECH)	2μL
Buffer K (MINOTECH)	5μL
H <sub>2</sub> O	39μL
Τελικός όγκος	50μL

Πίνακας 4. Σύσταση διαγνωστικής πέψης για τον φορέα pSiCOR.

Έπειτα από την διαδικασία των mini prep μετράται η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που έχει απομονωθεί στο μηχάνημα Quawell και θέλοντας τελικά να υπάρχει στο δείγμα 500ng πλασμίδιο υπολογίστηκε ότι θα προστεθούν 2μL από το πλασμιδιακό DNA. Στην περίπτωση που υπάρχουν περισσότερα από ένα δείγματα δημιουργείται mix με όλα τα συστατικά του πίνακα εκτός από το πλασμιδιακό DNA. Η πέψη πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2h και στην συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση. Επίσης, στις αντιδράσεις πέψης συμπεριλαμβάνονται δύο δείγματα που αξιοποιούνται το ένα ως θετικό (επιβεβαιωμένο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) και το άλλο ως αρνητικό control (self ligation). Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία προστέθηκαν 5μL από το self ligation και 1μl από το αραιωμένο θετικό control (midi positive shGATA4).

Τα δύο αυτά controls ηλεκτροφορούνται μαζί με τα δείγματα που εξετάζονται με σκοπό την διεξαγωγή συμπερασμάτων. Ειδικότερα, για την δημιουργία της πηκτής αγαρόζης 2% προστίθενται τα εξής: 5g αγαρόζης, 250mL TBE (0,5X), 25μL αιθίδιο. Επίσης, σε κάθε δείγμα εισάγονται 10μL χρωστικής Loading Dye (6x) και τελικά φορτώνονται στην πηκτή 45μL από το κάθε δείγμα. Επιπλέον, η σειρά με την οποία φορτώνονται τα δείγματα είναι η εξής: ladder (7μL), self ligation, θετικό (positive) control, και τα δείγματα μας. Ακόμη, η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 120 Volt.

### 3.2.5 Glycerol stock

Σε δείγματα, στα οποία αποδείχθηκε από το κεφάλαιο 3.2.4 ότι στο πλασμίδιο τους υπάρχει το ένθεμα, δημιουργούνται stocks. Συγκεκριμένα, προστίθενται 750μL από την καλλιέργεια και 250μL γλυκερόλης σε ένα άδειο tube που αποθηκεύονται στους -80°C.

### 3.2.6 Αλληλούχηση

Τα δείγματα που βγήκαν θετικά από τις διαγνωστικές πέψεις στάλθηκαν για αλληλούχηση με σκοπό την επιβεβαίωση της ύπαρξης θετικών κλώνων που έχουν λάβει το πλασμίδιο που φέρει το ένθεμα shRNA. Συγκεκριμένα, σε κάθε tube που στέλνεται για αλληλούχηση προστίθενται χμL από το δείγμα μας (σύμφωνα με την συγκέντρωση του δείγματος μας ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 100ng/μL) και γμL H<sub>2</sub>O. Η εταιρεία, στην οποία στέλνονται τα δείγματα για αλληλούχηση είναι η CeMIA.

Ακολούθως, πραγματοποιείται μετασχηματισμός των πλασμιδιακών φορέων που φέρουν το shRNA στα κύτταρα καρκινικών κυτταρικών σειρών (**Πίνακας 1**). Έπειτα διεξάγεται εξαγωγή του RNA, cDNA synthesis, και ποσοτική PCR.

### 3.2.7 RNA extraction

Η πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος είναι απαραίτητη προκειμένου να είναι εφικτή σε επόμενα στάδια η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του GREIT4-1 σε ορισμένες κυτταρικές σειρές. Αρχικά, γίνεται προσθήκη 1000μL τριζόλης (TRI) στα δείγματα που έχουν ληφθεί από την κάθε κυτταρική σειρά. Έπειτα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και μετά μεταφέρονται κατευθείαν στον πάγο. Ακολουθεί η προσθήκη 200μL χλωροφορμίου στον απαγωγό, ισχυρό vortex για περίπου 30 sec και φυγοκέντρηση σε 14.000 rpm για 5 min στους 4°C. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και το RNA παραμένει στην υδατική φάση. Γι' αυτό το λόγο λαμβάνεται το υπερκείμενο (αντιστοιχεί σε ποσότητα περίπου 550μL) και μεταφέρεται σε ένα δεύτερο tube 1,5mL. Στην συνέχεια προστίθενται 500μL ισοπροπανόλης και 5μL γλυκογόνο - ώστε να γίνει πιο εύκολα η καταβύθιση του RNA και να είναι πιο ευδιάκριτη η πελέτα - και αφού γίνει μία ελαφρά ανακίνηση αφήνονται τα δείγματα στον πάγο για 10 min. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15 min στις 14.000 rpm στους 4°C. Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μL 70% παγωμένης αιθανόλης, γίνεται έντονο vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rpm στους 4°C. Αμέσως μετά απομακρύνεται το υπερκείμενο με την χρήση πιπέτας χωρίς όμως να διαταραχθεί η πελέτα, καθώς εκεί υπάρχει το RNA και αφήνεται στον πάγο με ανοιχτό το καπάκι για 10-15 min ώστε να στεγνώσει τελείως το ίζημα και να μην υπάρχουν σταγόνες αιθανόλης. Μετά γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος με την προσθήκη 50μL RNase free H<sub>2</sub>O, θέρμανση του δείγματος στους 65 °C για 5 min και vortex. Τέλος, γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA που υπάρχει στο tube και του λόγου A260/280 χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Quawell για να ακολουθήσει η αποθήκευση του δείγματος στους -80 °C.

### 3.2.8 DNase treatment

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DNA που υπάρχουν στο δείγμα. Γι' αυτό το λόγο αξιοποιείται το ένζυμο DNάσης, το οποίο κατακερματίζει το DNA έτσι ώστε στο δείγμα να παραμείνει μόνο το RNA. Αρχικά, για την ενζυμική αυτή αντίδραση προστίθενται τα συστατικά του **πίνακα 5** σε νέο άδειο tube.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer (10x)	3μL



<b>Dnase I</b>	1μL
<b>Rnase out</b>	1μL
<b>Total nucleic acid sample</b>	25μl
<b>Τελικός όγκος</b>	30μl

**Πίνακας 5.** Σύσταση της αντίδρασης DNάσης.

Στην περίπτωση που έχουμε περισσότερα από ένα δείγμα δημιουργείται mix με τα συστατικά του **πίνακα 5** εκτός από το sample που προστίθεται ξεχωριστά. Η προσθήκη του Rnase out είναι απαραίτητη καθώς εμποδίζει την δράση των ενζύμων που καταστρέφουν το RNA. Έπειτα από την προσθήκη αυτών των συστατικών του πίνακα γίνεται σύντομο vortex, spin και τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1h. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο και προστίθενται 40μL Sodium Acetate grade (3M pH 5,6) και 330μL ddH<sub>2</sub>O (RNA Water). Ακολουθεί προσθήκη 400μL φαινόλης/χλωροφορμίου στον απαγωγό, vortex για περίπου 1min και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο (~ 385μL) χωρίς όμως να διαταραχθεί η μεσόφαση και εισάγεται σε ένα νέο tube, στο οποίο προστίθενται 1000μL 100% παγωμένης αιθανόλης και 5μL γλυκογόνο. Τα δείγματα αφού υποστούν ανακίνηση διατηρούνται στους -80°C τουλάχιστον για 1h. Μετά τα δείγματα απευθείας από τους -80 °C φυγοκεντρώνονται για 30 min στις 14.000 rpm στους 4 °C και αφαιρείται το υπερκείμενο. Ακολούθως, γίνεται προσθήκη 500μL παγωμένης 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Αφαιρείται όλο το υπερκείμενο με την χρήση πιπέτας ώστε να μην διαταραχθεί η πελέτα και τα δείγματα αφήνονται στον πάγο με ανοιχτό καπάκι για 10 min για να στεγνώσει το ίζημα. Αμέσως μετά γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος με 25μL RNA Water, τοποθέτηση των δειγμάτων στους 65 °C για 5 min, vortex και spin. Ωστόσο πριν αποθηκευτούν τα δείγματα στους -80 °C γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA και του λόγου A260/280 στο μηχάνημα Quawell.

### 3.2.9 cDNA synthesis (Reversal Transcription)

Σκοπός του πειράματος είναι η σύνθεση cDNA από το RNA που απομονώθηκε. Αρχικά, πραγματοποιούνται αραιώσεις ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του RNA που μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας το Quawell (διαλύονται σε αντίστοιχη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O) ώστε τελικά να υπάρχει 1μg ποσότητας RNA σε τελικό όγκο 10μL. Ειδικότερα στην πτυχιακή αυτή υπολογίστηκε πόση ποσότητα θα παρθεί από το κάθε δείγμα ώστε τελικά η ποσότητα του RNA να είναι 200ng και προστέθηκε H<sub>2</sub>O έχοντας τελικό όγκο 10μL. Στην συγκεκριμένη διαδικασία χρειάζονται δύο mix:

<b>Mix 1</b>	<b>Ποσότητες αντιδραστηρίων</b>
<b>Primer (10mM)</b>	1 μL
<b>dNTPs (10mM)</b>	1 μL

**Πίνακας 6.** Σύσταση του mix 1 της αντίδρασης σύνθεσης του cDNA ανά δείγμα.

Οι primers μπορεί να είναι oligodT ή random hexamers (2 μL) ή reverse gene specific primer. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 2 μL από το mix1 και τοποθετούνται σε

υδατόλουτρο στους 65°C για 5 λεπτά. Αμέσως μετά τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη του μορίου RNA (λόγω των πιθανών δευτεροταγών δομών του RNA), υβριδοποίηση του primer πάνω στην συμπληρωματική αλληλουχία ενώ παραμένει ανοιχτή η δομή του RNA. Στην συνέχεια ετοιμάζεται το mix 2 (Πίνακας 7).

Mix 2	Ποσότητες αντιδραστηρίων
MMLV(αντίστροφη μεταγραφάση)	1μL
DTT (100mM)	2μL
RNase	1μL
Buffer (5x)	4μL
Τελικός όγκος	20 μL

Πίνακας 7. Σύσταση του mix 2 της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης ανά δείγμα.

Ακολούθως, σε κάθε δείγμα γίνεται vortex, spin και προστίθενται 8 μL από το mix 2. Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37°C για 2h με σκοπό την πραγματοποίηση της αντίδρασης της cDNA σύνθεσης. Μετά τις 2h γίνεται προσθήκη 180 μL ddH<sub>2</sub>O και στο σημείο αυτό αποθηκεύονται στους -20 °C. Επιπλέον, στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης απαιτείται και ένα control δείγμα, το οποίο υφίσταται την ίδια ακριβώς διαδικασία με το δείγμα απλά αντί για να γίνει προσθήκη 1μL ενζύμου προστίθεται 1 μL ddH<sub>2</sub>O. Αναμένεται στην περίπτωση αυτή να μην υπάρχει cDNA.

### 3.2.10 Ποσοτική PCR (qPCR)

Προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα της έκφρασης του GREIT4-1 στις κυτταρικές σειρές του Πίνακα 1 πρέπει να πραγματοποιηθεί qPCR (Quantitative PCR). Γενικά με την qPCR είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της ενίσχυσης ενός δείγματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Η σύσταση της αντίδρασης ανά δείγμα είναι η εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες αντιδραστηρίων
SYBRgreen Buffer Mix (2x)	10μL
Primer mix	2μL
cDNA Template	4μL
H <sub>2</sub> O	4μL
Τελικός όγκος	20μL

Πίνακας 8. Σύσταση της αντίδρασης qPCR ανά δείγμα.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε SYBR green Mix (2x) της εταιρείας KAPA. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου GREIT4-1 χρησιμοποιήθηκαν τα ιδιοσυστάτα γονίδια GAPDH (γονίδιο που έχει ρόλο στον μεταβολισμό) και RPLP1(γονίδιο που εμπλέκεται σε ριβοσωμική υπομονάδα). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή της BioRad, καθώς και το πρόγραμμα CFX Manager 3.1 (BioRad) με σκοπό την διεξαγωγή και την ανάλυση της qPCR. Ακόμη, τα δείγματα

προετοιμάζονται σε ειδικά strips ή plates, τα οποία είναι συγκεκριμένα για την διαδικασία της qPCR.

### **3.2.11 RNA gel**

Αρχικά είναι απαραίτητο να καθαριστεί η συσκευή με SDS και H<sub>2</sub>O και να παραμείνει κλειστή έως ότου χρησιμοποιηθεί (τουλάχιστον μετά από 2 h). Γενικά είναι σημαντικό να καθαρίζονται πολύ καλά η συσκευή και τα χτενάκια καθώς και τα σκεύη που χρησιμοποιούνται είναι αναγκαίο να είναι αποστειρωμένα έτσι ώστε να μην υπάρχουν RNases. Για να τρέξει ένα RNA gel πρέπει να ξεπλυθεί η συσκευή πολύ καλά, διότι περιείχε SDS. Επιπλέον, η πηκτή αгарόζης είναι 1%. Συγκεκριμένα για την δημιουργία του gel αгарόζης απαιτούνται 0,5g αгарόζης, 50mL TBE 0,5x, 5g αιθίδιο. Αρχικά λιώνει το TBE μαζί με την αгарόζη. Έπειτα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο falcon, μέσα στο οποίο προστίθεται το αιθίδιο. Στην συνέχεια εισάγεται μέσα στο tray (πιατάκι), στο οποίο υπάρχουν και τα χτενάκια για να πήξει το gel. Ακολούθως αφού πήξει μεταφέρεται το gel στην συσκευή, φορτώνονται τα δείγματα και με την εφαρμογή κατάλληλης τάσης διεξάγεται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία στο RNA gel φορτώθηκαν 2 δείγματα. Το ένα προέρχεται από το RNA extraction (κεφάλαιο 3.2.7) και το άλλο αντιστοιχεί σε δείγμα, το οποίο έχει υποστεί DNase treatment (κεφάλαιο 3.2.8). Από το κάθε δείγμα φορτώθηκαν 18μL. Ειδικότερα, από το πρώτο δείγμα χρησιμοποιούνται 4μl και προστίθενται 11μL RNA H<sub>2</sub>O και 3μL Loading Dye ενώ από το δεύτερο δείγμα αξιοποιούνται 5μL και προστίθενται 10μL RNA H<sub>2</sub>O και 3μL Loading Dye.

### **3.2.12 Χαρακτηρισμός του μεταγράφου του GREIT4-1**

#### **3.2.12.1 Επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 στα δείγματα καρκινικών κυτταρικών σειρών**

Για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του lncRNA στις κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε εξαγωγή RNA, σύνθεση του cDNA και στην συνέχεια qPCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο GREIT4-1. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι προκειμένου το αποτέλεσμα που θα προκύψει να είναι αξιόπιστο είχαμε στην διάθεση μας cDNA από δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις και επομένως το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Ακόμη χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές που προέρχονται από καρκινικό επιθήλιο του στομάχου (AGS, KATOIII, MKN45, NUGC4), από καρκινικό επιθήλιο του μαστού (MCF7, SKBR3), από φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου (HFE), καθώς και οι κυτταρικές σειρές HCT116, HT29 που είναι καρκινικές σειρές του εντέρου.

Αφού πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της qPCR στην συνέχεια ποσοτικοποιήθηκαν και κανονικοποιήθηκαν τα δείγματα ως προς το ιδιοσύστατο γονίδιο RPLP1. Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκε ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων για κάθε δείγμα από τις δύο βιολογικές επαναλήψεις (1η και 2η βιολογική επανάληψη). Έτσι δημιουργήθηκε διάγραμμα, στο οποίο τα επίπεδα κανονικοποιήθηκαν ως προς το γονίδιο ιδιοσύστατης έκφρασης RPLP1.

Παράλληλα η διαδικασία της qPCR διεξήχθη σε κύτταρα AGS, στα οποία προηγουμένως έγινε σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, με σκοπό την μελέτη της έκφρασης του GREIT4-1 λόγω της σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων και κυρίως του GATA4. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε

και ένα δείγμα shSCRAMBLED, το οποίο δρα ως control. Ειδικότερα ο φορέας αυτός δεν παράγει shRNA που να στοχεύει τους μεταγραφικούς παράγοντες οπότε δίνεται η δυνατότητα της μελέτης της έκφρασης του GREIT4-1 στην περίπτωση της σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων συγκριτικά με το control. Ακόμη, σε κύτταρα AGS πραγματοποιήθηκε καταστολή του lncRNA GREIT4-1 και επομένως με το πείραμα της qPCR μελετήθηκε η έκφραση του GREIT4-1.

### **3.2.12.2 Υποκυτταρική κλασμάτωση (Subcellular fractionation)**

Η υποκυτταρική κλασμάτωση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα cDNA κυττάρων AGS, MKN45 και NUGC4, τα οποία προέκυψαν από κυτταροπλασματικά, πυρηνικά και χρωματινικά κλάσματα RNA στα πλαίσια προηγούμενων πτυχιακών του εργαστηρίου με σκοπό την μελέτη του εντοπισμού του GREIT4-1. Συγκεκριμένα, ελέγχεται ο εντοπισμός του GREIT4-1 στα κλάσματα του κυτταροπλάσματος, του πυρηνοπλάσματος και της χρωματίνης. Σε αυτά τα δείγματα cDNA πραγματοποιήθηκε ποσοτική qPCR με σκοπό την ανίχνευση του μεταγράφου GREIT4-1 στα διάφορα υποκυτταρικά κλάσματα σε κάθε σειρά. Όσον αφορά τα κύτταρα AGS η ανάλυση (στο κεφάλαιο 4.2.2) πραγματοποιήθηκε από το μέσο όρο δύο βιολογικών επαναλήψεων.

Πιο αναλυτικά για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής έγινε η συλλογή των εξής τριών υποκυτταρικών κλασμάτων: του κυτταροπλάσματος (S2), του πυρηνοπλάσματος (S3) και της χρωματίνης (P3). Αναλυτικά η διαδικασία της υποκυτταρικής κλασμάτωσης έχει αναφερθεί σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία. Έπειτα, υλοποιήθηκε ποσοτική PCR (qPCR) αφού προηγουμένως έγινε εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA. Επίσης, για την διεξαγωγή της qPCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το γονίδιο GREIT4-1. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων και συγκεκριμένα των επιπέδων των μεταγράφων του GREIT4-1 από το πείραμα της qPCR. Τα συμπεράσματα των αναλύσεων παρατίθενται στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

### **3.2.12.3 Μεταγραφική σταθερότητα (Transcriptional Stability)**

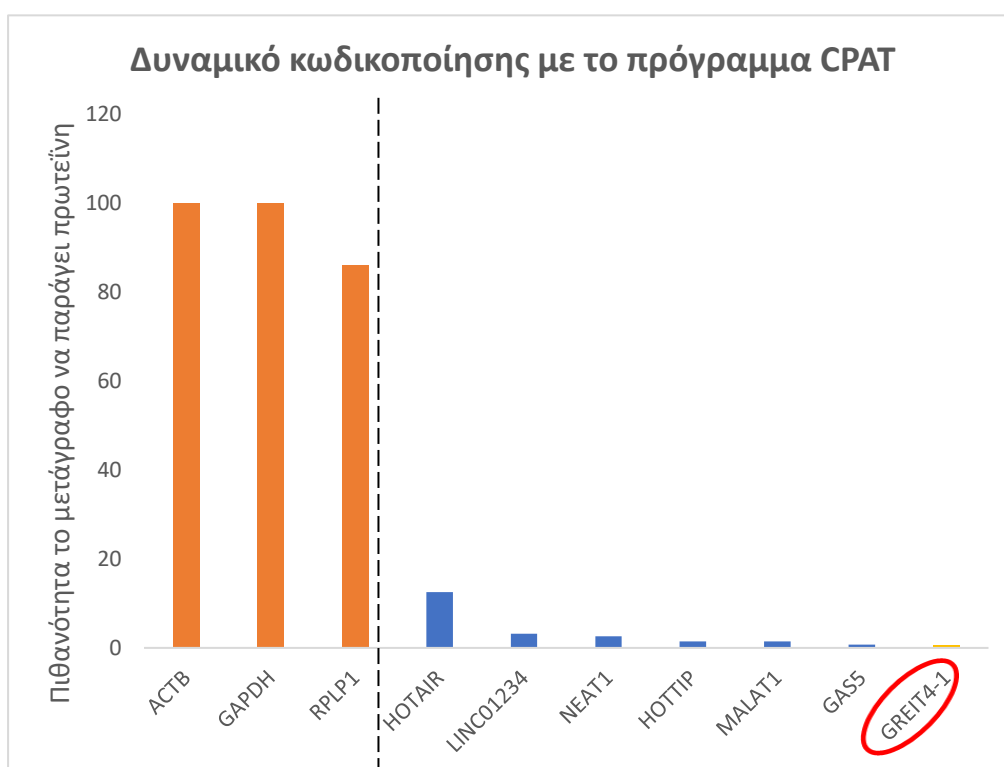
Πρόκειται για ένα πείραμα, στο οποίο η σταθερότητα των μεταγράφων παρατηρείται σε διαδοχικές χρονικές στιγμές. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά AGS και έπειτα από κατεργασία με 2μg/ml ακτινομυκίνης μελετήθηκε η μεταγραφική σταθερότητα των μεταγράφων του GREIT4-1 σε συγκεκριμένους χρόνους έκθεσης. Οι χρονικές στιγμές που επιλέχθηκαν έπειτα από την έκθεση της καρκινικής κυτταρικής σειράς AGS σε ακτινομυκίνη είναι οι εξής: μισή ώρα (0,5h), μία ώρα (1h), δύο ώρες (2h), τέσσερις ώρες (4h), έξι ώρες (6h), οχτώ ώρες (8h) και εικοσιτέσσερις ώρες (24h). Επίσης, η ακτινομυκίνη απουσιάζει από το δείγμα 0h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται RNA extraction, cDNA synthesis και ποσοτική PCR. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε το μετάγραφο MYC, του οποίου είναι γνωστός ο χρόνος υποδιπλασιασμού.

## **4. Αποτελέσματα**

## 4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

### 4.1.1 Ανάλυση του κωδικοποιητικού δυναμικού του lncRNA GREIT4-1

Αρχικά είναι σημαντικό να επιβεβαιωθεί πως το GREIT4-1 ανήκει στην ομάδα των μη κωδικοποιητικών γονιδίων και ότι συνιστά ένα μη κωδικοποιητικό μετάγραφο. Για την επίτευξη αυτού χρησιμοποιήθηκαν βιοπληροφορικές μέθοδοι. Συγκεκριμένα με την χρήση των προγραμμάτων CPC2 και CPAT πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του κωδικού δυναμικού της αλληλουχίας του GREIT4-1. Επίσης, στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες πειραματικά αποδεδειγμένων κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών μεταγράφων ως αρνητικά και θετικά δείγματα ελέγχου αντίστοιχα, όπως αναλυτικά αναφέρεται και στην ενότητα 3.2.1.1.



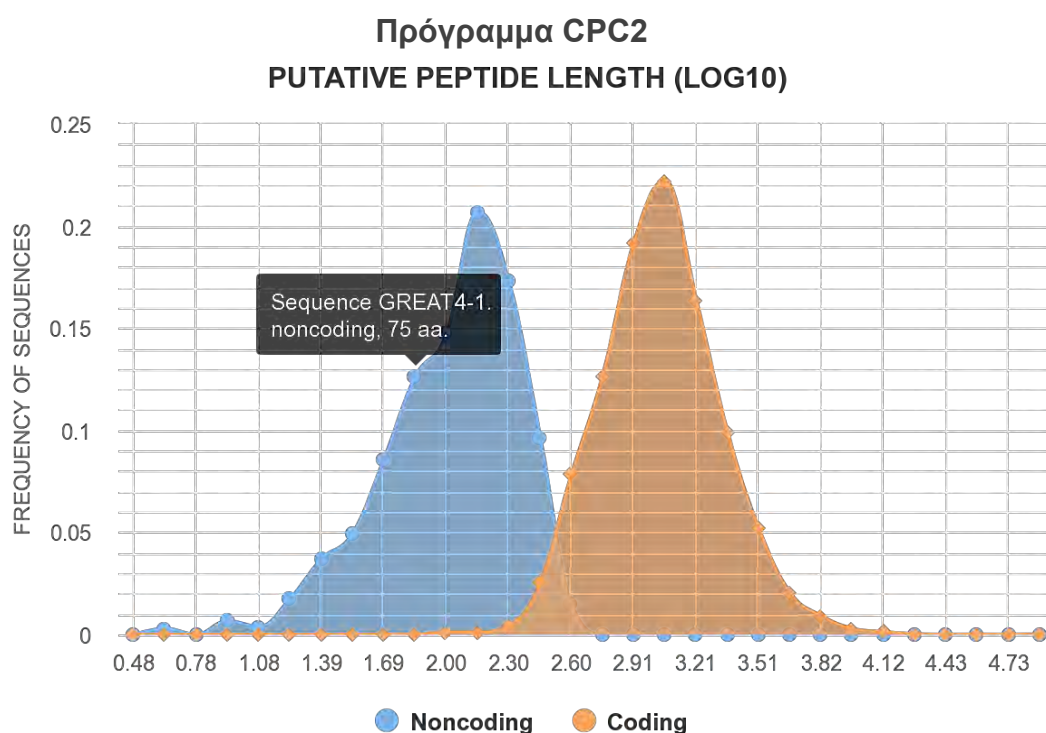
**Εικόνα 22.** Απεικόνιση του δυναμικού κωδικοποίησης του GREIT4-1 χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CPAT. Στον άξονα x εντοπίζονται τα ACTB, GAPDH, RPLP1 (γνωστά κωδικοποιητικά μετάγραφα) και τα HOTAIR, LINC01234, NEAT1, HOTTIP, MALAT, GAS5 (γνωστά μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα) και το GREIT4-1. Στον άξονα y αντιστοιχεί η πιθανότητα τα μετάγραφα των γονιδίων να παράγουν πρωτεΐνη. Στις πορτοκαλί στήλες αντιστοιχούν τα κωδικά γονίδια ενώ στις μπλε στήλες αντιστοιχούν τα μη κωδικά γονίδια. Το GREIT4-1 αναπαρίσταται με την κίτρινη στήλη.

