



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΙΜΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

**Ανίχνευση μακρών μη κωδικοποιητικών RNA που
ρυθμίζονται από μεταγραφικά σύμπλοκα στον καρκίνο**

Κατσούλη Ευαγγελία

Επιβλέπων Καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Λάρισα 2021

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

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

Κουρέτας Δημήτριος: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο η οποία οφείλεται σε περιβαλλοντικούς και μοριακούς παράγοντες. Χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας, λόγω του ότι διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, οδηγώντας έτσι σε δυσμενή πρόγνωση. Ως εκ τούτου, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών οι οποίοι θα είναι ειδικοί για το γαστρικό καρκίνο και θα μπορούν να ανιχνεύσουν τη νόσο σε αρχικά στάδια. Οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4a δημιουργούν ένα σύμπλοκο που ρυθμίζει την εντερική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, και μολονότι δεν εκφράζονται στο φυσιολογικό στόμαχο, παρατηρείται έκτοπη έκφρασή τους στην περίπτωση της εντερικής μεταπλασίας, η οποία αποτελεί προ-καρκινικό στάδιο του γαστρικού καρκίνου. Παρ' ότι οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικοί βιοδείκτες στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου, είναι ακατάλληλοι για θεραπευτική στόχευση καθώς εκφράζονται φυσιολογικά σε άλλους ιστούς, γεγονός που θα επέφερε ανεπιθύμητες ενέργειες. Συνεπώς, πιθανούς θεραπευτικούς στόχους θα μπορούσαν να αποτελούν τα γονίδια - στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων. Από τα παραπάνω γονίδια ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως θεραπευτικοί στόχοι παρουσιάζουν τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs), λόγω της ιστο-ειδικής και καρκινο-ειδικής έκφρασής τους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εύρεση lncRNAs που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό σύμπλοκο των CDX2 και HNF4a στο γαστρικό καρκίνο. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν δεδομένα βιοπληροφορικής RNA sequencing και ChIP sequencing, προκειμένου να βρεθούν οι lncRNA στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a, στους υποκινητές των οποίων προσδένεται ο HNF4a. Σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν επιλέχθηκαν 2 lncRNAs, cRENA 1 & 2 (CDX2 Regulated lncRNAs), τα οποία μελετήθηκαν ως προς τις ιδιότητές τους στο γαστρικό αλλά και σε άλλους γαστρεντερικούς καρκίνους. Παρατηρήθηκε ότι τα cRENA 1 & 2 υπερεκφράζονται στο γαστρικό καρκίνο και ιδιαίτερα από τα αρχικά στάδια της νόσου, γεγονός το οποίο τα καθιστά πολύ καλούς διαγνωστικούς βιοδείκτες. Η ρύθμιση των συγκεκριμένων lncRNAs από το μεταγραφικό παράγοντα CDX2 ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο. Μελλοντικά απομένει να ελεγχθεί πειραματικά η ρύθμιση των lncRNAs από το μεταγραφικό παράγοντα HNF4a αλλά και από το μεταγραφικό σύμπλοκο CDX2/HNF4a, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης και να διαπιστωθεί η μεταβολή της έκφρασης των συγκεκριμένων lncRNAs υπό διαφορετικές συνθήκες υπερέκφρασης και καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων.

Abstract

Gastric cancer is a multifactorial disease and can be caused by environmental and molecular factors. It shows high incidence and mortality rates, due to late-stage diagnosis, which leads to poor prognosis. Therefore, there is an urgent need in identifying new gastric cancer specific biomarkers to diagnose the disease in early stage. The transcription factors CDX2 and HNF4 α form a transcription complex which regulates intestinal development and differentiation and are not expressed in the normal stomach. However, they are ectopically expressed in gastric intestinal metaplasia, which is a pre-cancerous stage of gastric cancer. Despite the fact that CDX2 and HNF4 α are very useful diagnostic biomarkers in gastric cancer, they are “undruggable”, because they are normally expressed in other tissues and their therapeutic targeting could cause some serious side effects. Consequently, the targets of transcription factors CDX2 and HNF4 α could serve as possible therapeutic targets in gastric cancer. Nowadays, there is a big interest in long non-coding RNAs (lncRNAs), due to their tissue-specific and cancer-specific expression.

The aim of this study was the identification of lncRNAs that are regulated by the CDX2 and HNF4 α transcription complex in gastric cancer. In order to identify the lncRNAs which are regulated by CDX2 and HNF4 α and are bound by HNF4 α , RNA sequencing and ChIP sequencing data were analyzed. Two lncRNAs were chosen, cRENA 1 & 2 (CDX2 Regulated lncRNAs), and their role in gastric and other gastrointestinal cancers was studied. cRENA 1 & 2 Were found to be overexpressed in gastric cancer and especially in early stages, which makes them very good diagnostic biomarkers. The CDX2 regulation of these lncRNAs was experimentally confirmed in transcriptional level. Future investigation is required in order to confirm the HNF4 α regulation of cRENA 1 & 2, as well as the CDX2/HNF4 α co-regulation of these two lncRNAs. Furthermore, in each of these cases, the consequent changes of lncRNA expression should be studied, according to the bioinformatic analysis that was conducted.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Γιακουνή Αντώνη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του εργαστηρίου, τη συμπαράσταση και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να αποδώσω στους καθηγητές μου, κύριο Ματθιόπουλο και κύριο Κουρέτα για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική επιτροπή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια και την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και το σύντροφό μου, χωρίς τη βοήθεια και υποστήριξη των οποίων δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Ευχαριστίες	5
1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Ο καρκίνος του στομάχου	8
1.1.1 Επιδημιολογία.....	9
1.1.2 Υπότυποι του γαστρικού καρκίνου	9
1.1.3 Κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά του εντερικού και του διάχυτου υποτύπου.....	10
1.1.4 Μοριακοί υπότυποι γαστρικού καρκίνου	11
1.1.5 Διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου	13
1.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2	13
1.2.1 Ρύθμιση και λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα CDX2.....	14
1.2.2 Ο ρόλος του CDX2 στην καρκινογένεση του γαστρεντερικού σωλήνα	15
1.2.3 Ο ρόλος του CDX2 στην εντερική μεταπλασία	16
1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a	17
1.3.1 Ρύθμιση και λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a	18
1.3.2 Ο ρόλος του HNF4a στην καρκινογένεση του γαστρεντερικού σωλήνα ...	20
1.3.3 Ο ρόλος του HNF4a στην εντερική μεταπλασία.....	20
1.4 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA.....	22
1.4.1 Λειτουργίες και ιδιαιτερότητες των μη κωδικοποιητικών RNA.....	22
1.4.2 Τα lncRNAs στον καρκίνο	23
1.4.3 Τα lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες.....	24
1.4.4 Θεραπευτικές προοπτικές των lncRNAs στον καρκίνο	25
1.5 Σκοπός της εργασίας	25
2.Υλικά και Μεθοδολογία.....	26
2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση	26
2.1.1 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA (RNA sequencing)	26
2.1.2 Ανάλυση οντολογίας	26
2.1.3 Ανάλυση δεδομένων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP sequencing)	26
2.1.3 Κατασκευή διαγραμμάτων Venn.....	27
2.1.4 Αναζήτηση στη βάση δεδομένων GEPIA	27
2.2 Πειραματικό σκέλος.....	27

2.2.1 Απομόνωση RNA (RNA Extraction)	27
2.2.2 Χειρισμός με DNάση (DNase treatment).....	28
2.2.3 Σύνθεση cDNA.....	28
2.2.4 Ποσοτική PCR (Quantitative PCR).....	28
2.2.5 Απομόνωση πρωτεϊνών και μέθοδος Bradford	28
2.2.6 Western Blot	28
2.2.7 Κλωνοποίηση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pLB.....	30
2.2.8 Αλληλούχηση	31
3. Αποτελέσματα	32
3.1 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης.....	32
3.1.1 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA.....	32
3.1.2 Ανάλυση οντολογίας	35
3.1.3 Διαγράμματα Venn.....	36
3.1.4 Βάση δεδομένων GEPIA.....	40
3.2 Πειραματικά αποτελέσματα	41
3.2.1 Έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	41
3.2.2 Πρωτεϊνική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α σε κυτταρικές σειρές	42
3.2.3 Κλωνοποίηση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pLB.....	45
3.2.4 Έκφραση των lncRNAs cRENA 1 & 2 στην κυτταρική σειρά AGS.....	45
4. Συμπεράσματα - Συζήτηση	47
5. Βιβλιογραφία.....	50
6. Παράρτημα.....	65
6.1 Κώδικας δημιουργίας θερμικού χάρτη και διαγράμματος volcano.....	65
6.2 Συμπληρωματικά αποτελέσματα.....	66

1.Εισαγωγή

1.1 Ο καρκίνος του στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μια επιθετική νόσο που έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία. Παρ' όλη τη μείωση των περιστατικών που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες, ο καρκίνος του στομάχου παραμένει μέχρι και σήμερα ο 5^{ος} καρκίνος σε συχνότητα και ο 3^{ος} σε θνησιμότητα καρκίνος (Ferro et al., 2014). Περισσότερες από ένα εκατομμύριο περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο. Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου αποτελούσε την κυριότερη αιτία θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο έως τα μέσα του 1990. Σήμερα ο καρκίνος του στομάχου σημειώνει 783000 θανάτους ετησίως και συνολικά το 8,3% των θανάτων από καρκίνο αποδίδεται στον καρκίνο του στομάχου (Bray et al., 2018)

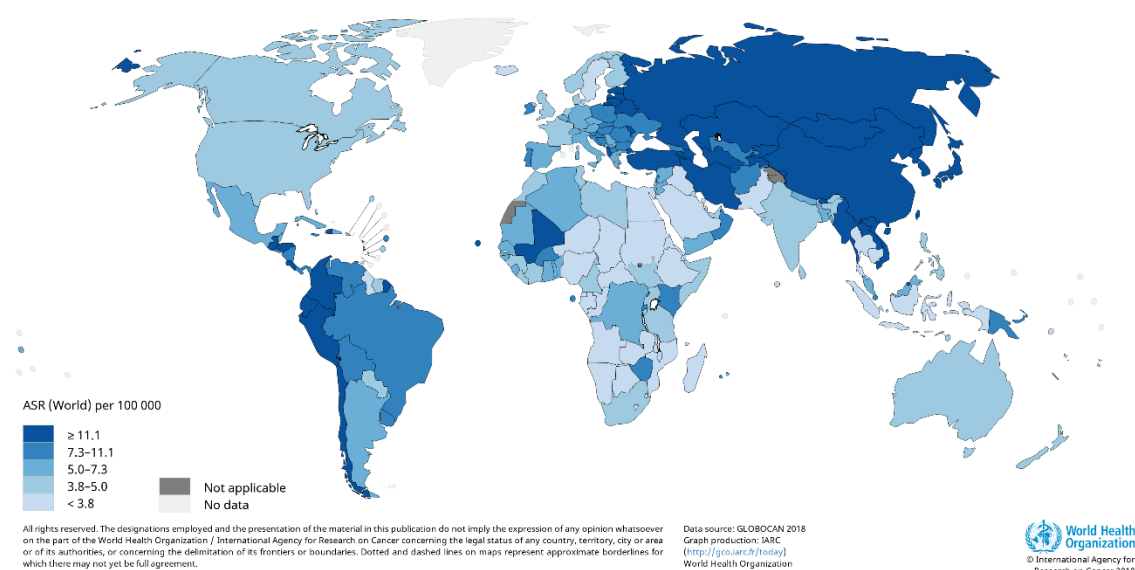
Η βελτίωση της διατροφής, η σωστή διατήρηση του φαγητού, η βελτιστοποιημένη πρόληψη και διάγνωση της νόσου και η θεραπεία στα αρχικά στάδια είναι παράγοντες που συνετέλεσαν στη σταδιακή μείωση των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου τις τελευταίες δεκαετίες. Τα αρχικά στάδια του γαστρικού καρκίνου τυπικά εμφανίζουν λίγα ή καθόλου συμπτώματα, συνεπώς ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, οδηγώντας σε δυσμενή πρόγνωση (Casamayor, Morlock, Maeda, & Ajani, 2018). Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στις χώρες της Δύσης, όπου λόγω του χαμηλού αριθμού περιστατικών, η ευαισθητοποίηση είναι μικρή και δεν υπάρχουν προγράμματα μαζικού ελέγχου. Αντιθέτως, σε κάποιες Ασιατικές χώρες (π.χ. Δημοκρατία της Κορέας και Ιαπωνία) όπου ο αριθμός περιστατικών είναι υψηλός και τα προγράμματα ελέγχου είναι ευρέως διαθέσιμα και οικονομικά συμφέροντα, η διάγνωση πραγματοποιείται νωρίτερα (Sitarz et al., 2018). Οι δύο αυτές χώρες είναι οι μόνες που έχουν θεσπίσει ένα πρόγραμμα ανίχνευσης γαστρικού καρκίνου σε εθνικό επίπεδο (Yuan, 2013).

Η επικρατέστερη θεραπεία σήμερα είναι η χειρουργική εκτομή με επικουρική χημειοθεραπεία ή χημειοακτινοβολία σε ορισμένες περιπτώσεις (Bang et al., 2012). Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μια ετερογενή ασθένεια, η οποία απαιτεί συνεχή προσοχή και έρευνα όσον αφορά την πρόληψη και την έγκαιρη ανίχνευση, όπως επίσης και την εύρεση καινοτόμων θεραπευτικών επιλογών (Carcas, 2014).

Ο κύριος παράγοντας κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του στομάχου είναι η μόλυνση με *Helicobacter pylori*, η οποία έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με μειωμένη απόπτωση, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένη κυτταρική μετανάστευση (Nagy et al., 2009). Είναι γνωστό ότι διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *H. pylori* φέρουν διαφορετικούς μολυσματικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους προκαλούν διαφορετικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο γαστρικό βλεννογόνο. Για παράδειγμα, το στέλεχος που φέρει τα *cagA* και *vacA* μπορεί να προκαλέσει ισχυρότερη ανοσολογική απόκριση, η οποία είναι συνδεδεμένη με την ύπαρξη προ-καρκινικών αλλοιώσεων όπως η γαστρική εντερική μεταπλασία (Winter et al., 2014). Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου είναι η γεωγραφική τοποθεσία, η ηλικία, το φύλο, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση, το κάπνισμα, η κατανάλωση υψηλής ποσότητας αλατιού μέσω της διατροφής, καθώς και γενετικοί παράγοντες (Lyons et al., 2019). Η εθνικότητα είναι ένας επιπλέον παράγοντας κινδύνου εμφάνισης και ταυτόχρονα με τη γεωγραφική κατανομή αντικατοπτρίζουν τις διαφορές στα διατροφικά πρότυπα (Fock, 2014).

1.1.1 Επιδημιολογία

Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου ετησίως εμφανίζονται στην Ασία, όπου παρατηρείται περισσότερο από το 70% των περιπτώσεων, και σχεδόν το 50% από αυτές εντοπίζεται στην Κίνα. Επιπλέον, υψηλά ποσοστά εμφάνισης σημειώνονται στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη και τη Νότια Αμερική (Bray et al., 2018). Παγκοσμίως, τα περιστατικά γαστρικού καρκίνου φαίνεται να είναι συχνότερα στους άνδρες και να αυξάνονται με την ηλικία, με την πλειοψηφία των περιστατικών να εμφανίζονται μετά την ηλικία των 60 ετών (Ferlay et al., 2015). Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου διαφέρει δραματικά μεταξύ των χωρών. Η γεωγραφική κατανομή του συγκεκριμένου είδους καρκίνου έχει αποτυπωθεί στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, στην κοινωνικοοικονομική κατάσταση και στον επιπολασμό των μολύνσεων από *H. pylori* (Jemal et al., 2011).



Εικόνα 1: Ποσοστά εμφάνισης γαστρικού καρκίνου ανά την υφήλιο, και για τα δύο φύλα, ανεξαρτήτου ηλικίας, για το έτος 2018 (ανάκτηση από <http://globocan.iarc.fr>).

1.1.2 Υπότυποι του γαστρικού καρκίνου

Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί περίπου το 90-95% των καρκίνων του στομάχου, με το λέμφωμα, το λειομυοσάρκωμα, το γαστρεντερικό στρωματικό όγκο και τους νευροενδοκρινείς όγκους να αντιπροσωπεύουν το υπόλοιπο (Feldman, 2010). Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, παρόλο που πολλές φορές αναφέρεται ως μια κατηγορία, στην πραγματικότητα εμπεριέχει δύο ανατομικές υποκατηγορίες, το γαστρικό καρκίνο στην καρδιά και το μη-καρδιακό γαστρικό καρκίνο, με διακριτά κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά. Ο γαστρικός καρκίνος στην καρδιά ορίζεται ως το αδενοκαρκίνωμα στο πρόσθιο τμήμα του στομάχου, περιλαμβάνει τη γαστροοισοφαγική σύνδεση και εντοπίζεται έως 5 εκατοστά από αυτή (Washington, 2010). Ο καρδιακός γαστρικός καρκίνος έχει συσχετιστεί με την παχυσαρκία, τη χρόνια γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και πιθανώς το κάπνισμα. Ανάμεσα στους Καυκάσιους άνδρες, τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρούνται στις ΗΠΑ. Ο καρδιακός γαστρικός καρκίνος εμφανίζει παρόμοια κλινικά και επιδημιολογικά στοιχεία με το

οισοφαγικό αδενοκαρκίνωμα, και μικρότερη μακροχρόνια επιβίωση σε σχέση με το μη-καρδιακό γαστρικό καρκίνο (Amini et al., 2015).

Ο τυπικός μη-καρδιακός γαστρικός καρκίνος εμπεριέχει όγκους που εμφανίζονται πιο απομακρυσμένα και αιτιολογικά σχετίζονται με τη μόλυνση από *H. pylori*, με το κάπνισμα και την υψηλή πρόσληψη αλατιού με το φαγητό. Επιπλέον, ένα μικρό ποσοστό αυτού του τύπου καρκίνου οφείλεται και σε μόλυνση από τον ιό Epstein-Barr (EBV) (Marqués-Lespier, González-Pons, & Cruz-Correa, 2016). Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren, το συγκεκριμένο είδος γαστρικού καρκίνου διακρίνεται περαιτέρω στον εντερικό ή καλά διαφοροποιημένο υπότυπο, στο διάχυτο ή αδιαφοροποίητο υπότυπο, και στο μεικτό υπότυπο (Lauren, 1965). Οι σχετικές συχνότητες εμφάνισης είναι περίπου 54% για τον εντερικό υπότυπο, 32% για το διάχυτο υπότυπο και 14% για το μεικτό υπότυπο (Hu et al., 2012). Οι παραπάνω υπότυποι διαθέτουν αρκετά διακριτά κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης και της αιτιολογίας, της καρκινογένεσης, της επιδημιολογίας και των προφίλ έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών. Συνεπώς, αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ασθένειες οι οποίες απαιτούν διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις (Vauhkonen, Vauhkonen, & Sipponen, 2006).

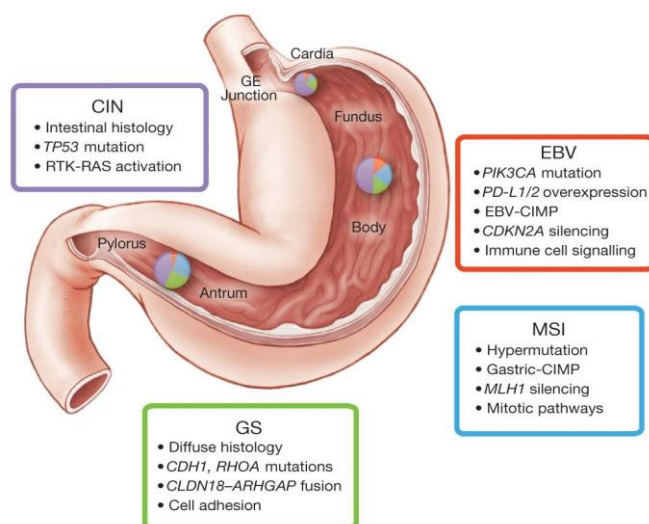
1.1.3 Κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά του εντερικού και του διάχυτου υποτύπου

Στον εντερικό υπότυπο γαστρικού καρκίνου τα κύτταρα του όγκου εμφανίζουν κυτταρική προσκόλληση, διαμορφώνονται σε σωληνοειδείς ή αδενικούς σχηματισμούς και συχνά προκύπτουν μέσω εντερικής μεταπλασίας (Lauren, 1965). Επιπρόσθετα, ο συγκεκριμένος τύπος γαστρικού καρκίνου έχει συσχετιστεί με λεμφική και αγγειακή διεισδυτικότητα. Ο εντερικός τύπος γαστρικού καρκίνου παρατηρείται συχνότερα σε γηραιούς άνδρες, επηρεάζει το άντρο του στομάχου και εμφανίζει μεγαλύτερη πορεία και καλύτερη πρόγνωση (Qiu et al., 2013). Έχει αναγνωριστεί μια αλληλουχία γεγονότων η οποία θεωρείται ότι προκαλεί το συγκεκριμένο υπότυπο γαστρικού καρκίνου, αντιπροσωπεύοντας διαδοχικά βήματα στην προ-καρκινική διαδικασία, όπως η επιφανειακή γαστρίτιδα, η χρόνια ατροφική γαστρίτιδα, η εντερική μεταπλασία και τέλος η δυσπλασία (Correa, 1992). Η μόλυνση από το *H. pylori* σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες ενεργοποιεί την παραπάνω διαδικασία, καταλήγοντας σε εντερικού υποτύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (Barros, Freund, David, & Almeida, 2012). Μοριακό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου υποτύπου γαστρικού καρκίνου αποτελεί η *de novo* έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2, η έκφραση του οποίου είναι περιορισμένη στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο (Mesquita et al., 2006).

Αντιθέτως, στο διάχυτο υπότυπο γαστρικού καρκίνου, τα κύτταρα του όγκου δεν εμφανίζουν προσκόλληση και διεισδύουν στο στρώμα ως μεμονωμένα κύτταρα ή μικρές ομάδες, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας πληθυσμός από μη-συνεκτικά, διάσπαρτα καρκινικά κύτταρα (Qiu et al., 2013). Ο διάχυτος υπότυπος σχετίζεται με άτομα μικρότερης ηλικίας και εμφανίζει προδιάθεση σε γυναίκες, συγκριτικά με τον εντερικό υπότυπο (Lauren, 1965). Ο συγκεκριμένος υπότυπος καρκίνου συνήθως επηρεάζει το σώμα του στομάχου, και παρουσιάζει μικρότερη πορεία και χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τον εντερικό υπότυπο (Y. C. Chen et al., 2016).

1.1.4 Μοριακοί υπότυποι γαστρικού καρκίνου

Ο πιο περιεκτικός χαρακτηρισμός των υποτύπων του γαστρικού καρκίνου πραγματοποιήθηκε το 2014 από το The Cancer Genome Atlas Research Network. Η συγκεκριμένη μελέτη περιέχει τα βήματα για την κατηγοριοποίηση των ασθενών και τη δοκιμή στοχευμένων θεραπειών (Bass et al., 2014). Στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής κοινοπραξίας αξιολογήθηκαν 295 πρώιμα γαστρικά αδενοκαρκινώματα, χρησιμοποιώντας 6 μοριακές πλατφόρμες συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης σωματικού αριθμού αντιγράφων, της αλληλούχησης ολόκληρου του συνόλου των εξονίων, του προφίλ της μεθυλίωσης του DNA, της αλληλούχησης του συνόλου των αγγελιοφόρων RNA (mRNA), της αλληλούχησης των μικρο-RNA (miRNA) και τέλος των συστοιχιών πρωτεΐνης ανάστροφης φάσης (RPPA)(Q. Wang, Liu, & Hu, 2019). Επιπλέον, σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος αστάθειας μικροδορυφόρου (MSI). Η μελέτη αυτή πρότεινε μια μοριακή ταξινόμηση, διακρίνοντας τον καρκίνο του στομάχου σε τέσσερις μοριακούς υποτύπους: (i) όγκοι θετικοί στον ιό *Epstein-Barr* (EBV; 8,8% των δειγμάτων), (ii) όγκοι μικροδορυφορικά ασταθείς (21,7% των δειγμάτων), (iii) γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (19,7% των δειγμάτων) και (iv) όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (49,8% των δειγμάτων)(Bass et al., 2014).



Εικόνα 2: Κύρια χαρακτηριστικά των τεσσάρων μοριακών υποτύπων του γαστρικού καρκίνου. CIN: Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια, EBV: EBV-θετικοί όγκοι, MSI: όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια, GS: γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (Bass et al., 2014).

(i) Όγκοι EBV-θετικοί

Ο συγκεκριμένος υπότυπος γαστρικού καρκίνου είναι περισσότερο εντοπισμένος στο γαστρικό θόλο ή σώμα (62%), χωρίς να παρουσιάζει εντερική μεταπλασία, και συναντάται συχνότερα σε άνδρες ασθενείς (81%)(Bass et al., 2014). Επιπρόσθετα, χαρακτηρίζεται από υψηλό φορτίο του ιού EBV, εκτεταμένη υπερμεθυλίωση του DNA, επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στη φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάση (*PIK3CA*), δραστική πρωτεΐνη πλούσια σε AT που περιέχει την περιοχή 1A (*ARID1A*), μεταλλάξεις στο συν-καταστολέα των B-κυττάρων του λεμφώματος 6 (*BCOR*), υπερέκφραση του προγραμματισμένου προσδέτη θανάτου 1/2 (*PD-L1/2*), ενίσχυση της κινάσης *JAK2* και του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ErbB2 (*ERBB2*)(Bass et al., 2014).

Οι όγκοι EBV-θετικοί οφείλονται σε μόλυνση από τον ιό EBV, καθώς η αρχική είσοδος του ιού σε ένα μεμονωμένο κύτταρο ξενιστή μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω εξάπλωση και ανάπτυξη καρκίνου (Shibata & Weiss, 1992; Yuen et al., 1994). Έχουν βρεθεί 9 ικά γονίδια τα οποία εκφράζονται σε υψηλό βαθμό στον καρκίνο του στομάχου (*BARF0*, *BARF1*, *BcLF1*, *BHRF1*, *BLLF1*, *BRLF1*, *BZLF1*, *EBNA1*, *LMP2A*)(J. Kim, Lee, Bae, Lee, & Kim, 2005; Kusano et al., 2006; Sudo et al., 2004; Zhao et al., 2013). Η υπερέκφραση του γονιδίου *LMP2A* εμπλέκεται στην αυξορρυθμισμό της πρωτεΐνης *survinin*, η οποία ενεργοποιεί την κυτταρική μεθυλοτρανσφεράση 3b (DNMT3b), προκαλώντας έκτοπη υπερμεθυλίωση του DNA κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος των κυττάρων του ξενιστή (M. S. Chang et al., 2006; Zhao et al., 2013). Οι παραπάνω τυπικές γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις ορίζουν τους EBV-θετικούς όγκους ως ένα διακριτό μοριακό υπότυπο γαστρικού καρκίνου.

(ii) Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI)

Ο συγκεκριμένος υπότυπος παρατηρείται σε μεγαλύτερες ηλικίες (μέσος όρος εμφάνισης τα 72 έτη), με μια μεγαλύτερη συχνότητα σε γυναίκες (56%)(Bass et al., 2014). Ο φαινότυπος μικροδορυφορικής αστάθειας είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης πολλαπλών μεταλλάξεων στο γονιδίωμα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, τους μικροδορυφόρους, λόγω του ελαττωματικού μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (Velho, Fernandes, Leite, Figueiredo, & Seruca, 2014). Η επιγενετική σίγηση του γονιδίου *MHL1* με υπερμεθυλίωση του υποκινητή του είναι ο βασικός μηχανισμός που οδηγεί στην απώλεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA στο γαστρικό καρκίνο, αντιπροσωπεύοντας το 75-100% αυτών των περιπτώσεων (Figueiredo et al., 2017). Οι όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια αντιπροσωπεύουν το 37% όλων των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου (Bass et al., 2014; Zhu et al., 2015).

(iii) Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι

Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι εμφανίζονται συνήθως σε μεγαλύτερη ηλικία και ανήκουν στο διάχυτο υπότυπο (Figueiredo et al., 2017). Ο συγκεκριμένος υπότυπος καρκίνου παρουσιάζει μικρό βαθμό ανευπλοειδίας και μικρότερη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53*. Αυτοί οι όγκοι συχνά φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την Ε-καδερίνη (*CDH1*), ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, καθώς επίσης και στο γονίδιο της οικογένειας γονιδίων *Ras*, που κωδικοποιεί τη μικρή GTPάση που ρυθμίζει την κυτταρική κινητοποίηση (*RHOA*)(Bass et al., 2014). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *RHOA* συμβαίνουν κυρίως σε θερμά σημεία (hotspots), δηλαδή περιοχές του γονιδιώματος στις οποίες συγκεντρώνονται μεταλλάξεις, κυρίως σε λειτουργικές περιοχές σημαντικές για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *RhoA* με τους τελεστές της (Figueiredo et al., 2017). Οι λειτουργικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι οι ασθενείς που είχαν μεταλλάξεις στα θερμά σημεία είχαν ελαττωματική σηματοδότηση της πρωτεΐνης *RhoA*, η οποία μπορεί να συμβάλει στην έλλειψη κυτταρικής προσκόλλησης και στο μεταστατικό μοτίβο ανάπτυξης των όγκων που ανήκουν στο διάχυτο υπότυπο (Bass et al., 2014; K. Wang et al., 2014).

(iv) Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια

Οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια συνήθως εμφανίζουν γαστρική εντερική μεταπλασία σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren, ενώ φέρουν μεταλλάξεις στο

ογκο-κατασταλτικό γονίδιο *TP53* και μεταλλάξεις που ενεργοποιούν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν υποδοχείς κινασών τυροσίνης (Bass et al., 2014). Περίπου το 37% του συνόλου των γαστρικών όγκων φέρουν ενισχύσεις σε τέτοιου είδους γονίδια, όπως τα *EGFR*, *FGFR2*, *HER2* και *MET*, ανεξάρτητα από το μοριακό υπότυπο στον οποίο ανήκουν (Röcken, 2017). Σε αυτή την κατηγορία κατατάσσονται και οι όγκοι στους οποίους παρατηρείται ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες (Cristescu et al., 2015).

1.1.5 Διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου

Το κυρίαρχο εργαλείο για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου είναι η γαστροσκόπηση (Martín-Richard et al., 2020), που αφορά επεμβατικού τύπου εξέταση. Παράλληλα με τις απεικονιστικές τεχνικές, η χρήση βιοδεικτών έχει αναδειχθεί ως νέα διαγνωστική επιλογή για την έγκαιρη και γρήγορη ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου (Tavakoli, Khatami, Momeni, Azadbakht, & Ghasemi, 2020). Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου δεν εμφανίζουν καλή ειδικότητα και ευαισθησία, γεγονός που τους καθιστά μη ειδικούς για το συγκεκριμένο είδος καρκίνου (Tong et al., 2016; Tsai et al., 2016). Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη βελτιωμένων διαγνωστικών μεθόδων για την έγκαιρη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου είναι απαραίτητη (Necula et al., 2019).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια τυπική θεραπεία για το γαστρικό καρκίνο και οι θεραπευτικές επιλογές εξαρτώνται από το στάδιο της ασθένειας, την παρουσία των βιοδεικτών και την προτεινόμενη αγωγή από τους θεράποντες ιατρούς (Sexton, Al Hallak, Diab, & Azmi, 2020). Για τους καρκίνους σε αρχικά στάδια δίνεται έμφαση στην εκτομή του όγκου αντί για συστηματική χημειοθεραπεία (Bollschweiler, Berlth, Baltin, Mönig, & Hölscher, 2014). Ο τύπος της χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από τη θέση του όγκου και το βάθος της διεσόδου, αλλά σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει την ενδοσκοπική εκτομή του βλεννογόνου, την περιφερική οισοφαγεκτομή και τη μερική ή ολική γαστρεκτομή (Sexton et al., 2020). Στα προχωρημένα στάδια γαστρικού καρκίνου η βασική θεραπεία περιλαμβάνει συνδυασμούς χημειοακτινοβολίας, μοριακής στοχευμένης θεραπείας και ανοσοθεραπείας (Tan et al., 2020).

Ο γαστρικός καρκίνος παραμένει μια σημαντική αιτία θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο παγκοσμίως, με τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας να οφείλονται στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των περιστατικών γαστρικού καρκίνου διαγιγνώσκεται σε μεταγενέστερα στάδια όπου η πρόγνωση είναι δυσμενής και οι θεραπευτικές επιλογές περιορισμένες (Necula et al., 2019). Λόγω της υψηλής θνησιμότητας και της καθυστερημένης διάγνωσης του συγκεκριμένου καρκίνου, απαιτείται βαθύτερη γνώση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη παθογένεση και εύρεση πιθανών βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση (Tan et al., 2020).

1.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2

Το γονίδιο *Cdx2* (Caudal-related homeobox transcription factor 2) ανήκει στην οικογένεια των ομοιοτικών γονιδίων, τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της φυσιολογικής εμβρυονικής ανάπτυξης (James, Erler, & Kazenwadel, 1994). Η αλληλουχία του γονιδίου εμφανίζει ομολογία με το γονίδιο *caudal* της *Drosophila melanogaster*, το οποίο απαιτείται για την πρόσθια - οπίσθια διαφοροποίηση (McGinnis & Krumlauf, 1992). Το γονίδιο *Cdx2* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της

διαφοροποίησης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (R. J. Guo, Suh, & Lynch, 2004), όπως έχουν δείξει *in vitro* αλλά και *in vivo* πειράματα (Silberg, Swain, Suh, & Traber, 2000).

Τα ομοιοτικά γονίδια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, την κλάση I (*HOX*) και την κλάση II (non-*HOX*). Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί 39 *HOX* γονίδια, τα οποία ταξινομούνται στις ομάδες *A*, *B*, *C* και *D* (Shah & Sukumar, 2010). Τα ομοιοτικά γονίδια χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, το ομοιοπλαίσιο (homeobox), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική επικράτεια, την ομοιοτική περιοχή (homeodomain), με μήκος συνήθως 60 αμινοξέα (Bürglin & Affolter, 2016). Πολλές ομοιοτικές πρωτεΐνες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες με σημαντικό ρόλο στην εμβρυονική ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση, και αρκετές εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες (Boncinelli, 1997). Το γονίδιο *Cdx2* ανήκει στην κλάση II των ομοιοτικών γονιδίων (Chawengsaksophak, 2019).

Η έκφραση του γονιδίου *Cdx2* σε ποντικούς εντοπίζεται εξωεμβρυϊκά 3,5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση στο τροφοεξώδερμα, και αργότερα σε κάποιους ιστούς του πλακούντα που προέρχονται από αυτό (Yagi, Akiyama, & Yuasa, 1999). Η εμβρυϊκή έκφραση ξεκινά στις 8,5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση στο οπίσθιο έντερο, στην ουρά, στο οπίσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα και στο παραξιακό μεσόδερμα πριν τη δημιουργία των σωματιών (Beck, Erler, Russell, & James, 1995). Η έκφραση του *Cdx2* αυξάνεται δραματικά κατά τη διάρκεια μιας κρίσιμης περιόδου στην εντερική ανάπτυξη, τη μετατροπή του σπλαγγχικού ενδοδέρματος σε ένα απλό κυλινδρικό επιθήλιο (Silberg et al., 2000). Αργότερα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και κατά την ενήλικη ζωή, η έκφραση του CDX2 περιορίζεται στο εντερικό επιθήλιο, όπου τα επίπεδα μεταγραφής διαφέρουν ποσοτικά ανάλογα με την περιοχή, με την υψηλότερη έκφραση να εμφανίζεται στο εγγύς κόλον (James et al., 1994). Η έκφραση του *Cdx2* σχετίζεται με ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της κυτταρικής προσκόλλησης και της κυτταρικής μορφολογίας (Holmes, Egan, Swan, & O'Morain, 2007).

Η έκφραση του *Cdx2* είναι περιορισμένη σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, και η ικανότητά του να καθορίζει την κυτταρική μοίρα το καθιστά έναν “κύριο ρυθμιστή” (“master regulator”) (Michael P. Verzi et al., 2010). Έχει βρεθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 καταλαμβάνει περισσότερες από 12000 θέσεις πάνω στο γονιδίωμα των εντερικών κυττάρων ενήλικων ποντικών (Verzi, Shin, Ho, Liu, & Shivdasani, 2011). Οι περισσότερες από αυτές τις θέσεις βρίσκονται μακριά από θέσεις έναρξης της μεταγραφής (Transcriptional Start Sites, TSSs), και εμπεριέχονται σε μια χρωματινική διαμόρφωση που υποδεικνύει ενεργούς ενισχυτές, δηλαδή δύο καλά τοποθετημένα νουκλεοσώματα εμπλουτισμένα με διμεθυλιωμένη τη λυσίνη 4 της ιστόνης 3 (H3K4me2) (H. H. He et al., 2010; Michael P. Verzi et al., 2010). Επιπρόσθετα, σε ανθρώπινα εντερικά κύτταρα Caco-2, ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 προσδένεται στο DNA σε κοντινή απόσταση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο GATA6 και ο HNF4a, και άλλους ιστο-ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Michael P. Verzi et al., 2010).

1.2.1 Ρύθμιση και λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα CDX2

Το γονίδιο *Cdx2* αυτορυθμίζεται *in vivo* και λειτουργεί ως μεταγραφικός στόχος της ίδιας της CDX2 πρωτεΐνης, τόσο στο γαστρικό όσο και στο εντερικό περιβάλλον

(Barros et al., 2011). Επιπλέον, το γονίδιο *Cdx2* ρυθμίζεται και από το σηματοδοτικό μονοπάτι AMPK, γεγονός το οποίο οδηγεί σε επιθηλιακή διαφοροποίηση. Η ρύθμιση του *Cdx2* πραγματοποιείται μέσω τροποποιήσεων των ιστονών στον υποκινητή του γονιδίου (Sun, Yang, Rogers, Du, & Zhu, 2017).

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 διατηρείται στο εντερικό επιθήλιο καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής και συνυπάρχουν ποικίλες φωσφορυλιωμένες μορφές, κάθε μια από τις οποίες προκαλεί διαφορετικές επιδράσεις στην κυτταρική συμπεριφορά (Isabelle Gross et al., 2005). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη CDX2 φωσφορυλιώνεται στην αμινοτελική περιοχή από τις πρωτεϊνικές κινάσες MAPKs και αυτό το γεγονός ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης (Rings et al., 2001).

Η πρωτεΐνη CDX2 ρυθμίζει τη δραστηριότητα υποκινητών για μια πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται σε εντερικές λειτουργίες, όπως είναι οι πεπτικές υδρολάσες και οι μεταφορείς, τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, οι υποδοχείς και τα σηματοδοτικά μόρια, γεγονός το οποίο προσδίδει στο *Cdx2* ένα ρόλο τόσο στα απορροφητικά όσο και στα εκκριτικά μονοπάτια στο έντερο (Freund, Duluc, Reimund, Gross, & Domon-Dell, 2015). Στα διαφοροποιημένα κύτταρα, ο CDX2 προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων μαζί με το μεταγραφικό παράγοντα HNF4a, ενώ στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα προσδένεται μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο GATA6 (M. P. Verzi et al., 2010; Michael P. Verzi et al., 2010).