Από το διάγραμμα της εικόνας 22 είναι δυνατή η σύγκριση των ήδη χαρακτηρισμένων κωδικών και μη κωδικών μεταγράφων με το γονίδιο που μελετάται στην παρούσα εργασία GREIT4-1. Πιο αναλυτικά, η πιθανότητα κωδικοποίησης για τα γονίδια ACTB, GAPDH και RPLP1 είναι ίση με 1 (100%) ή κοντά στο 100%. Αντίθετα για τα μετάγραφα μακρών μη κωδικοποιητικών γονιδίων HOTAIR, LINC01234, NEAT1, HOTTIP, MALAT, GAS5 τα ποσοστά των κωδικών πιθανοτήτων είναι μικρότερα από 20% (τιμή μικρότερη από 20 στο διάγραμμα) και συγκεκριμένα τα ποσοστά κωδικοποιητικής πιθανότητας των περισσότερων από αυτά τα μετάγραφα αντιστοιχούν σε τιμές



μικρότερες από 10%. Επίσης, από την συγκεκριμένη ανάλυση προκύπτει ότι η τιμή που αντιστοιχεί στο μετάγραφο του GREIT4-1 είναι πολύ μικρή (μικρότερη και από τα χαρακτηρισμένα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα). Επομένως, συμπεραίνεται ότι το γονίδιο GREIT4-1 ανήκει στην ομάδα των μακρών μη κωδικοποιητικών RNA (lncRNA).

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CPC2 με σκοπό την ενίσχυση της προηγούμενης υπόθεσης, δηλαδή ότι το GREIT4-1 ανήκει στην ομάδα των lncRNA. Ειδικότερα, στο διάγραμμα της **εικόνας 23** παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών του κωδικού δυναμικού που αφορά τόσο τα κωδικοποιητικά όσο και τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα για το σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι τιμές του συγκεκριμένου γραφήματος βασίζονται στο μήκος των παραγόμενων πεπτιδίων. Ακόμη, η ομάδα των μη κωδικοποιητικών μεταγράφων αναπαρίσταται με μπλε ενώ η ομάδα των κωδικών αλληλουχιών με πορτοκαλί. Επομένως, παρατηρώντας το γράφημα γίνεται αντιληπτό ότι το μετάγραφο του GREIT4-1 ανήκει στα μη κωδικά μετάγραφα ενώ το πιθανό παραγόμενο πολυπεπίδιο της συγκεκριμένης αλληλουχίας αποτελείται από 75 αμινοξέα. Επιπλέον, το μήκος του μεταγράφου του lncRNA είναι πολύ μικρότερο από το μήκος των κωδικών μεταγράφων.

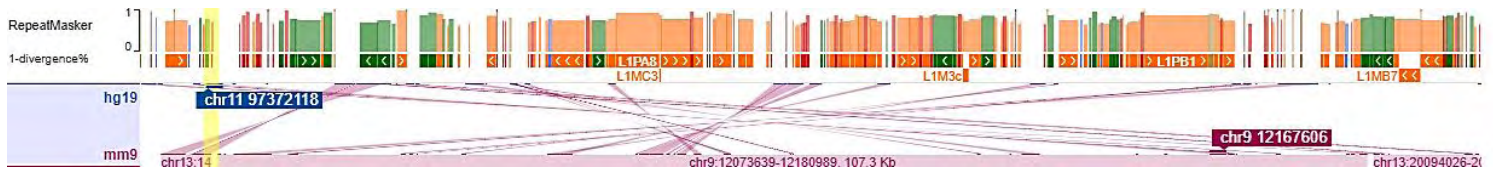


**Εικόνα 23.** Γράφημα απεικόνισης του μήκους των παραγόμενων πεπτιδίων από τα μετάγραφα του ανθρώπινου γονιδιώματος συμπεριλαμβανομένου του GREIT4-1. Στον άξονα x βρίσκονται σε λογαριθμική κλίμακα οι τιμές του μήκους των πεπτιδίων. Οι τιμές του άξονα y αντιστοιχούν στην συχνότητα εμφάνισης αλληλουχιών που παρουσιάζουν ίδια σκορ.

Συνεπώς, σύμφωνα με τις προηγούμενες παρατηρήσεις των γραφημάτων επιβεβαιώνεται ότι το GREIT4-1 συνιστά ένα lncRNA.

#### 4.1.2 Ανάλυση συνταινίας- συνέκφρασης στον ποντικό

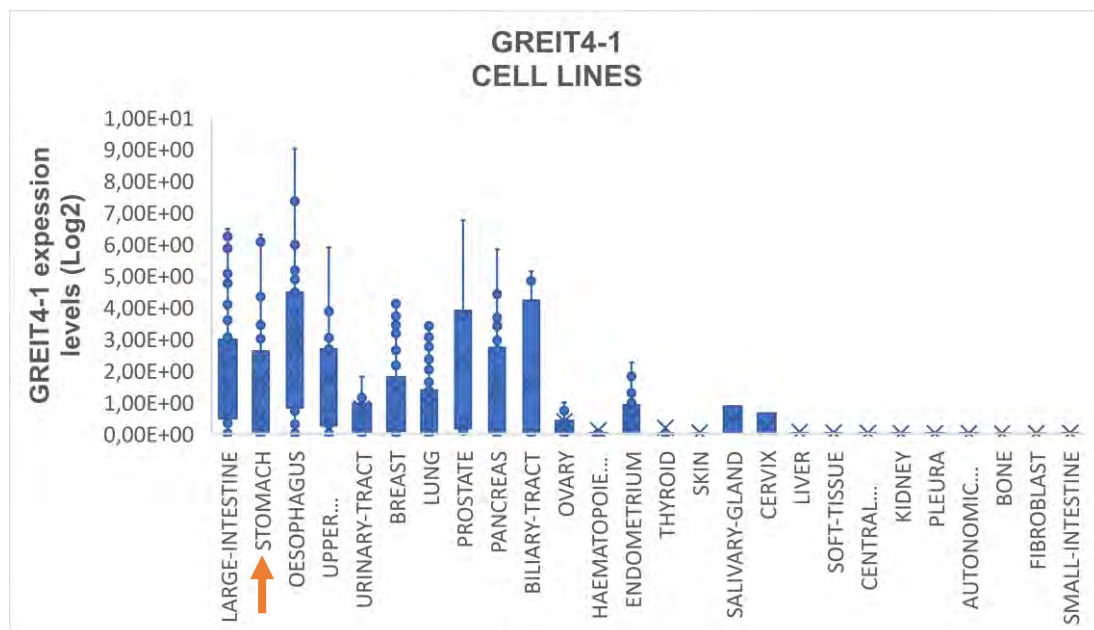
Ο ποντικός συνιστά οργανισμό μοντέλο για την μελέτη του καρκίνου. Γι' αυτό το λόγο απαιτείται έλεγχος της γονιδιωματικής περιοχής του lncRNA GREIT4-1 στον ποντικό, δηλαδή κατά πόσο υπάρχει αυτούσια στον ποντικό σε σχέση πάντοτε με τον ανθρώπινο οργανισμό. Στην **εικόνα 24** φαίνεται η χρωμοσωμική περιοχή του ποντικού, η οποία αντιστοιχεί στην γονιδιωματική περιοχή του γονιδίου του GREIT4-1 στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Αυτό λοιπόν που παρατηρείται από την εικόνα είναι ότι δεν υπάρχει αυτούσια στον ποντικό η αλληλουχία του συγκεκριμένου lncRNA GREIT4-1 αφού ο αντίστοιχος γενετικός τόπος στον ποντικό είναι κατακερματισμένος σε τρία διαφορετικά τμήματα πάνω σε δύο χρωμοσώματα (9 και 13) συνεπώς δεν εμφανίζεται συντήρηση σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας του GREIT4-1 στον ποντικό σε σχέση με τον άνθρωπο.



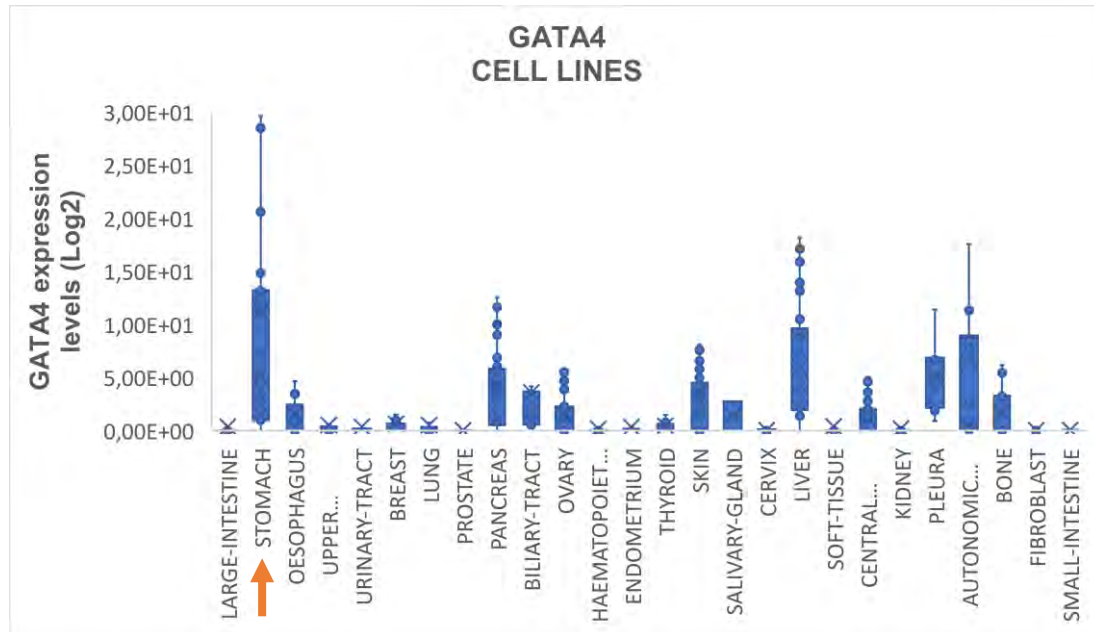
**Εικόνα 24.** Εστίαση στην γονιδιωματική περιοχή του GREIT4-1. Δεν διακρίνεται αντιστοιχία της αλληλουχίας του GREIT4-1 από τον άνθρωπο στον ποντικό.

#### 4.1.3 Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και του GATA4 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Από την ανάλυση της έκφρασης του lncRNA GREIT4-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από όλους τους τύπους καρκίνου που έγινε προέκυψε το γράφημα της **εικόνας 25**, στο οποίο τα αποτελέσματα αποτυπώνονται με την μορφή boxplots. Συγκεκριμένα από το γράφημα προκύπτει ότι το GREIT4-1 εκφράζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που αφορούν το γαστρεντερικό σύστημα (παχύ έντερο, στομάχος, οισοφάγος, πάγκρεας, χολική οδός), ενώ επίσης εντοπίζεται έκφραση αυτού και στον πνεύμονα (που συνιστά όργανο μετάστασης στον καρκίνο του στομάχου), στο άνω αναπνευστικό σύστημα, στο ουροποιητικό σύστημα, στο μαστό και στον προστάτη. Αντίστοιχο γράφημα (**Εικόνα 26**) έχει δημιουργηθεί και για τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4.



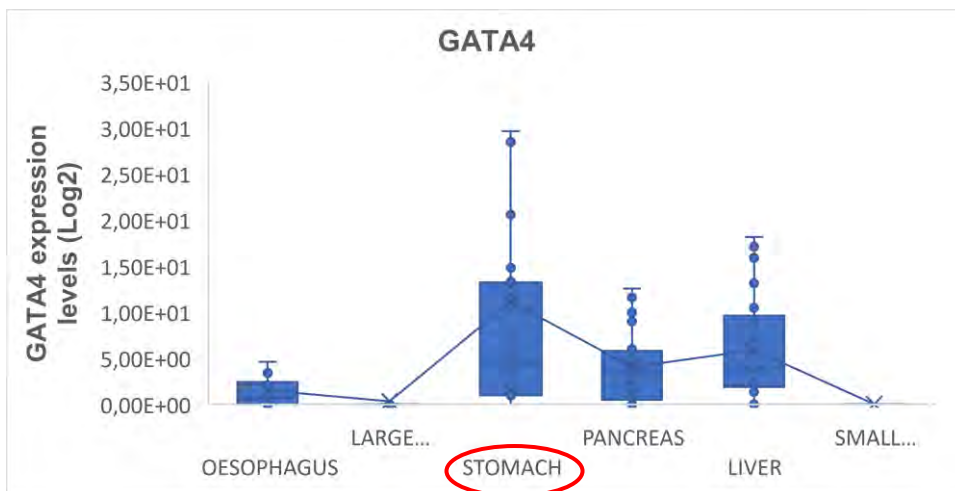
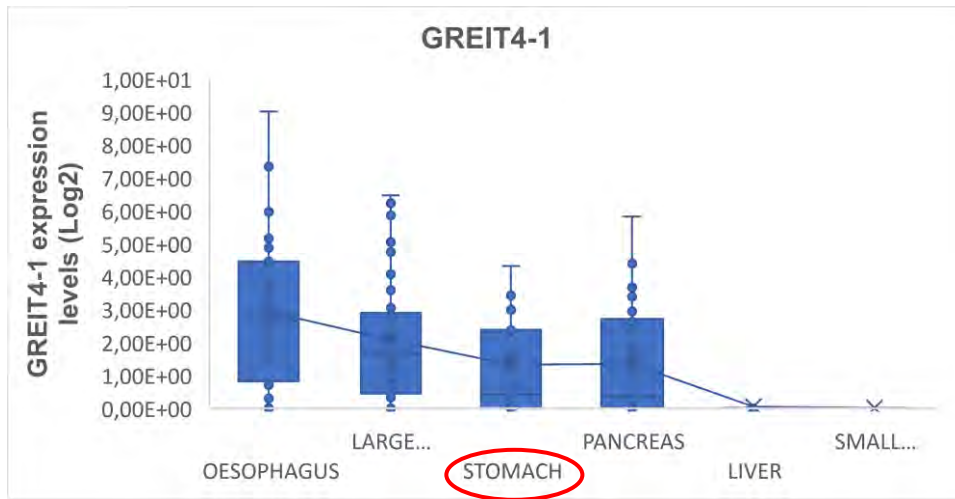
**Εικόνα 25.** Γράφημα ανάλυσης της έκφρασης του GREIT4-1 σε λογαριθμική κλίμακα σε 1020 καρκινικές κυτταρικές σειρές όλων των διαφορετικών τύπων καρκίνου.



**Εικόνα 26.** Γράφημα ανάλυσης της έκφρασης του GATA4 σε λογαριθμική κλίμακα σε 1020 καρκινικές κυτταρικές σειρές διαφόρων τύπων καρκίνου.

Στην περίπτωση του GATA4 παρατηρείται υψηλή έκφραση αυτού συγκεκριμένα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου ενώ επίσης διαπιστώνεται μικρότερη έκφραση του στο ήπαρ, στο δέρμα, στα πλευρά, στο πάγκρεας και στα αυτόνομα γάγγλια. Συνεπώς από τα δύο γραφήματα προκύπτει ότι το lncRNA GREIT4-1 και ο GATA4 εμφανίζουν εξειδικευμένη και υψηλή έκφραση στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου, το οποίο σημαίνει ότι ο GATA4 μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση του GREIT4-1 στην συγκεκριμένη περίπτωση. Ωστόσο, το GREIT4-1 εντοπίζεται και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές εκτός του στομάχου όπου ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 δεν ανιχνεύεται και συγκεκριμένα οι κυτταρικές αυτές σειρές αντιστοιχούν στο παχύ έντερο, στο μαστό, στο πνεύμονα, και στο ουροποιητικό σύστημα. Επιπλέον, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η έκφραση του lncRNA GREIT4-1 είναι εντοπισμένη αρκετά στο γαστρεντερικό σύστημα ενώ του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 εκτείνεται και σε άλλους ιστούς, όπως για παράδειγμα στα πλευρά, στα οστά και στο δέρμα. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι ο άξονας y στην περίπτωση του GATA4 είναι σε λογαριθμική κλίμακα όπως και στην περίπτωση του GREIT4-1 αλλά διαφέρει η κλίμακα, διότι ο GATA4 ως μεταγραφικός παράγοντας έχει μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με ένα lncRNA και στην περίπτωση αυτή σε σχέση με το GREIT4-1.

Έπειτα λόγω των παρατηρήσεων των προηγούμενων αναλύσεων πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης του GREIT4-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του γαστρεντερικού συστήματος ενώ αντίστοιχο γράφημα δημιουργήθηκε και για το GATA4. Αναλυτικότερα στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται για την συγκεκριμένη ανάλυση συμπεριλαμβάνονται αυτές του οισοφάγου, του παχέος και του λεπτού εντέρου, του στομάχου, του παγκρέατος και του ήπατος (**Εικόνα 27**).



**Εικόνα 27.** Απεικόνιση της ανάλυσης των εκφράσεων του GREIT4-1 και του GATA4 με την μορφή boxplots σε λογαριθμική κλίμακα από 187 καρκινικές κυτταρικές σειρές του γαστρεντερικού συστήματος. Η μπλε γραμμή ενώνει τους μέσους όρους των δειγμάτων κάθε κατηγορίας.

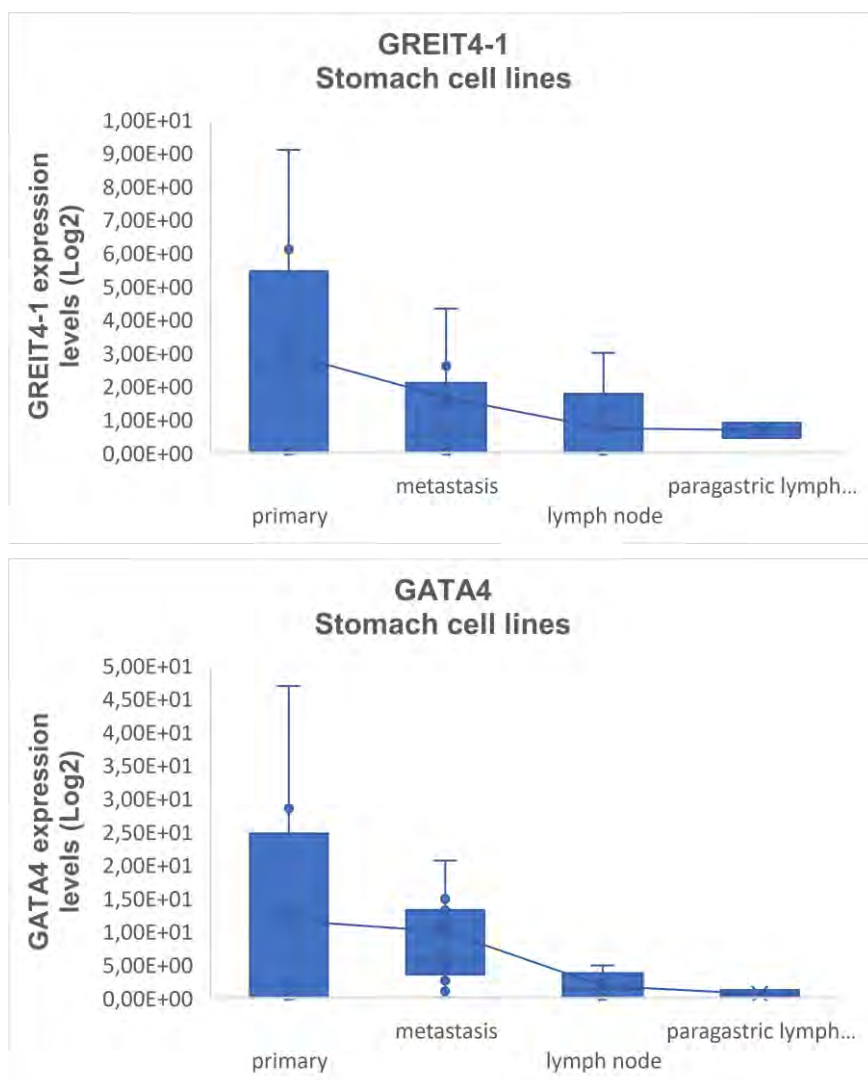
Από τα γραφήματα της **εικόνας 27** εντοπίζεται υψηλή και εξειδικευμένη έκφραση των GREIT4-1 και GATA4 κυρίως στο στομάχο. Επίσης, και τα δύο ανιχνεύονται στο πάγκρεας με μικρότερη έκφραση συγκριτικά με το στομάχο. Ακόμη, το GREIT4-1 εντοπίζεται στον οισοφάγο και το παχύ έντερο και απουσιάζει από το ήπαρ. Ο GATA4 ανιχνεύεται στην περίπτωση του ήπατος ενώ δεν εκφράζεται στην περίπτωση του οισοφάγου και του παχέος εντέρου. Τέλος, δεν παρατηρείται έκφραση ούτε του GATA4 ούτε του GREIT4-1 στο λεπτό έντερο.

Επομένως, σύμφωνα με τις προηγούμενες αναλύσεις διαπιστώνεται παρουσία και των δύο σε αυξημένα επίπεδα μόνο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου.

Γι' αυτό το λόγο εστιάζοντας στην συνέχεια μόνο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου δημιουργήθηκαν boxplots σύμφωνα με το στάδιο της ασθένειας για τα γονίδια GATA4 και GREIT4-1. Από την συγκεκριμένη ανάλυση προέκυψαν τα γραφήματα της **εικόνας 28** όπου παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο έκφρασης για το GATA4 και το GREIT4-1. Πιο αναλυτικά εντοπίζεται υψηλότερη έκφραση σε πρωτογενείς όγκους στο στομάχο συγκριτικά με το στάδιο της μετάστασης, το οποίο στο γράφημα διαχωρίζεται από τους λεμφικούς αδένες και τους παραγαστρικούς



λεμφικούς αδένες. Άρα, γίνεται κατανοητό ότι η έκφραση του GATA4 και του GREIT4-1 εντοπίζονται σε πρωτεύον όγκο στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου.

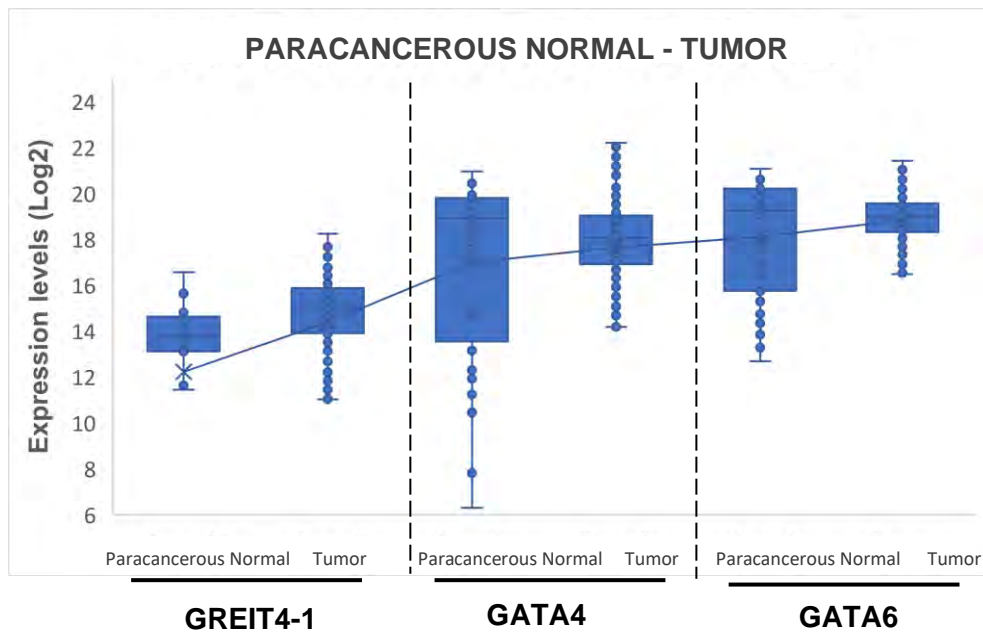


**Εικόνα 28.** Κατασκευή boxplots με σκοπό την ανάλυση των εκφράσεων του GREIT4-1 και του GATA4 σε λογαριθμική κλίμακα σε 37 καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου για το κάθε γονίδιο. Η μπλε γραμμή ενώνει τους μέσους όρους των δειγμάτων κάθε κατηγορίας

#### 4.1.4 Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 και μεταγραφικών παραγόντων σε βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών

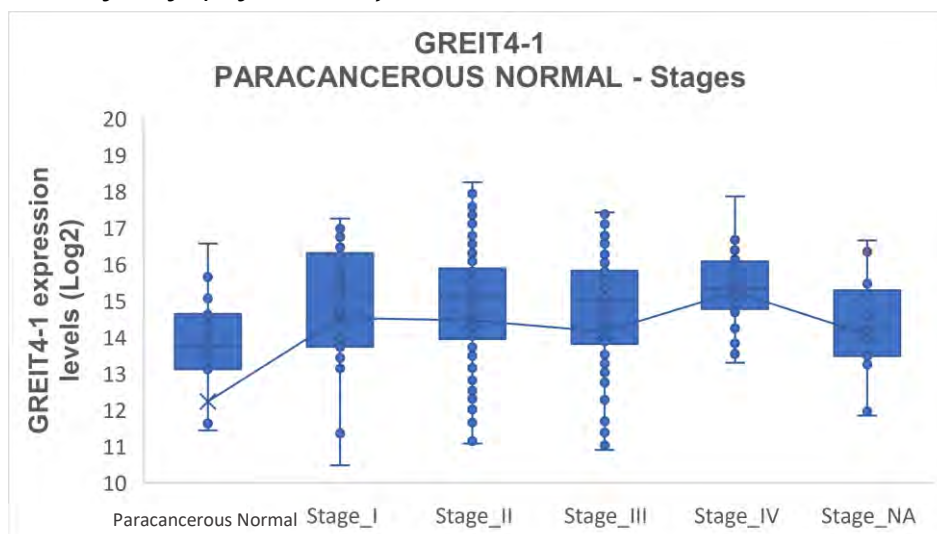
Από την ανάλυση που έγινε για το GREIT4-1 καθώς και για τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και GATA6 από βιοψίες Αμερικανών και Ευρωπαίων ασθενών κατασκευάστηκαν τα boxplots της **εικόνα 29**. Πιο συγκεκριμένα, εστιάζοντας στον μέσο όρο των boxplots εντοπίζεται αυξημένη έκφραση των GREIT4-1, GATA4 και GATA6 στον καρκίνο του στομάχου συγκριτικά με το φυσιολογικό παρακείμενο ιστό όπου η έκφραση τους είναι μικρότερη. Παράλληλα ενώ παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια των τιμών στην περίπτωση φυσιολογικών παρακείμενων ιστών του GATA4 και του GATA6, συνολικά η έκφραση τους είναι μικρότερη σε σχέση με την

περίπτωση του καρκίνου του στομάχου. Επομένως, από την συγκεκριμένη ανάλυση επιβεβαιώνεται η παρουσία του GREIT4-1 καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 σε υψηλά επίπεδα στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου.