Η πρωτεΐνη CDX2, πέρα από τη λειτουργία της ως μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται στο DNA, λειτουργεί και με διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως παραδείγματος χάριν μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη SMAD3, προκειμένου να ενεργοποιηθεί το σύστημα αναφοράς TGFβ, απουσία του παράγοντα TGFβ (Calon et al., 2007). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη CDX2 αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p65 του παράγοντα NF-κB και κατά συνέπεια προλαμβάνει την πρόσδεση και ενεργοποίηση του υποκινητή του Cox-2 από τον NF-κB (S. P. Kim et al., 2004; H. Mutoh, Hayakawa, Sakamoto, & Sugano, 2007). Επιπλέον, μέσω της αλληλεπίδρασης με τη β-κατενίνη και παρεμποδίζοντας την πρόσδεση της στο συν-παράγοντα Tcf4, η πρωτεΐνη CDX2 εμπλέκεται και στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt (R. J. Guo, Funakoshi, Lee, Kong, & Lynch, 2010). Τέλος, η πρωτεΐνη CDX2 εμπλέκεται και στην επιδιόρθωση του DNA, αλληλεπιδρώντας με συστατικά του μηχανισμού επιδιόρθωσης και κατ' επέκταση καταστέλλοντάς τον. Συγκεκριμένα, η ομοιοπρωτεΐνη CDX2 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Ku70/80 στη χρωματίνη, οι οποίες εμπλέκονται στην αναγνώριση των θραύσεων στις 2 έλικες του DNA, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση του μοριακού μηχανισμού της επιδιόρθωσης του DNA (Freund et al., 2015). Ωστόσο, αυτή η λειτουργία του CDX2 παρατηρήθηκε στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου όπου το γονίδιο εκφράζεται φυσιολογικά και όχι σε ιστούς όπου παρατηρείται έκτοπη έκφραση του γονιδίου (Renouf et al., 2012).

1.2.2 Ο ρόλος του CDX2 στην καρκινογένεση του γαστρεντερικού σωλήνα

Πληθώρα ερευνών έχουν δείξει ότι τα ομοιοτικά γονίδια ενδέχεται να έχουν είτε ογκο-κατασταλτικές είτε ογκο-επαγωγικές ιδιότητες, ανάλογα με το μοτίβο έκφρασής τους σε ποικίλους ιστούς (Joo, Park, & Chun, 2016). Όσον αφορά τις ογκογόνες ιδιότητες, τα ομοιοτικά γονίδια εκφράζονται φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή περίοδο και ενεργοποιούνται ξανά στους όγκους, ενώ μειώνεται η έκφρασή

τους σε φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς. Αντίθετα, συγκεκριμένα ομοιοτικά γονίδια εκφράζονται σε φυσιολογικούς διαφοροποιημένους ιστούς και μειώνεται η έκφρασή τους στους όγκους (Haria & Naora, 2013). Παρ' όλα αυτά, ένα ομοιοτικό γονίδιο μπορεί να παρουσιάζει ογκο-κατασταλτικές και ογκο-επαγωγικές ιδιότητες, ανάλογα με τον ιστό ή τις κυτταρικές γενεαλογίες που εκφράζεται (Joo et al., 2016). Με αυτό τον τρόπο λειτουργεί και το γονίδιο *Cdx2*, λειτουργώντας τόσο ως ογκο-κατασταλτικό γονίδιο όσο και ογκογονίδιο (Salari et al., 2012).

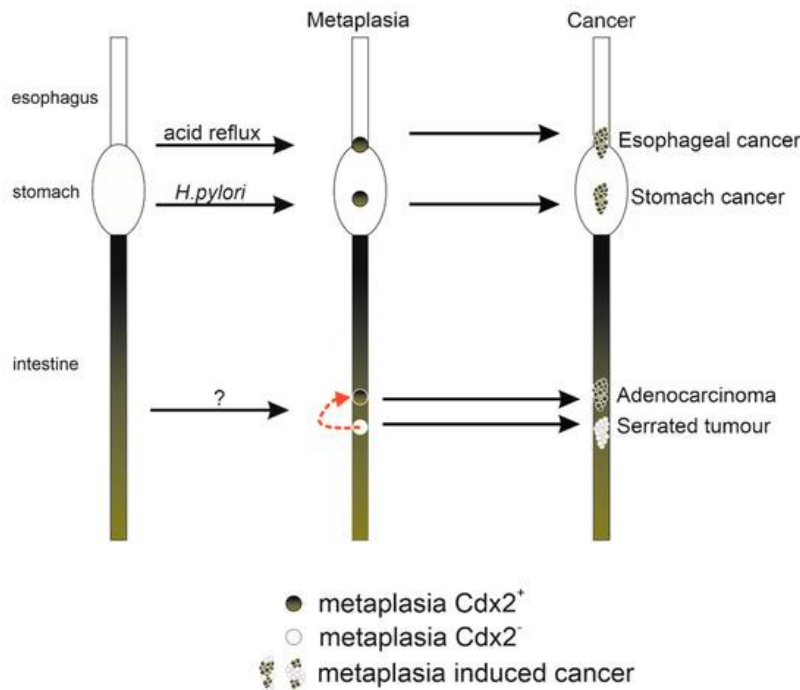
Το γονίδιο *Cdx2* θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ανάπτυξης του οισοφάγου Barret's (Moons et al., 2004; Phillips, Frierson, & Moskaluk, 2003), μιας επίκτητης κατάστασης στην οποία το φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο του οισοφάγου αντικαθίσταται από εντερικού τύπου μεταπλαστικό κυλινδρικό επιθήλιο με κύτταρα Goblet (Tamagawa et al., 2012). Συγκεκριμένα, μέσω ενός μηχανισμού δύο βημάτων που οδηγεί στην ανάπτυξη του οισοφάγου Barret's, τα χολικά οξέα ενεργοποιούν τον υποκινητή του *Cdx2* και ενεργοποιούν την παραγωγή της CDX2 πρωτεΐνης στα οισοφαγικά κερατινοκύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία βλεννογόνου εντερικού τύπου, λειτουργώντας έτσι ως ογκογονίδιο (Kazumori, Ishihara, Rumi, Kadowaki, & Kinoshita, 2006).

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου το γονίδιο *Cdx2* λειτουργεί ως ογκο-καταστολέας (Krueger et al., 2009). Στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου η έκφραση του *Cdx2* γίνεται ετερογενής και μειώνεται, και έχει βρεθεί ότι το γονίδιο *Cdx2* διαθέτει αντι-μεταστατικές ιδιότητες, καθώς δεν εκφράζεται στα μεταστατικά κύτταρα στο συγκεκριμένο καρκίνο (I. Gross et al., 2008). Η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης CDX2 σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο καρκίνου, με αγγειακή διήθηση και μετάσταση (Baba et al., 2009; Bae, Lee, Cho, Kim, & Kang, 2015; B. Y. Zhang et al., 2017). Επιπλέον, σε ασθενείς με πλήρη απουσία της CDX2 πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί μειωμένος χρόνος επιβίωσης (Dalerba et al., 2016).

1.2.3 Ο ρόλος του CDX2 στην εντερική μεταπλασία

Η έκτοπη έκφραση του γονιδίου *Cdx2* έχει συσχετιστεί με το σχηματισμό της εντερικής μεταπλασίας στο στόμαχο (Yuasa et al., 2005), καθώς η πρωτεΐνη CDX2 δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό στόμαχο, αλλά εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στην περίπτωση της εντερικής μεταπλασίας (Bai et al., 2002; Seno et al., 2002). Η έκτοπη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 στο γαστρικό βλεννογόνο προκαλεί τη διαφοροποίηση του επιθηλίου σε εντερικού τύπου, γεγονός το οποίο αποτελεί το πρώτο βήμα προς την εντερική μεταπλασία (Silberg et al., 2002) και επάγεται από τη μόλυνση με *H.pylori* (Manzo et al., 2006).

Αυτό επιβεβαιώνεται σε πειράματα στα οποία η έκφραση του *Cdx2* κατευθυνόταν στους γαστρικούς βλεννογόνους σε διαγονιδιακά ποντίκια χρησιμοποιώντας *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων ειδικών για γαστρικό βλεννογόνο, όπου η έκτοπη έκφραση του *Cdx2* προκάλεσε εντερική μεταπλασία (Hiroyuki Mutoh et al., 2002). Στο γαστρικό βλεννογόνο φαίνεται ότι ο ρόλος του *Cdx2* είναι ογκο-επαγωγικός (Asano et al., 2016) και καθώς εξελίσσεται ο όγκος σε μεταγενέστερα στάδια η έκφρασή του μειώνεται, υποδεικνύοντας ότι εφόσον επαχθεί η καρκινογένεση ο ρόλος του μπορεί να καταστεί ογκο-κατασταλτικός ή μη απαραίτητος (H.-J. Kim et al., 2020).

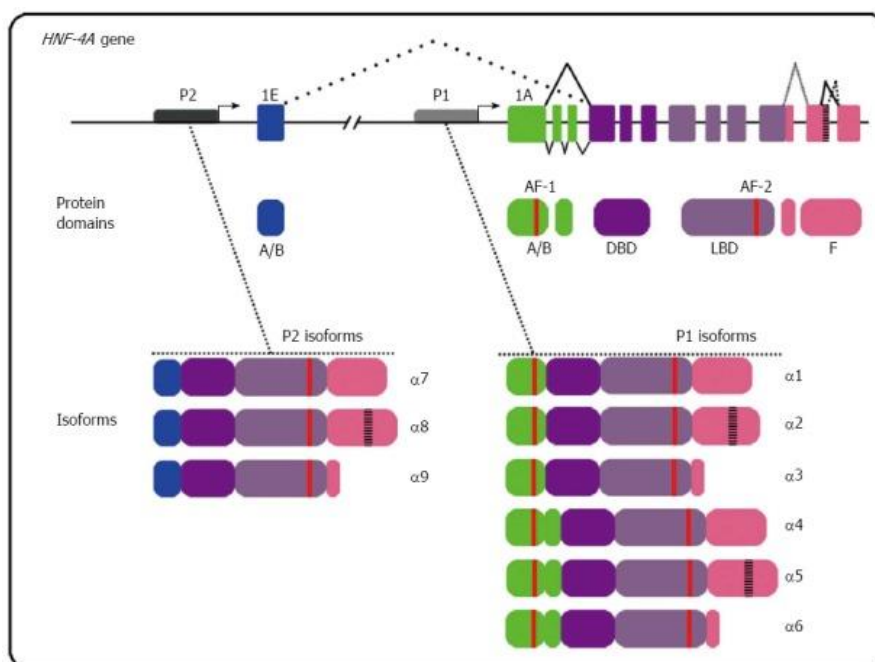


Εικόνα 3: Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση της μεταπλασίας που προκαλείται από τη μεταβολή της έκφρασης του Cdx2 και οδηγεί σε καρκινογένεση στο γαστρεντερικό σωλήνα (Chawengsaksophak, 2019).

1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α

Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor 4α) ανήκει στην υπεροικογένεια υποδοχέων στεροειδών/θυροειδικών ορμονών και έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία μιας πληθώρας μεταβολικών οργάνων, όπως είναι το ήπαρ, το πάγκρεας, οι νεφροί και το έντερο (Odom et al., 2004; Stoffel & Duncan, 1997; Taraviras, Paula Monaghan, Schütz, & Kelsey, 1994). Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην παραπάνω κατηγορία υποδοχέων ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση ως απόκριση σε ποικίλα σηματοδοτικά μόρια (όπως στεροειδή, θυροειδικές ορμόνες, ρετινοειδή, βιταμίνη D3 και λιπιδικοί μεταβολίτες), μέσω της πρόσδεσης σε συγκεκριμένα στοιχεία απόκρισης (response elements, REs) των γονιδίων - στόχων τους (Chambon, 1996; Evans, 1988; Mangelsdorf & Evans, 1995). Ο HNF4α, όπως και άλλα μέλη της υπεροικογένειας στην οποία ανήκει, διαθέτει μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης του DNA τύπου «δακτυλίου ψευδαργύρου» C4 (Taraviras et al., 1994).

Το γονίδιο HNF4α περιέχει 13 εξώνια και διαθέτει δύο υποκινητές, P1 και P2, κωδικοποιώντας τουλάχιστον εννέα διαφορετικές ισομορφές ως αποτέλεσμα της εναλλακτικής χρήσης των υποκινητών και του εναλλακτικού ματίσματος (Dean, Tang, Seckl, & Nyirenda, 2010). Η έκφραση των διαφορετικών ισομορφών του HNF4α μπορεί να ποικίλει στα αναπτυξιακά στάδια με ιστο-ειδικό τρόπο. Παραδείγματος χάριν, στον ποντικό, η ισομορφή P2 εκφράζεται κυρίως στο εμβρυϊκό ήπαρ, ενώ η ισομορφή P1 κυριαρχεί στο ενήλικο ήπαρ (Torres-Padilla, Fougère-Deschatrette, & Weiss, 2001).



Εικόνα 4: Οι δύο ομάδες ισομορφών P1 και P2 του γονιδίου HNF4a, οι οποίες προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα και τους δύο υποκινητές (Babeu & Boudreau, 2014).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, το mRNA του γονιδίου HNF4a ανιχνεύεται αρχικά στο πρώιμο ενδόδερμα της βλαστοκύστης την εμβρυονική μέρα 4,5 και συνεχίζει να εκφράζεται στο εξωεμβρυϊκό σπλαγγχνικό ενδόδερμα καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης (Watt, Garrison, & Duncan, 2003). Η έκφραση στο αναπτυσσόμενο έμβρυο ανιχνεύεται στο ήπαρ και στο έντερο 8,5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, και μετέπειτα στο αναπτυσσόμενο πάγκρεας και νεφρούς την ημέρα 10 (Duncan et al., 1994; Taraviras et al., 1994).

1.3.1 Ρύθμιση και λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a

Παρόλο που ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a αρχικά θεωρούνταν ορφανός υποδοχέας, η δραστηριότητά του ρυθμίζεται από την πρόσδεση λιπαρών ακυλο-CoA θειοεστέρων (Sladek, Zhong, Lai, & Darnell, 1990). Ο HNF4a ακετυλιώνεται, φωσφορυλιώνεται και μπορεί να προσδεθεί στους παράγοντες SMAD3 και SMAD4, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι ενδέχεται να ρυθμίζεται από πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια (Chou et al., 2003; G. Jiang, Nepomuceno, Yang, & Sladek, 1997; Soutoglou, Katrakili, & Talianidis, 2000). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ένας ενισχυτικός βρόχος της BMP/SMAD σηματοδότησης και του HNF4a, ο οποίος προωθεί και σταθεροποιεί της εντερική κυτταρική ταυτότητα στο ενήλικο έντερο (L. Chen, Toke, Luo, Vasoya, Fullem, et al., 2019).

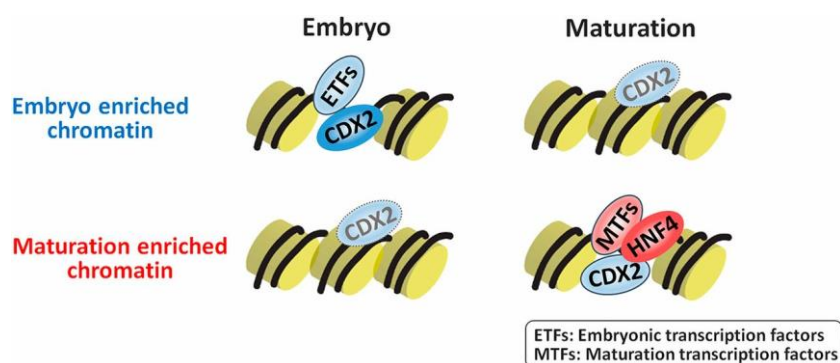
Συνοπτικά, η ρύθμιση του HNF4a πραγματοποιείται σε πολλαπλά επίπεδα: επιγενετικά (Kwon et al., 2016; Kwon et al., 2018), μεταγραφικά συμπεριλαμβανομένης και της ρύθμισης του υποκινητή, σε επίπεδο δευτεροταγούς δομής του μεταγράφου, ρύθμιση από microRNA (S. Guo & Lu, 2017; Lu, 2016), καθώς επίσης και μετα-μεταφραστικά, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της αποικοδόμησης και του πυρηνικού εντοπισμού (Babeu & Boudreau, 2014; C. F. Jiang et al., 2016; Viollet, Kahn, & Raymondjean, 1997).

Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a προσδένεται ως ομοδιμερές στο σημείο αναγνώρισης στο DNA, το οποίο είναι ένα άμεσο στοιχείο επανάληψης (AGGTCA) με ένα ή δύο νουκλεοτιδικά διαχωριστικά που ορίζονται DR1 και DR2 αντίστοιχα. Μετά την πρόσδεσή του στο DNA, ο HNF4a επιστρατεύει μεταγραφικούς ενεργοποιητές και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας θετικά την έκφραση των γονιδίων - στόχων του (Gonzalez, 2008).

Ο HNF4a απαιτείται για την έκφραση σημαντικών γονιδίων των οποίων τα προϊόντα συμβάλλουν στην εντερική λειτουργία. Μέσα σε αυτά τα γονίδια συμπεριλαμβάνονται και εκείνα τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μια σειρά από φυσιολογικές και κυτταρικές λειτουργίες, υποδεικνύοντας έτσι ότι ο HNF4a δεν είναι μόνο απαραίτητος για την ανάπτυξη του παχέος εντέρου, αλλά συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της φυσιολογίας του ενήλικου εντέρου (Garrison et al., 2006). Μερικές από τις λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει ο HNF4a είναι η ανοσολογική απόκριση, η απόπτωση, η απόκριση στο στρες, η ρύθμιση του μεταβολισμού και συγκεκριμένα μονοπάτια που σχετίζονται με καρκίνο, μέσω της στόχευσης περισσότερων από 240 πρωτεϊνών (Bolotin et al., 2010).

Ο πυρηνικός υποδοχέας HNF4a συμβάλλει καθοριστικά στη δημιουργία ενός ώριμου επιθηλίου στο παχύ έντερο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (L. Chen, Toke, Luo, Vasoya, Aita, et al., 2019). Η απώλεια του HNF4a στον επιθηλιακό ιστό του παχέος εντέρου έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του σχηματισμού των φυσιολογικών κρυπών, τη λέπτυνση των μυϊκών κυτταρικών στρωμάτων, την απώλεια του αγγειακού ιστού, τη μείωση του αριθμού των επιθηλιακών κυττάρων και την ατελή ωρίμανση των κυττάρων Goblet (Garrison et al., 2006).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του εμβρυϊκού εντέρου ο HNF4a λειτουργεί συνεργατικά με τον CDX2. Αρχικά ο CDX2 δρα στη δημιουργία του εντερικού φαινοτύπου, και στη συνέχεια προσελκύει τον HNF4a και τον ενεργοποιεί στο ώριμο έντερο. Συνεπώς, αυτοί οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για την ωρίμανση του εμβρυϊκού εντέρου (L. Chen, Toke, Luo, Vasoya, Aita, et al., 2019).



Εικόνα 5: Πιθανό μοντέλο της λειτουργίας του δικτύου μεταγραφικών παραγόντων κατά τη μετατροπή των εμβρυϊκών σε ώριμους ιστούς. Αριστερά: Ο CDX2 συμμετέχει στη διαφοροποίηση σε εντερικό φαινότυπο, και προσδένεται σε προσβάσιμες χρωματινικές περιοχές μαζί με εμβρυϊκούς μεταγραφικούς παράγοντες. Στους εμβρυϊκούς ιστούς, μικρότερη πρόσδεση του CDX2 μπορεί να γίνεται σε περιοχές που θα γίνουν αργότερα προσβάσιμες κατά την ωρίμανση. Δεξιά: Καθώς το έντερο ωριμάζει, περιοχές εμπλουτισμένες κατά την ωρίμανση γίνονται περισσότερο προσβάσιμες. Ένα νέο δίκτυο

μεταγραφικών παραγόντων συνεργάζεται για τη σταθεροποίηση της χρωματίνης και την εντερική ωρίμανση (L. Chen, Toke, Luo, Vasoya, Aita, et al., 2019).

1.3.2 Ο ρόλος του HNF4a στην καρκινογένεση του γαστρεντερικού σωλήνα

Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a έχει συσχετιστεί με πολλές ασθένειες στον άνθρωπο, όπως ο διαβήτης, η ιογενής λοίμωξη ηπατίτιδας Β και ο καρκίνος (Z. Wang et al., 2020). Όσον αφορά τον καρκίνο, ο ρόλος του HNF4a εξαρτάται από το περιβάλλον, καθώς μπορεί να παρουσιάζει τόσο ογκο-κατασταλτικές όσο και ογκο-επαγωγικές ιδιότητες (Xiang et al., 2015). Οι αλλαγές στην έκφραση του HNF4a έχουν συσχετιστεί με πολλούς τύπους καρκίνου, όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και τον καρκίνο του λεπτού και παχέος εντέρου (Mathieu Darsigny et al., 2010).

Στο ήπαρ, η απώλεια του HNF4a παρατηρείται στην περίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και η απορρύθμιση του HNF4a σχετίζεται με την εξέλιξη, την αποδιαφοροποίηση, τη μετάσταση και τη δυσμενή πρόγνωση του συγκεκριμένου καρκίνου (Lazarevich et al., 2010). Από τα παραπάνω προκύπτει η ογκο-κατασταλτική λειτουργία του HNF4a στον καρκίνο του ήπατος (Xiang et al., 2015).

Ο HNF4a δεν εκφράζεται φυσιολογικά στον οισοφάγο, όμως η έκφρασή του αυξάνεται στην περίπτωση του οισοφαγίου Barret's και επάγει τον κυλινδρικό φαινότυπο στα οισοφαγικά επιθηλιακά κύτταρα (Collepriest et al., 2017; Rogerson et al., 2019). Ο HNF4a συγκεκριμένα δημιουργεί ανοιχτές περιοχές στη μη-προσβάσιμη χρωματίνη, το οποίο ενδεχομένως να είναι ένα από τα αρχικά στάδια του καρκίνου του οισοφάγου (Rogerson et al., 2019). Επιπλέον, στα κύτταρα του οισοφαγίου Barret's και εν συνεχεία στα κύτταρα του οισοφαγικού όγκου εκφράζεται και ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι ο HNF4a και ο GATA6 ενδέχεται να συνεργάζονται καταλαμβάνοντας τις ίδιες γονιδιωματικές περιοχές, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τη γονιδιακή έκφραση (Owen et al., 2018).

Στο έντερο, ο HNF4a είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της λειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων και της φυσιολογίας των εντερικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης της ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, της ανοσολογικής λειτουργίας, της μεταφοράς ιόντων, της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού και του οξειδωτικού στρες (Ahn et al., 2008; Cattin et al., 2009; Darsigny et al., 2009; M. Darsigny et al., 2010). Ο HNF4a κατέχει κυρίως ογκο-επαγωγικό ρόλο στο έντερο (T. Xu et al., 2020), αν και ο ρόλος του ενδέχεται να μεταβάλλεται ανάλογα με την ισομορφή που παρατηρείται (Chellappa et al., 2016; Vuong et al., 2015). Επιπρόσθετα, ο HNF4a είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του παράγοντα CDX2, καθώς οι μεταβολές της έκφρασης του HNF4a σε εντερικές καρκινικές κυτταρικές σειρές επιφέρουν αντίστοιχες μεταβολές στην έκφραση του CDX2 (Saandi et al., 2013).

1.3.3 Ο ρόλος του HNF4a στην εντερική μεταπλασία

Φυσιολογικά, ο HNF4a δεν εκφράζεται στο γαστρικό επιθήλιο, παρά την ενδοδερμική προέλευσή του (S. Jiang et al., 2003; Tanaka et al., 2006). Ωστόσο, περιορισμένη έκφραση του HNF4a παρατηρείται στην εντερική μεταπλασία στον ενήλικο γαστρικό βλεννογόνο και στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (Tanaka et al., 2006). Συνεπώς, ο HNF4a αποτελεί ένα ογκογονίδιο στο γαστρικό καρκίνο (H. R. Chang et

al., 2016). Συγκεκριμένα, μια ισομορφή του HNF4α έχει σχετιστεί με τη μόλυνση από τον ιό EBV στο γαστρικό καρκίνο (Uozaki et al., 2011). Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α αποτελεί έναν ειδικό βιοδείκτη στο γαστρικό καρκίνο, καθώς χρησιμοποιείται για τη διάκριση του από τα άλλα είδη καρκίνων (van der Post et al., 2014).

Στο γαστρικό καρκίνο ο HNF4α είναι απαραίτητος για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (H. R. Chang et al., 2016; Chia et al., 2015). Μια άλλη μελέτη έχει συνδέσει τον παράγοντα HNF4α με την έκφραση του ογκο-καταστολέα *ITLN1* και με βελτιωμένη πρόγνωση του γαστρικού καρκίνου (D. Li et al., 2015). Η δραστηριότητα του HNF4α στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο και ο ογκο-ειδικός ρόλος του στην καρκινογένεση του στομάχου υποδεικνύουν ότι ο HNF4α πιθανώς λειτουργεί ως ένα ογκογονίδιο “επιβίωσης-γενεαλογίας” (“lineage-survival”), όπου συγκεκριμένες λειτουργίες του HNF4α αξιοποιούνται για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου στο στομάχι (Garraway & Sellers, 2006). Ωστόσο, παρά τις ογκογονικές ιδιότητες των γονιδίων “επιβίωσης-γενεαλογίας”, η έκφραση αυτών των παραγόντων όπως και του HNF4α συχνά σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση (Salti et al., 2000; Wilbertz et al., 2011; Winslow et al., 2011).

Ο HNF4α ρυθμίζει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2, καθώς προσδένεται στον υποκινητή του (Boyd, Bressendorff, Møller, Olsen, & Troelsen, 2009), όπως επίσης έχει βρεθεί ότι ο CDX2 ρυθμίζει την ικανότητα του HNF4α να ελέγχει τη γονιδιακή έκφραση στο έντερο (Verzi, Shin, San Roman, Liu, & Shivdasani, 2013). Επιπρόσθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α ενδεχομένως ρυθμίζει θετικά τη δραστηριότητα του ίδιου του υποκινητή του (Bailly, Torres-Padilla, Tinel, & Weiss, 2001). Ο Ni και οι συνεργάτες του μελέτησαν την περίπτωση της εντερικής μεταπλασίας που προκαλείται από την παλινδρόμηση χολικών οξέων και έδειξαν ότι αυτή προκαλείται από την επαγωγή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και KLF4, η οποία ρυθμίζεται άμεσα από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του HNF4α ακολουθείται από ένα σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία εντερικής μεταπλασίας στο στομάχι (Ni et al., 2020).

Εν κατακλείδι, οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4α διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσιολογική ανάπτυξη και ωρίμανση του εντερικού επιθηλίου, όσο και στην εμφάνιση εντερικής μεταπλασίας στο στόμαχο. Οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες, CDX2 και HNF4α, αποτελούν χρήσιμους διαγνωστικούς βιοδείκτες στο γαστρικό καρκίνο και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διάκρισή του από τα υπόλοιπα είδη καρκίνων, λόγω της υψηλής ειδικότητάς τους (Jucá et al., 2017; Masood, Loya, & Yusuf, 2016). Παρά την αξία τους ως διαγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο, οι μεταγραφικοί παράγοντες θεωρούνται ακατάλληλοι για θεραπευτική στόχευση (“undruggable”)(Darnell, 2002), λόγω του ότι εκφράζονται σε φυσιολογικούς ιστούς στους οποίους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, και η στόχευσή τους θα επέφερε πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες (Johnston & Carroll, 2015). Συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων στόχων για τη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου. Μια πιθανή επιλογή αποτελούν τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (Chandra Gupta & Nandan Tripathi, 2017).

1.4 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA

Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται κατά 98% περίπου από γονίδια που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Wilusz, Sunwoo, & Spector, 2009). Το DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες αρχικά είχε θεωρηθεί ότι δε διαθέτει κάποια λειτουργία, και για αυτό το λόγο χαρακτηρίστηκε ως “junk DNA” (Kung, Colognori, & Lee, 2013; Ohno, 1972; Orgel & Crick, 1980). Ωστόσο, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχησης του RNA και των υπολογιστικών μεθόδων για τη συναρμολόγηση του μεταγραφώματος, κατέστη φανερό ότι πέρα από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, υπάρχουν και πολλά μη κωδικοποιητικά RNA (non coding RNAs, ncRNAs) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μια πληθώρα βιολογικών λειτουργιών (Ma et al., 2012).

Σε γενικές γραμμές, τα ncRNAs διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση το μήκος τους. Τα μετάγραφα τα οποία έχουν μήκος μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια χαρακτηρίζονται ως μικρά μη κωδικοποιητικά RNA (Qi & Du, 2013), συμπεριλαμβανομένων των microRNA, piRNA και siRNA (L. He & Hannon, 2004). Αντίθετα, τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non coding RNAs, lncRNAs) ποικίλουν σε μέγεθος από 200 έως 100 χιλιάδες νουκλεοτίδια, είναι χαμηλά συντηρημένα σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας και δε λειτουργούν ως πρότυπο για τη σύνθεση πρωτεϊνών (Qi & Du, 2013). Τα lncRNAs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και με βάση τη γονιδιωματική εγγύτητα του γενετικού τους τύπου με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε 5 κατηγορίες: (i) νοηματικά (sense), (ii) αντινοηματικά (antisense), (iii) αμφίδρομα (bidirectional), (iv) ιντρονικά (intronic) και (v) διαγονιδιακά (intergenic) (Mattick, 2009; Mercer, Dinger, & Mattick, 2009).

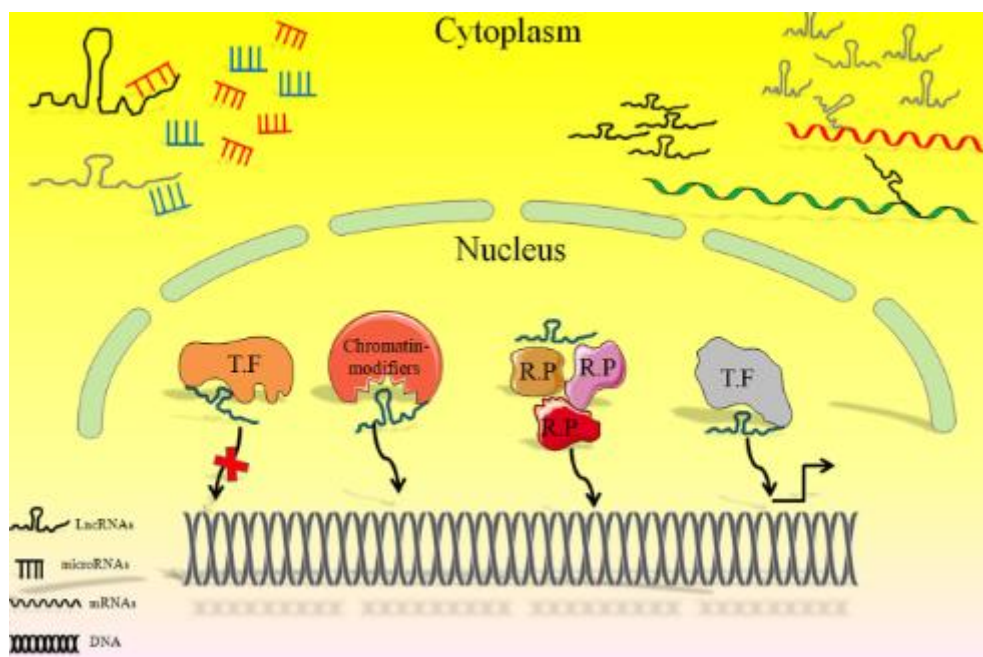
Τα lncRNAs, παρόλο που χαρακτηρίζονται ως mRNA-like μετάγραφα, δε διαθέτουν σταθερό και λειτουργικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, συνεπώς δεν κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες (Bhat et al., 2016). Όπως και τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα γονίδια lncRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (Ramskold, Wang, Burge, & Sandberg, 2009; Wu et al., 2008). Η πλειοψηφία των πρώιμων lncRNA μεταγράφων που προκύπτουν πολύ-αδενυλιώνεται στο 3' άκρο και δέχεται καλύπτρα από μεθυλ-γουανοσίνη στο 5' άκρο (Losko, Kotlinowski, & Jura, 2016). Στην πλειοψηφία τους τα γονίδια που κωδικοποιούν lncRNA εμπεριέχουν υποκινητές, διαθέτουν τους δικούς τους μεταγραφικούς παράγοντες και μοναδικά ρυθμιστικά μοτίβα DNA (Dempsey & Cui, 2017).

1.4.1 Λειτουργίες και ιδιαιτερότητες των μη κωδικοποιητικών RNA

Το μήκος των lncRNAs επιτρέπει το σχηματισμό περίπλοκων δευτεροταγών και τριτοταγών δομών, οι οποίες μπορεί να έχουν συγκεκριμένους ρόλους σε κυτταρικές λειτουργίες (Schmitt & Chang, 2016). Επιπρόσθετα, τα lncRNAs επιτελούν τόσο *cis*- όσο και *trans*-ρυθμιστικές λειτουργίες (Fattahi et al., 2020). Όσον αφορά την *trans* ρύθμιση, τα lncRNAs συμπλέκονται με μεταγραφικούς παράγοντες και μέσω της RNA πολυμεράσης II ασκούν επίδραση σε γονίδια που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ενώ στη *cis* ρύθμιση επάγουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης για γονίδια που εντοπίζονται στο ίδιο χρωμόσωμα (X. Shi, Sun, Liu, Yao, & Song, 2013).

Τα lncRNAs δρουν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και η λειτουργία τους σχετίζεται με την κυτταρική θέση τους (Fattahi et al., 2020). Τα πυρηνικά lncRNAs δρουν ως ρυθμιστές χρωματίνης, ως μεταγραφικοί ρυθμιστές και

ως μετα-μεταγραφικοί επεξεργαστές της ωρίμανσης και του ματίσματος του RNA, ενώ τα κυτταροπλασματικά lncRNAs συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση και έχουν μια ρυθμιστική επίδραση στη σταθερότητα και μετάφραση του mRNA (Schmitt & Chang, 2016).



Εικόνα 6: Οι λειτουργίες των lncRNAs στη γονιδιακή ρύθμιση. Στο κυτταρόπλασμα τα lncRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω της πρόσδεσης σε miRNAs, όπως επίσης και μετα-μεταγραφικά γεγονότα όπως το μάτισμα, τη μετάφραση του mRNA και την αποικοδόμηση του mRNA. Στον πυρήνα, τα lncRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω της ρύθμισης της λειτουργίας μεταγραφικών παραγόντων, είτε οδηγώντας τροποποιητές χρωματίνης στα γονίδια-στόχους, είτε τέλος μέσω ρυθμιστικών πρωτεϊνών, λειτουργώντας ως ικρίωμα για την πρόσδεσή τους. lncRNAs: long non-coding RNAs; miRNAs: microRNAs; mRNA: messenger RNA; TF: Transcription Factor; RP: Regulatory Protein (Fattahi et al., 2020).

1.4.2 Τα lncRNAs στον καρκίνο

Τα lncRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες αλληλεπιδρώντας με DNA, RNA και άλλα μεταγραφικά μόρια (Dhanoo, Sethi, Verma, Arora, & Mukhopadhyay, 2018). Έχει βρεθεί ότι η έκφραση και οι λειτουργίες των lncRNAs είναι στενά συνδεδεμένες με την ύπαρξη ασθενειών στον άνθρωπο (X. Zhang, Hong, Chen, Xu, & Wang, 2019). Σε αυτές τις ασθένειες συμπεριλαμβάνεται και ο καρκίνος, καθώς τα lncRNAs συμμετέχουν σε πολλά από τα χαρακτηριστικά καρκινικά στάδια, όπως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, η αποφυγή του κυτταρικού θανάτου και η μετάσταση (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Η δράση των lncRNAs μπορεί να είναι άμεση, όπου μπορούν να δρουν είτε ως ογκογονίδια είτε ως ογκο-κατασταλτικά γονίδια, είτε έμμεση, μέσω της αλληλεπίδρασης με γνωστά ογκο-επαγωγικά και ογκο-κατασταλτικά γονίδια, όπως τα MYC και p53 (Barsyte-Lovejoy et al., 2006; Huarte et al., 2010).

Συγκεκριμένα, τα lncRNAs έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση πολλών τύπων καρκίνου, καθώς εμπλέκονται στην ογκογένεση (Do & Kim, 2018), στην αναστολή του

κυτταρικού κύκλου (Kitagawa, Kitagawa, Kotake, Niida, & Ohhata, 2013), στην απόπτωση (J. Li, Tian, Yang, & Gong, 2016), στην επιθηλιακή σε μεσεγγυματική μετάβαση (EMT)(Gugnoni & Ciarrocchi, 2019), στη μετάσταση (Shen, Qi, & Du, 2015), στην κυτταρική μετανάστευση (Dhamija & Diederichs, 2016) και την κυτταρική διήθηση (Fattahi et al., 2020). Όσον αφορά τον καρκίνο του στομάχου, τα lncRNAs εμπλέκονται στους μηχανισμούς ανάπτυξης του καρκίνου μέσω άμεσης προώθησης ή καταστολής της κυτταρικής ανάπτυξης και διήθησης, είτε μέσω ρύθμισης ογκογονιδίων και ογκο-κατασταλτικών γονιδίων (Cheng et al., 2019; Fang, Pan, Leng, & Ye, 2015; Tsoi et al., 2015; Z. Yang, Guo, Li, Shi, & Li, 2016).

1.4.3 Τα lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες

Τα lncRNAs εμφανίζουν πολύ καλές προοπτικές ως διαγνωστικοί βιοδείκτες καθώς παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ειδικότητας σε ιστούς και κύτταρα και είναι ανιχνεύσιμα στα υγρά του σώματος, π.χ. στο αίμα, στα ούρα και στο σάλιο (Fattahi et al., 2020). Το γεγονός ότι τα περισσότερα lncRNAs απορρυθμίζονται στον καρκίνο και επιδεικνύουν ιστο-ειδικότητα και καρκινο-ειδικότητα τα καθιστούν ιδανικά για τη διάγνωση του καρκίνου (Chandra Gupta & Nandan Tripathi, 2017). Η απορρύθμιση των lncRNAs στους πρωτεύοντες καρκινικούς ιστούς αντικατοπτρίζεται στα βιολογικά υγρά, γεγονός το οποίο υποδεικνύει τη δυνατότητα να αναπτυχθούν αποτελεσματικοί βιοδείκτες βασιζόμενοι σε lncRNAs, ελάχιστα παρεμβατικοί και ανεκτοί από τους ασθενείς, συγκρινόμενοι με τις παρεμβατικές βιοψίες (Silva, Bullock, & Calin, 2015).

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματά τους όσον αφορά τη διάγνωση του καρκίνου βρίσκεται και η υψηλή σταθερότητα κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας στο ανθρώπινο σώμα, ιδίως όταν εμπεριέχονται σε εξωσώματα και αποπτωτικά σωματίδια (Akers, Gonda, Kim, Carter, & Chen, 2013). Η ανίχνευση των lncRNAs που σχετίζονται με καρκίνο στα βιολογικά υγρά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση του καρκίνου, διαχωρίζοντας τους ασθενείς από τους υγιείς στα αρχικά του στάδια, με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία (Bolha, Ravnik-Glavač, & Glavač, 2017). Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να αξιολογηθεί και η πρόγνωση των ασθενών, καθώς επίσης και ο κίνδυνος μετάστασης και επανεμφάνισης, μαζί με την επιτυχία της θεραπείας (T. Shi, Gao, & Cao, 2016).