**Εικόνα 29.** Γράφημα ανάλυσης των εκφράσεων του GREIT4-1, του GATA4 και του GATA6 σε λογαριθμική κλίμακα σε 375 βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών καθώς και σε 40 φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς. Η μπλε γραμμή ενώνει τους μέσους όρους των δειγμάτων κάθε κατηγορίας.

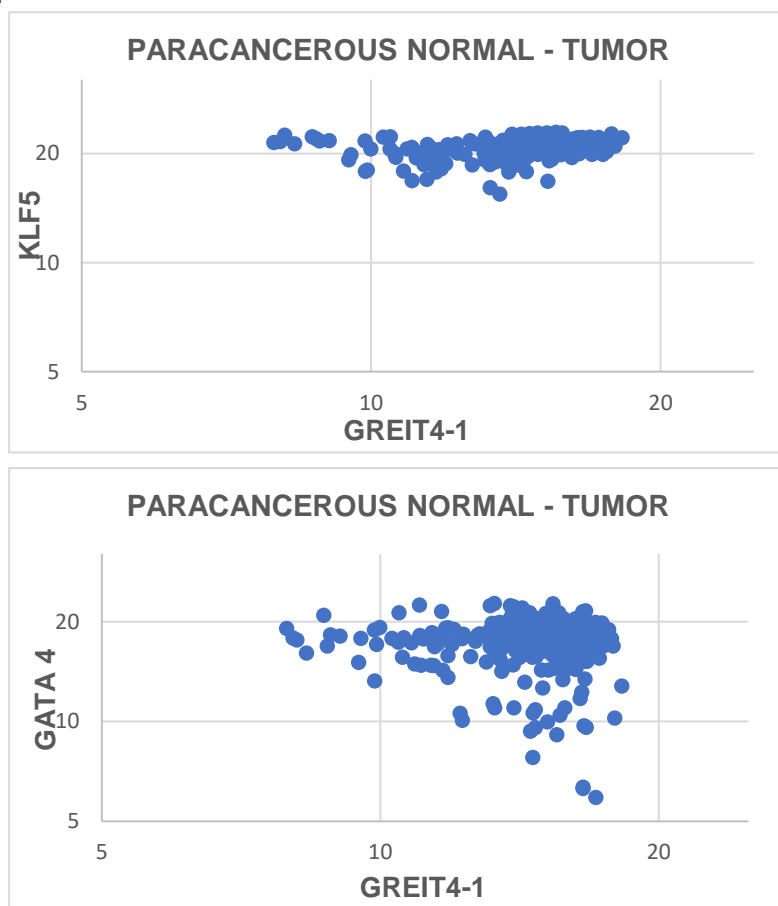
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης του lncRNA GREIT4-1 σε κάθε στάδιο του καρκίνου του στομάχου (Stage I, II, III, IV, NA) και το γράφημα που προέκυψε από την ανάλυση αυτή βρίσκεται στην **εικόνα 30**. Συγκεκριμένα δεν παρατηρήθηκε εξειδικευμένη έκφραση ως προς ένα στάδιο αλλά εντοπίστηκε το GREIT4-1 σε αυξημένα επίπεδα σε όλα τα στάδια συγκριτικά με τον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό. Επίσης, η υψηλή έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA κυμαίνεται γύρω από τις ίδιες τιμές και στα έξι στάδια.



**Εικόνα 30.** Γράφημα απεικόνισης της ανάλυσης της έκφρασης του GREIT4-1 σε λογαριθμική κλίμακα από 375 βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών καθώς και 40 φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς ανά στάδιο της ασθένειας.



Έπειτα λόγω της υψηλής έκφρασης του GREIT4-1 καθώς και του GATA4 που παρατηρήθηκε στον καρκίνο του στομάχου και η οποία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν το GATA4 ρυθμίζει την έκφραση του GREIT4-1, κατασκευάστηκε scatter plot (Εικόνα 31) με σκοπό την συσχέτιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 με το GREIT4-1 (βασιζόμενοι στα δεδομένα που αντιστοιχούν στον καρκίνο του στομάχου και στους φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς των ασθενών). Επιπλέον, αντίστοιχο γράφημα δημιουργήθηκε και για την συσχέτιση των γονιδίων KLF5 και GREIT4-1.

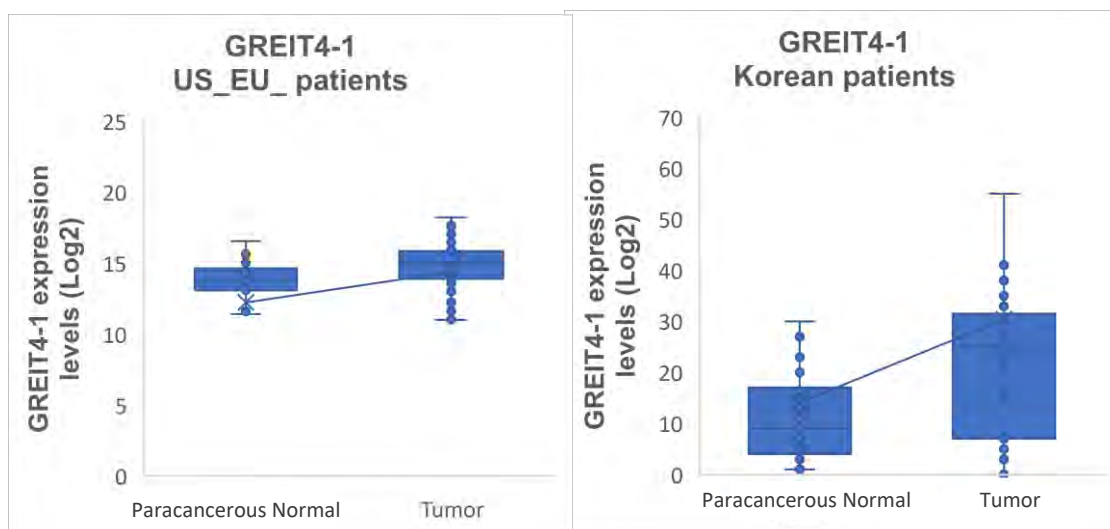


**Εικόνα 31.** Δημιουργία scatter plots από δεδομένα 375 βιοψιών Ευρωπαϊκών και Αμερικανών ασθενών καθώς και από 40 φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς σε λογαριθμική κλίμακα με σκοπό την συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων GREIT4-1 και του GATA4 καθώς και του GREIT4-1 με το KLF5.

Από την συγκεκριμένη ανάλυση προέκυψε ότι ο συντελεστής συσχέτισης (R) στην περίπτωση του KLF5 – GREIT4-1 είναι 0,394470886 ενώ ο συντελεστής ισχύος ( $R^2$ ) είναι 0,15560728. Συνεπώς, διαπιστώνεται σημαντική συσχέτιση μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 και του GREIT4-1 (η τιμή του συντελεστή συσχέτισης είναι μεγαλύτερη από 0). Αντίθετα από την ανάλυση του GATA4 με το GREIT4-1 προέκυψε ότι ο συντελεστής συσχέτισης (R) έχει τιμή 0,101042239 ενώ ο συντελεστής ισχύος ( $R^2$ ) είναι 0,010209534 (οι τιμές είναι πολύ κοντά στο 0). Άρα, υπάρχει μικρή συσχέτιση μεταξύ του GATA4 και του GREIT4-1. Η εξήγηση αυτού παρατίθεται στην ενότητα της συζήτησης.

#### 4.1.5 Ανάλυση έκφρασης του GREIT4-1 σε βιοψίες Κορεατών ασθενών και φυσιολογικών παρακαείμενων ιστών

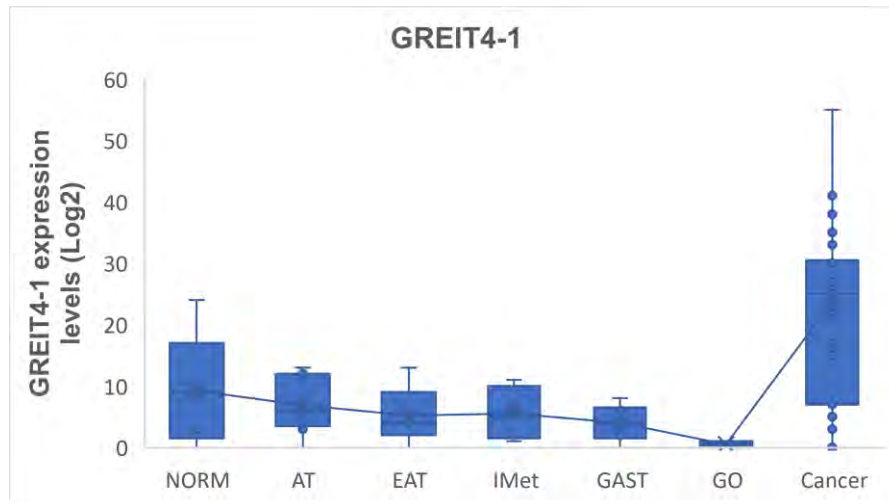
Από την ανάλυση της έκφρασης του GREIT4-1 σε βιοψίες Κορεατών ασθενών και φυσιολογικών παρακαείμενων ιστών κατασκευάστηκαν τα boxplots της **εικόνας 32**. Ειδικότερα στην εικόνα αυτή παρατίθεται και το γράφημα της ανάλυσης της έκφρασης του GREIT4-1 σε βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και φυσιολογικών παρακαείμενων ιστών με στόχο την σύγκριση με τους Κορεάτες ασθενείς.



**Εικόνα 32.** Δημιουργία boxplots με στόχο την ανάλυση της έκφρασης του GREIT4-1 σε λογαριθμική κλίμακα από συνολικά 68 δείγματα Κορεατών, 375 βιοψίες Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών καθώς και από 40 φυσιολογικούς παρακαείμενους ιστούς Ευρωπαίων και Αμερικανών.

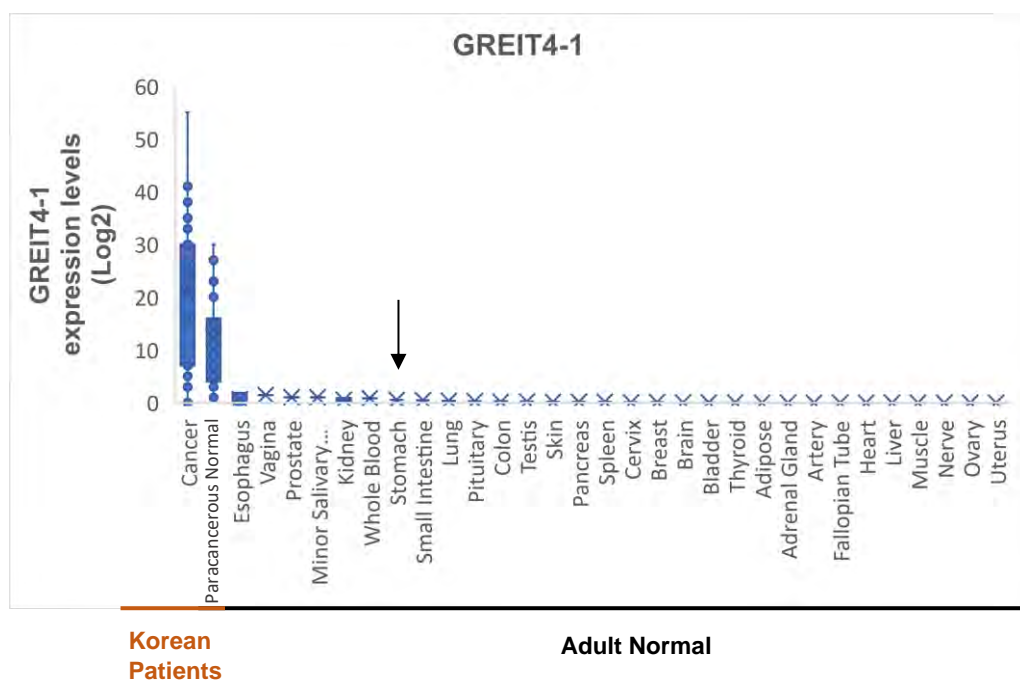
Από την **εικόνα 32** παρατηρείται υψηλότερη έκφραση του GREIT4-1 στον καρκίνο του στομάχου συγκριτικά με το φυσιολογικό παρακαείμενο ιστό στην περίπτωση των Κορεατών, όπως και στην περίπτωση των Αμερικανών και Ευρωπαίων ασθενών. Παρατηρώντας όμως, την γραμμή που ενώνει του μέσους όρους των τιμών διαπιστώνεται μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ του όγκου και του φυσιολογικού παρακαείμενου ιστού στους Κορεάτες ασθενείς. Ακόμη είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η παρουσία του lncRNA GREIT4-1 στους όγκους των Κορεατών είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τους όγκους των Αμερικανών και Ευρωπαίων. Αυτό συμβαίνει, διότι στην περίπτωση των όγκων στους Κορεάτες ασθενείς εντοπίζεται υψηλότερη έκφραση του lncRNA σε σχέση με τους Αμερικανούς και Ευρωπαίους ασθενείς. Γενικότερα, παρατηρώντας στα δύο γραφήματα ότι η κλίμακα του άξονα y μεταξύ αυτών διαφέρει, διαπιστώνεται ότι η έκφραση του GREIT4-1 είναι μεγαλύτερη στους Κορεάτες. Επιπλέον, δεν πρέπει να παραλειφθεί ότι στην περίπτωση των Κορεατών τόσο τα δείγματα των ασθενών όσο και των φυσιολογικών παρακαείμενων ιστών (συνολικά 68 δείγματα) παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ετερογένεια (παραλλακτικότητα) στις τιμές έκφρασης του GREIT4-1. Ειδικότερα παρατηρείται ότι ορισμένες τιμές ταυτίζονται με το 0. Παρ' όλα αυτά τα περισσότερα δείγματα στην περίπτωση των όγκων στους Κορεάτες αντιστοιχούν σε υψηλές τιμές έκφρασης του GREIT4-1.

Στην συνέχεια αφού διαπιστώθηκε η υψηλή έκφραση του GREIT4-1 στους Κορεάτες ασθενείς, πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπέδων έκφρασης αυτού του lncRNA σε προκαρκινικά στάδια (**Εικόνα 33**). Αναλυτικότερα από την ανάλυση αυτή το GREIT4-1 εντοπίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα στα προκαρκινικά στάδια συγκριτικά με το στάδιο εμφάνισης του καρκίνου, καθώς και με το φυσιολογικό παρακείμενο ιστό.



**Εικόνα 33.** Γράφημα ανάλυσης της έκφρασης του GREIT4-1 σε λογαριθμική κλίμακα σε 34 δείγματα ασθενών Κορεατών και 64 δείγματα που αντιστοιχούν στα προκαρκινικά στάδια (NORM: Normal, GAST: Gastritis, AT: Atrophy, EAT: Extended atrophy, IM: Intestinal metaplasia, ORG: Stomach organoids). Η μπλε γραμμή ενώνει τους μέσους όρους των δειγμάτων κάθε κατηγορίας.

Ακολούθως, από την ανάλυση της έκφρασης του GREIT4-1 που πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς δημιουργήθηκε το γράφημα της **εικόνας 34**, στο οποίο βρίσκονται και τα boxplot από την ανάλυση των Κορεατών ασθενών. Πιο αναλυτικά, δεν ανιχνεύεται το lncRNA στους φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς (ή εντοπίζεται ελάχιστη έκφραση) συγκριτικά με τους όγκους των Κορεατών και τους φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς όπου τα επίπεδα της έκφρασης του lncRNA είναι υψηλότερα. Αυτή η παρατήρηση ισχύει και για το στόμαχο σε φυσιολογικό ενήλικο άτομο.



Korean Patients

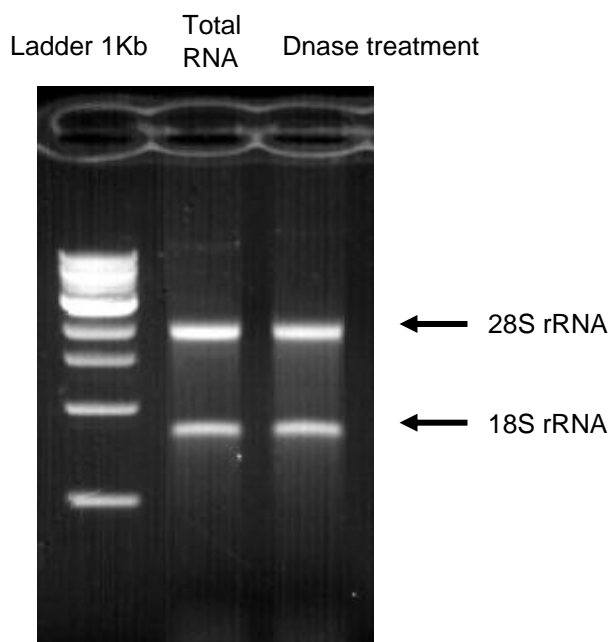
Adult Normal

**Εικόνα 34.** Γράφημα ανάλυσης της έκφρασης του GREIT4-1 σε λογαριθμική κλίμακα σε 55 δείγματα από φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς και 68 δείγματα ασθενών Κορεατών (συμπεριλαμβανομένου και των φυσιολογικών παρακείμενων ιστών).

## 4.2 Πειραματικά αποτελέσματα

### 4.2.1 RNA gel και ηλεκτροφόρηση

Το συγκεκριμένο πείραμα έγινε χρησιμοποιώντας δύο δείγματα. Το ένα δείγμα προέκυψε από εξαγωγή του RNA (RNA extraction) από καρκινικά κύτταρα AGS και το άλλο από Dnase treatment. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να παρατηρηθεί η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης του RNA και γενικά της ποιότητας/ακεραιότητας του RNA. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ηλεκτροφόρησης αποτυπώνονται στην **εικόνα 35**. Οι ζώνες αντιστοιχούν στο ριβοσωμικό RNA (rRNA) 28S και 18S, όπως φαίνεται και στην εικόνα.



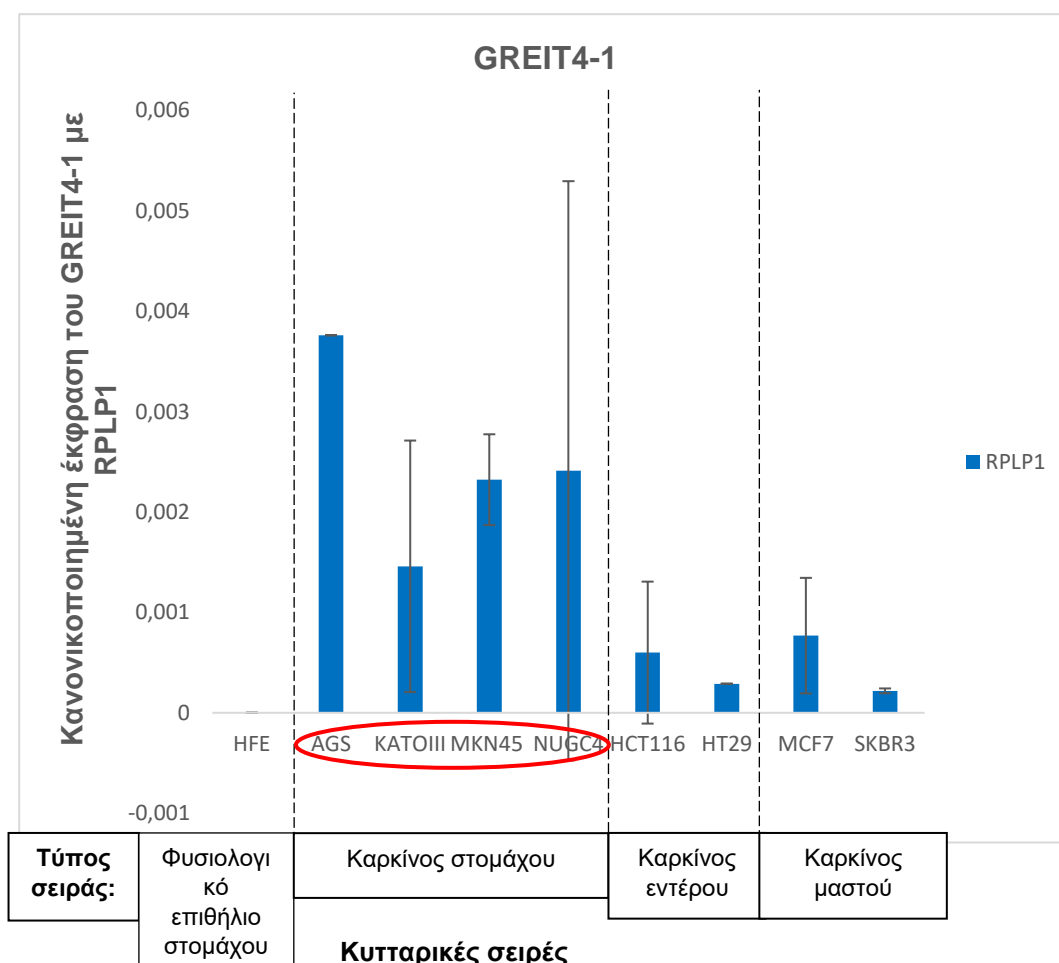
**Εικόνα 35.** Ηλεκτροφόρηση RNA δειγμάτων έπειτα από τις διαδικασίες του RNA extraction και του Dnase treatment. Στην πρώτη στήλη φαίνονται οι ζώνες του Ladder 1Kb. Ακολουθεί το δείγμα, στο οποίο έχει γίνει RNA extraction, και στην τελευταία στήλη φαίνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στο δείγμα που έχει υποστεί Dnase treatment.

### 4.2.2 Επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 σε κυτταρικές σειρές

Αρχικά είναι απαραίτητος ο πειραματικός έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του GREIT4-1 στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, οι οποίες είναι διαθέσιμες στο εργαστήριο, με σκοπό τον εντοπισμό της κυτταρικής σειράς όπου παρατηρείται η υψηλότερη έκφραση. Το διάγραμμα που ακολουθεί απεικονίζει την υψηλότερη έκφραση του lncRNA GREIT4-1 στις καρκινικές σειρές συγκριτικά με την κυτταρική σειρά HFE που προέρχεται από το φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου (**Εικόνα 36**). Η παρατήρηση αυτή αναμενόταν να γίνει καθώς το GREIT4-1 έχει πολύ μικρή έκφραση φυσιολογικά στο στόμαχο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το διάγραμμα που προκύπτει από το πείραμα της qPCR, είναι αποτέλεσμα του μέσου όρου δύο

βιολογικών επαναλήψεων. Επίσης, τα error bars του διαγράμματος προέρχονται από δύο βιολογικές επαναλήψεις.

Συγκεκριμένα εστιάζοντας στην **εικόνα 36** όπου η κανονικοποίηση έγινε με το γονίδιο RPLP1, εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα του GREIT4-1 μόνο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου. Ειδικότερα η υψηλότερη έκφραση ανιχνεύεται στην κυτταρική σειρά AGS ενώ ακολουθούν τα κύτταρα MKN45, NUGC4 και τέλος η καρκινική κυτταρική σειρά KATOIII. Όσον αφορά τις υπόλοιπες καρκινικές κυτταρικές σειρές (HCT116, HT29, MCF7, SKBR3) η έκφραση είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με τα καρκινικά κύτταρα του στομάχου. Επιπλέον, δεν εντοπίζεται έκφραση του GREIT4-1 στα κύτταρα HFE που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό επιθήλιο του στομάχου.