Όσον αφορά τον καρκίνο του στομάχου, επειδή η πλειοψηφία των ασθενών διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικών και μη επεμβατικού τύπου μοριακών βιοδεικτών για τα αρχικά στάδια της νόσου (Tan et al., 2020). Η έκφραση και η λειτουργία των lncRNAs μεταβάλλεται στα διαφορετικά στάδια του γαστρικού καρκίνου, συνεπώς στα αρχικά στάδια της νόσου όπου αυτή δεν μπορεί να διαγνωστεί με τις συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους, τα επίπεδα των lncRNAs θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα για το διαχωρισμό των ασθενών από τα υγιή άτομα (J. Wang et al., 2016).

Συνοψίζοντας, συγκρινόμενοι με τους κλασικούς καρκινικούς βιοδείκτες, τα lncRNAs διαθέτουν τα παρακάτω πλεονεκτήματα: (i) εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα, (ii) ο έλεγχος για τα lncRNAs είναι εύκολος και μη παρεμβατικός και (iii) τα lncRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες ανεξάρτητα, σε συνδυασμό με άλλα lncRNAs ή ως ένα συμπλήρωμα στους κλασικούς βιοδείκτες (Tan et al., 2020).

1.4.4 Θεραπευτικές προοπτικές των lncRNAs στον καρκίνο

Παράλληλα με τη χρήση τους στη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου, τα lncRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως θεραπευτικοί στόχοι (Qi & Du, 2013), καθώς η ιστο-ειδική και καρκινο-ειδική έκφρασή τους και η ικανότητα να ελέγχουν το μικροπεριβάλλον του όγκου τα καθιστούν πολύ σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους (Tan et al., 2020). Στο πλαίσιο αυτό, ο χειρισμός των επιπέδων των lncRNAs ή/και της λειτουργίας τους στα καρκινικά κύτταρα παρέχει μια νέα στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου (G. Yang, Lu, & Yuan, 2014).

Συγκριτικά με τους γνωστούς πρωτεϊνικούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών παραγόντων, οι lncRNA στόχοι εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, το γεγονός ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις που προκαλούνται από τα lncRNAs στον καρκίνο εντοπίζονται σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές, παρέχει τη δυνατότητα ειδικής στόχευσης των τροποποιήσεων αυτών (G. Yang et al., 2014). Μια τέτοιου είδους προσέγγιση μειώνει τις παρενέργειες της θεραπείας, και θα μπορούσε ακόμα να είναι χρήσιμη για την πρόληψη του καρκίνου (Huang, Ernberg, & Kauffman, 2009; Moskalev, Schubert, & Hoheisel, 2012). Επιπλέον, ένα ακόμα πλεονέκτημα της στόχευσης των lncRNAs είναι ότι η λειτουργική αφαίρεση ενός lncRNA με ρυθμιστική λειτουργία μπορεί να έχει ποικίλα αποτελέσματα, οδηγώντας σε ταυτόχρονη βλάβη σε πολλαπλά μονοπάτια που σχετίζονται με τους όγκους (Tan et al., 2020).

Η θεραπευτική στόχευση των lncRNAs αποτελεί μια καινοτόμο προσέγγιση στη θεραπεία πολλών ειδών καρκίνου, όπως και του καρκίνου του στομάχου (Tan et al., 2020). Τα lncRNAs μπορούν να στοχευθούν μέσω της εφαρμογής των μικρών παρεμβαλλόμενων RNA (siRNAs) (T. P. Xu et al., 2015; F. Yang et al., 2012), μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 για επεξεργασία του γονιδιώματος (Ho et al., 2015; Liu et al., 2018; Zhen et al., 2017) και μέσω της χρήσης μιας ρυθμιστικής περιοχής των lncRNAs σε ανασυνδυασμένα πλασμίδια (Smaldone & Davies, 2010; T. P. Xu et al., 2014; F. Yang et al., 2012). Παρόλο που η χρήση των lncRNAs ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες είναι σχετικά ευκολότερη και μη παρεμβατική για τους ασθενείς, οι θεραπευτικές εφαρμογές των lncRNAs απαιτούν πιο εντατική και δυναμική έρευνα όσον αφορά τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, τη μείωση των παρενεργειών, τη σταθερότητα και την ασφάλεια της θεραπείας (Fattahi et al., 2020).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση lncRNA στόχων που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό σύμπλοκο των παραγόντων CDX2 και HNF4a στον καρκίνο του στομάχου, τόσο με βιοπληροφορικές όσο και με πειραματικές προσεγγίσεις, για την εύρεση νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών βιοδεικτών γαστρικού καρκίνου. Όσον αφορά τη βιοπληροφορική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα τόσο από αλληλούχηση RNA (RNA sequencing), όσο και από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP sequencing), προκειμένου να βρεθούν lncRNAs που ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a. Όσον αφορά την πειραματική προσέγγιση, πραγματοποιήθηκαν qPCRs για τον έλεγχο της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, όπως επίσης και qPCRs για τον έλεγχο της έκφρασης των 2 lncRNAs, cRENA 1 & cRENA 2, που βρέθηκαν ότι ρυθμίζονται από τον CDX2.

2.Υλικά και Μεθοδολογία

2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

2.1.1 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA (RNA sequencing)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 & HNF4a. Συγκεκριμένα, τα δεδομένα αλληλούχησης για το μεταγραφικό παράγοντα CDX2 αφορούσαν στην υπερέκφραση και καταστολή του στην κυτταρική σειρά MKN45. Όσον αφορά το μεταγραφικό παράγοντα HNF4a, τα δεδομένα αλληλούχησης RNA αφορούσαν την υπερέκφρασή του στην κυτταρική σειρά HFE145 και την καταστολή του στην κυτταρική σειρά YCC3.

Τα δεδομένα αλληλούχησης RNA αναλύθηκαν μέσω της γλώσσας προγραμματισμού R, όπου πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και κατασκευάστηκαν οι θερμικοί χάρτες (heatmaps) και τα διαγράμματα volcano (volcano plots) για κάθε μία περίπτωση. Για την κατασκευή των διαγραμμάτων volcano χρησιμοποιήθηκε το πακέτο DESeq2, το οποίο αποτελεί ένα πακέτο ανάλυσης της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης που βασίζεται στην αρνητική διωνυμική κατανομή. Με βάση τους θερμικούς χάρτες που προέκυψαν από την R, βρέθηκαν τα προφίλ διαφορικής γονιδιακής έκφρασης σε κάθε μία περίπτωση υπερέκφρασης και καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων. Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από το DESeq2 προέκυψαν τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια σε κάθε μία περίπτωση, όπου λήφθηκαν υπ' όψη τα γονίδια που είχαν $p\text{-value} < 0,05$ και $\text{fold change} > 2$ (αυξορρυθμιζόμενα γονίδια) ή $\text{fold change} < -2$ (μειορρυθμιζόμενα γονίδια).

2.1.2 Ανάλυση οντολογίας

Την εύρεση των στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων ακολούθησε η ανάλυση οντολογίας στο GENECODIS, το οποίο αποτελεί ένα διαδικτυακό εργαλείο για την εύρεση σημαντικών annotations σε λίστες γονιδίων (<https://genecodis.genyo.es/>). Επιπλέον, αναζητήθηκαν και τα KEGG Pathways για τα συγκεκριμένα γονίδια, δηλαδή τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα προς ανάλυση γονίδια και σχετίζονται με γνωστές ασθένειες, όπως επίσης και τα Panther Pathways, που αποτελούν τα μοριακά μονοπάτια αλληλεπίδρασης των γονιδίων.

2.1.3 Ανάλυση δεδομένων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP sequencing)

Παράλληλα με την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης RNA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για το μεταγραφικό παράγοντα HNF4a. Τα δεδομένα ChIP sequencing προέρχονταν από 3 διαφορετικές κυτταρικές σειρές, KATOIII, NUGC4 και YCC3. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πακέτο bedtools intersect Bash, από όπου βρέθηκαν οι υποκινητές στους οποίους προσδένεται ο HNF4a στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παρούσα διπλωματική εργασία είχαν οι υποκινητές lncRNAs και ψευδογονιδίων στους οποίους προσδένεται ο HNF4a.

2.1.3 Κατασκευή διαγραμμάτων Venn

Προκειμένου να βρεθούν τα κοινά διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια και στους δύο μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά και οι κοινοί υποκινητές lncRNAs και ψευδογονιδίων στους οποίους προσδένεται ο HNF4a στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές, κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα Venn με το πακέτο Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

2.1.4 Αναζήτηση στη βάση δεδομένων GEPIA

Η βάση δεδομένων GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, <https://genecodis.genyo.es/>), η οποία αποτελεί μια βάση δεδομένων καρκινικών και φυσιολογικών προφίλ γονιδιακής έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του προφίλ έκφρασης επιλεγμένων lncRNAs.

2.2 Πειραματικό σκέλος

2.2.1 Απομόνωση RNA (RNA Extraction)

Πρωταρχικός στόχος των πειραμάτων αποτέλεσε η ανάλυση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Για το σκοπό αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ολικού RNA από 9 διαφορετικές κυτταρικές σειρές:

- HFE145: παρακαρκινικά φυσιολογικά γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (normal-like)
- AGS: γαστρικά επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα
- MKN45: κύτταρα αδενοκαρκινώματος γαστρικού επιθηλίου
- NUGC4: πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος
- KATOIII: κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος πλευρικής μετάστασης
- HCT116: καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου παχέος εντέρου
- HT29: κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου
- MCF7: κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού
- SKBR3: καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου μαστού

Για την απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων αρχικά προστέθηκαν 1000 μl τριζόλη στα κύτταρα, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και μεταφέρθηκαν σε πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl χλωροφόρμιο και έγινε ανάδευση σε vortex για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14000 rpm, 4° C. Μόλις ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση το υπερκείμενο που δημιουργήθηκε μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα erpendorf και προστέθηκε ίση ποσότητα ισοπροπανόλης. Κατόπιν ακολούθησε ανάδευση, επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 14000 rpm, 4° C. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500 μl παγωμένης αιθανόλης 70% στο ίζημα και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14000 rpm, 4° C. Ακολούθως, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και οι σωλήνες erpendorf παρέμειναν με ανοικτό το καπάκι για 10 - 15 λεπτά ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη και να παραμείνει μόνο το ίζημα. Στο τέλος προστέθηκαν 50 μl RNase free H₂O, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 65° C για 5 λεπτά, πραγματοποιήθηκε πολύ καλή ανάδευση στο vortex και αποθηκεύτηκαν στους -80° C για μελλοντική χρήση.

2.2.2 Χειρισμός με DNάση (DNase treatment)

Έπειτα από την απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων ακολούθησε καθαρισμός και αποικοδόμηση του γονιδιωματικού DNA με χρήση DNase I (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.3 Σύνθεση cDNA

Πριν την έναρξη της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων και αραίωσή τους με ddH₂O, όπου αυτό ήταν απαραίτητο, ώστε όλα τα δείγματα να περιέχουν 1 μg RNA σε τελική ποσότητα 10μl. Κατόπιν, σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση του ενζύμου MMLV (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Ακολούθησε επώαση στο υδατόλουτρο για 2 ώρες στους 37° C. Μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν 380 μl ddH₂O και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C.

2.2.4 Ποσοτική PCR (Quantitative PCR)

Για την ποσοτική PCR χρησιμοποιήθηκε το μείγμα 2x SYBRGREEN (KAPA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα DNA γνωστής συγκέντρωσης σε υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια ιδιοσύστατης έκφρασης GAPDH και RPLP1. Η συσκευή της PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν της BioRad και το πρόγραμμα σχεδιασμού της αντίδρασης και ανάλυσης των αποτελεσμάτων ήταν το CFX Manager (BioRad).

2.2.5 Απομόνωση πρωτεϊνών και μέθοδος Bradford

1 ml ευκαρυωτικής κυτταροκαλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στις 3000 rpm, 4° C. Έπειτα απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 μl RIPA (10 mM Tris-Cl /pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 140 mM NaCl) και ακολούθησε ανάδευση έως ότου να διαλυθεί το ίζημα.

Μετά την απομόνωση των πρωτεϊνών από το προηγούμενο βήμα ακολούθησε η ανάμειξη 800 μl αντιδραστήριου Bradford με 1 μl δείγματος διαλυμένου σε RIPA και προστέθηκαν 100 μl ddH₂O. Μόλις προστέθηκαν το αντιδραστήριο Bradford και το ddH₂O ακολούθησε η ανάδευση για 1 λεπτό στο vortex και στη συνέχεια τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος λ = 595 nm. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σχετική κανονικοποίηση των δειγμάτων και προστέθηκε μια ποσότητα RIPA έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν παρόμοια τιμή απορρόφησης, και συνεπώς παρόμοια συγκέντρωση. Τέλος, προστέθηκε SDS Loading Buffer 2x, σε αναλογία 1:1 με το RIPA που είχε ήδη προστεθεί και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C για μελλοντική χρήση σε Western Blot.

2.2.6 Western Blot

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η συναρμολόγηση της συσκευής και η παρασκευή των gel της ηλεκτροφόρησης με μείγμα ακρυλαμίδης 40% (Bradford) σύμφωνα με τους πίνακες.

Πίνακας 1: Συστατικά του πηκτώματος διαχωρισμού 10% (resolving gel).

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
ddH ₂ O	2,325 ml
40% acrylamide mix	1,275 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml
10% SDS	0,05 ml
10% Ammonium persulfate	0,05 ml
TEMED	0,002 ml

Πίνακας 2: Συστατικά του πηκτώματος στοίβαξης 5% (stacking gel).

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
ddH ₂ O	1,4875 ml
40% acrylamide mix	0,2475 ml
1,0 M Tris pH 6,8	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
10% Ammonium persulfate	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

Αφού ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, που περιείχε το ρυθμιστικό διάλυμα Running buffer, η σύσταση του οποίου είναι: 100 ml Running buffer 10x, 10 ml SDS 10% και 890 ml ddH₂O. Ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων, η οποία περιλάμβανε τη θέρμανσή τους για 5 λεπτά στους 95° C. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 70 - 75 Volt μέχρι τα δείγματα να περάσουν στο resolving gel, όπου η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100 Volt, έως ότου η χρωστική απομακρύνθηκε από το gel. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αφαιρέθηκε το gel από τη συσκευή και απορρίφθηκε το stacking gel.

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η μεταφορά του gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αρχικά παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Transfer buffer, το οποίο περιείχε 100 ml Running buffer 10x χωρίς SDS, 200 ml MeOH και 700ml ddH₂O. Η συσκευή μεταφοράς συνδέθηκε με συσκευή ηλεκτροφοδοσίας και εφαρμόστηκε τάση 110 Volt για 90 λεπτά, κατά τη διάρκεια των οποίων παρέμειναν μέσα σε πάγο.

Μετά το πέρας της μεταφοράς πραγματοποιήθηκε το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στη μεμβράνη, μέσω της επώασης σε 5 ml διαλύματος TBST 5%. Το παραπάνω διάλυμα περιείχε 100 ml TBST και 5 gr αποβουτυρωμένο γάλα. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η επώαση για 1 ώρα με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είχε αραιώση 1:1000, και ακολούθησαν 4 διαδοχικές πλύσεις με TBST. Στη συνέχεια έγινε η επώαση και με το δευτερογενές αντίσωμα και ακολούθησαν 4 διαδοχικές πλύσεις με TBST.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση του φιλμ σε σκοτεινό δωμάτιο, η οποία περιλάμβανε τη διαδοχική εμφύσηση του φιλμ σε δοχεία που περιείχαν το υγρό ανάπτυξης, το υγρό στερέωσης και νερό, αφού είχε προηγηθεί η προσθήκη των δύο αντιδραστηρίων του υποστρώματος χημειοφωτάγειας ECL. Σε ορισμένες από τις πειραματικές δοκιμασίες Western blot που πραγματοποιήθηκαν, αντί για εμφάνιση της μεμβράνης σε σκοτεινό δωμάτιο με τη χρήση αντιδραστηρίων, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή AMERSHAM ImageQuant 800.

antisense oligos και 96 μl Annealing Buffer 10x, και επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 95° C. Κατόπιν, τα ενθέματα αφέθηκαν να κρυώσουν και μόλις η θερμοκρασία έφτασε στους 30° C ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης, δηλαδή η αντίδραση της ενσωμάτωσης των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα. Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ολονύκτια επώαση στους 16° C. Τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Αντίδραση λιγάσης.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Ένθεμα	4 μl
Buffer T4 10x (NEB)	2 μl
T4 DNA λιγάση (NEB)	1 μl
Πλασμιδιακός φορέας	2 μl
ddH ₂ O	11 μl
Τελικός όγκος	20 μl

Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η κλωνοποίηση των πλασμιδιακών φορέων που προέκυψαν από την αντίδραση της λιγάσης πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *E.coli* XL1Blue. Ακολούθησε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης και εκ νέου απομόνωση μόνο των θετικών κλώνων με kit. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Plasmid QuickPure Mini Prep kit της εταιρίας Macherey-Nagel.

Διαγνωστικές πέψεις

Για την εξακρίβωση της ύπαρξης θετικών πλασμιδιακών φορέων, και κατά συνέπεια της επιτυχημένης κλωνοποίησης των ενθεμάτων στους φορείς, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού XbaI/SlaI (Enzyquest) και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τα συστατικά της αντίδρασης της διαγνωστικής πέψης φαίνονται στον πίνακα 5. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες στους 37° C και έπειτα ακολούθησε η προσθήκη 10 μl loading dye (6x) για την ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 5: Αντίδραση διαγνωστικής πέψης.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	5 μl
Buffer EQ 10x (Enzyquest)	5 μl
XbaI ένζυμο (Enzyquest)	2 μl
SlaI ένζυμο (Enzyquest)	2 μl
ddH ₂ O	36 μl
Τελικός όγκος	50 μl

2.2.8 Αλληλούχηση

Τα δείγματα που προέκυψαν θετικά μετά από τις διαγνωστικές πέψεις και ηλεκτροφορήσεις στάλθηκαν για αλληλούχηση προκειμένου να διαπιστωθεί σε η ύπαρξη και η σωστή ενσωμάτωση του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα. Η αλληλούχηση κατά Sanger πραγματοποιήθηκε στην εταιρία CeMIA (<https://cemia.eu/>).

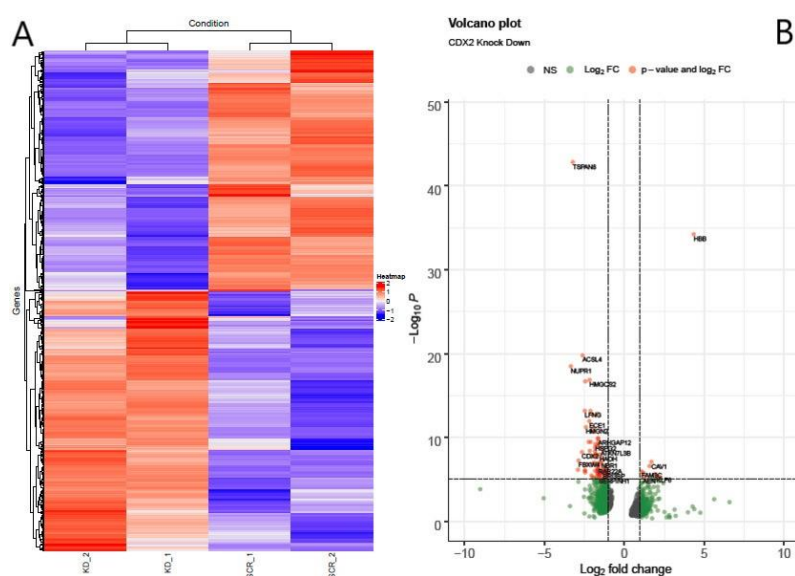
3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης

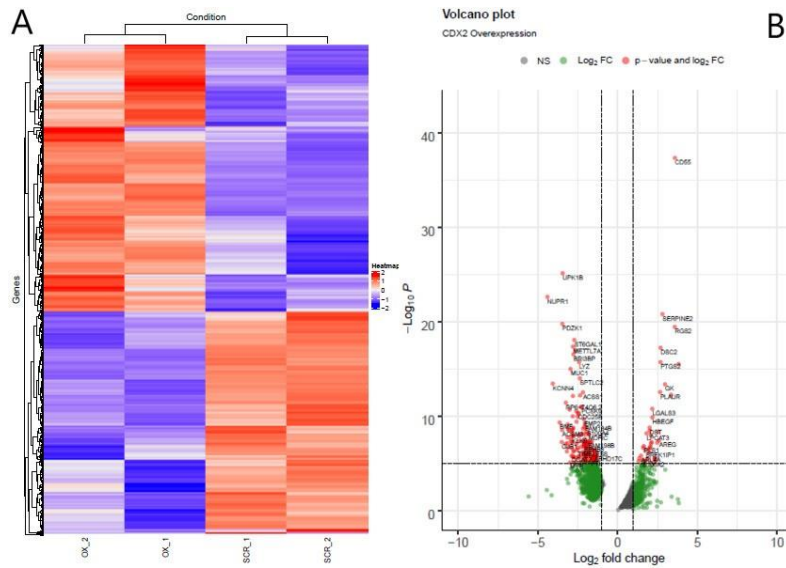
3.1.1 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA

Η βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπούσε στην εύρεση διαφορεικά εκφρασμένων lncRNA στόχων τα οποία ρυθμίζονται από το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α στον καρκίνο του στομάχου. Μέσω της ανάλυσης των δεδομένων αλληλούχησης RNA για την υπερέκφραση και καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχοι θερμικοί χάρτες και τα volcano plots για κάθε περίπτωση, τα οποία παρατίθενται παρακάτω.

Μεταγραφικός παράγοντας CDX2

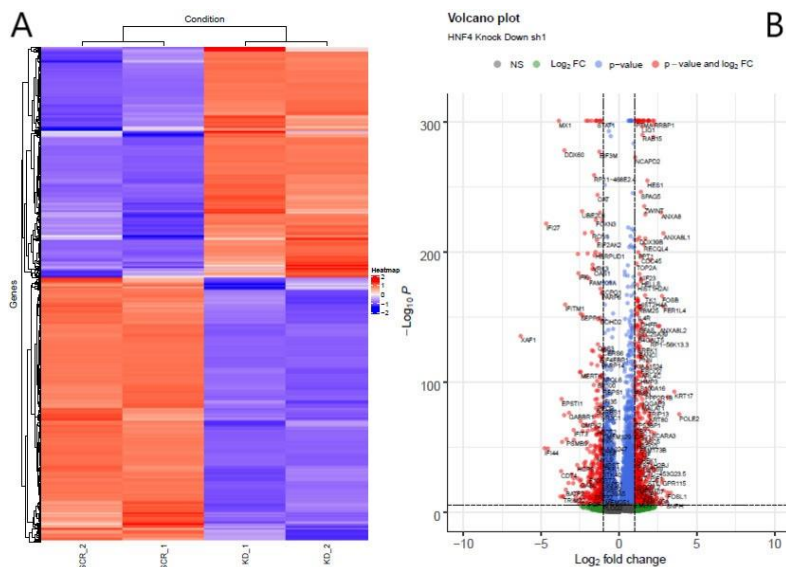


Διάγραμμα 1: (A) Θερμικός χάρτης των διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της καταστολής του CDX2. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, ενώ η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη συνθήκη του πειράματος, όπου KD είναι η καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα και SCR είναι τα control. Με κόκκινο αναπαρίστανται τα αυξορρυθμιζόμενα γονίδια, ενώ με μπλε τα μειορρυθμιζόμενα γονίδια. (B) Volcano plot των διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της καταστολής του CDX2. Στον άξονα x βρίσκεται ο δυαδικός λογάριθμος του αριθμού των φορών αύξησης ή μείωσης της έκφρασης (\log_2 fold change), ενώ στον άξονα y βρίσκεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του p-value ($-\log_{10}p$).



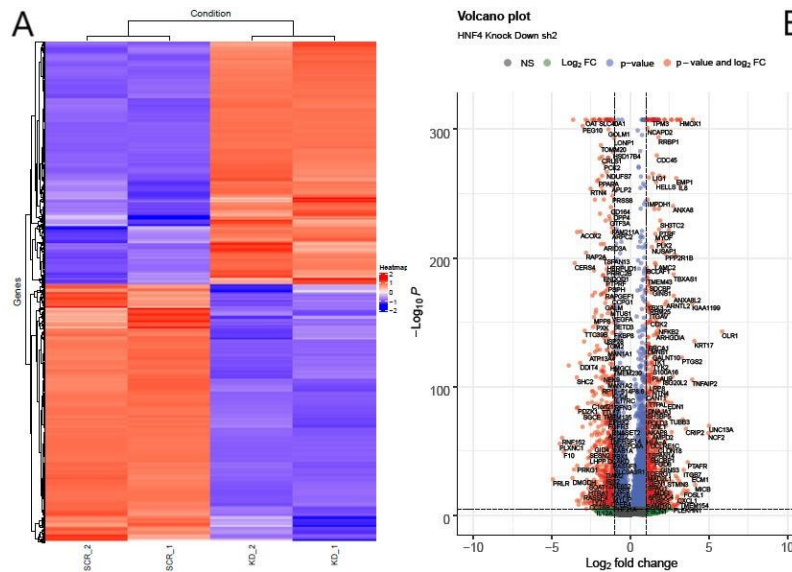
Διάγραμμα 2: (A) Θερμικός χάρτης των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της υπερέκφρασης του CDX2. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, ενώ η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη συνθήκη του πειράματος, όπου OX είναι η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα και SCR είναι τα control. Με κόκκινο αναπαρίστανται τα αυξορρυθμιζόμενα γονίδια, ενώ με μπλε τα μειορρυθμιζόμενα γονίδια. (B) Volcano plot των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της υπερέκφρασης του CDX2. Στον άξονα x βρίσκεται ο δυαδικός λογάριθμος του αριθμού των φορών αύξησης ή μείωσης της έκφρασης (\log_2 fold change), ενώ στον άξονα y βρίσκεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του p-value ($-\log_{10}p$).

Μεταγραφικός παράγοντας HNF4a

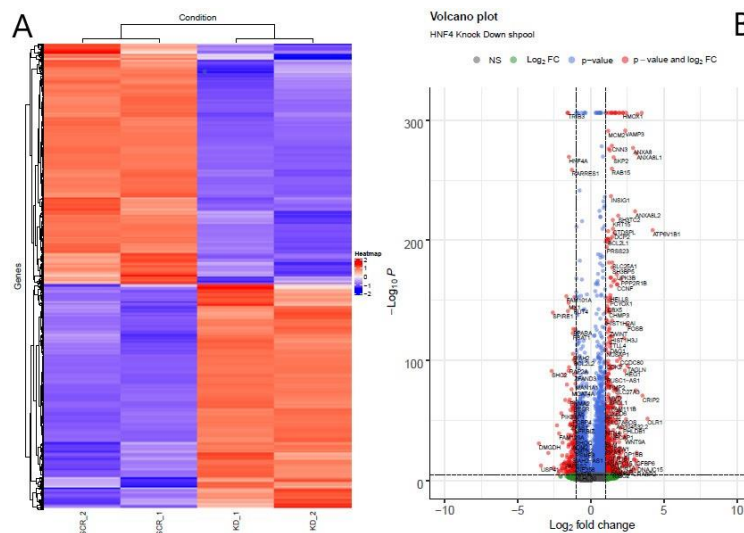


Διάγραμμα 3: (A) Θερμικός χάρτης των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της καταστολής του HNF4a (sh1). Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, ενώ η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη συνθήκη του πειράματος, όπου KD είναι η καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα και SCR είναι τα control. Με κόκκινο αναπαρίστανται τα αυξορρυθμιζόμενα γονίδια, ενώ με μπλε τα μειορρυθμιζόμενα γονίδια. (B) Volcano plot των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της

καταστολής του *HNF4a* (*sh1*). Στον άξονα χ βρίσκεται ο δυαδικός λογάριθμος του αριθμού των φορών αύξησης ή μείωσης της έκφρασης (\log_2 fold change), ενώ στον άξονα y βρίσκεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του *p*-value ($-\log_{10}p$).

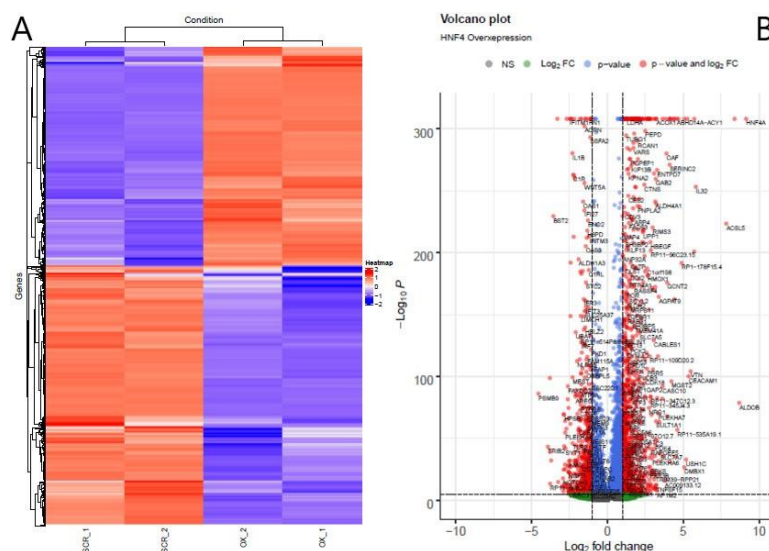


Διάγραμμα 4: (A) Θερμικός χάρτης των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της καταστολής του *HNF4a* (*sh2*). Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, ενώ η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη συνθήκη του πειράματος, όπου *KD* είναι η καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα και *SCR* είναι τα *control*. Με κόκκινο αναπαρίστανται τα αυξορρυθμιζόμενα γονίδια, ενώ με μπλε τα μειορρυθμιζόμενα γονίδια. (B) Volcano plot των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της καταστολής του *HNF4a* (*sh2*). Στον άξονα χ βρίσκεται ο δυαδικός λογάριθμος του αριθμού των φορών αύξησης ή μείωσης της έκφρασης (\log_2 fold change), ενώ στον άξονα y βρίσκεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του *p*-value ($-\log_{10}p$).



Διάγραμμα 5: (A) Θερμικός χάρτης των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της καταστολής του *HNF4a* (*shpool*). Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, ενώ η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη συνθήκη του πειράματος, όπου *KD* είναι η καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα και *SCR* είναι τα *control*. Με κόκκινο αναπαρίστανται τα αυξορρυθμιζόμενα γονίδια, ενώ με μπλε τα μειορρυθμιζόμενα

γονίδια. (B) Volcano plot των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της καταστολής του HNF4a (shpool). Στον άξονα x βρίσκεται ο δυαδικός λογάριθμος του αριθμού των φορών αύξησης ή μείωσης της έκφρασης (\log_2 fold change), ενώ στον άξονα y βρίσκεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του p-value ($-\log_{10}p$).



Διάγραμμα 6: (A) Θερμικός χάρτης των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της υπερέκφρασης του HNF4a. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, ενώ η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη συνθήκη του πειράματος, όπου OX είναι η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα και SCR είναι τα control. Με κόκκινο αναπαρίστανται τα αυξορρυθμιζόμενα γονίδια, ενώ με μπλε τα μειορρυθμιζόμενα γονίδια. (B) Volcano plot των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στην περίπτωση της υπερέκφρασης του HNF4a. Στον άξονα x βρίσκεται ο δυαδικός λογάριθμος του αριθμού των φορών αύξησης ή μείωσης της έκφρασης (\log_2 fold change), ενώ στον άξονα y βρίσκεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του p-value ($-\log_{10}p$).

Λόγω του ότι ο στόχος ήταν η εύρεση lncRNA στόχων που ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 & HNF4a, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα των παραπάνω volcano plots και βρέθηκαν τόσο τα στατιστικώς σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, όσο και ο αριθμός αυτών που αντιστοιχούν σε γονίδια lncRNAs. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον πίνακα 6.

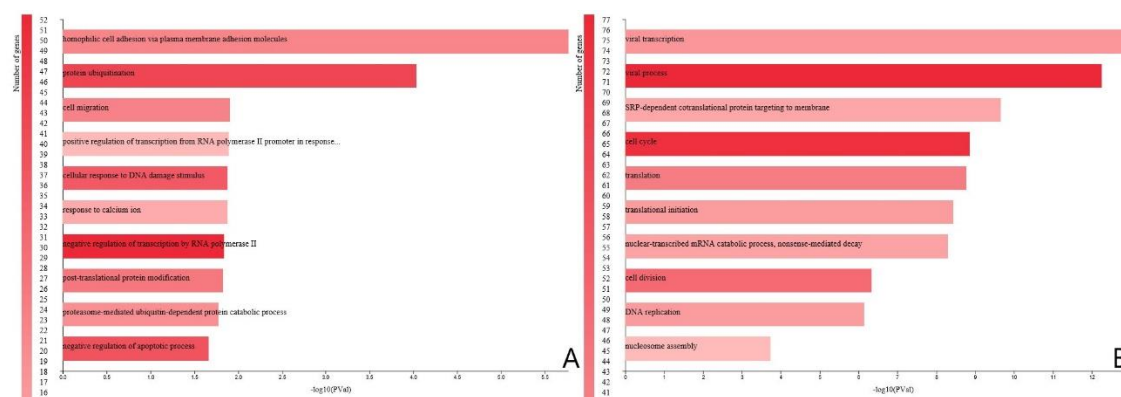
Πίνακας 6: Τα στατιστικώς σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 & HNF4a, μετά από καταστολή και υπερέκφρασή τους.

Περίπτωση	Γονίδια	lncRNAs
Καταστολή CDX2	1508	22
Υπερέκφραση CDX2	2367	38
Καταστολή HNF4a (sh1)	10871	653
Καταστολή HNF4a (sh2)	11225	693
Καταστολή HNF4a (shpool)	10227	593
Υπερέκφραση HNF4a	11216	659

3.1.2 Ανάλυση οντολογίας

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η εύρεση της λειτουργίας και των μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που απορρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς

παράγοντες CDX2 και HNF4α. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας για τα στατιστικώς σημαντικά απορρυθμιζόμενα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης οντολογίας παρουσιάζονται παρακάτω.



Διάγραμμα 7: Διαγράμματα ανάλυσης οντολογίας που παρουσιάζουν τη βιολογική λειτουργία (GO Biological Process) των γονιδίων που απορρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 (A) και HNF4α (B).

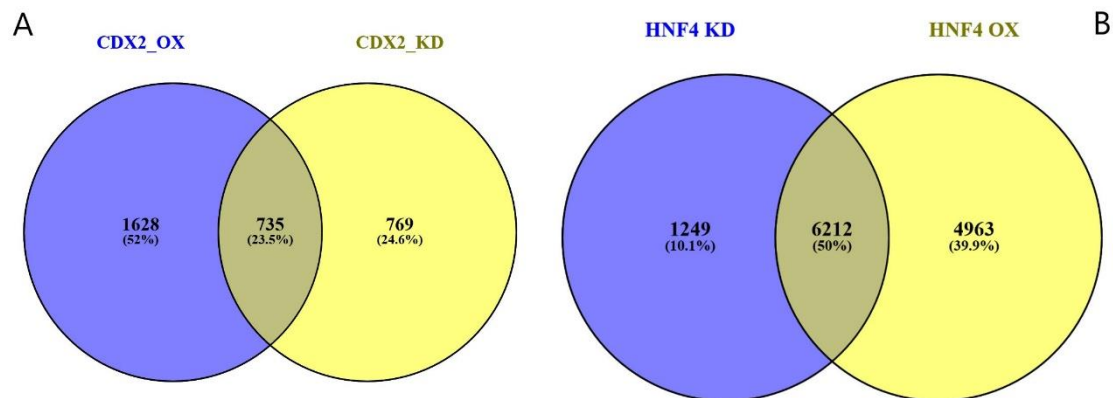
Από την ανάλυση οντολογίας προκύπτει ότι τα γονίδια που απορρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα CDX2 συμμετέχουν κυρίως στις διαδικασίες της ουβικουιτίνωσης των πρωτεϊνών, της κυτταρικής μετανάστευσης, της ρύθμισης της μεταγραφής από την RNA pol II και της ρύθμισης της απόπτωσης (διάγραμμα 7A). Όσον αφορά τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια και σχετίζονται με ασθένειες, αυτά αφορούν κυρίως μεταβολικά μονοπάτια και καρκινογένεση (διάγραμμα 21A). Τέλος, τα μονοπάτια Wnt, Cadherin και p53 αποτελούν τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια που απορρυθμίζονται από το CDX2 (διάγραμμα 22A).

Αντίστοιχα, ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α ρυθμίζει κυρίως γονίδια που εμπλέκονται στις βιολογικές διεργασίες του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής διαίρεσης και της αντιγραφής του DNA (διάγραμμα 7B). Όσον αφορά τα μονοπάτια που εμπλέκονται σε ασθένειες, τα γονίδια που απορρυθμίζονται από τον HNF4α συμμετέχουν κυρίως σε μεταβολικά μονοπάτια (διάγραμμα 21B), όπως επίσης και στα σηματοδοτικά μονοπάτια integrin, p53 και PDGF (διάγραμμα 22B).

3.1.3 Διαγράμματα Venn

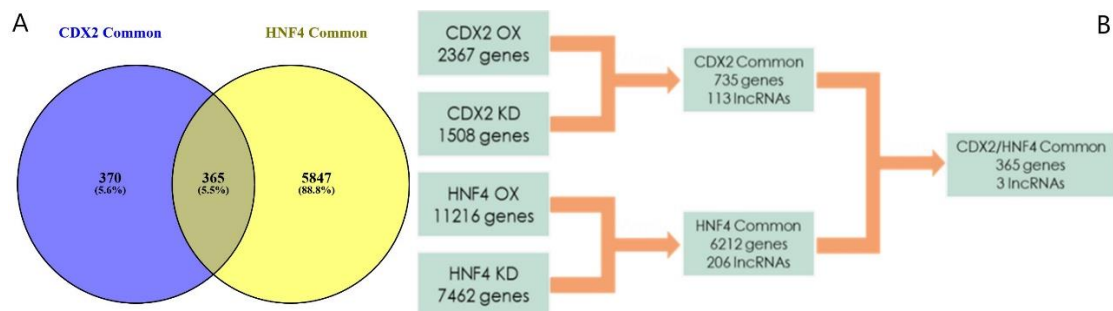
Προκειμένου να βρεθούν τα κοινά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στην περίπτωση των δύο μεταγραφικών παραγόντων ταυτόχρονα κατασκευάστηκαν διαγράμματα Venn, τα οποία παρατίθενται παρακάτω.

Δεδομένα αλληλούχησης RNA (RNA seq)



Διάγραμμα 8: Διαγράμματα Venn όπου φαίνονται τα κοινά διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια στην περίπτωση του CDX2 (A) και HNF4α (B).