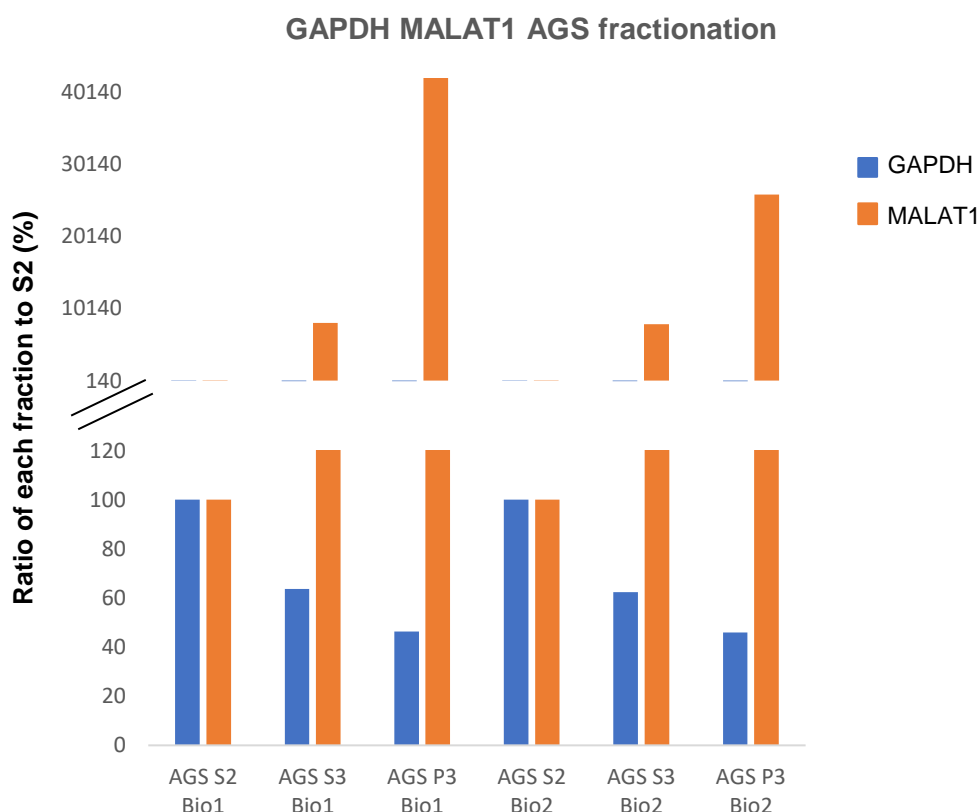


**Εικόνα 36.** Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του lncRNA GREIT4-1 σε 9 κυτταρικές σειρές. Το διάγραμμα αφορά το μέσο όρο των κανονικοποιημένων επιπέδων έκφρασης των δύο βιολογικών επαναλήψεων. Οι κυτταρικές σειρές που αξιοποιούνται είναι οι HFE, AGS, KATOIII, MKN45, NUGC4, HCT116, HT29, MCF7, SKBR3. Οι τιμές του διαγράμματος είναι κανονικοποιημένες με το housekeeping γονίδιο RPLP1.

Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι το GREIT4-1 ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα μόνο στις διαθέσιμες καρκινικές σειρές του στομάχου και συγκεκριμένα διαπιστώνεται η πολύ υψηλή έκφραση στα κύτταρα AGS, τα οποία στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα καταστολής.

### 4.2.3 Υποκυτταρική κλασμάτωση

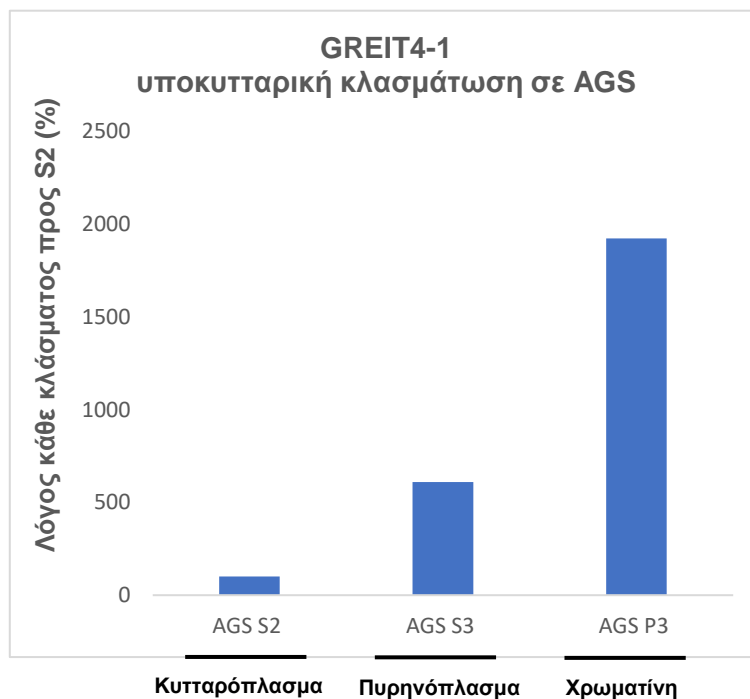
Η πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος κρίνεται απαραίτητη, διότι τα lncRNA μπορούν να βρίσκονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα αλλά οι ρόλοι που επιτελούν στο καθένα διαφοροποιούνται. Γι' αυτό το λόγο υλοποιήθηκε το πείραμα της υποκυτταρικής κλασμάτωσης, για την διεξαγωγή του οποίου χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές AGS, MKN45 και NUGC4, καθώς στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές εντοπίστηκε έκφραση του GREIT4-1 που απεικονίζεται στα διαγράμματα της **εικόνας 38**. Πριν την διεξαγωγή του πειράματος για το lncRNA GREIT4-1 σε αυτά τα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε η υποκυτταρική κλασμάτωση χρησιμοποιώντας εκκινητές για ήδη γνωστά γονίδια στην κυτταρική σειρά AGS. Συγκεκριμένα, ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια GAPDH και MALAT. Το πρώτο είναι γνωστό κωδικοποιητικό γονίδιο, το μετάγραφο του οποίου ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα διότι στο κλάσμα αυτό υπάρχουν τα ριβοσώματα προκειμένου το GAPDH να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη, ενώ το δεύτερο είναι γνωστό μη κωδικοποιητικό γονίδιο, το μετάγραφο του οποίου αλληλεπιδρά με την χρωματίνη. Επίσης, το πείραμα έγινε σε δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις προκειμένου το αποτέλεσμα να είναι όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστο. Ωστόσο τα διαγράμματα των κυτταρικών σειρών MKN45 και NUGC4 αφορούν την μία βιολογική επανάληψη ενώ το διάγραμμα της κυτταρικής σειράς AGS είναι αποτέλεσμα του μέσου όρου των δύο βιολογικών επαναλήψεων. Στο διάγραμμα στον άξονα x αντιστοιχούν τα κλάσματα και σε ποια βιολογική επανάληψη αναφέρονται ενώ στον άξονα y αντιστοιχούν τα επίπεδα παρουσίας των μεταγράφων σε σχέση με το κυτταρόπλασμα σε ποσοστό%. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο διάγραμμα της **εικόνας 37**, το οποίο αντιστοιχεί στην έκφραση των γονιδίων GAPDH και MALAT1 στα κύτταρα AGS στα κλάσματα του κυτταροπλάσματος, του πυρηνοπλάσματος και της χρωματίνης, όπου όπως αναμένονταν και στις δύο βιολογικές επαναλήψεις παρατηρείται αυξημένη παρουσία - και συγκεκριμένα η μέγιστη τιμή - του GAPDH και του MALAT1 στο κυτταρόπλασμα και την χρωματίνη αντίστοιχα. Παρόμοιος έλεγχος με ήδη γνωστά γονίδια για τις κυτταρικές σειρές MKN45 και NUGC4 έχει πραγματοποιηθεί σε προηγούμενες πτυχιακές εργασίες.

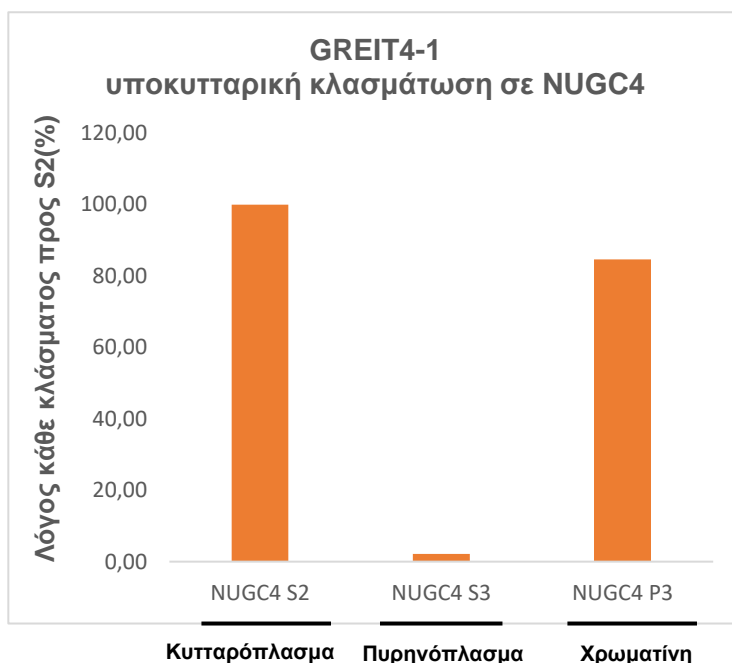
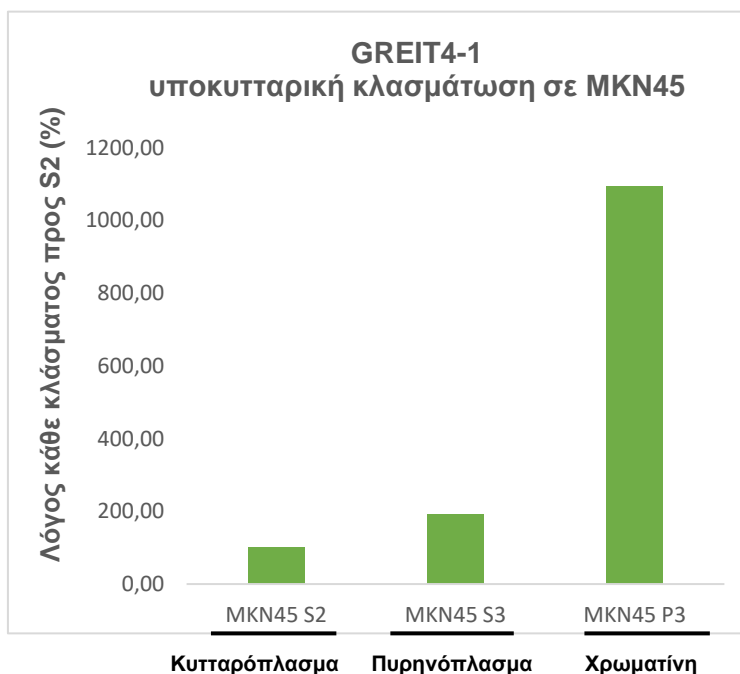




**Εικόνα 37.** Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της qPCR των δύο βιολογικών επαναλήψεων (Bio1, Bio2) για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των μεταγράφων GAPDH και MALAT1. Οι μπλε μπάρες αντιστοιχούν στο GAPDH ενώ οι πορτοκαλί μπάρες στο MALAT1. Ο άξονας y αναπαριστά τα επίπεδα των μεταγράφων ως λόγος κάθε κλάσματος προς το κλάσμα του κυτταροπλάσματος σε ποσοστό %, ενώ στον άξονα x αντιστοιχούν τα κλάσματα και σε ποια βιολογική επανάληψη αναφέρονται (Bio: Βιολογική Επανάληψη) . (axis break)

Όσον αφορά την **εικόνα 38** το πρώτο διάγραμμα αντιστοιχεί στα αποτελέσματα που προκύπτουν από την κυτταρική σειρά AGS, το δεύτερο γράφημα αντιστοιχεί στα κύτταρα MKN45 και το τρίτο διάγραμμα αφορά τα αποτελέσματα από την καρκινική κυτταρική σειρά NUGC4. Στα γραφήματα τα κλάσματα αντιστοιχούν στον άξονα x ενώ ο άξονας y αναπαριστά το λόγο του αριθμού των μεταγράφων κάθε κλάσματος προς το κλάσμα του κυτταροπλάσματος (S2) και η τιμή του λόγου αυτού βρίσκεται σε ποσοστό (%). Στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών AGS και MKN45 εντοπίζεται το lncRNA σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό στο κλάσμα της χρωματίνης και ελάχιστα στο κυτταρόπλασμα ενώ στο τελευταίο διάγραμμα που αφορά την κυτταρική σειρά NUGC4 ανιχνεύεται σε υψηλό ποσοστό στην χρωματίνη αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Η παρουσία του στο πυρηνόπλασμα και στις τρεις περιπτώσεις είναι πολύ μικρή. Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι στην περίπτωση του NUGC4 η κλίμακα του άξονα y που αντιστοιχεί στα ποσοστά είναι πολύ μικρότερη συγκριτικά με τα ποσοστά των προηγούμενων δύο διαγραμμάτων (που αφορούν τα κύτταρα AGS και MKN45). Επομένως, συγκριτικά με τα πρώτα δύο γραφήματα η παρουσία του GREIT4-1 στο κυτταρόπλασμα στα κύτταρα NUGC4 δεν είναι τόσο έντονη αναφορικά με την ανίχνευση των μεταγράφων αυτού του lncRNA στην χρωματίνη όπου και στις τρεις κυτταρικές σειρές - και ιδιαίτερα στις AGS και MKN45 – εντοπίζεται σε πολύ υψηλά ποσοστά (>1000%).





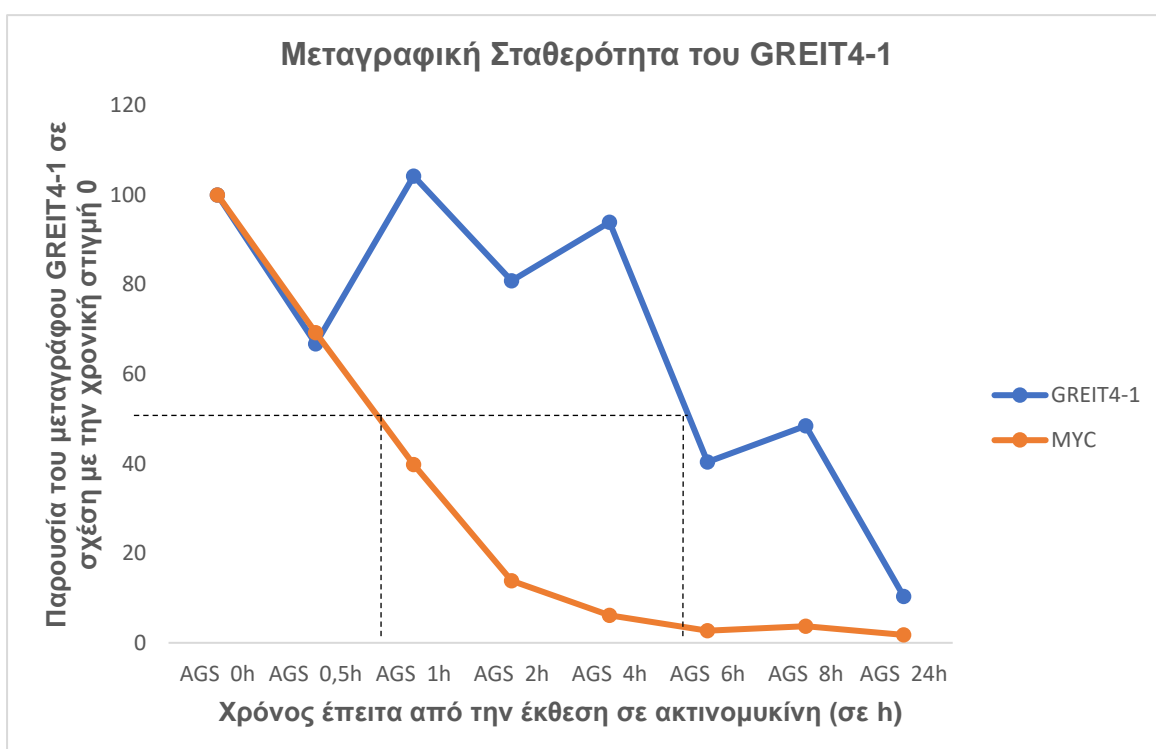
**Εικόνα 38.** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της qPCR με την μορφή διαγραμμάτων με σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό των μεταγράφων του lncRNA GREIT4-1. Το πρώτο διάγραμμα, οι μπάρες του οποίου είναι με μπλε χρώμα, αντιστοιχεί στην υποκυτταρική κλασμάτωση που έγινε στην κυτταρική σειρά AGS, το δεύτερο διάγραμμα που είναι με πράσινο αντιστοιχεί στα κύτταρα MKN45 και το τρίτο διάγραμμα που είναι με πορτοκαλί χρώμα αφορά την κυτταρική σειρά NUGC4. Το ποσοστό του λόγου κάθε κλάσματος προς το κλάσμα του κυτταροπλάσματος που βρίσκεται στον άξονα y απεικονίζει τα επίπεδα των μεταγράφων του GREIT4-1.

Συνεπώς λόγω της αυξημένης παρουσίας του GREIT4-1 στο κλάσμα P3 και στις τρεις κυτταρικές σειρές AGS, MKN45, NUGC4 οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το GREIT4-1 εντοπίζεται στην πλειοψηφία του στο κλάσμα της χρωματίνης.

#### 4.2.4 Μεταγραφική σταθερότητα

Το συγκεκριμένο πείραμα υλοποιήθηκε με σκοπό την μελέτη της σταθερότητας και του χρόνου υποδιπλασιασμού (ο χρόνος που απαιτείται ώστε τα επίπεδα των μεταγράφων να μειωθούν κατά 50% λόγω αποικοδόμησης αυτών) των μεταγράφων του GREIT4-1. Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα AGS λόγω της υψηλής έκφραση του GREIT4-1, στα οποία προστέθηκε ακτινομυκίνη που αναστέλλει την μεταγραφή. Οι χρονικές στιγμές, οι οποίες μελετήθηκαν έπειτα από την έκθεση των κυττάρων με σταθερή συγκέντρωση ακτινομυκίνης και αντιστοιχούν στον άξονα x, είναι οι εξής: 0,5h (ώρες), 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h. Στον άξονα y αναπαρίστανται τα επίπεδα των μεταγράφων του lncRNA GREIT4-1 σε σχέση με την χρονική στιγμή 0 σε ποσοστό %. Ο ρυθμός αποικοδόμησης προσδιορίζεται μελετώντας την παρουσία των μεταγράφων του γονιδίου που μελετάται κάθε χρονική στιγμή όπου τα κύτταρα έχουν κατεργαστεί με ακτινομυκίνη. Την χρονική στιγμή 0 απουσιάζει η ακτινομυκίνη και επομένως το δείγμα αυτό χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου.

Παρατηρώντας το γράφημα της **εικόνας 39** διαπιστώνεται ότι τα μετάγραφα του πρωτο-ογκογονιδίου MYC έχουν τον αναμενόμενο μικρό χρόνο υποδιπλασιασμού που αντιστοιχεί σε λιγότερο από 1h. Αυτό συμβαίνει, διότι το γονίδιο MYC μεταφράζεται σε πρωτεΐνη ενός μεταγραφικού παράγοντα, όποτε η έκφραση του ρυθμίζεται αυστηρά. Αντίθετα αυτό που παρατηρείται για το lncRNA GREIT4-1 είναι ότι μέχρι τις 4h εντοπίζεται μικρή αυξομείωση ως προς τα επίπεδα των μεταγράφων δείχνοντας ότι είναι σταθερό μετάγραφο αλλά η τάση που υπάρχει είναι μείωση στον αριθμό αυτών. Στο διάστημα μεταξύ των 4h και 6h εντοπίζεται απότομη πτώση ως προς την παρουσία των μεταγράφων του GREIT4-1 ενώ στις 24h παρατηρείται η μικρότερη τιμή ως προς τα μεταγραφικά επίπεδα του συγκεκριμένου lncRNA. Επίσης, ο χρόνος υποδιπλασιασμού των μεταγράφων του γονιδίου GREIT4-1 βρίσκεται λίγο πριν τις 6h, το οποίο αποδεικνύει ότι δεν αποικοδομούνται με πολύ γρήγορο ρυθμό συγκριτικά με τα μετάγραφα του MYC.

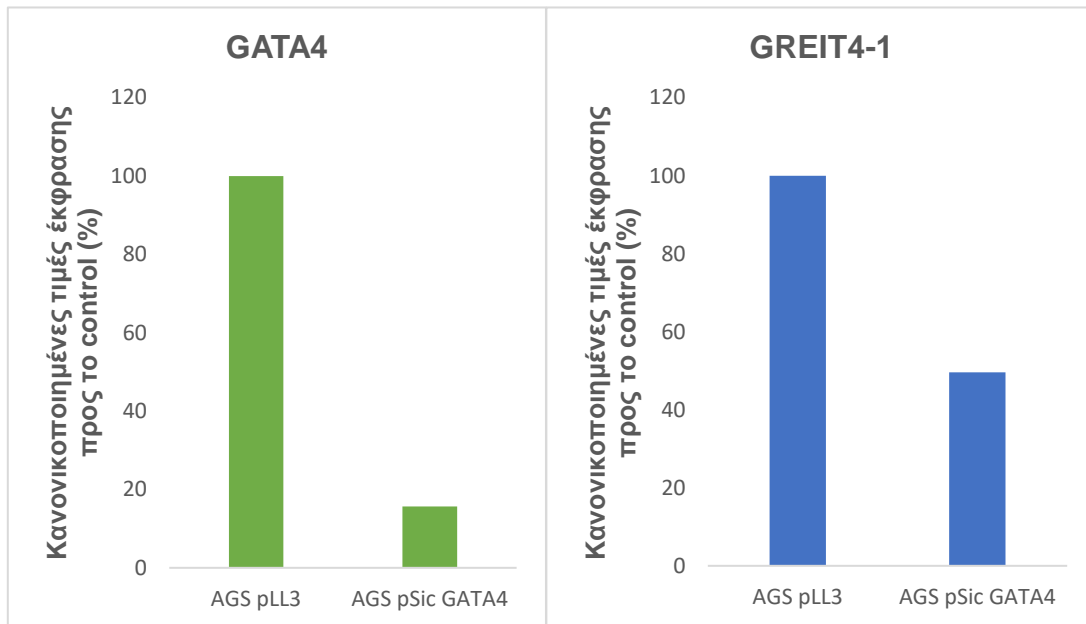


**Εικόνα 39.** Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της qPCR. Στο γράφημα απεικονίζεται το επίπεδο των μεταγράφων του lncRNA GREIT4-1 και του MYC στην κυτταρική σειρά AGS σε διάφορα χρονικά διαστήματα έπειτα από την έκθεση σε ακτινομυκίνη. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στα μετάγραφα του γονιδίου GREIT4-1 ενώ το πορτοκαλί χρώμα αντιπροσωπεύει τα μετάγραφα του γονιδίου MYC. Η χρονική στιγμή 0h αντιστοιχεί σε όλη την ποσότητα του lncRNA και χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν την χρονική στιγμή όπου τα μετάγραφα βρίσκονται στο χρόνο υποδιπλασιασμού τους.

#### 4.2.5 Έλεγχος της έκφρασης των GREIT4-1 και GATA4 από την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα GATA4

Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα της βιοπληροφορικής ανάλυσης ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 πιθανόν ρυθμίζει την έκφραση του lncRNA GREIT4-1 (**Εικόνα 25-27**). Επομένως, πραγματοποιήθηκε καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 στην κυτταρική σειρά AGS ώστε να ελεγχθεί η έκφραση του GATA4 και του lncRNA GREIT4-1 υπό την καταστολή του παράγοντα GATA4. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του GREIT4-1 έπειτα από την σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 στα κύτταρα AGS και συνεπώς η παρατήρηση της πιθανής ρύθμισης του GREIT4-1 από το GATA4. Στην κυτταρική σειρά AGS είχε εντοπιστεί αυξημένη παρουσία του GREIT4-1 και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται τα συγκεκριμένα κύτταρα. Στην συνέχεια διεξήχθη εξαγωγή RNA από τα δείγματα στα οποία έγινε σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων, σύνθεση του cDNA και ποσοτική PCR με χρήση εκκινητών ειδικών για το lncRNA GREIT4-1 και εκκινητές που προσδένονται στον μεταγραφικό παράγοντα GATA4 στα κύτταρα AGS. Επίσης, στο συγκεκριμένο πείραμα της qPCR ως μάρτυρας χρησιμοποιείται ένα δείγμα, στο οποίο τα κύτταρα AGS προσλαμβάνουν έναν φορέα με shSCRAMBLED που δεν στοχεύει πουθενά στο γονιδίωμα.

Ειδικότερα τα αποτελέσματα της ανάλυσης της qPCR στην καρκινική κυτταρική σειρά AGS αναπαρίστανται στα διαγράμματα της **εικόνας 40**. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με το ιδιοσύστατο γονίδιο RPLP1. Στο γράφημα ο άξονας y αναπαριστά το ποσοστό του λόγου κάθε δείγματος προς τα επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 στο δείγμα control σε ποσοστό % ενώ στον άξονα x αντιστοιχούν τα δείγματα. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε ποσοστό (%) συμβάλλει στην σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων χωρίς τα ποσοστά αυτά να αντιπροσωπεύουν τα πραγματικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα. Πιο αναλυτικά έπειτα από την σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 στα κύτταρα AGS παρατηρείται η μείωση του GATA4 που επιτυγχάνεται καθώς και πώς η μείωση του GATA4 επηρεάζει την έκφραση του lncRNA GREIT4-1 στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Επομένως, από τα διαγράμματα διαπιστώνεται ότι έχει πραγματοποιηθεί επιτυχή σίγηση του GATA4 σε ποσοστό 85% συγκριτικά με το control. Η επιτυχής καταστολή του GATA4 σε πολύ υψηλό ποσοστό στα κύτταρα AGS επιβεβαιώνεται και σε επόμενο πείραμα που συνιστά διαφορετική βιολογική επανάληψη αυτού (κεφάλαιο 4.2.7, δεξί διάγραμμα της **εικόνας 42**). Επίσης, ικανοποιητική μείωση εντοπίζεται και στην περίπτωση του lncRNA GREIT4-1 σε ποσοστό 51% σε σύγκριση με το control, η οποία οφείλεται στην καταστολή του GATA4. Συνεπώς, το lncRNA GREIT4-1 καταστάληκε κατά την σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και επομένως, το GATA4 πιθανόν ρυθμίζει την έκφραση του GREIT4-1.