Στην περίπτωση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α, λόγω του ότι στην καταστολή του υπήρχαν 3 διαφορετικές περιπτώσεις [sh1HNF4α, sh2HNF4α, shroo1HNF4α (διάγραμμα 23)] ήταν απαραίτητη η εύρεση των κοινών απορρυθμιζόμενων γονιδίων στις 3 αυτές περιπτώσεις, τα οποία ήταν 7462. Τα συγκεκριμένα γονίδια αντιπροσωπεύουν τα γονίδια στην καταστολή του HNF4α και χρησιμοποιήθηκαν στις μετέπειτα αναλύσεις.



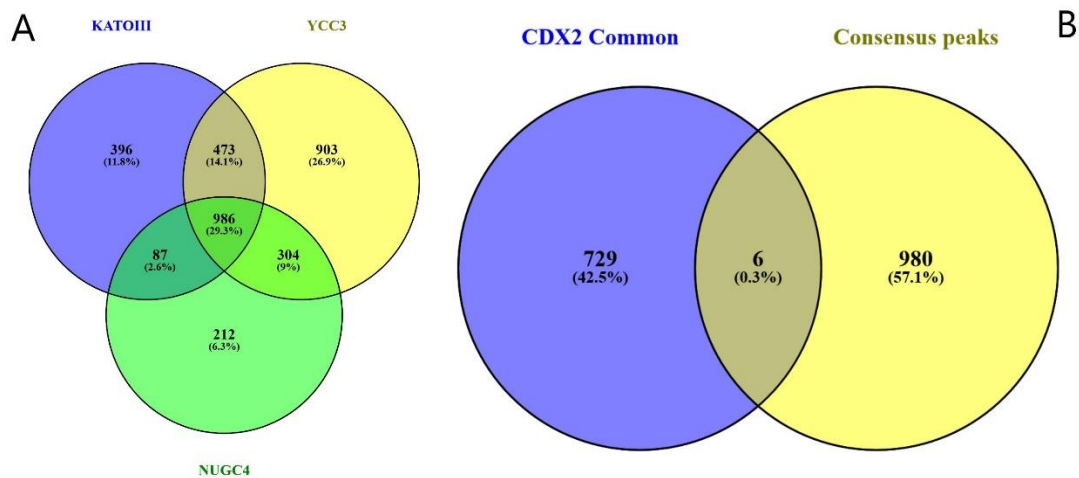
Διάγραμμα 9: (A) Διάγραμμα Venn όπου φαίνονται τα κοινά διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια στην περίπτωση των CDX2 & HNF4α. (B) Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε κατά την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης RNA (RNA sequencing) προκειμένου να βρεθούν τα κοινά απορρυθμιζόμενα γονίδια για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα ανάλυσης των δεδομένων αλληλούχησης RNA βρέθηκαν 735 και 6212 γονίδια τα οποία απορρυθμίζονται στην υπερέκφραση και την καταστολή του CDX2 και HNF4α αντίστοιχα (διάγραμμα 8). Συγκρίνοντας τα γονίδια αυτά βρέθηκαν 365 γονίδια τα οποία απορρυθμίζονται ταυτόχρονα και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες (διάγραμμα 9A). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στο διάγραμμα 9B.

Δεδομένα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP seq)

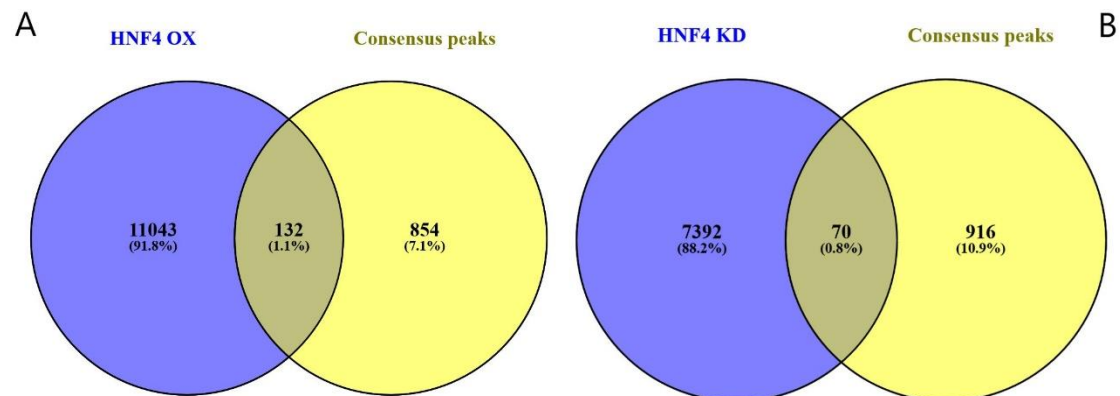
Από την ανάλυση των δεδομένων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στην περίπτωση του HNF4α, βρέθηκαν οι υποκινητές των γονιδίων στους οποίους προσδένεται ο HNF4α. Λόγω του ότι ο σκοπός ήταν η εύρεση lncRNA στόχων των

μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α, από την παραπάνω ανάλυση βρέθηκαν και αξιοποιήθηκαν μόνο οι υποκινητές γονιδίων lncRNA στους οποίους προσδένεται ο HNF4α.



Διάγραμμα 10: Διαγράμματα Venn στα οποία φαίνονται οι κοινές κορυφές (peaks) που αντικατοπτρίζουν τους υποκινητές γονιδίων lncRNA στους οποίους προσδένεται ο HNF4α στις 3 διαφορετικές κυτταρικές σειρές, KATOIII, YCC3 και NUGC4 (A), όπως και τα κοινά lncRNAs στους υποκινητές των οποίων προσδένεται ο HNF4α και απορρυθμίζονται από τον παράγοντα CDX2 (B).

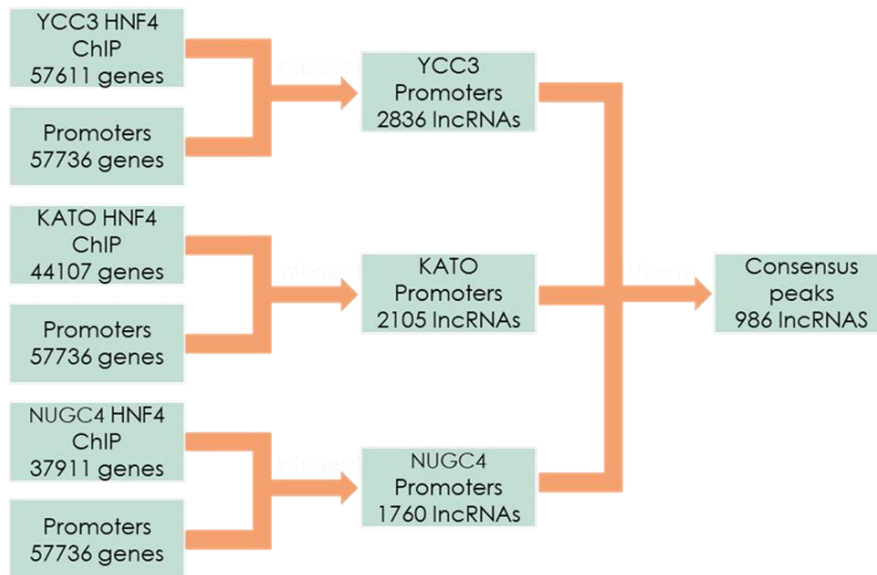
Αρχικά βρέθηκαν οι υποκινητές γονιδίων lncRNA στους οποίους προσδένεται ο HNF4α και στις 3 κυτταρικές σειρές (KATOIII, NUGC4, YCC3), οι οποίοι είναι 986 (διάγραμμα 10A). Στη συνέχεια, συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα της ανάλυσης RNA sequencing και ChIP sequencing δεδομένων, προκειμένου να βρεθούν τα lncRNA που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό σύμπλοκο των παραγόντων CDX2 & HNF4α.



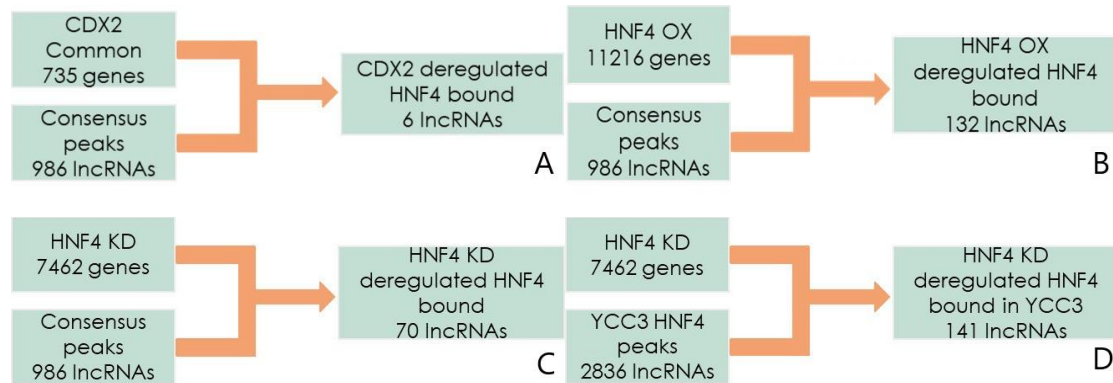
Διάγραμμα 11: Διαγράμματα Venn στα οποία φαίνονται τα lncRNAs στους υποκινητές των οποίων προσδένεται ο HNF4α και απορρυθμίζονται στην υπερέκφραση του HNF4α (A) και στην καταστολή του (B).

Συνοψίζοντας, βρέθηκαν 6 lncRNAs τα οποία απορρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα CDX2 και στους υποκινητές τους προσδένεται ο HNF4α (διάγραμμα 10B) και 132 lncRNAs τα οποία απορρυθμίζονται στην υπερέκφραση του HNF4α και στους υποκινητές τους προσδένεται ο HNF4α (διάγραμμα 11A). Στην περίπτωση της καταστολής του HNF4α μελετήθηκαν τόσο τα lncRNAs που

απορρυθμίζονται στην καταστολή του και στους υποκινητές των οποίων προσδένεται ο HNF4a και στις 3 κυτταρικές σειρές, όσο και στην κυτταρική σειρά YCC3 μεμονωμένα, καθώς η καταστολή του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα YCC3. Συνεπώς, βρέθηκαν 70 και 141 lncRNAs αντίστοιχα (διαγράμματα 11B & διάγραμμα 24). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στα διαγράμματα 12 και 13.



Διάγραμμα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε κατά την ανάλυση των δεδομένων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP sequencing) προκειμένου να βρεθούν οι υποκινητές lncRNA στους οποίους προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a στις κυτταρικές σειρές YCC3, KATOIII και NUGC4.

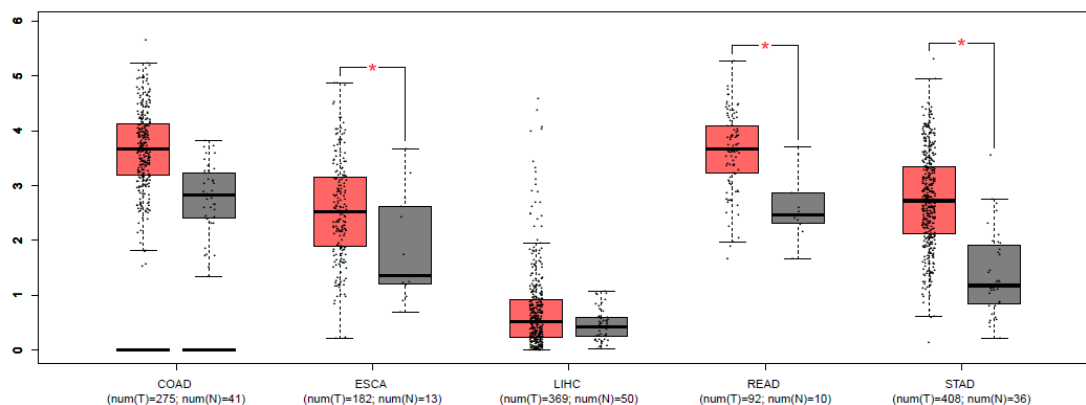


Διάγραμμα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε κατά τη συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης RNA και των δεδομένων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (RNA sequencing & ChIP sequencing) προκειμένου να βρεθούν τα lncRNAs στους υποκινητές των οποίων προσδένεται ο HNF4a και απορρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα CDX2 (A), από την υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a (B) και από την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a (C, D).

3.1.4 Βάση δεδομένων GEPIA

Με βάση την παραπάνω βιοπληροφορική ανάλυση επιλέχθηκαν 2 lncRNA στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a, τα οποία ονομάστηκαν cRENA 1 & 2 αντίστοιχα (CDX2 Regulated lncRNAs). Από την αναζήτηση των δύο αυτών lncRNAs στη βάση δεδομένων GEPIA σχετικά με την έκφρασή τους σε διαφορετικούς τύπους γαστρεντερικού καρκίνου προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

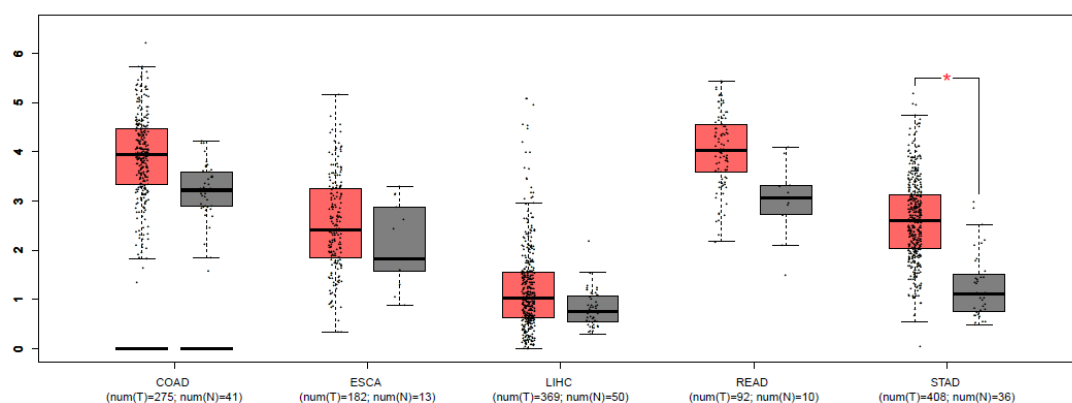
cRENA 1



Διάγραμμα 14: Διάγραμμα boxplot στο οποίο απεικονίζεται η έκφραση του cRENA 1 σε πέντε τύπους γαστρεντερικού καρκίνου. Με κόκκινο απεικονίζεται η έκφραση σε καρκινικούς ιστούς, ενώ με γκρι απεικονίζεται η έκφραση σε φυσιολογικούς παρακαρκινικούς ιστούς (TCGA normal). COAD = αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (colon adenocarcinoma), ESCA = καρκίνος του οισοφάγου (esophageal cancer), LIHC = ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (liver hepatocellular carcinoma), READ = αδενοκαρκίνωμα στο ορθό (rectum adenocarcinoma), STAD = γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (stomach adenocarcinoma).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων GEPIA, το lncRNA cRENA 1 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης σε 3 τύπους καρκίνου, στον καρκίνο του οισοφάγου, στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στο γαστρικό καρκίνο, σε σχέση με τους φυσιολογικούς παρακαρκινικούς ιστούς (διάγραμμα 14). Συγκεκριμένα, στο γαστρικό καρκίνο η αυξημένη έκφραση παρατηρείται ήδη από το αρχικό στάδιο του καρκίνου (stage I), και παραμένει αυξημένη έως και το τελικό στάδιο (stage IV; Διάγραμμα 25A). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη διαγνωστική σημαντικότητα του συγκεκριμένου lncRNA, καθώς η αυξημένη έκφρασή του παρατηρείται στα αρχικά καρκινικά στάδια και έτσι καθίσταται δυνατή η έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Όσον αφορά τη συσχέτιση της έκφρασης του cRENA 1 με την επιβίωση των ασθενών, από το διάγραμμα Kaplan - Meier φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση στην ολική επιβίωση (διάγραμμα 25B).

cRENA 2



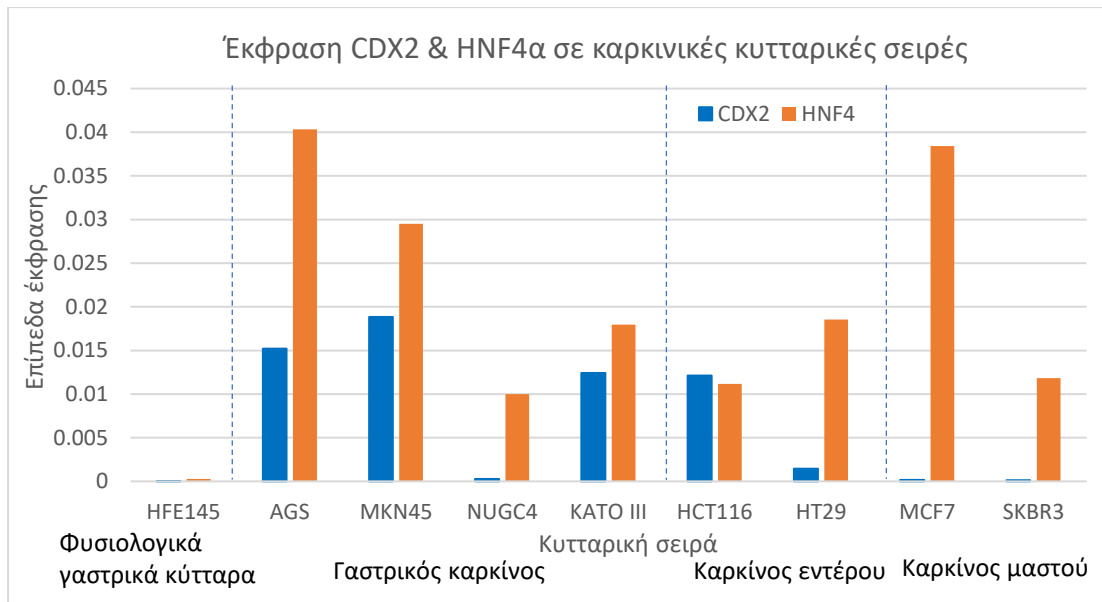
Διάγραμμα 15: Διάγραμμα boxplot στο οποίο απεικονίζεται η έκφραση του cRENA 2 σε πέντε τύπους γαστρεντερικού καρκίνου. Με κόκκινο απεικονίζεται η έκφραση σε καρκινικούς ιστούς, ενώ με γκρι απεικονίζεται η έκφραση σε φυσιολογικούς παρακαρκινικούς ιστούς (TCGA normal). COAD = αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (colon adenocarcinoma), ESCA = καρκίνος του οισοφάγου (esophageal cancer), LIHC = ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (liver hepatocellular carcinoma), READ = αδενοκαρκίνωμα στο ορθό (rectum adenocarcinoma), STAD = γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (stomach adenocarcinoma).

Παρόμοια αποτελέσματα με το cRENA 1 παρουσιάζει και το cRENA 2, καθώς παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου lncRNA στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου, σε σχέση με τους φυσιολογικούς παρακαρκινικούς ιστούς (διάγραμμα 15). Η αύξηση αυτή της έκφρασης ξεκινάει από τα αρχικά στάδια της νόσου, γεγονός που υποδεικνύει τη σημαντικότητα στη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου, όπως και στην περίπτωση του cRENA 1 (διάγραμμα 26A). Τέλος, στο διάγραμμα Kaplan - Meier δεν παρατηρείται συσχέτιση της επιβίωσης των ασθενών με την έκφραση του cRENA 2 (διάγραμμα 26B).

3.2 Πειραματικά αποτελέσματα

3.2.1 Έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4a σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Κύριο στόχο του πειραματικού σκέλους αποτέλεσε η σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a σε κυτταρικές σειρές, μέσω της κλωνοποίησης shRNAs σε πλασμιδιακούς φορείς και εισαγωγή των φορέων στα κύτταρα. Αυτό προϋποθέτει την εύρεση των κυτταρικών σειρών στις οποίες εκφράζονται υψηλά οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ποσοτικές PCR μετά από απομόνωση RNA από τις κυτταρικές σειρές και σύνθεση cDNA.