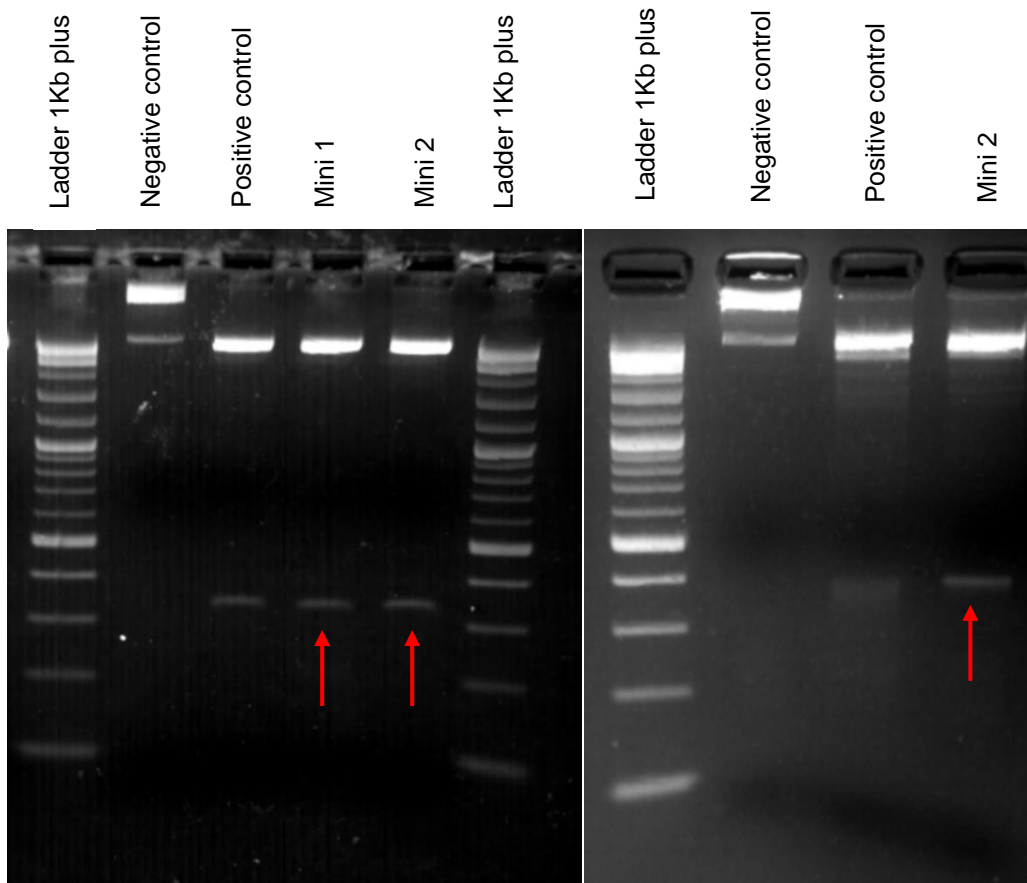
**Εικόνα 40.** Διαγράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της qPCR σε κύτταρα AGS με σκοπό την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του lncRNA GREIT4-1 υπό την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε σύγκριση με το δείγμα control (κύτταρα AGS που έχουν διαμολυνθεί με shSCRAMBLED που δεν στοχεύει πουθενά στο γονιδίωμα). Το αριστερό γράφημα (πράσινο χρώμα) αποδεικνύει επιτυχημένη σίγηση του GATA4. Στο διάγραμμα στα δεξιά (μπλε χρώμα) αναπαρίστανται τα επίπεδα των μεταγράφων του GREIT4-1 σε ποσοστό % του λόγου κάθε δείγματος προς το δείγμα control υπό την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα GATA4.

#### 4.2.6 Κλωνοποίηση shRNA έναντι του GREAT4-1

Έπειτα από την επιβεβαίωση του ρυθμιστικού ρόλου του GATA4 στο lncRNA GREIT4-1 επόμενο βήμα ήταν ο σχεδιασμός και η κλωνοποίηση shRNAs έναντι του ίδιου του lncRNA GREIT4-1. Συνεπώς πραγματοποιείται διαγνωστική πέψη με σκοπό τον έλεγχο της ένθεσης των ολιγονουκλεοτιδίων του GREIT4-1 στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) ένας άκοπος pSicoR φορέας, ο οποίος δεν φέρει ένθεμα (self ligation). Ως θετικός μάρτυρας (positive control) χρησιμοποιήθηκε pSicoR φορέας που έχει ενσωματωμένο shGATA4, το οποίο έχει επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην αριστερή **εικόνα 41**. Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται ότι και το Mini 1 και το Mini 2 είναι θετικά δείγματα, διότι η ζώνη που παρατηρείται στα δείγματα αυτά ευθυγραμμίζεται με την ζώνη του θετικού μάρτυρα (στις 333bp). Επίσης, στα θετικά δείγματα εμφανίζεται και μια έντονη ζώνη ψηλά, η οποία αντιστοιχεί στο υπόλοιπο πλασμίδιο. Αντίθετα στον αρνητικό μάρτυρα δεν παρατηρείται ζώνη στις ίδιες βάσεις με τα θετικά δείγματα.

Το αποτέλεσμα που αφορά το mini2 επιβεβαιώνεται και από μια δεύτερη ανεξάρτητη πέψη. Όπως συνέβη και με τα δύο προηγούμενα ένζυμα περιορισμού τα δείγματα έπειτα από την διαδικασία της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2% όπως φαίνεται και στην δεξιά **εικόνα 41**. Από την εικόνα παρατηρείται ότι η ζώνη στο δείγμα Mini 2 ευθυγραμμίζεται με την ζώνη του δείγματος θετικού ελέγχου (περίπου στις 400bp) σε αντίθεση με τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος αντιστοιχεί σε άκοπο

φορέα pSicoR και επομένως δεν εντοπίζεται αντίστοιχη ζώνη. Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει επιτυχή ένθεση των ολιγονουκλεοτιδίων του GREIT4-1 στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR. Στην συνέχεια επιλέχθηκε ο κλώνος 2, ο οποίος στάλθηκε για αλληλούχηση, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση του shRNA για το GREIT4-1 στον φορέα.



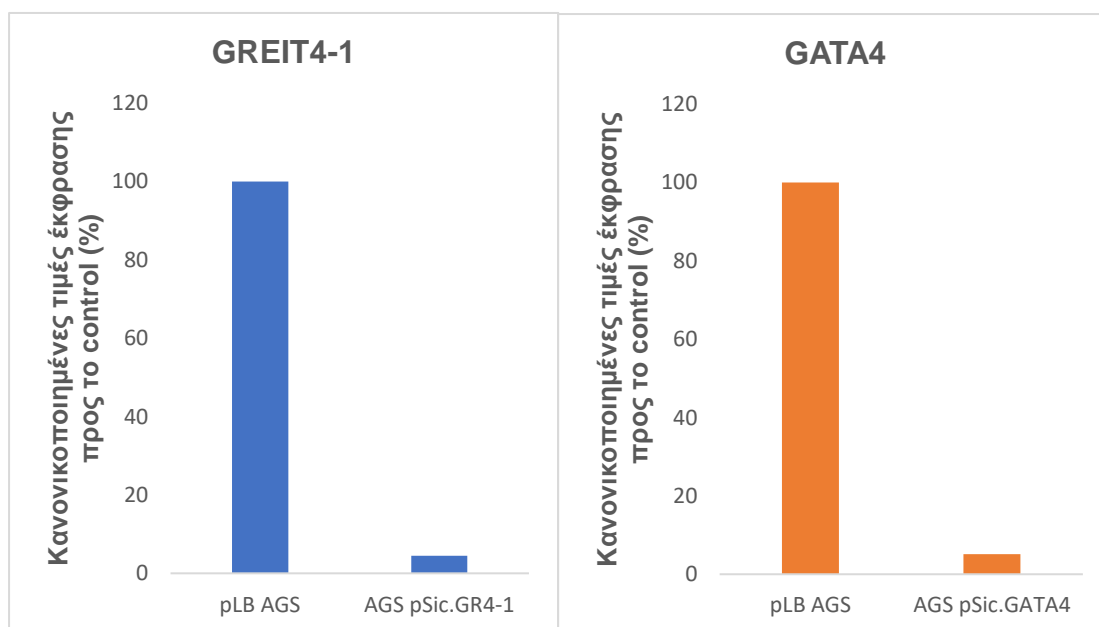
**Εικόνα 41.** Εικόνα αριστερά: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% έπειτα από διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα *SmaI/XbaI* για τον φορέα pSicoR. Στην πρώτη και στην τελευταία στήλη φαίνονται οι ζώνες του ladder 1Kb plus. Δίπλα από την πρώτη στήλη υπάρχει ο αρνητικός μάρτυρας (negative control). Ακολουθεί ο θετικός μάρτυρας (positive control). Στη συνέχεια υπάρχουν τα δείγματα Mini1, Mini2 (συνολικά 2 μοναδιαίες αποικίες) ώστε να γίνει ο έλεγχος της ένθεσης των ολιγονουκλεοτιδίων του GREIT4-1 στο φορέα pSicoR. Με τα κόκκινα βελάκια σημειώνονται οι ζώνες των δύο δειγμάτων που συνιστούν θετικό αποτέλεσμα της διαγνωστικής πέψης. Εικόνα δεξιά: Ομοίως με την εικόνα αριστερά. Η μόνη διαφορά είναι ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση ηλεκτροφορούνται δείγματα η πέψη των οποίων έγινε με τα ένζυμα περιορισμού *BamHI/XbaI*. Επιπλέον, στην πέψη αυτή αξιοποιήθηκε μόνο το δείγμα Mini 2. Συνεπώς από την ηλεκτροφόρηση επιβεβαιώνεται η επιτυχής ένθεση των ολιγονουκλεοτιδίων GREIT4-1 στον φορέα pSicoR.



#### 4.2.7 Έλεγχος της έκφρασης των GREIT4-1 υπό την καταστολή αυτού του lncRNA σε κύτταρα AGS

Έπειτα από την επιτυχή ένθεση των shRNA του GREIT4-1 στον φορέα pSicoR και την πραγματοποίηση της καταστολής αυτού του lncRNA σε κύτταρα AGS, διεξήχθη το πείραμα της qPCR σε δείγμα cDNA που προέρχεται από την κυτταρική σειρά AGS. Σκοπός του πειράματος αυτού είναι ο έλεγχος της έκφρασης του lncRNA GREIT4-1 έπειτα από την καταστολή του συγκεκριμένου lncRNA σε κύτταρα AGS. Επίσης, στο ίδιο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί και η μελέτη της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 υπό την καταστολή αυτού, το οποίο συνιστά διαφορετική βιολογική επανάληψη του πειράματος της ενότητας 4.2.5. (αριστερό πράσινο διάγραμμα της εικόνας 40). Ακόμη ως control χρησιμοποιήθηκε ο φορέας με shSCRAMBLED. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της qPCR αναπαρίστανται στην **εικόνα 42**. Στο πείραμα αυτό της qPCR σχεδιάστηκαν εκκινητές ειδικοί για το GATA4 και εκκινητές που προσδένονται στο lncRNA GREIT4-1. Στο αριστερό γράφημα ο άξονας y αναπαριστά το ποσοστό του λόγου κάθε δείγματος προς τα επίπεδα έκφρασης του GREIT4-1 στο δείγμα control σε ποσοστό % ενώ στον άξονα x αντιστοιχούν τα δείγματα. Αντίστοιχα συμβαίνει και για το δεξιό διάγραμμα αλλά για το γονίδιο GATA4.

Από την **εικόνα 42** (αριστερό μπλε διάγραμμα) παρατηρείται ότι η καταστολή του lncRNA GREIT4-1 ήταν επιτυχής σε ποσοστό 95% συγκριτικά με το control. Επιπλέον, πολύ μεγάλη μείωση εντοπίζεται και στην περίπτωση του GATA4 σε ποσοστό 96% σε σχέση με το control (δεξί πορτοκαλί γράφημα). Όσον αφορά το GATA4 το πείραμα για το γονίδιο αυτό είχε διεξαχθεί και σε δείγμα cDNA από μια ανεξάρτητη βιολογική επανάληψη στα κύτταρα AGS (βλέπε αριστερό διάγραμμα εικόνας 40), όπου η έκφραση του GATA4 μειώθηκε σε ποσοστό 85%. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η επιτυχής μείωση στην έκφραση του GATA4 έπειτα από καταστολή αυτού από δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



**Εικόνα 42.** Διαγράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της qPCR σε κύτταρα AGS με σκοπό την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του lncRNA GREIT4-1 υπό την καταστολή αυτού του lncRNA σε σύγκριση με το δείγμα control (κύτταρα AGS που έχουν διαμολυνθεί με shSCRAMBLED), καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 έπειτα από την καταστολή του GATA4. Το αριστερό γράφημα (μπλε χρώμα) αποδεικνύει επιτυχημένη σίγηση του GREIT4-1. Στο διάγραμμα στα δεξιά (πορτοκαλί χρώμα) αναπαρίστανται επιτυχημένη καταστολή του GATA4.

## **5. Συμπεράσματα και Συζήτηση**

Ο καρκίνος του στομάχου παραμένει υψηλά στην λίστα των περιπτώσεων καρκίνου που εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά εμφάνισης και θνητότητας παρά τις προσπάθειες που καταβάλλουν οι επιστήμονες για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης ασθένειας [273]. Πιο αναλυτικά, ο αριθμός των ατόμων που εμφανίζουν την συγκεκριμένη νόσο, ο οποίος ξεπερνούσε τα 1,22 εκατομμύρια το έτος 2017, και των θανάτων αυξάνεται παγκοσμίως και ιδιαίτερα σε χώρες της Ανατολικής Ασίας [274]. Επιπλέον, ένα βασικό πρόβλημα που αφορά τον καρκίνο του στομάχου είναι η διάγνωση του σε προχωρημένα στάδια λόγω της απουσίας διαγνωστικών εργαλείων αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης μεταστάσεων [275]. Σε αυτό συμβάλλει η μεγάλη ετερογένεια σε γενετικό επίπεδο που εμφανίζεται στον πληθυσμό. Ακόμη, αναφορικά με την θεραπεία της συγκεκριμένης νόσου αξιοποιούνται κυρίως η χειρουργική επέμβαση με σκοπό την αφαίρεση του όγκου και οι χημειοθεραπείες τα αποτελέσματα των οποίων όμως δεν έχουν σημαντικά οφέλη, λόγω της ήδη καθυστερημένης διάγνωσης του καρκίνου του στομάχου [276],[277],[278] ενώ παράλληλα σημειώνεται αύξηση του κόστους των θεραπειών σε προχωρημένο στάδιο [98]. Συνεπώς, είναι αναγκαία η εύρεση εξειδικευμένων βιοδεικτών, οι οποίοι θα χρησιμεύσουν τόσο για την έγκαιρη διάγνωση όσο και ως θεραπευτικοί στόχοι της ασθένειας.

Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 δρα φυσιολογικά ως ρυθμιστής συγκεκριμένης κυτταρικής γενεαλογίας και ειδικότερα εντοπίζεται στα στάδια ανάπτυξης του στομάχου όπου συμβάλλει στην διατήρηση ορισμένων κυτταρικών τύπων. Επίσης, είναι ένα ογκογονίδιο, η έκφραση του οποίου ενισχύεται στον καρκίνο του στομάχου και οδηγεί στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου όγκου ενεργοποιώντας αναπτυξιακά στάδια εξειδικευμένα για το στομάχο (lineage survival oncogene) (υποενότητα 1.4.6) [141]. Λόγω της φυσιολογικής λειτουργίας του συγκεκριμένου αυτού παράγοντα δεν μπορεί να αποτελέσει άμεσο θεραπευτικό στόχο. Συνεπώς, η προσοχή στρέφεται στα γονίδια στόχους του GATA4 και ειδικότερα στα lncRNAs. Τα lncRNAs συνιστούν μη κωδικοποιητικά μετάγραφα [279] και εμφανίζουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης, καθώς εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς και σε συγκεκριμένα στάδια εμβρυικής ανάπτυξης (υποενότητα 1.5.3) [280],[281]. Αυτό είναι σημαντικό στην περίπτωση της μελέτης ενός τύπου καρκίνου, όπως ο καρκίνος του στομάχου. Η έκφραση των lncRNA απορρυθμίζεται στην περίπτωση του καρκίνου με ορισμένα να μειορρυθμίζονται και άλλα να αυξορρυθμίζονται (υποενότητα 1.5.5). Άρα lncRNAs, των οποίων η έκφραση τους ρυθμίζεται από το GATA4 και αυξάνεται στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, εντάσσονται στο πλαίσιο των εξειδικευμένων μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων με σκοπό την έγκαιρη πρόγνωση της νόσου ενώ παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι της ασθένειας [282],[283].

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία δεν αναφέρεται ότι υπάρχουν lncRNA είτε πυρηνικά είτε κυτταροπλασματικά, τα οποία να ρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα GATA4. Αυτό όμως δεν ισχύει για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας GATA ή και άλλα γονίδια που ανήκουν στην κατηγορία των lineage survival oncogenes και συμβάλλουν στην διατήρηση συγκεκριμένης κυτταρικής γενεαλογίας. Πιο αναλυτικά ο μεταγραφικός παράγοντας KLF5 (Krüppel-like factor 5) αλληλεπιδρά με το DNA όπως και οι παράγοντες GATA με δακτύλους ψευδαργύρου και ανήκει στην οικογένεια των lineage survival oncogenes ενεργοποιώντας πρώιμα αναπτυξιακά συστήματα. Επίσης, η έκφραση του αυξάνεται στην περίπτωση του καρκίνου του στομάχου [284]. Ακόμη, ο KLF5 έχει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφραση του LINC00346 στην συγκεκριμένη νόσο. Συγκεκριμένα, προσδένεται στον υποκινητή του lncRNA LINC00346 και ενισχύει την έκφραση του με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα του στα καρκινικά κύτταρα του στομάχου. Το LINC00346 είναι ένα κυτταροπλασματικό

lncRNA και έχει ρόλο σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Επιπρόσθετα, η αύξηση στην έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA επιταχύνει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και κατ' επέκταση την ανάπτυξη των κυττάρων ενώ παράλληλα προωθεί την μετάσταση των κυττάρων [285]. Συνεπώς, αυτό το lncRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την διάκριση των καρκινικών κυττάρων του στομάχου από τα φυσιολογικά κύτταρα. Μία ακόμη περίπτωση, σύμφωνα με την οποία ο μεταγραφικός παράγοντας KLF5 ρυθμίζει την έκφραση ενός lncRNA, εντοπίζεται στον καρκίνο του μαστού. Ειδικότερα, το lncRNA RP1-5O6.5 (ή απλούστερα RP1) υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και αυτή η αυξημένη έκφραση οφείλεται στην ρύθμιση του από τον παράγοντα KLF5, ο οποίος έχει αυξημένη έκφραση στην συγκεκριμένη νόσο και στρατολογεί τον παράγοντα p300 στον υποκινητή του RP1. Αν και δεν είναι πλήρως γνωστός ο ρόλος του RP1 έχει παρατηρηθεί ότι η μεγάλη έκφραση στην συγκεκριμένη νόσο ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου [286]. Επομένως, το RP1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός θεραπευτικός στόχος και βιοδείκτης για την συγκεκριμένη νόσο.

Εκτός από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 υπάρχουν και άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων και όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή είναι το MITF, το οποίο έχει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των μελανοκυττάρων (υποενότητα 1.4.7). Πιο αναλυτικά, η έκφραση του MITF ελέγχεται από το SOX10 και μαζί το MITF-SOX10 ελέγχουν την έκφραση αρκετών lncRNA στην περίπτωση του μελανώματος. Ένα lncRNA που έχει δείχθει ότι η έκφραση του ελέγχεται από το MITF-SOX10 είναι το DIRC3, το οποίο είναι ένα πυρηνικό lncRNA και δρα κατασταλτικά στο μελάνωμα μέσω της έκφρασης του γονιδίου IGFBP5. Συνεπώς, η έκφραση του lncRNA DIRC3 καταστέλλεται από το σύμπλοκο MITF-SOX10 ενώ στο στάδιο της μετάστασης παρατηρείται μείωση της έκφρασης του MITF-SOX10 και συνεπώς αύξηση του DIRC3 [287]. Ακόμη, στην περίπτωση του μελανώματος έχει μελετηθεί και ένας ακόμη πιθανός δείκτης που είναι το lncRNA SAMMSON. Ειδικότερα, αποτελεί στόχο του μεταγραφικού παράγοντα SOX10 και επάγει την έκφραση του SAMMSON στις περισσότερες περιπτώσεις των ανθρωπίνων μελανωμάτων συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του όγκου [288].

Από τα προηγούμενα παραδείγματα συμπεραίνεται ότι υπάρχουν lncRNAs, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην διατήρηση συγκεκριμένης κυτταρικής γενεαλογίας (lineage survival cell). Επίσης, τα lncRNAs που αποτελούν στόχους αυτών των μεταγραφικών παραγόντων μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες για την έγκαιρη πρόγνωση του καρκίνου και ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιείται στο εργαστήριο μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του lncRNA GREIT4-1 από μεταγραφικά σύμπλοκα στον καρκίνο του στομάχου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μη κωδικοποιητικής ικανότητας του γονιδίου GREIT4-1 με την χρήση των προγραμμάτων CPAT και CPC2 όπου αποδείχθηκε ότι ανήκει στην οικογένεια των lncRNAs (**Εικόνα 22-23**). Επιπλέον, με την χρήση του προγράμματος WashU διαπιστώθηκε ότι ο γονιδιωματικός τόπος του GREIT4-1 δεν διατηρείται ακέραιος στον ποντικό (**Εικόνα 24**). Ακολούθως, από τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του GREIT4-1 και του μεταγραφικού παράγοντα σε 1020 καρκινικές κυτταρικές σειρές προέκυψε υψηλή και εξειδικευμένη έκφραση και των δύο γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα του στομάχου επιβεβαιώνοντας την βασική υπόθεση ότι τα lncRNA εξειδικεύουν τους μεταγραφικούς παράγοντες και συγκεκριμένα το lncRNA GREIT4-1 εξειδικεύει το GATA4 (**Εικόνα 25-26**). Αντίστοιχο αποτέλεσμα πάρθηκε και από τα boxplot της **εικόνας 27**, τα οποία εστιάζουν στο γαστρεντερικό σύστημα ενισχύοντας την υπόθεση ότι ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 ρυθμίζει την έκφραση του lncRNA GREIT4-1. Επίσης, από την ανάλυση μόνο

των καρκινικών κυττάρων του στομάχου, όπου εντοπίστηκε υψηλή έκφραση και των δύο γονιδίων, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του GATA4 και του GREIT4-1 στα πρωταρχικά στάδια του όγκου συγκριτικά με τα μετέπειτα στάδια (στάδιο μετάστασης) (**Εικόνα 28**). Από αυτήν την μελέτη διαπιστώνεται η συσχέτιση του παράγοντα GATA4 και του GREIT4-1 στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Στην συνέχεια διεξήχθη ανάλυση της έκφρασης του GREIT4-1 και των μεταγραφικών παραγόντων από 400 βιοψιών Ευρωπαίων και Αμερικανών ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών (**Εικόνα 29**) όπου επιβεβαιώνεται και από τις βιοψίες η αυξημένη έκφραση του GREIT4-1 καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 στον καρκίνο του στομάχου συγκριτικά με το φυσιολογικό παρακείμενο. Επομένως, η υψηλή παρουσία του GREIT4-1 και του GATA4 στον καρκίνο του στομάχου που διαπιστώθηκε τόσο από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και από τις βιοψίες ασθενών, ενισχύει την υπόθεση της ρύθμισης αυτού του lncRNA από τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4. Αφού παρατηρήθηκε η παρουσία του GREIT4-1 στον καρκίνο του στομάχου, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης αυτού στα στάδια της συγκεκριμένης νόσου (**Εικόνα 30**). Ωστόσο δεν εντοπίστηκε διαφορά ως προς την έκφραση αυτού στα στάδια του καρκίνου του στομάχου, το οποίο είναι ενθαρρυντικό για την χρήση του GREIT4-1 ως βιοδείκτη με σκοπό την διάγνωση της νόσου από τα πρώτα κιάλας στάδια.

Επίσης, δημιουργήθηκαν scatter plots προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα η συσχέτιση του lncRNA GREIT4-1 με τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4, καθώς έχει δείχθει ότι εκφράζονται και τα δύο σε υψηλά επίπεδα στον καρκίνο του στομάχου. Επιπλέον, κατασκευάστηκε και ένα scatter plot με σκοπό την μελέτη της συσχέτισης του GREIT4-1 με τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 (**Εικόνα 31**). Από την ανάλυση αυτή παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του GREIT4-1 και του KLF5. Με άλλα λόγια αυτή η ισχυρή θετική συσχέτιση σημαίνει ότι αύξηση της έκφρασης του KLF5 συνεπάγεται και αύξηση της έκφρασης του GREIT4-1, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο KLF5 μπορεί να συμμετέχει στην ρύθμιση του συγκεκριμένου lncRNA. Αντίθετα, όσον αφορά το GREIT4-1 και το GATA4 παρατηρήθηκε μικρή συσχέτιση. Επομένως, προκύπτει ότι στους όγκους υπάρχει πολύπλοκη ρύθμιση του lncRNA που μελετάται από πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, δηλαδή η έκφραση του δεν ελέγχεται μόνο από το GATA4 αλλά και από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Ωστόσο δεν πρέπει να παραλειφθεί το γεγονός ότι τα δεδομένα για την συγκεκριμένη ανάλυση προέκυψαν από 375 βιοψίες τυχαίων ασθενών και φυσιολογικών παρακείμενων ιστών ενώ τα συγκεκριμένα δείγματα αφορούν ετερογενείς όγκους από διάφορα στάδια, ηλικίες και θεραπείες σε επίπεδο ασθενούς, το οποίο σημαίνει ότι υπάρχει πολύ μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των ασθενών που επηρεάζει το αποτέλεσμα των συσχετίσεων.

Επιπλέον, στα πλαίσια της βιοπληροφορικής ανάλυσης δημιουργήθηκαν boxplots με σκοπό την ανάλυση της έκφρασης του GREIT4-1 σε 68 βιοψίες Κορεατών συγκριτικά με την ανάλυση που έγινε σε Ευρωπαίους και Αμερικανούς ασθενείς (**Εικόνα 32**). Από την ανάλυση αυτή διαπιστώθηκε η υψηλή έκφραση του GREIT4-1 στην περίπτωση του καρκίνου σε σχέση με τον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό στην περίπτωση των Κορεατών. Αντίστοιχη αλλά με μικρότερη διαφορά στην έκφραση συγκριτικά με τον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό παρατηρήθηκε και από τα boxplot των Ευρωπαίων και των Αμερικανών ασθενών. Η υψηλή έκφραση του GREIT4-1 στους Κορεάτες σε σχέση με του Ευρωπαίους και του Αμερικανούς ασθενείς οφείλεται στις αυξημένες τιμές, στις οποίες αντιστοιχεί η έκφραση του lncRNA. Γενικά, στους Κορεάτες ασθενείς παρατηρείται παραλλακτικότητα μεταξύ των ασθενών, καθώς υπάρχουν τόσο μηδενικές τιμές, οι οποίες αντιστοιχούν σε βιοψίες όπου δεν ανιχνεύεται το GREIT4- 1

όσο και τιμές με υψηλή έκφραση του lncRNA. Ωστόσο, στον μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων εντοπίζεται υψηλή παρουσία του GREIT4-1 στον καρκίνο του στομάχου.

Έπειτα από την παρατήρηση της αυξημένης παρουσίας του lncRNA στους Κορεάτες ασθενείς, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης αυτού και στα προκαρκινικά στάδια (**Εικόνα 33**). Από την ανάλυση αυτή διαπιστώθηκε μικρότερη έκφραση σε όλα τα προκαρκινικά στάδια συγκριτικά με τον καρκίνο και το φυσιολογικό παρακείμενο ιστό. Συνεπώς, το συγκεκριμένο lncRNA GREIT4-1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στα αρχικά στάδια της νόσου, όπου παρατηρείται και ενίσχυση των αντιγράφων του GATA4, και όχι στις προκαρκινικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, η επιβεβαίωση ότι το GREIT4-1 εκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα ενώ δεν εντοπίζεται σε φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς προήλθε από την αντίστοιχη ανάλυση (**Εικόνα 34**), όπου συγκριτικά με τους Κορεάτες ασθενείς δεν ανιχνεύεται το lncRNA στους φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του στομάχου. Επομένως, από τις βιοπληροφορικές αναλύσεις προέκυψαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο ως προς την εξειδικευμένη υψηλή έκφραση του GREIT4-1 και του GATA4 στον καρκίνο του στομάχου όσο και για την πιθανή ρύθμιση του lncRNA από τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4 δίνοντας την δυνατότητα της αξιοποίησης του GREIT4-1 ως δείκτη για την έγκαιρη πρόγνωση του καρκίνου σε πρώιμα στάδια και της πιθανής επανεμφάνισης της νόσου έπειτα από την θεραπεία.

Από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο επιβεβαιώθηκε η παρουσία του GREIT4-1 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου (AGS, MKN45, KATOII, NUGC4) (**Εικόνα 36**), οι οποίες αξιοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των υπόλοιπων πειραμάτων. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη έκφραση εντοπίστηκε στην κυτταρική σειρά AGS και αυτή η κυτταρική σειρά αντιστοιχεί σε πρωτογενές δείγμα καρκίνου του στομάχου. Επιπλέον, όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου lncRNA από το πείραμα της υποκυτταρικής κλασμάτωσης (**Εικόνα 37-38**) προέκυψε ότι το GREIT4-1 εντοπίζεται στην χρωματίνη παρουσιάζοντας παρόμοιο πρότυπο εντοπισμού με το μη κωδικοποιητικό γονίδιο MALAT, το οποίο είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με την χρωματίνη [289]. Συνεπώς, αυτό ενισχύει την πιθανότητα η βιολογική δράση του GREIT4-1 να βρίσκεται στην χρωματίνη όπου το lncRNA μπορεί να αλληλεπιδρά μεταξύ άλλων με το DNA, με παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, με μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ επίσης μπορεί να συμβάλλει στην αλληλεπίδραση απομακρυσμένων περιοχών της χρωματίνης. Επιπρόσθετα, σχετικά με την μεταγραφική σταθερότητα του lncRNA αυτό που παρατηρείται από την **εικόνα 39** είναι ότι το GREIT4-1 εμφανίζει χρόνο υποδιπλασιασμού κοντά στις 6h. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο lncRNA συμμετέχει στο σχηματισμό συμπλόκων με πρωτεΐνες και επομένως να αυξάνεται ο χρόνος που το lncRNA παραμένει σταθερό ώστε να επιτελέσει της βιολογική του δράση. Επομένως, το συγκεκριμένο πείραμα μπορεί να οδηγήσει σε συμπεράσματα σχετικά με την λειτουργία του lncRNA.

Ακόμη, στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας δύο δείγματα που αφορούν την μεταγραφική σταθερότητα την χρονικά στιγμή των 2h ηλεκτροφορήθηκαν ενδεικτικά (**Εικόνα 35**) ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του RNA extraction. Το ένα δείγμα προέρχεται από το στάδιο του RNA extraction και το άλλο από Dnase treatment. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι και στα δύο δείγματα η ένταση των δύο ζωνών είναι παρόμοια, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε ένα αποτελεσματικό RNA extraction. Επιπλέον, η αυξημένη φωτεινότητα στις δύο ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στο ριβοσωμικό RNA (rRNA) 28S και 18S, αποδεικνύει ότι το συνολικό RNA είναι καλής ποιότητας, είναι ακέραιο και δεν έχει κατακερματιστεί. Αυτό



ισχύει και για τα δύο δείγματα (RNA και DNase treatment). Επίσης, παρατηρείται ότι η ζώνη που αντιστοιχεί στο 28S είναι πιο έντονη από την ζώνη που αντιστοιχεί στο 18S (αναλογία 28S:18S περίπου 2:1). Ακόμη, δεν εντοπίζεται μόλυνση του δείγματος από γονιδιωματικό DNA (gDNA) έπειτα από την αντίδραση της DNase.

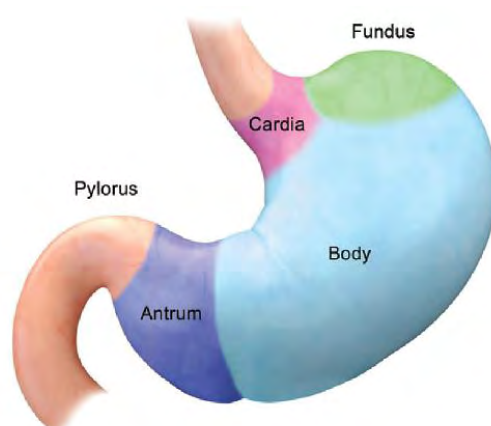
Όπως έχει δειχθεί και από την βιοπληροφορική ανάλυση εντοπίζεται εξειδικευμένη έκφραση των GREIT4-1 και του GATA4 στον καρκίνο του στομάχου, το οποίο πιθανόν συμβαίνει λόγω της ρύθμισης του GREIT4-1 από το GATA4. Για να μελετηθεί η υπόθεση αυτή πειραματικά πραγματοποιήθηκε qPCR για τα γονίδια GATA4 και GREIT4-1 σε δείγματα στα οποία είχε γίνει σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα AGS, στα οποία εντοπίζεται υψηλή έκφραση του GREIT4-1 (**Εικόνα 40**). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την κυτταρική σειρά AGS φανερώνουν επιτυχή σίγηση του GATA4, καθώς η μείωση των μεταγράφων του GATA4 είναι σε ποσοστό 85% σε σχέση με το control (στο αριστερό πράσινο διάγραμμα), ενώ ικανοποιητική μείωση της τάξης του 51% υπήρξε και στην περίπτωση του GREIT4-1 (στο δεξί μπλε διάγραμμα), η οποία οφείλεται στην καταστολή του GATA4. Αυτό σημαίνει ότι η έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA βρίσκεται υπό τον έλεγχο του GATA4 και επομένως η απουσία του GATA4 επηρεάζει την έκφραση του GREIT4-1. Επίσης, το πείραμα καταστολής του παράγοντα GATA4 στα κύτταρα AGS διεξήχθη ξανά, το οποίο συνιστά βιολογική επανάληψη για το μεταγραφικό παράγοντα GATA4 και το αποτέλεσμα αυτού αναπαρίσταται στο δεξί (πορτοκαλί) διάγραμμα της **εικόνας 42** που εξηγείται στην επόμενη παράγραφο.

Επιπλέον, στην παρούσα πτυχιική εργασία κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια των shRNAs του GREIT4-1 ώστε να εκφραστούν τα shRNA με σκοπό την σίγηση του συγκεκριμένου lncRNA. Ειδικότερα, το shRNA αναγνωρίζει το 3' άκρο του GREIT4-1, διότι με αυτόν τον τρόπο αποικοδομείται το μετάγραφο και επομένως αυξάνεται η πιθανότητα να επιτευχθεί η καταστολή του lncRNA. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη με σκοπό να ελεγχθεί η ένθεση των ολιγονουκλεοτιδίων του GREIT4-1 στον φορέα pSicoR. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης αναπαρίσταται στην **εικόνα 41**, το οποίο δείχνει ότι η ένθεση των shRNA που στοχεύουν το GREIT4-1 στον φορέα ήταν επιτυχής. Η επιτυχής μείωση στην έκφραση του GREIT4-1 υπό την καταστολή αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στα κύτταρα AGS διαφαίνεται στο αριστερό (μπλε) διάγραμμα της **εικόνας 42**, η μείωση στην έκφραση του οποίου εντοπίζεται σε ποσοστό 95% συγκριτικά με το control. Επίσης, στην εικόνα αυτή (στο δεξί πορτοκαλί διάγραμμα) επιβεβαιώνεται και η μείωση στην έκφραση του GATA4 υπό την καταστολή αυτού σε ποσοστό 96% στα κύτταρα AGS, το οποίο είχε παρατηρηθεί και στο αριστερό (πράσινο) διάγραμμα της **εικόνας 40** (σε ποσοστό 85%) που αφορά διαφορετική βιολογική επανάληψη αυτού. Οπότε και από τις δύο βιολογικές επαναλήψεις που αφορούν την καταστολή του GATA4 στα κύτταρα AGS προκύπτει επιτυχής σίγηση του GATA4 σε πολύ υψηλό ποσοστό (85% στην μία βιολογική επανάληψη και 96% στην άλλη). Επιπλέον, όπως διαπιστώθηκε και από το αριστερό (μπλε) διάγραμμα της εικόνας 42 όπου το ποσοστό σίγησης είναι πολύ υψηλό (95%) η καταστολή του GREIT4-1 στην κυτταρική σειρά AGS ήταν επιτυχής.

## **6.Παράρτημα**

## 6.1 Ανατομία του στομάχου

Ο στομάχος είναι ένα όργανο που βρίσκεται στο άνω αριστερό τεταρτημόριο της κοιλίας κάτω από το διάφραγμα. Είναι ένας μυϊκός σάκος που έχει μορφή σχήματος J και εκτείνεται από το κατώτερο οισοφαγικό πόρο έως και το δωδεκαδάχτυλο του λεπτού εντέρου. Επιπρόσθετα, έχει δύο ανοίγματα την καρδιά και τον πυλωρό, τα οποία ενώνουν το στομάχο με τον οισοφάγο σχηματίζοντας την γαστρο-οισοφαγική ένωση και τον δωδεκαδάχτυλο σχηματίζοντας την γαστρο-δωδεκαδακτυλική ένωση αντίστοιχα. Επίσης, αποτελείται από τα εξής τμήματα: την καρδιά, το θόλο, το σώμα, το άντρο και τον πυλωρό (**Εικόνα 37**) [290]. Πιο αναλυτικά, η καρδιά είναι μακροσκοπικά αδιαφανής ζώνη που εκτείνεται για μερικά εκατοστά μακριά από τη γαστρο-οισοφαγική διασταύρωση και αποτελείται από σωληνοειδείς αδένες που επενδύονται από κύτταρα που εκκρίνουν οξύ και βλέννα. Ο θόλος είναι το ανώτατο τμήμα του στομάχου. Το σώμα περιλαμβάνει τα 2/3 της γαστρικής περιοχής. Το άντρο αποτελεί το κατώτερο τμήμα του στομάχου και έχει σχήμα χοάνης και το στενό τμήμα αυτής συνδέεται με το στομάχι μέσω του πυλωρού [42], [126].



**Εικόνα 37.** Ανατομία του στομάχου [42]

Τέσσερα διαφορετικά στρώματα συνιστούν το τοίχωμα του στομάχου, τα οποία είναι ο βλεννογόνος, ο υποβλεννογόνος, το μυϊκό στρώμα και ο ορογόνος υμένας [291],[292]. Πιο συγκεκριμένα, ο βλεννογόνος χιτώνας έρχεται σε επαφή με τα θρεπτικά συστατικά και είναι μια πλήρως σωληνοειδής αδενική μορφή. Επίσης, όλο το τοίχωμα συνίσταται από επιθήλιο και κοιλότητες, τα οποία επενδύονται με κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα και εκκρίνουν επίσης διττανθρακικά άλατα καθώς και ιόντα νατρίου [293]. Ο υποβλεννογόνος αποτελείται από ένα παχύ φύλλο συνδετικού ιστού, το οποίο παρέχει ελαστικότητα στο στομάχι. Το εξαιρετικά παχύ στρώμα λείου μυός, το οποίο αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα, έχει ρόλο στις περισταλτικές κινήσεις του στομάχου ενώ ο ορογόνος υμένας είναι το εξωτερικό στρώμα του τοιχώματος και αποτελείται από τη στήριξη του συνδετικού ιστού [294].

Επιπλέον, τρεις κύριοι τύποι αδένων εμπεριέχονται στο γαστρικό βλεννογόνο: οι καρδιακοί αδένες, οι οξυντικοί αδένες (κύτταρα που παράγουν βλέννα και υδροχλωρικό οξύ) και οι πυλωρικοί αδένες (κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα και γαστρίνη) [295], [296]. Ακόμη περιλαμβάνει ιστούς που προέρχονται από τα 3 εμβρυϊκά στρώματα συμπεριλαμβανομένων των εντερικών νεύρων εκτοδερμικής προέλευσης, των λείων μυών μεσοδερμικής προέλευσης και των μεσεγγυματικών κυττάρων καθώς και του επιθηλίου ενδοδερμικής προέλευσης που φέρει την κοιλότητα του στομάχου. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι απαιτούνται αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο γαστρικό ενδόδερμα και μεσόδερμα με σκοπό την σωστή γαστρική ανάπτυξη[297].

Η φυσιολογική λειτουργία του στομάχου περιλαμβάνει την παραγωγή οξέων και ενζύμων που συμμετέχουν στην πέψη του φαγητού και την κατακράτηση αυτού για την ρυθμιζόμενη μεταφορά της τροφής προς το λεπτό έντερο [298].

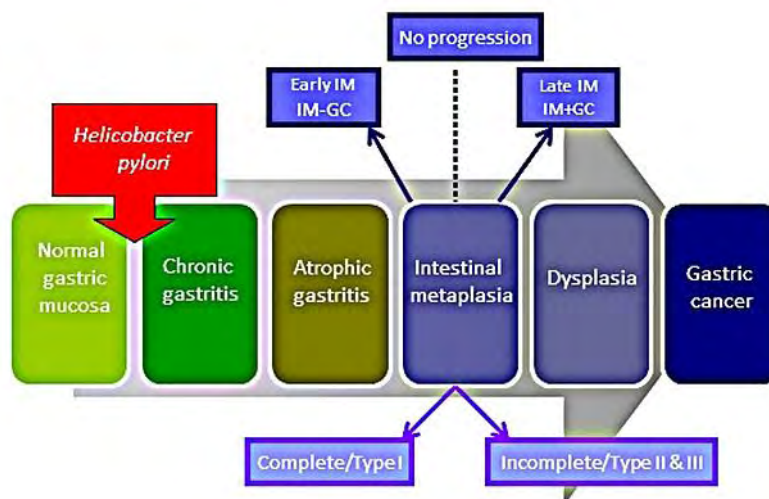
## 6.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες υπεύθυνοι για την εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου

Η υψηλή κατανάλωση άλατος είναι ο σημαντικότερος διατροφικός παράγοντας που οδηγεί σε ατροφική γαστρίτιδα [299]. Αυτό συμβαίνει, διότι το αλάτι οδηγεί σε φλεγμονή διαβρώνοντας το βλεννογόνο φράγμα του στομάχου [300]. Αντίθετα, τα φρέσκα φρούτα και τα φυλλώδη λαχανικά καθώς και αυτά που είναι πλούσια σε βιταμίνη C, E και Β-καροτένιο προστατεύουν τον οργανισμό από την εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, καθώς έχουν αντιοξειδωτική δράση [301]. Επίσης, η έλλειψη σιδήρου συμβάλλει στην πρόοδο της καρκινογένεσης. Ακόμη, το κάπνισμα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση εντερικής μεταπλασίας και δυσπλασίας [302]. Παράλληλα, η παχυσαρκία είναι ένα σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην εμφάνιση του καρδιακού γαστρικού αδενοκαρκινώματος λόγω της αντίστασης στην ινσουλίνη, των παραγόντων που σχετίζονται με την φλεγμονή και του οξειδωτικού στρες [303]. Ωστόσο σημαντικότερο ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου έχει το *Helicobacter pylori*, το οποίο είναι ένα Gram- βακτήριο και βρίσκεται στο 50% του παγκόσμιου πληθυσμού στο στόμαχο, ενώ συμβάλλει στον καρκίνο του στομάχου μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης του με το γαστρικό επιθήλιο [304]. Η συμμετοχή του λοιπόν, στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου συνδέεται με την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης γονιδίου A (CagA) που σχετίζεται με την κυτταροτοξίνη και η οποία φέρει ένα συντηρημένο μοτίβο στο C-τελικό άκρο που ευθύνεται για την σοβαρότητα της παθογένειας [305]. Επιπλέον, το *Helicobacter pylori* οδηγεί στην εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου και μέσω της χρόνιας φλεγμονής [306]. Συγκεκριμένα, το στέλεχος αυτό είναι ιδιαίτερα μολυσματικό στην Κορέα και σε συνδυασμό με την υψηλή κατανάλωση άλατος από τους Κορεάτες που αποτελεί αίτιο εμφάνισης της νόσου, οδηγεί την εμφάνιση συχνά σε ατροφικής γαστρίτιδας, η οποία τελικά προδιαθέτει για εμφάνιση της νόσου [307].

## 6.3 Correa pathway

Έπειτα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε γαστρικό καρκίνο εντερικού τύπου αποδείχθηκε ότι η χρόνια λοίμωξη που προκαλείται από το *Helicobacter pylori* εξελίσσεται και διέρχεται από ορισμένα στάδια. Το *Helicobacter pylori* θεωρείται ο σημαντικότερος παράγοντας που οδηγεί σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα [308]. Πιο αναλυτικά, το μοντέλο ανάπτυξης γαστρικού αδενοκαρκινώματος περιλαμβάνει το εξής μονοπάτι διαδοχικών αλλοιώσεων: χρόνια γαστρίτιδα, ατροφική γαστρίτιδα, εντερική μεταπλασία, δυσπλασία, και τέλος καρκίνος του στομάχου (Correa pathway). (Εικόνα 38) Αρχικά λοιπόν, ο φυσιολογικός γαστρικός βλεννογόνος μολύνεται με *Helicobacter pylori* και ενεργοποιείται μια φλεγμονώδης απόκριση, η οποία θα οδηγήσει πρώτα σε χρόνια και έπειτα σε ατροφική γαστρίτιδα. Ειδικότερα, η ατροφική γαστρίτιδα ορίζεται ως η απώλεια του εξειδικευμένου αδενικού ιστού [309] ενώ η εντερική μεταπλασία που αποτελεί επόμενο στάδιο θεωρείται μια προ-νεοπλασματική διαδικασία αυξημένου κινδύνου για την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου [310]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η ατροφική γαστρίτιδα αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στο Correa pathway και γι' αυτό χρησιμοποιείται ως δείκτης του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του στομάχου, ενώ ακόμη θεωρείται καλύτερος δείκτης σε σχέση με την εντερική μεταπλασία [311].

Γενικά, η χρόνια φλεγμονή προκαλεί αυξημένο οξειδωτικό στρες και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ που επάγει καρκινογένεση [312], ενώ παράλληλα επιταχύνει την καταστροφή του DNA και συμβάλλει στην μεθυλίωση υποκινητών σε γονίδια που δρουν ως καταστολείς όγκων οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην ανάπτυξη καρκίνου [313].



**Εικόνα 38.** Μονοπάτι διαδοχικών σταδίων που οδηγεί στην εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου. (Correa pathway). Από το στάδιο της εντερικής μεταπλασίας (IM) ορισμένοι μόνο ασθενείς θα οδηγηθούν σε καρκίνο του στομάχου. Τα δείγματα IM που προέρχονται από γειτονικές περιοχές του καρκίνου του στομάχου ονομάζονται IM + GC (ή late IM), τα δείγματα IM που προέρχονται από ασθενείς στους οποίους δεν εμφανίζεται καρκίνος του στομάχου χαρακτηρίζονται ως IM-GC (ή early IM). [309]

#### 6.4 Χρωμοσωμική αστάθεια (CIN)

Ο υπότυπος CIN αντιπροσωπεύει το 50% των καρκίνων του γαστρικού συστήματος και εμφανίζεται κυρίως στην οισοφαγογαστρική ένωση (esophagogastric junction, EGJ) / καρδιά ενώ συνδέεται με τον εντερικό ιστολογικό τύπο [75]. Συγκεκριμένα, ο γαστρικός καρκίνος εντερικού τύπου σχετίζεται με την αύξηση του αριθμού αντιγράφων στα χρωμοσώματα 8q, 17q και 20q, ενώ ο διάχυτος γαστρικός καρκίνος συνδέεται με την αύξηση του αριθμού αντιγράφων στα 12q και 13q χρωμοσώματα [314]. Ακόμη, γονίδια στα οποία παρατηρείται απώλεια ετεροζυγωτίας είναι τα APC, το NME1 και το TP53 που εμφανίζεται στο 71% των γαστρικών καρκίνων [315]. Επιπλέον, ο καρκίνος του στομάχου που εμφανίζει χρωμοσωμική αστάθεια χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο καταστολής όγκου p53, και στον υποδοχέα κινάση τυροσίνης (RTK). Πιο αναλυτικά ενισχύονται ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια RTK / RAS / MAPK, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα ογκογονίδια HER2, VEGFA, BRAF, και EGFR. Επίσης, εντοπίζεται απορρύθμιση του γονιδίου MET που συμβάλλει στην μετάπτωση του επιθηλίου, ενίσχυση της έκφρασης του FGFR2, και σε μικρότερο ποσοστό μετάλλαξη του γονιδίου RAS, τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια που ενισχύονται στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου. Οι υποδοχείς της οικογένειας πρωτεϊνών HER ανήκουν στην οικογένεια κινάσης τυροσίνης, με σηματοδότηση μέσω των μονοπατιών MAPK και οι μεταλλάξεις ενίσχυσης οδηγούν στη μετάπτωση των κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα ενώ εμφανίζονται και στα δύο φύλα [316], [317], [318], [76].

## 6.5 Χρωμοσωμική αναδιαμόρφωση

Η χρωμοσωμική αναδιαμόρφωση είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός που εντοπίζεται στον καρκίνο του στομάχου [319]. Ο σχηματισμός των νουκλεοσωμάτων περιορίζει την προσβασιμότητα του DNA από τους μεταγραφικούς παράγοντες. Άρα, απαιτείται αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων με σκοπό την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA και την περαιτέρω έκφραση του. Για την πραγματοποίηση χρησιμοποιούνται σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης εξαρτώμενα από το ATP. Τα σύμπλοκα αυτά ταξινομούνται ανάλογα με τον τύπο της υπομονάδας ATPασης σε οικογένειες μερικές από τις οποίες είναι οι εξής SWI / SNF (switch/sucrose non-fermentable), ISWI, CHD, INO80 και SWR1. Κάθε οικογένεια συμπλόκου χρησιμοποιεί διαφορετικό μηχανισμό ώστε να αναδιαμορφώσει τα νουκλεοσώματα και καθένα αξιοποιείται σε διαφορετική διεργασία, όπως καταστολή γονιδίου, ενεργοποίηση γονιδίου, ανταλλαγή ιστονών και απόκριση βλάβης στο DNA. Επομένως, είναι φανερό ότι μεταλλάξεις ή υπερεκφράσεις των συμπλόκων αυτών σημειώνονται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως και στον καρκίνο του στομάχου. Ακόμη γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στην επιγενετική αυτή τροποποίηση αποτελώντας μέρος των συμπλόκων που αναδιαμορφώνουν την χρωματίνη και έχει παρατηρηθεί ότι έχουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του στομάχου είναι τα εξής: EED, ARID1A, ING5, CTBP1, CBX3, CBX7, MTA1, και NSD1 [320], [321], [322].

## 6.6 Ο ρόλος του GATA4 στο γαστρεντερικό σύστημα

Ενώ ο GATA4 ανιχνεύεται στο λεπτό έντερο, εντοπίζεται σε ορισμένα τμήματα αυτού και συγκεκριμένα στο εγγύς δωδεκαδάχτυλο και στην νήσιδα ρυθμίζοντας την έκφραση ορισμένων γονιδίων, ενώ απουσιάζει από τον απομακρυσμένο ειλεό [323]. Συνεπώς, απουσία του GATA4 η έκφραση των γονιδίων στην περιοχή της νήσιδας μεταπίπτει σε αυτή του ειλεού. Επίσης, ρόλος του είναι η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και η αναγέννηση του επιθηλίου στο λεπτό έντερο, διαδικασίες που απαιτούν ενεργοποίηση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούν πολύπλοκα δίκτυα γονιδίων. Παράλληλα εντοπίζεται έκφραση αυτού σε εντερικές κρύπτες και περιοχές που απορροφούν θρεπτικές ουσίες. Επομένως, σημειώνεται η σημασία του GATA4 σε πεπτικές και απορροφητικές λειτουργίες [324]. Επιπλέον, εκφράζεται στο φυσιολογικό βλεννογόνο του στομάχου και του παχέος εντέρου, όπου επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή βλέννας ενώ συνεισφέρει και στη διατήρηση της διαφοροποίησης του γαστρεντερικού βλεννογόνου. Με αυτόν τον τρόπο αποδεικνύεται ο σημαντικός ρόλος του GATA4 στην ανάπτυξη του εγγύς τμήματος του λεπτού εντέρου [325]. Ωστόσο, εντοπίζεται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων στο δωδεκαδάχτυλο, καθώς και στο σώμα και το άντρο, τα οποία μαζί με την καρδιά και τον πυλωρό συνιστούν τμήματα του στομάχου [135].

## 6.7 GATA και καρκίνος

Ορισμένες επιγενετικές τροποποιήσεις του GATA4 και συγκεκριμένα η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του στις νησίδες CpG [167] και η υποακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 από τις διακετυλάσες έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση στην έκφραση του GATA4 που μπορεί να οδηγήσει σε σίγηση και απώλεια έκφρασης αυτού. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε ορισμένους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος των ωοθηκών, του οισοφάγου, των πνευμόνων, του μαστού και του παχέος εντέρου [326], [327].



## 6.8 Παραδείγματα των lncRNA και δράσεις αυτών

Το lncRNA ANRIL (antisense non-coding RNA in the INK4 locus) συνδέεται με το σύμπλοκο PRC1 και PRC2 τροποποιώντας την δομή της χρωματίνης στο γενετικό τόπο INK4 [328]. Ακόμη μέσω τροποποίηση ιστόνης τα lncRNAs, που εκφράζονται από τις HOX περιοχές, ελέγχουν την προσβασιμότητα της χρωματίνης σε μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ επίσης συμμετέχουν και στην απενεργοποίηση X χρωμοσωμάτων. Ειδικότερα το lncRNAs XIST/TSIX, το οποίο είναι και το καλύτερα χαρακτηρισμένο lncRNA, συμβάλλει μέσω αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στην απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X [329], [330]. Το lncRNA HOTAIR συμμετέχει στην ρύθμιση της έκφρασης ενός HOX (Hox antisense intergenic RNA) γονιδίου που εντοπίζεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα [331]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα lncRNAs δρουν ως σκαλωσιές, όπου προσδένουν μέσω χαλαρής σύνδεσης σύμπλοκα πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε συγκεκριμένη βιολογική διεργασία, όπως το HOTAIR που προσδένει τους παράγοντες PRC2 και LSD1/CoREST, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα την μεθυλίωση της H3K27 και την διμεθυλίωση της H3K4 αντίστοιχα [332], [333], [334], [335].

## 6.9 Υποπερίπτωση της *Cis* δράσης των lncRNA

Διαπιστώνεται ότι στην περίπτωση της *Cis* δράσης τα lncRNA έχουν ρόλο ενισχυτή επάγοντας την έκφραση των γειτονικών γονιδίων και γενικά αυτό που ρυθμίζει τα γειτονικά γονίδια είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής των συγκεκριμένων lncRNA σε αντίθεση με την *Trans* δράση όπου καθοριστικό ρόλο έχει το μετάγραφο των lncRNA, ενώ επίσης εντοπίζεται και ο σχηματισμός του βρόγχου χρωματίνης [233].

## **7. Βιβλιογραφία**

1. Kawagoe, K., et al., *Regulation of aberrantly expressed SERPINH1 by antitumor miR-148a-5p inhibits cancer cell aggressiveness in gastric cancer*. J Hum Genet, 2020.
2. Herszenyi, L. and Z. Tulassay, *Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010. **14**(4): p. 249-58.
3. Ho, S.W.T. and P. Tan, *Dissection of gastric cancer heterogeneity for precision oncology*. Cancer Sci, 2019. **110**(11): p. 3405-3414.
4. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
5. Song, Y., et al., *A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer*. Br J Cancer, 2017. **116**(8): p. 973-989.
6. Hsieh, H.L. and M.M. Tsai, *Tumor progression-dependent angiogenesis in gastric cancer and its potential application*. World J Gastrointest Oncol, 2019. **11**(9): p. 686-704.
7. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
8. Zare, A., et al., *Factors Affecting the Survival of Patients with Gastric Cancer Undergone Surgery at Iran Cancer Institute: Univariate and Multivariate Analyses*. Iran J Public Health, 2014. **43**(6): p. 800-8.
9. Karimi, P., et al., *Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(5): p. 700-13.
10. Tan, Y.K. and J.W. Fielding, *Early diagnosis of early gastric cancer*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006. **18**(8): p. 821-9.
11. Wong, S.S., et al., *Genomic landscape and genetic heterogeneity in gastric adenocarcinoma revealed by whole-genome sequencing*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5477.
12. Conteduca, V., et al., *H. pylori infection and gastric cancer: state of the art (review)*. Int J Oncol, 2013. **42**(1): p. 5-18.
13. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2016. **27**(suppl 5): p. v38-v49.
14. Arnold, M., et al., *Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory*. Eur J Cancer, 2015. **51**(9): p. 1164-87.
15. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
16. Freedman, N.D., et al., *Menstrual and reproductive factors and gastric cancer risk in a large prospective study of women*. Gut, 2007. **56**(12): p. 1671-7.
17. Mohammadpour, S., et al., *The Factors Associated With Direct Medical Costs in Gastric Cancer Patients: Quantile Regression Approach Compared With Gamma Regression*. Value Health Reg Issues, 2019. **21**: p. 127-132.
18. Lee, H.J., H.K. Yang, and Y.O. Ahn, *Gastric cancer in Korea*. Gastric Cancer, 2002. **5**(3): p. 177-82.
19. Kweon, S.S., *Updates on Cancer Epidemiology in Korea, 2018*. Chonnam Med J, 2018. **54**(2): p. 90-100.
20. Eom, B.W., et al., *Trends in Gastric Cancer Incidence According to the Clinicopathological Characteristics in Korea, 1999-2014*. Cancer Res Treat, 2018. **50**(4): p. 1343-1350.
21. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17036.
22. Thrumurthy, S.G., et al., *The diagnosis and management of gastric cancer*. BMJ, 2013. **347**: p. f6367.
23. Suh, Y.S., et al., *National cancer screening program for gastric cancer in Korea: Nationwide treatment benefit and cost*. Cancer, 2020.

24. Choi, K.S. and M. Suh, *Screening for gastric cancer: the usefulness of endoscopy*. Clin Endosc, 2014. **47**(6): p. 490-6.
25. Dan, Y.Y., J.B. So, and K.G. Yeoh, *Endoscopic screening for gastric cancer*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(6): p. 709-16.
26. Janulaityte-Gunther, D., et al., *Helicobacter pylori antibodies and gastric cancer: a gender-related difference*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. **44**(2): p. 191-5.
27. Whiting, J.L., et al., *Screening for gastric cancer by Helicobacter pylori serology: a retrospective study*. Br J Surg, 1998. **85**(3): p. 408-11.
28. Yang, D., et al., *Survival of metastatic gastric cancer: Significance of age, sex and race/ethnicity*. J Gastrointest Oncol, 2011. **2**(2): p. 77-84.
29. Rassy, E., T. Assi, and N. Pavlidis, *Exploring the biological hallmarks of cancer of unknown primary: where do we stand today?* Br J Cancer, 2020.
30. Slavin, T.P., et al., *Genetics of gastric cancer: what do we know about the genetic risks?* Transl Gastroenterol Hepatol, 2019. **4**: p. 55.
31. Yuasa, Y., *Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(8): p. 592-600.
32. Padmanabhan, N., T. Ushijima, and P. Tan, *How to stomach an epigenetic insult: the gastric cancer epigenome*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(8): p. 467-478.
33. Zouridis, H., et al., *Methylation subtypes and large-scale epigenetic alterations in gastric cancer*. Sci Transl Med, 2012. **4**(156): p. 156ra140.
34. Tan, I.B., et al., *Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy*. Gastroenterology, 2011. **141**(2): p. 476-85, 485 e1-11.
35. Chen, K., et al., *Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: implications for prognosis and therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(4): p. 1107-12.
36. Yuen, S.T. and S.Y. Leung, *Genomics Study of Gastric Cancer and Its Molecular Subtypes*. Adv Exp Med Biol, 2016. **908**: p. 419-39.
37. Chen, C., et al., *Molecular Profiles and Metastasis Markers in Chinese Patients with Gastric Carcinoma*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 13995.
38. Lin, D., et al., *Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma: Is There an Optimal Management?* Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2019. **39**: p. e88-e95.
39. Oliveira, C., R. Seruca, and F. Carneiro, *Hereditary gastric cancer*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2009. **23**(2): p. 147-57.
40. Melton, S.D., R.M. Genta, and R.F. Souza, *Biomarkers and molecular diagnosis of gastrointestinal and pancreatic neoplasms*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(11): p. 620-8.
41. Nemtsova, M.V., et al., *Clinical relevance of somatic mutations in main driver genes detected in gastric cancer patients by next-generation DNA sequencing*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 504.
42. Kang, H.C., et al., *Beyond the GIST: mesenchymal tumors of the stomach*. Radiographics, 2013. **33**(6): p. 1673-90.
43. Theiss, L. and C.M. Contreras, *Gastrointestinal Stromal Tumors of the Stomach and Esophagus*. Surg Clin North Am, 2019. **99**(3): p. 543-553.
44. Skinnider, B.F., *Lymphoproliferative Disorders of the Gastrointestinal Tract*. Arch Pathol Lab Med, 2018. **142**(1): p. 44-52.
45. Dias, A.R., et al., *Gastric Neuroendocrine Tumor: Review and Update*. Arq Bras Cir Dig, 2017. **30**(2): p. 150-154.
46. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.

47. Riihimaki, M., et al., *Metastatic spread in patients with gastric cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 52307-52316.
48. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**: p. 28.
49. Bernards, N., et al., *No improvement in median survival for patients with metastatic gastric cancer despite increased use of chemotherapy*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(12): p. 3056-60.
50. Siddiqui, I.A., et al., *Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2015. **1348**(1): p. 20-31.
51. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35 Suppl**: p. S244-S275.
52. Li, W., et al., *Molecular alterations of cancer cell and tumour microenvironment in metastatic gastric cancer*. *Oncogene*, 2018. **37**(36): p. 4903-4920.
53. Wei, Y., et al., *LDLRAD2 overexpression predicts poor prognosis and promotes metastasis by activating Wnt/beta-catenin/EMT signaling cascade in gastric cancer*. *Aging (Albany NY)*, 2019. **11**(20): p. 8951-8968.
54. Yousefi, H., et al., *Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance*. *Oncogene*, 2020. **39**(5): p. 953-974.
55. Kim, Y.M., I.H. Kim, and T.J. Nam, *Inhibition of AGS human gastric cancer cell invasion and proliferation by Capsosiphon fulvescens glycoprotein*. *Mol Med Rep*, 2013. **8**(1): p. 11-6.
56. Yang, L., et al., *Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**: p. 8.
57. Akagi, T., N. Shiraishi, and S. Kitano, *Lymph node metastasis of gastric cancer*. *Cancers (Basel)*, 2011. **3**(2): p. 2141-59.
58. Serra, O., et al., *Comparison and applicability of molecular classifications for gastric cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2019. **77**: p. 29-34.
59. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications*. *Pathobiology*, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
60. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. *J Gastrointest Oncol*, 2012. **3**(3): p. 251-61.
61. Shen, L., et al., *Key Genes in Stomach Adenocarcinoma Identified via Network Analysis of RNA-Seq Data*. *Pathol Oncol Res*, 2017. **23**(4): p. 745-752.
62. Polk, D.B. and R.M. Peek, Jr., *Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(6): p. 403-14.
63. Crew, K.D. and A.I. Neugut, *Epidemiology of gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(3): p. 354-62.
64. Mukaisho, K., et al., *Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: interactions among pH, Helicobacter pylori, and bile acids*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 412.
65. Korivi, B.R., et al., *Intestinal and diffuse gastric cancer: a retrospective study comparing primary sites*. *Clin Imaging*, 2019. **56**: p. 33-40.
66. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. *Nature*, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
67. Lordick, F. and Y.Y. Janjigian, *Clinical impact of tumour biology in the management of gastroesophageal cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(6): p. 348-60.
68. Polkowski, W., et al., *Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction*. *Ann Surg Oncol*, 1999. **6**(3): p. 290-7.

69. Xing, R., et al., *Whole-genome sequencing reveals novel tandem-duplication hotspots and a prognostic mutational signature in gastric cancer*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2037.
70. Komuro, A., et al., *Diffuse-type gastric carcinoma: progression, angiogenesis, and transforming growth factor beta signaling*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(8): p. 592-604.
71. Li, R., et al., *Inhibition of CDH17 gene expression via RNA interference reduces proliferation and apoptosis of human MKN28 gastric cancer cells*. Int J Oncol, 2017. **50**(1): p. 15-22.
72. Ahn, S., et al., *High-throughput Protein and mRNA Expression-based Classification of Gastric Cancers Can Identify Clinically Distinct Subtypes, Concordant With Recent Molecular Classifications*. Am J Surg Pathol, 2017. **41**(1): p. 106-115.
73. Tanner, M., et al., *Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab*. Ann Oncol, 2005. **16**(2): p. 273-8.
74. Bijlsma, M.F., et al., *Molecular subtypes in cancers of the gastrointestinal tract*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(6): p. 333-342.
75. Strand, M.S., A.C. Lockhart, and R.C. Fields, *Genetics of Gastric Cancer*. Surg Clin North Am, 2017. **97**(2): p. 345-370.
76. Garattini, S.K., et al., *Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications*. World J Gastrointest Oncol, 2017. **9**(5): p. 194-208.
77. Wang, Q., G. Liu, and C. Hu, *Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma*. Gastroenterology Res, 2019. **12**(6): p. 275-282.
78. Dong, M., et al., *Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma*. Hum Pathol, 2016. **53**: p. 25-34.
79. Camargo, M.C., C. Figueiredo, and J.C. Machado, *Review: Gastric malignancies: Basic aspects*. Helicobacter, 2019. **24 Suppl 1**: p. e12642.
80. Cho, J., M.S. Kang, and K.M. Kim, *Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response*. J Gastric Cancer, 2016. **16**(1): p. 1-7.
81. Kim, M.S., et al., *Frameshift mutations of Wnt pathway genes AXIN2 and TCF7L2 in gastric carcinomas with high microsatellite instability*. Hum Pathol, 2009. **40**(1): p. 58-64.
82. Leung, S.Y., et al., *Microsatellite instability, Epstein-Barr virus, mutation of type II transforming growth factor beta receptor and BAX in gastric carcinomas in Hong Kong Chinese*. Br J Cancer, 1999. **79**(3-4): p. 582-8.
83. Ratti, M., et al., *Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(22): p. 4151-4162.
84. Haron, N.H., et al., *Microsatellite Instability and Altered Expressions of MLH1 and MSH2 in Gastric Cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2019. **20**(2): p. 509-517.
85. Ling, X., et al., *H. pylori infection is related to mitochondrial microsatellite instability in gastric carcinogenesis*. Infect Agent Cancer, 2016. **11**: p. 30.
86. Zhang, W., *TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics*. Chin J Cancer, 2014. **33**(10): p. 469-70.
87. Liu, Y., et al., *Comparative Molecular Analysis of Gastrointestinal Adenocarcinomas*. Cancer Cell, 2018. **33**(4): p. 721-735 e8.
88. Corso, G., et al., *Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: metanalysis and systematic review of the literature*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 8.



89. Kim, Y., et al., *Profiling cancer-associated genetic alterations and molecular classification of cancer in Korean gastric cancer patients*. *Oncotarget*, 2017. **8**(41): p. 69888-69905.
90. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
91. Martin, S.A., et al., *Genomic instability and the selection of treatments for cancer*. *J Pathol*, 2010. **220**(2): p. 281-9.
92. Geigl, J.B., et al., *Defining 'chromosomal instability'*. *Trends Genet*, 2008. **24**(2): p. 64-9.
93. Ottini, L., et al., *Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives*. *Ann Oncol*, 2006. **17 Suppl 7**: p. vii97-102.
94. Buffart, T.E., et al., *Gastric cancers of Western European and African patients show different patterns of genomic instability*. *BMC Med Genomics*, 2011. **4**: p. 7.
95. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology*. *Neoplasia*, 2017. **19**(5): p. 412-420.
96. Rocken, C., *Molecular classification of gastric cancer*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(3): p. 293-301.
97. Liu, D., et al., *Decreasing mortality and hospitalizations with rising costs related to gastric cancer in the USA: an epidemiological perspective*. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 138.
98. Kim, J.H., et al., *Early Detection is Important to Reduce the Economic Burden of Gastric Cancer*. *J Gastric Cancer*, 2018. **18**(1): p. 82-89.
99. Viger, R.S., et al., *Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(4): p. 781-98.
100. Viger, R.S., et al., *Role of the GATA family of transcription factors in andrology*. *J Androl*, 2004. **25**(4): p. 441-52.
101. Gao, L., et al., *Lung cancer deficient in the tumor suppressor GATA4 is sensitive to TGFBR1 inhibition*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 1665.
102. Bates, D.L., et al., *Crystal structures of multiple GATA zinc fingers bound to DNA reveal new insights into DNA recognition and self-association by GATA*. *J Mol Biol*, 2008. **381**(5): p. 1292-306.
103. Martinez de LaPiscina, I., et al., *GATA4 Variants in Individuals With a 46,XY Disorder of Sex Development (DSD) May or May Not Be Associated With Cardiac Defects Depending on Second Hits in Other DSD Genes*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 142.
104. Jepeal, L.I., M.O. Boylan, and M. Michael Wolfe, *GATA-4 upregulates glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in cells of pancreatic and intestinal lineage*. *Mol Cell Endocrinol*, 2008. **287**(1-2): p. 20-9.
105. Chlon, T.M. and J.D. Crispino, *Combinatorial regulation of tissue specification by GATA and FOG factors*. *Development*, 2012. **139**(21): p. 3905-16.
106. Singh, M.K., et al., *Gata4 and Gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(3): p. 1765-72.
107. Holtzinger, A. and T. Evans, *Gata4 regulates the formation of multiple organs*. *Development*, 2005. **132**(17): p. 4005-14.
108. Stefanovic, S. and V.M. Christoffels, *GATA-dependent transcriptional and epigenetic control of cardiac lineage specification and differentiation*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. **72**(20): p. 3871-81.
109. Oda, M., et al., *DNA methylation restricts lineage-specific functions of transcription factor Gata4 during embryonic stem cell differentiation*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(6): p. e1003574.

110. Molkenkin, J.D., *The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression.* J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 38949-52.
111. Jonckheere, N., et al., *GATA-4/-6 and HNF-1/-4 families of transcription factors control the transcriptional regulation of the murine Muc5ac mucin during stomach development and in epithelial cancer cells.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1819**(8): p. 869-76.
112. Whitcomb, J., L. Gharibeh, and M. Nemer, *From embryogenesis to adulthood: Critical role for GATA factors in heart development and function.* IUBMB Life, 2020. **72**(1): p. 53-67.
113. Nemer, G., et al., *A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot.* Hum Mutat, 2006. **27**(3): p. 293-4.
114. Lentjes, M.H., et al., *The emerging role of GATA transcription factors in development and disease.* Expert Rev Mol Med, 2016. **18**: p. e3.
115. Ohara, Y., et al., *GATA-4 gene organization and analysis of its promoter.* Biol Pharm Bull, 2006. **29**(3): p. 410-9.
116. Malek Mohammadi, M., et al., *The transcription factor GATA4 promotes myocardial regeneration in neonatal mice.* EMBO Mol Med, 2017. **9**(2): p. 265-279.
117. Khalid, A.B., et al., *GATA4 Directly Regulates Runx2 Expression and Osteoblast Differentiation.* JBMR Plus, 2018. **2**(2): p. 81-91.
118. Rodriguez-Seguel, E., et al., *Loss of GATA4 causes ectopic pancreas in the stomach.* J Pathol, 2020. **250**(4): p. 362-373.
119. Ang, Y.S., et al., *Disease Model of GATA4 Mutation Reveals Transcription Factor Cooperativity in Human Cardiogenesis.* Cell, 2016. **167**(7): p. 1734-1749 e22.
120. Martin, J., B.A. Afouda, and S. Hoppler, *Wnt/beta-catenin signalling regulates cardiomyogenesis via GATA transcription factors.* J Anat, 2010. **216**(1): p. 92-107.
121. Heineke, J., et al., *Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart.* J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3198-210.
122. Kuo, C.T., et al., *GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation.* Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1048-60.
123. Kim, T.H. and R.A. Shivdasani, *Stomach development, stem cells and disease.* Development, 2016. **143**(4): p. 554-65.
124. Faure, S. and P. de Santa Barbara, *Molecular embryology of the foregut.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011. **52 Suppl 1**: p. S2-3.
125. Wen, X.Z., et al., *Methylation of GATA-4 and GATA-5 and development of sporadic gastric carcinomas.* World J Gastroenterol, 2010. **16**(10): p. 1201-8.
126. Bai, Y., et al., *Distinct expression of CDX2 and GATA4/5, development-related genes, in human gastric cancer cell lines.* Mol Carcinog, 2000. **28**(3): p. 184-8.
127. Willet, S.G. and J.C. Mills, *Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: from Embryogenesis to Adult Homeostasis.* Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2016. **2**(5): p. 546-559.
128. Jacobsen, C.M., et al., *Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium.* Dev Biol, 2002. **241**(1): p. 34-46.
129. 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, 2003. **23**(23): p. 8429-39.
130. DeLaForest, A., et al., *GATA4 Is Required for Budding Morphogenesis of Posterior Foregut Endoderm in a Model of Human Stomach Development.* Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 44.
131. Yin, X., et al., *Engineering Stem Cell Organoids.* Cell Stem Cell, 2016. **18**(1): p. 25-38.

132. Duque-Correa, M.A., et al., *Organoids - New Models for Host-Helminth Interactions*. Trends Parasitol, 2020. **36**(2): p. 170-181.
133. Jackson, E.L. and H. Lu, *Three-dimensional models for studying development and disease: moving on from organisms to organs-on-a-chip and organoids*. Integr Biol (Camb), 2016. **8**(6): p. 672-83.
134. Lau, H.C.H., et al., *Organoid models of gastrointestinal cancers in basic and translational research*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020. **17**(4): p. 203-222.
135. Haveri, H., et al., *Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa*. BMC Gastroenterol, 2008. **8**: p. 9.
136. Serrano, F., et al., *Gata4 blocks somatic cell reprogramming by directly repressing Nanog*. Stem Cells, 2013. **31**(1): p. 71-82.
137. Maeda, M., et al., *Roles of gastric GATA DNA-binding proteins*. J Exp Biol, 1996. **199**(Pt 3): p. 513-20.
138. Thompson, C.A., et al., *GATA4 Is Sufficient to Establish Jejunal Versus Ileal Identity in the Small Intestine*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(3): p. 422-446.
139. Beuling, E., et al., *GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors*. Dev Biol, 2008. **322**(1): p. 179-89.
140. Ooi, W.F., et al., *Epigenomic profiling of primary gastric adenocarcinoma reveals super-enhancer heterogeneity*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12983.
141. Chia, N.Y., et al., *Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development*. Gut, 2015. **64**(5): p. 707-19.
142. Bosse, T., et al., *Gata4 and Hnf1alpha are partially required for the expression of specific intestinal genes during development*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(5): p. G1302-14.
143. Cassandri, M., et al., *Zinc-finger proteins in health and disease*. Cell Death Discov, 2017. **3**: p. 17071.
144. Bossard, P. and K.S. Zaret, *GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation*. Development, 1998. **125**(24): p. 4909-17.
145. Kim, S.I., et al., *BRG1 requirement for long-range interaction of a locus control region with a downstream promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2259-64.
146. Tremblay, M., O. Sanchez-Ferras, and M. Bouchard, *GATA transcription factors in development and disease*. Development, 2018. **145**(20).
147. Tsankov, A.M., et al., *Transcription factor binding dynamics during human ES cell differentiation*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 344-9.
148. Enane, F.O., et al., *GATA4 loss of function in liver cancer impedes precursor to hepatocyte transition*. J Clin Invest, 2017. **127**(9): p. 3527-3542.
149. Alvarez, M.C., et al., *Methylation pattern of THBS1, GATA-4, and HIC1 in pediatric and adult patients infected with Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(10): p. 2850-7.
150. Kinnunen, S., et al., *Nuclear Receptor-Like Structure and Interaction of Congenital Heart Disease-Associated Factors GATA4 and NKX2-5*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144145.
151. Zhang, Y., et al., *Associations of GATA4 genetic mutations with the risk of congenital heart disease: A meta-analysis*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(18): p. e6857.
152. Zheng, R. and G.A. Blobel, *GATA Transcription Factors and Cancer*. Genes Cancer, 2010. **1**(12): p. 1178-88.
153. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma*. Nature, 2017. **541**(7636): p. 169-175.

154. Kondratyeva, L.G., et al., *Downregulation of expression of mater genes SOX9, FOXA2, and GATA4 in pancreatic cancer cells stimulated with TGFbeta1 epithelial-mesenchymal transition*. Dokl Biochem Biophys, 2016. **469**(1): p. 257-9.
155. Lin, L., et al., *A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1341-7.
156. Dulak, A.M., et al., *Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis*. Cancer Res, 2012. **72**(17): p. 4383-93.
157. Han, X., et al., *Restoration of GATA4 expression impedes breast cancer progression by transcriptional repression of ReLA and inhibition of NF-kappaB signaling*. J Cell Biochem, 2019. **120**(1): p. 917-927.
158. Garraway, L.A. and W.R. Sellers, *Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(8): p. 593-602.
159. 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, 2012. **61**(5): p. 673-84.
160. Levy, C., M. Khaled, and D.E. Fisher, *MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene*. Trends Mol Med, 2006. **12**(9): p. 406-14.
161. McGill, G.G., et al., *Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability*. Cell, 2002. **109**(6): p. 707-18.
162. Liu, K., et al., *The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis*. Cell Signal, 2013. **25**(5): p. 1264-71.
163. Wilbertz, T., et al., *SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer*. Mod Pathol, 2011. **24**(7): p. 944-53.
164. Tagne, J.B., et al., *Genome-wide analyses of Nkx2-1 binding to transcriptional target genes uncover novel regulatory patterns conserved in lung development and tumors*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29907.
165. Yang, L., et al., *Nkx2-1: a novel tumor biomarker of lung cancer*. J Zhejiang Univ Sci B, 2012. **13**(11): p. 855-66.
166. Kim, E.K. and E.J. Choi, *Compromised MAPK signaling in human diseases: an update*. Arch Toxicol, 2015. **89**(6): p. 867-82.
167. Gong, Y., et al., *GATA4 inhibits cell differentiation and proliferation in pancreatic cancer*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0202449.
168. Kyronlahti, A., et al., *GATA-4 regulates Bcl-2 expression in ovarian granulosa cell tumors*. Endocrinology, 2008. **149**(11): p. 5635-42.
169. van der Sluis, M., et al., *The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(3): p. 952-60.
170. Arul, G.S., et al., *Mucin gene expression in Barrett's oesophagus: an in situ hybridisation and immunohistochemical study*. Gut, 2000. **47**(6): p. 753-61.
171. Warson, C., et al., *Barrett's esophagus is characterized by expression of gastric-type mucins (MUC5AC, MUC6) and TFF peptides (TFF1 and TFF2), but the risk of carcinoma development may be indicated by the intestinal-type mucin, MUC2*. Hum Pathol, 2002. **33**(6): p. 660-8.
172. Ayanbule, F., N.S. Belaguli, and D.H. Berger, *GATA factors in gastrointestinal malignancy*. World J Surg, 2011. **35**(8): p. 1757-65.
173. Sun, Z. and B. Yan, *Multiple roles and regulatory mechanisms of the transcription factor GATA6 in human cancers*. Clin Genet, 2020. **97**(1): p. 64-72.

174. Heng, J.C., et al., *The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(2): p. 167-74.
175. Sulahian, R., et al., *An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer*. Oncogene, 2014. **33**(49): p. 5637-48.
176. Kim, T.H. and R.A. Shivdasani, *Notch signaling in stomach epithelial stem cell homeostasis*. J Exp Med, 2011. **208**(4): p. 677-88.
177. Cai, K.Q., et al., *Loss of GATA4 and GATA6 expression specifies ovarian cancer histological subtypes and precedes neoplastic transformation of ovarian surface epithelia*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6454.
178. Agostini, M., et al., *The role of noncoding RNAs in epithelial cancer*. Cell Death Discov, 2020. **6**: p. 13.
179. Wu, S., et al., *LncRNA HRCEG, regulated by HDAC1, inhibits cells proliferation and epithelial-mesenchymal-transition in gastric cancer*. Cancer Genet, 2020. **241**: p. 25-33.
180. Johnsson, P., et al., *Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(3): p. 1063-71.
181. Hao, N.B., et al., *The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(46): p. 81572-81582.
182. Ye, D.M., et al., *Significant function and research progress of biomarkers in gastric cancer*. Oncol Lett, 2020. **19**(1): p. 17-29.
183. Pauli, A., J.L. Rinn, and A.F. Schier, *Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 136-49.
184. Kapranov, P., et al., *RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription*. Science, 2007. **316**(5830): p. 1484-8.
185. Gibb, E.A., et al., *Human cancer long non-coding RNA transcriptomes*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25915.
186. Mathy, N.W. and X.M. Chen, *Long non-coding RNAs (lncRNAs) and their transcriptional control of inflammatory responses*. J Biol Chem, 2017. **292**(30): p. 12375-12382.
187. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
188. Prensner, J.R. and A.M. Chinnaiyan, *The emergence of lncRNAs in cancer biology*. Cancer Discov, 2011. **1**(5): p. 391-407.
189. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 629-41.
190. Wang, Z. and Y. Zheng, *lncRNAs Regulate Innate Immune Responses and Their Roles in Macrophage Polarization*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 8050956.
191. Zhang, X., et al., *Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
192. You, Z., et al., *Integrated analysis of lncRNA and mRNA repertoires in Marek's disease infected spleens identifies genes relevant to resistance*. BMC Genomics, 2019. **20**(1): p. 245.
193. Gloss, B.S. and M.E. Dinger, *The specificity of long noncoding RNA expression*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 16-22.
194. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
195. Ruiz-Orera, J., et al., *Long non-coding RNAs as a source of new peptides*. Elife, 2014. **3**: p. e03523.
196. Morris, K.V. and P.K. Vogt, *Long antisense non-coding RNAs and their role in transcription and oncogenesis*. Cell Cycle, 2010. **9**(13): p. 2544-7.

197. Agirre, X., et al., *Long non-coding RNAs discriminate the stages and gene regulatory states of human humoral immune response*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 821.
198. Qureshi, I.A. and M.F. Mehler, *Non-coding RNA networks underlying cognitive disorders across the lifespan*. Trends Mol Med, 2011. **17**(6): p. 337-46.
199. Reis, E.M. and S. Verjovski-Almeida, *Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics*. Front Genet, 2012. **3**: p. 32.
200. Spizzo, R., et al., *RNA inhibition, microRNAs, and new therapeutic agents for cancer treatment*. Clin Lymphoma Myeloma, 2009. **9 Suppl 3**: p. S313-8.
201. Spizzo, R., et al., *Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research?* Oncogene, 2012. **31**(43): p. 4577-87.
202. Taft, R.J., et al., *Non-coding RNAs: regulators of disease*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 126-39.
203. Arun, G., S.D. Diermeier, and D.L. Spector, *Therapeutic Targeting of Long Non-Coding RNAs in Cancer*. Trends Mol Med, 2018. **24**(3): p. 257-277.
204. Nair, L., H. Chung, and U. Basu, *Regulation of long non-coding RNAs and genome dynamics by the RNA surveillance machinery*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(3): p. 123-136.
205. Jiang, X. and Q. Ning, *Long noncoding RNAs as novel players in the pathogenesis of hypertension*. Hypertens Res, 2020.
206. Li, Y., et al., *Long Noncoding RNA HOX Transcript Antisense RNA Gene rs17720428 Single Nucleotide Polymorphism Is Associated with Gastric Cancer Risk and Prognosis*. Genet Test Mol Biomarkers, 2020. **24**(1): p. 38-46.
207. Mercer, T.R., M.E. Dinger, and J.S. Mattick, *Long non-coding RNAs: insights into functions*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(3): p. 155-9.
208. Tahira, A.C., et al., *Long noncoding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 141.
209. Morris, K.V. and J.S. Mattick, *The rise of regulatory RNA*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(6): p. 423-37.
210. Akkipeddi, S.M.K., A.J. Velleca, and D.M. Carone, *Probing the function of long noncoding RNAs in the nucleus*. Chromosome Res, 2020. **28**(1): p. 87-110.
211. Flippot, R., et al., *Long non-coding RNAs in genitourinary malignancies: a whole new world*. Nat Rev Urol, 2019. **16**(8): p. 484-504.
212. Sarfi, M., M. Abbastabar, and E. Khalili, *Long noncoding RNAs biomarker-based cancer assessment*. J Cell Physiol, 2019. **234**(10): p. 16971-16986.
213. Li, T., et al., *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(8): p. 8601-12.
214. Li, X. and X.D. Fu, *Chromatin-associated RNAs as facilitators of functional genomic interactions*. Nat Rev Genet, 2019. **20**(9): p. 503-519.
215. Gupta, R.A., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1071-6.
216. Beckedorff, F.C., et al., *Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics*. Biosci Rep, 2013. **33**(4).
217. Fang, Y. and M.J. Fullwood, *Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(1): p. 42-54.
218. Yoshioka, H. and Y. Yoshiko, *The Roles of Long Non-Protein-Coding RNAs in Osteo-Adipogenic Lineage Commitment*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
219. Gil, N. and I. Ulitsky, *Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs*. Nat Rev Genet, 2020. **21**(2): p. 102-117.
220. Huarte, M. and J.L. Rinn, *Large non-coding RNAs: missing links in cancer?* Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R152-61.



221. Yang, Y.W., et al., *Essential role of lncRNA binding for WDR5 maintenance of active chromatin and embryonic stem cell pluripotency*. *Elife*, 2014. **3**: p. e02046.
222. Gibb, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 38.
223. Jia, R., et al., *Novel insights into chromosomal conformations in cancer*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 173.
224. Yao, R.W., Y. Wang, and L.L. Chen, *Cellular functions of long noncoding RNAs*. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(5): p. 542-551.
225. Kanhere, A. and R.G. Jenner, *Noncoding RNA localisation mechanisms in chromatin regulation*. *Silence*, 2012. **3**(1): p. 2.
226. Shields, E.J., A.F. Petracovici, and R. Bonasio, *IncRedibly versatile: biochemical and biological functions of long noncoding RNAs*. *Biochem J*, 2019. **476**(7): p. 1083-1104.
227. Taft, R.J., M. Pheasant, and J.S. Mattick, *The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity*. *Bioessays*, 2007. **29**(3): p. 288-99.
228. Bar, C., S. Chatterjee, and T. Thum, *Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Pathology, Diagnosis, and Therapy*. *Circulation*, 2016. **134**(19): p. 1484-1499.
229. Qi, M., et al., *Integrated analysis of a ceRNA network reveals potential prognostic lncRNAs in gastric cancer*. *Cancer Med*, 2020. **9**(5): p. 1798-1817.
230. Morlando, M., M. Ballarino, and A. Fatica, *Long Non-Coding RNAs: New Players in Hematopoiesis and Leukemia*. *Front Med (Lausanne)*, 2015. **2**: p. 23.
231. Karlsson, O. and A.A. Baccarelli, *Environmental Health and Long Non-coding RNAs*. *Curr Environ Health Rep*, 2016. **3**(3): p. 178-87.
232. Poliseno, L., et al., *A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology*. *Nature*, 2010. **465**(7301): p. 1033-8.
233. Peng, Z., C. Zhang, and C. Duan, *Functions and mechanisms of long noncoding RNAs in lung cancer*. *Onco Targets Ther*, 2016. **9**: p. 4411-24.
234. Ariel, F., et al., *R-Loop Mediated trans Action of the APOLO Long Noncoding RNA*. *Mol Cell*, 2020. **77**(5): p. 1055-1065 e4.
235. Mishra, K. and C. Kanduri, *Understanding Long Noncoding RNA and Chromatin Interactions: What We Know So Far*. *Noncoding RNA*, 2019. **5**(4).
236. Guil, S. and M. Esteller, *Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(11): p. 1068-75.
237. Perry, R.B. and I. Ulitsky, *The functions of long noncoding RNAs in development and stem cells*. *Development*, 2016. **143**(21): p. 3882-3894.
238. Dimitrova, N., et al., *LincRNA-p21 activates p21 in cis to promote Polycomb target gene expression and to enforce the G1/S checkpoint*. *Mol Cell*, 2014. **54**(5): p. 777-90.
239. Fatica, A. and I. Bozzoni, *Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development*. *Nat Rev Genet*, 2014. **15**(1): p. 7-21.
240. Gawronski, K.A.B. and J. Kim, *Single cell transcriptomics of noncoding RNAs and their cell-specificity*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017. **8**(6).
241. Yu, H., et al., *Analysis of Long Non-Coding RNA Expression Profile and Functional Study of LOC389332 in Early Gastric Cancer*. *Med Sci Monit*, 2019. **25**: p. 10114-10121.
242. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. *Nature*, 2009. **458**(7235): p. 223-7.
243. Zhou, Z., et al., *Epigenetic regulation of long non-coding RNAs in gastric cancer*. *Oncotarget*, 2018. **9**(27): p. 19443-19458.
244. Perez, D.S., et al., *Long, abundantly expressed non-coding transcripts are altered in cancer*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(5): p. 642-55.
245. Shen, X.H., P. Qi, and X. Du, *Long non-coding RNAs in cancer invasion and metastasis*. *Mod Pathol*, 2015. **28**(1): p. 4-13.

246. Wang, Y., F. Yang, and Q. Yang, *The regulatory roles and potential prognosis implications of long non-coding RNAs in gastric cancer*. *Histol Histopathol*, 2019: p. 18188.
247. Sun, M. and W.L. Kraus, *From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease*. *Endocr Rev*, 2015. **36**(1): p. 25-64.
248. Yap, K.L., et al., *Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a*. *Mol Cell*, 2010. **38**(5): p. 662-74.
249. Yu, W., et al., *Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA*. *Nature*, 2008. **451**(7175): p. 202-6.
250. Shao, G., et al., *Long non-coding RNA MALAT1 activates autophagy and promotes cell proliferation by downregulating microRNA-204 expression in gastric cancer*. *Oncol Lett*, 2020. **19**(1): p. 805-812.
251. Do, H. and W. Kim, *Roles of Oncogenic Long Non-coding RNAs in Cancer Development*. *Genomics Inform*, 2018. **16**(4): p. e18.
252. Cheetham, S.W., et al., *Long noncoding RNAs and the genetics of cancer*. *Br J Cancer*, 2013. **108**(12): p. 2419-25.
253. Mitra, S.A., A.P. Mitra, and T.J. Triche, *A central role for long non-coding RNA in cancer*. *Front Genet*, 2012. **3**: p. 17.
254. Huarte, M., *The emerging role of lncRNAs in cancer*. *Nat Med*, 2015. **21**(11): p. 1253-61.
255. Li, Z.X., et al., *MALAT1: a potential biomarker in cancer*. *Cancer Manag Res*, 2018. **10**: p. 6757-6768.
256. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. *Nat Rev Genet*, 2011. **12**(12): p. 861-74.
257. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *lncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(10).
258. Liu, Y., et al., *Potential Role of lncRNA H19 as a Cancer Biomarker in Human Cancers Detection and Diagnosis: A Pooled Analysis Based on 1585 Subjects*. *Biomed Res Int*, 2019. **2019**: p. 9056458.
259. Yang, G., X. Lu, and L. Yuan, *lncRNA: a link between RNA and cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1839**(11): p. 1097-109.
260. Chaudhary, R. and A. Lal, *Long noncoding RNAs in the p53 network*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017. **8**(3).
261. Peng, W.X., P. Koirala, and Y.Y. Mo, *lncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer*. *Oncogene*, 2017. **36**(41): p. 5661-5667.
262. Chen, Y., et al., *Down regulation of lincRNA-p21 contributes to gastric cancer development through Hippo-independent activation of YAP*. *Oncotarget*, 2017. **8**(38): p. 63813-63824.
263. Lai, Y., et al., *Tumour suppressive long non-coding RNA AFDN-DT inhibits gastric cancer invasion via transcriptional regulation*. *J Cell Mol Med*, 2020. **24**(5): p. 3157-3166.
264. Tao, Y., et al., *Long non-coding RNA OIP5-AS1 promotes the growth of gastric cancer through the miR-367-3p/HMGA2 axis*. *Dig Liver Dis*, 2020.
265. Cao, Y., et al., *Long Noncoding RNA UCA1 Regulates PRL-3 Expression by Sponging MicroRNA-495 to Promote the Progression of Gastric Cancer*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020. **19**: p. 853-864.
266. Niu, J., X. Song, and X. Zhang, *Regulation of lncRNA PVT1 on miR-125 in metastasis of gastric cancer cells*. *Oncol Lett*, 2020. **19**(2): p. 1261-1266.
267. Ba, M.C., et al., *lncRNA AC093818.1 accelerates gastric cancer metastasis by epigenetically promoting PDK1 expression*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(1): p. 64.

268. Liu, K., et al., *Long non-coding RNAs regulate drug resistance in cancer*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 54.
269. Zhang, X., et al., *Role of non-coding RNAs and RNA modifiers in cancer therapy resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 47.
270. Wang, Y., et al., *Long noncoding RNA MRUL promotes ABCB1 expression in multidrug-resistant gastric cancer cell sublines*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(17): p. 3182-93.
271. Kang, Y.J., et al., *CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(W1): p. W12-W16.
272. Wang, L., et al., *CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(6): p. e74.
273. den Hoed, C.M. and E.J. Kuipers, *Gastric Cancer: How Can We Reduce the Incidence of this Disease?* Curr Gastroenterol Rep, 2016. **18**(7): p. 34.
274. Collaborators, G.B.D.S.C., *The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**(1): p. 42-54.
275. Pasechnikov, V., et al., *Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(38): p. 13842-62.
276. Song, Z., et al., *Progress in the treatment of advanced gastric cancer*. Tumour Biol, 2017. **39**(7): p. 1010428317714626.
277. Orditura, M., et al., *Treatment of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(7): p. 1635-49.
278. Santoro, R., G.M. Ettorre, and E. Santoro, *Subtotal gastrectomy for gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(38): p. 13667-80.
279. Liu, Z., J. Dai, and H. Shen, *Systematic analysis reveals long noncoding RNAs regulating neighboring transcription factors in human cancers*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(9 Pt B): p. 2785-2792.
280. Wu, M., et al., *Expression and function of lncRNA MALAT-1 in the embryonic development of zebrafish*. Gene, 2019. **680**: p. 65-71.
281. Evans, J.R., F.Y. Feng, and A.M. Chinnaiyan, *The bright side of dark matter: lncRNAs in cancer*. J Clin Invest, 2016. **126**(8): p. 2775-82.
282. Huang, Q., J. Yan, and R. Agami, *Long non-coding RNAs in metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(1): p. 75-81.
283. Tano, K. and N. Akimitsu, *Long non-coding RNAs in cancer progression*. Front Genet, 2012. **3**: p. 219.
284. Kwak, M.K., et al., *Expression of Kruppel-like factor 5 in human gastric carcinomas*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(2): p. 163-7.
285. 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, 2019. **26**(11): p. 2179-2193.
286. Jia, X., et al., *KLF5 regulated lncRNA RP1 promotes the growth and metastasis of breast cancer via repressing p27kip1 translation*. Cell Death Dis, 2019. **10**(5): p. 373.
287. Coe, E.A., et al., *The MITF-SOX10 regulated long non-coding RNA DIRC3 is a melanoma tumour suppressor*. PLoS Genet, 2019. **15**(12): p. e1008501.
288. Leucci, E., et al., *Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON*. Nature, 2016. **531**(7595): p. 518-22.
289. West, J.A., et al., *The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites*. Mol Cell, 2014. **55**(5): p. 791-802.
290. Chaudhry, S.R., M.N.P. Liman, and D.C. Peterson, *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Stomach*, in StatPearls. 2020: Treasure Island (FL).

291. Gelberg, H.B., *Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(1): p. 54-66.
292. Pangtey, B., J.M. Kaul, and S. Mishra, *Histogenesis of Muscularis Mucosa and Muscularis Externa of Stomach: A Human Foetal Study*. J Clin Diagn Res, 2017. **11**(8): p. AC01-AC03.
293. Saenz, J.B. and J.C. Mills, *Acid and the basis for cellular plasticity and reprogramming in gastric repair and cancer*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(5): p. 257-273.
294. Coffey, R.J., et al., *Menetrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 70-80.
295. Hsu, M. and F. Lui, *Physiology, Stomach*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
296. Choi, E., et al., *Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum*. Gut, 2014. **63**(11): p. 1711-20.
297. Bhatia, A. and B. Bordoni, *Embryology, Gastrointestinal*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
298. Karasov, W.H. and A.E. Douglas, *Comparative digestive physiology*. Compr Physiol, 2013. **3**(2): p. 741-83.
299. Tsugane, S. and S. Sasazuki, *Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence*. Gastric Cancer, 2007. **10**(2): p. 75-83.
300. Ge, S., et al., *Association between Habitual Dietary Salt Intake and Risk of Gastric Cancer: A Systematic Review of Observational Studies*. Gastroenterol Res Pract, 2012. **2012**: p. 808120.
301. Sitarz, R., et al., *Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 239-248.
302. Peleteiro, B., et al., *Smoking, Helicobacter pylori virulence, and type of intestinal metaplasia in Portuguese males*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(2): p. 322-6.
303. Ang, T.L. and K.M. Fock, *Clinical epidemiology of gastric cancer*. Singapore Med J, 2014. **55**(12): p. 621-8.
304. Zhang, F., et al., *Molecular mechanism of Helicobacter pylori-induced autophagy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2019. **18**(6): p. 6221-6227.
305. Hatakeyama, M., *Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the Helicobacter pylori CagA oncoprotein*. Cancer Sci, 2011. **102**(1): p. 36-43.
306. Sepulveda, A.R., *Helicobacter, Inflammation, and Gastric Cancer*. Curr Pathobiol Rep, 2013. **1**(1): p. 9-18.
307. Graham, D.Y., *Roadmap for elimination of gastric cancer in Korea*. Korean J Intern Med, 2015. **30**(2): p. 133-9.
308. Strugatsky, D., et al., *Structure of the proton-gated urea channel from the gastric pathogen Helicobacter pylori*. Nature, 2013. **493**(7431): p. 255-8.
309. Busuttil, R.A., et al., *Role of p53 in the progression of gastric cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(23): p. 12016-26.
310. Chen, X., et al., *Variation in gene expression patterns in human gastric cancers*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3208-15.
311. Fox, J.G. and T.C. Wang, *Inflammation, atrophy, and gastric cancer*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 60-9.
312. Tan, P. and K.G. Yeoh, *Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma*. Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1153-1162 e3.
313. Matsusaka, K., et al., *DNA methylation in gastric cancer, related to Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(14): p. 3916-26.

314. Buffart, T.E., et al., *High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers*. *Virchows Arch*, 2009. **455**(3): p. 213-23.
315. Hudler, P., *Genetic aspects of gastric cancer instability*. *ScientificWorldJournal*, 2012. **2012**: p. 761909.
316. McLean, M.H. and E.M. El-Omar, *Genetics of gastric cancer*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(11): p. 664-74.
317. Liu, X. and S.J. Meltzer, *Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017. **3**(3): p. 348-358.
318. Chivu-Economescu, M., et al., *New therapeutic options opened by the molecular classification of gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, 2018. **24**(18): p. 1942-1961.
319. Bilgic, F., et al., *Potential role of chromatin remodeling factor genes in atrophic gastritis/gastric cancer risk*. *Turk J Gastroenterol*, 2018. **29**(4): p. 427-435.
320. Zang, Z.J., et al., *Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes*. *Nat Genet*, 2012. **44**(5): p. 570-4.
321. Kang, C., et al., *Epigenetics: an emerging player in gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(21): p. 6433-47.
322. Chia, N.Y. and P. Tan, *Molecular classification of gastric cancer*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(5): p. 763-9.
323. Walker, E.M., C.A. Thompson, and M.A. Battle, *GATA4 and GATA6 regulate intestinal epithelial cytodifferentiation during development*. *Dev Biol*, 2014. **392**(2): p. 283-94.
324. Aronson, B.E., K.A. Stapleton, and S.D. Krasinski, *Role of GATA factors in development, differentiation, and homeostasis of the small intestinal epithelium*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. **306**(6): p. G474-90.
325. Lepage, D., et al., *Gata4 is critical to maintain gut barrier function and mucosal integrity following epithelial injury*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 36776.
326. Yamamura, N. and T. Kishimoto, *Epigenetic regulation of GATA4 expression by histone modification in AFP-producing gastric adenocarcinoma*. *Exp Mol Pathol*, 2012. **93**(1): p. 35-9.
327. Zhou, W., et al., *Acetylation of H3K4, H3K9, and H3K27 mediated by p300 regulates the expression of GATA4 in cardiocytes*. *Genes Dis*, 2019. **6**(3): p. 318-325.
328. Salehi, S., et al., *State of the art technologies to explore long non-coding RNAs in cancer*. *J Cell Mol Med*, 2017. **21**(12): p. 3120-3140.
329. Bunch, H., *Gene regulation of mammalian long non-coding RNA*. *Mol Genet Genomics*, 2018. **293**(1): p. 1-15.
330. Silva, J.M., et al., *Identification of long stress-induced non-coding transcripts that have altered expression in cancer*. *Genomics*, 2010. **95**(6): p. 355-62.
331. Dey, B.K., A.C. Mueller, and A. Dutta, *Long non-coding RNAs as emerging regulators of differentiation, development, and disease*. *Transcription*, 2014. **5**(4): p. e944014.
332. Vance, K.W. and C.P. Ponting, *Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs*. *Trends Genet*, 2014. **30**(8): p. 348-55.
333. Ransohoff, J.D., Y. Wei, and P.A. Khavari, *The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(3): p. 143-157.
334. Chen, J., S. Liu, and X. Hu, *Long non-coding RNAs: crucial regulators of gastrointestinal cancer cell proliferation*. *Cell Death Discov*, 2018. **4**: p. 50.
335. Piao, H.L. and L. Ma, *Non-coding RNAs as regulators of mammary development and breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2012. **17**(1): p. 33-42.