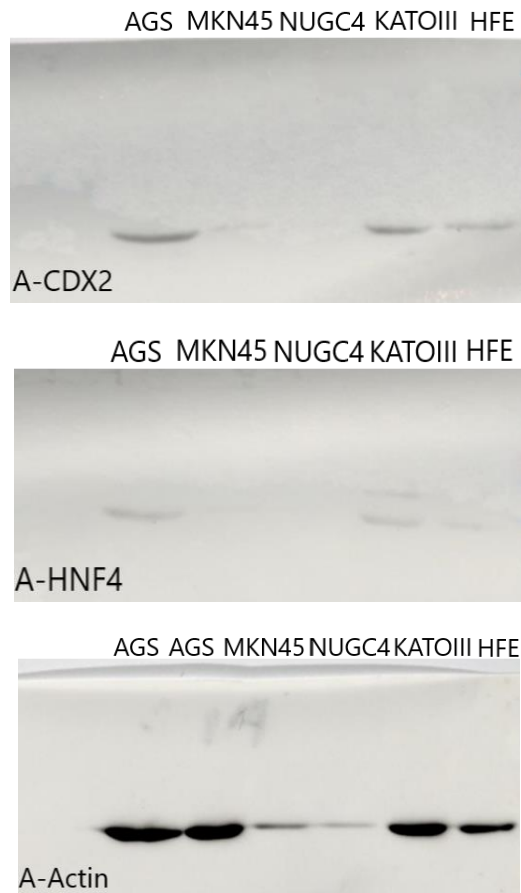


Διάγραμμα 16: Διάγραμμα έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η έκφραση είναι κανονικοποιημένη ως προς το γονίδιο ιδιοσύστατης έκφρασης GAPDH.

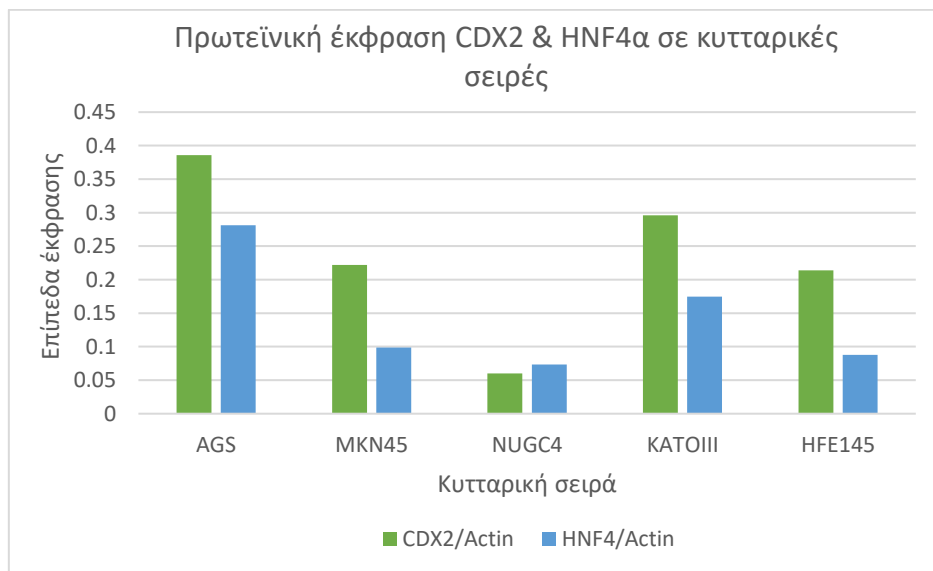
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4α εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα στην κυτταρική σειρά AGS, συγκριτικά με την κυτταρική σειρά φυσιολογικού στομάχου (HFE145). Η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε ως προς το γονίδιο ιδιοσύστατης έκφρασης GAPDH. Παρατηρείται επίσης ότι η έκφραση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων είναι χαμηλότερη στην περίπτωση του καρκίνου του εντέρου, ο οποίος αποτελεί ένα συγγενικό είδος καρκίνου, και ακόμη χαμηλότερη στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, ο οποίος αποτελεί έναν καρκίνο απομακρυσμένο από το γαστρεντερικό σύστημα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν τα κύτταρα AGS για την κλωνοποίηση των shRNA για τη σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α.

3.2.2 Πρωτεϊνική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α σε κυτταρικές σειρές

Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α ελέγχθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, πέρα από το επίπεδο mRNA. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν Western blot, στις οποίες ελέγχθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών CDX2 και HNF4α σε φυσιολογικά γαστρικά κύτταρα (HFE145), καθώς επίσης και σε κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου (AGS, MKN45, NUGC4, KATOIII). Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα των qPCRs για την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α, διότι βρέθηκε ότι η έκφρασή τους είναι υψηλότερη στην κυτταρική σειρά AGS σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές (εικόνα 8). Η υψηλότερη έκφραση στην κυτταρική σειρά AGS επιβεβαιώνεται και μετά την κανονικοποίηση της έκφρασης ως προς την ιδιοσύστατη πρωτεΐνη ακτίνη (διάγραμμα 17). Ωστόσο, όπως παρατηρείται στην έκφραση της ακτίνης, στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών MKN45 και NUGC4 δεν έγινε σωστή φόρτωση των δειγμάτων κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Για αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η επανάληψη της συγκεκριμένης διαδικασίας.



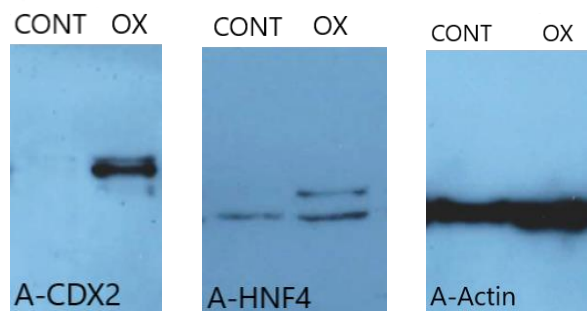
Εικόνα 8: Έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α και της πρωτεΐνης ιδιοσύστατης έκφρασης ακτίνης σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.



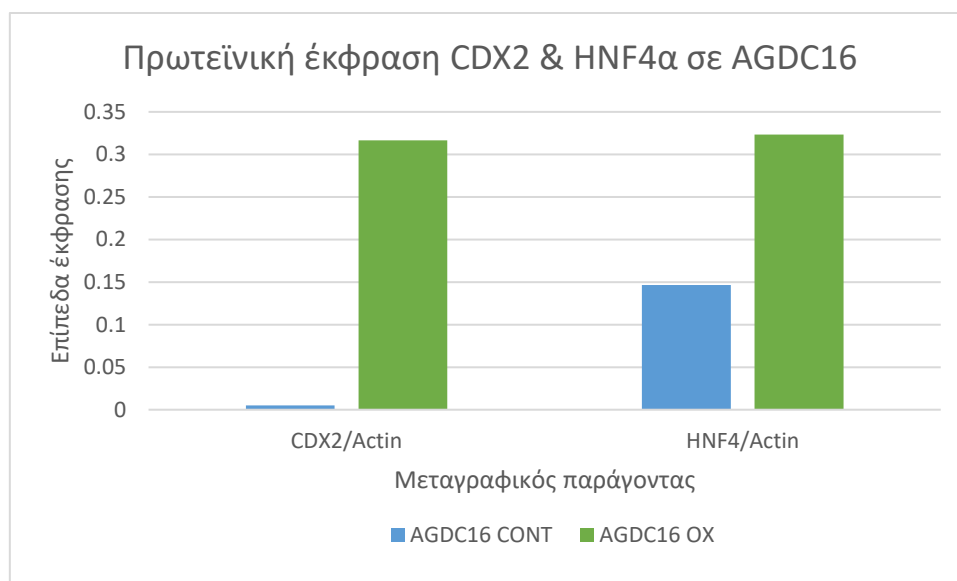
Διάγραμμα 17: Διάγραμμα κανονικοποιημένης πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α ως προς την πρωτεΐνη ακτίνη, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Με πράσινο απεικονίζεται η έκφραση του μεταγραφικού

παράγοντα CDX2, ενώ με μπλε απεικονίζεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη Western blot σε διαφορετική κυτταρική σειρά, στα κύτταρα AGDC16, η οποία αποτελεί μια κυτταρική σειρά AGS που έχει τροποποιηθεί με τη μέθοδο CRISPR/Cas9, προκειμένου να εκφράζει την πρωτεΐνη dCas. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα με υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 (OX), και κύτταρα control που δεν παρουσίαζαν υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 (CONT).



Εικόνα 9: Έκφραση των πρωτεϊνών CDX2 (αριστερά), HNF4α (μέση) και ακτίνης (δεξιά) στην κυτταρική σειρά AGDC16. CONT = control, OX = υπερέκφραση.

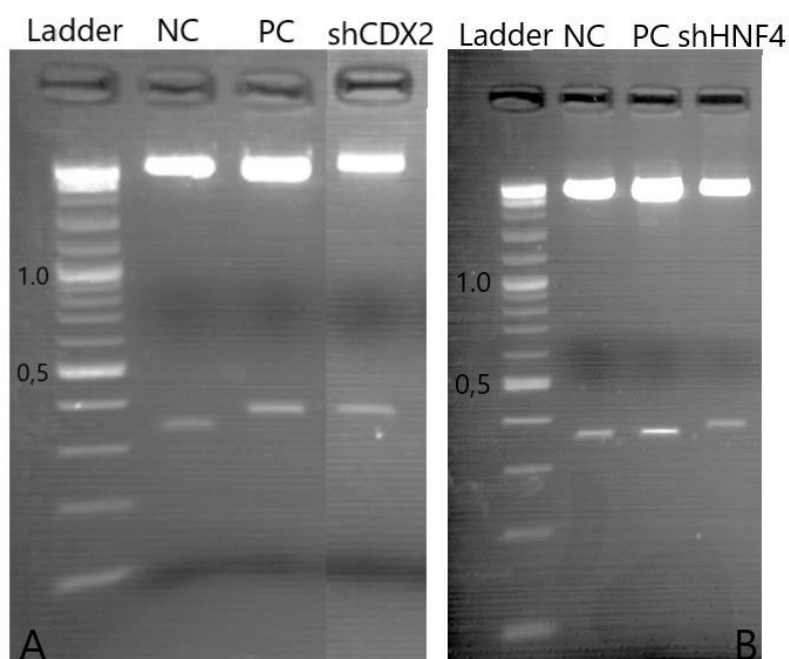


Διάγραμμα 18: Διάγραμμα κανονικοποιημένης πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 & HNF4α ως προς την πρωτεΐνη ακτίνη, στην κυτταρική σειρά AGDC16. CONT = control, OX = υπερέκφραση.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 στην κυτταρική σειρά AGDC16 συνεπάγεται αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α, σε σχέση με τα κύτταρα control. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη σημασία της κυτταρικής σειράς AGDC16 ως ένα εργαλείο υπερέκφρασης μεταγραφικών παραγόντων.

3.2.3 Κλωνοποίηση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pLB

Μετά την εξακρίβωση της υψηλής έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α στην κυτταρική σειρά AGS, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ακολούθησε η προσπάθεια κλωνοποίησης των shRNAs για τους δύο αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες σε πλασμίδια. Απώτερος σκοπός ήταν η εισαγωγή αυτών των πλασμιδίων στα κύτταρα AGS για την επίτευξη σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α, μέσω της παραγωγής siRNAs από τα πλασμίδια. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας χωρίς ένθεμα, ενώ ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ένας συγγενικός πλασμιδιακός φορέας με ενσωματωμένο το shRNA CDX2.

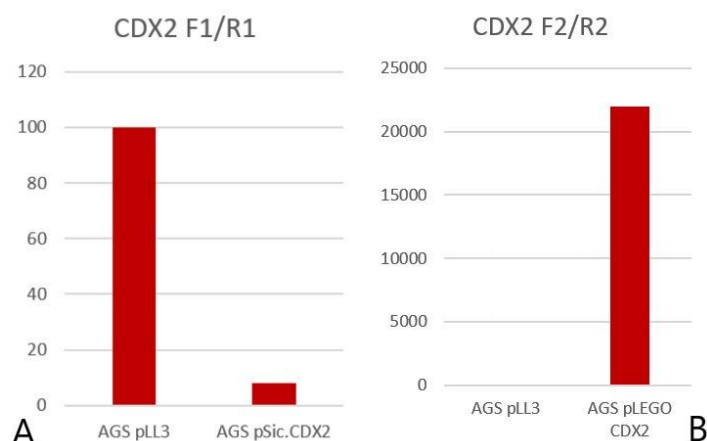


Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής πέψης μετά από την κλωνοποίηση των shRNAs CDX2 (A) & HNF4α (B) στον πλασμιδιακό φορέα pLB. NC: αρνητικό control, PC: θετικό control.

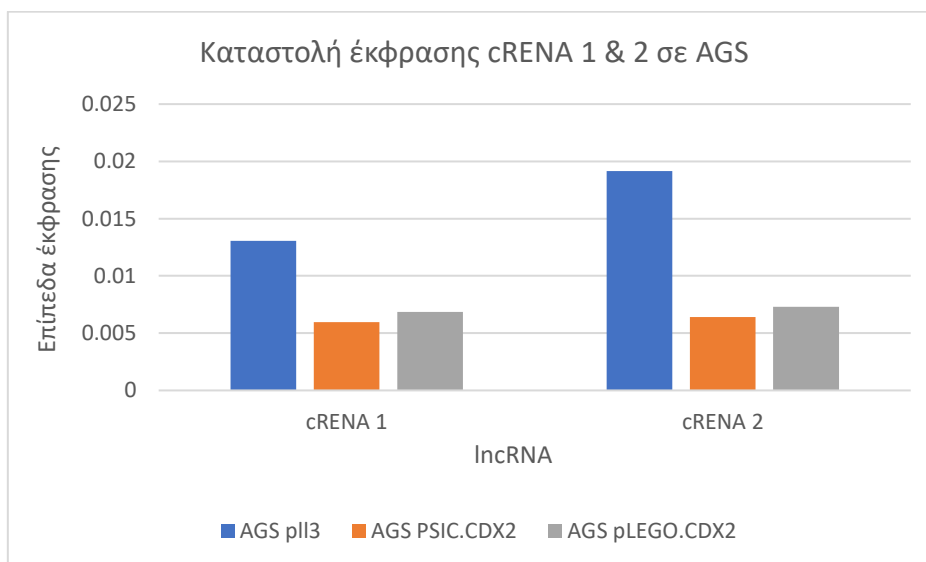
Όπως φαίνεται στην εικόνα 10, τόσο την περίπτωση του CDX2 όσο και στην περίπτωση του HNF4α βρέθηκε ένας θετικός κλώνος μετά από τη διαγνωστική πέψη. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της ένθεσης των shRNAs ελέγχθηκε και με αλληλούχηση, όπου τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. Συνεπώς, η κλωνοποίηση των shRNAs δεν ήταν επιτυχής και πρέπει να επαναληφθεί.

3.2.4 Έκφραση των lncRNAs cRENA 1 & 2 στην κυτταρική σειρά AGS

Το τελικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε ο έλεγχος της έκφρασης των δύο lncRNA στόχων των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α, των cRENA 1 & 2. Η έκφραση των cRENA 1 & 2 ελέγχθηκε μόνο στην περίπτωση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2, τόσο στην περίπτωση της υπερέκφρασης όσο και στην περίπτωση της καταστολής του. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν η AGS, καθώς διαπιστώθηκε προηγουμένως ότι η έκφραση του CDX2 είναι υψηλότερη στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου.



Διάγραμμα 19: Διάγραμμα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *CDX2* στην περίπτωση της καταστολής (A) και υπερέκφρασης (B). Η κανονικοποίηση έχει γίνει ως προς το γονίδιο ιδιοσύστατης έκφρασης *RPLP1*.



Διάγραμμα 20: Διάγραμμα έκφρασης των *lncRNAs* *cRNA 1* & *2* στην περίπτωση της καταστολής και υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *CDX2*. Τα κύτταρα *AGS pLL3* λειτουργούν ως *control*, τα κύτταρα *AGS PSIC.CDX2* χαρακτηρίζονται από καταστολή του *CDX2*, ενώ τα κύτταρα *AGS pLEGO.CDX2* χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του *CDX2*.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι η καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα *CDX2* σε ποσοστό περίπου 90% (διάγραμμα 19A) επιφέρει μείωση της έκφρασης των *cRNA 1* & *2*, σε σχέση με την έκφραση στα κύτταρα *control*. Όσον αφορά την υπερέκφραση του *CDX2*, και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μείωση της έκφρασης των *cRNA 1* & *2*, στο ίδιο επίπεδο με την αντίστοιχη καταστολή (διάγραμμα 20).

4. Συμπεράσματα - Συζήτηση

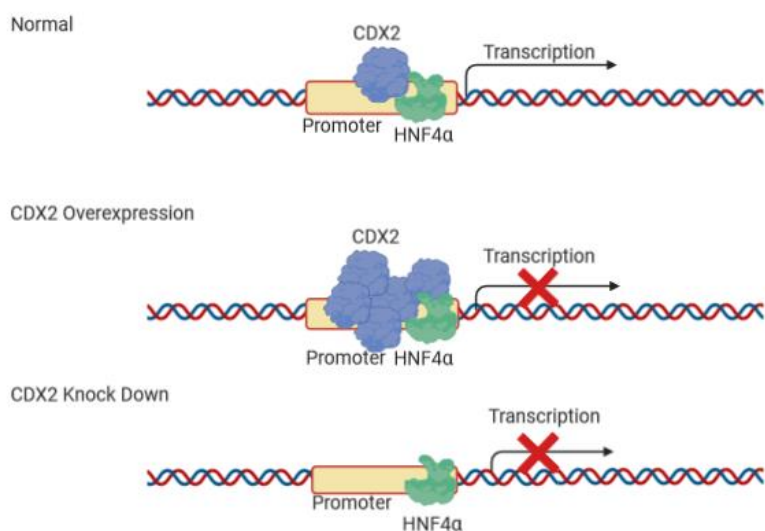
Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εύρεση lncRNAs τα οποία ρυθμίζονται από το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a στο γαστρικό καρκίνο. Οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται στο στάδιο της εντερικής μεταπλασίας όπου δρουν συνεργατικά και συμβάλλουν στην εμφάνιση εντερικού φαινοτύπου στα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου. Ο έλεγχος της έκφρασης των CDX2 και HNF4a έδειξε ότι οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και καρκίνου του μαστού. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τη βιβλιογραφία, καθώς έχει βρεθεί ότι η ειδική έκφραση των CDX2 και HNF4a στο γαστρικό καρκίνο αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για τη διάκρισή του από τους υπόλοιπους τύπους καρκίνου (Jucá et al., 2017; X.-T. Wang et al., 2012). Ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου, υψηλότερη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a παρατηρείται στα κύτταρα AGS, η οποία αποτελεί κυτταρική σειρά πρωτεύοντος γαστρικού καρκίνου, ενώ αντίθετα στην φυσιολογική γαστρική κυτταρική σειρά HFE145 δεν παρατηρείται έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων. Το γεγονός αυτό, σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, οφείλεται στο ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4a δεν εκφράζονται στο φυσιολογικό στόμαχο, αλλά παρατηρείται έκτοπη έκφρασή τους στα αρχικά στάδια του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, και συγκεκριμένα στο στάδιο της εντερικής μεταπλασίας (Bai et al., 2002; S. Jiang et al., 2003; Seno et al., 2002; Tanaka et al., 2006). Τα αποτελέσματα της έκφρασης των CDX2 και HNF4a ελέγχθηκαν και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όπου επιβεβαιώθηκε η υψηλή έκφρασή τους στην κυτταρική σειρά AGS.

Χρησιμοποιώντας δεδομένα RNA sequencing και ChIP sequencing βρέθηκαν τα γονίδια στόχοι του HNF4a τα οποία ρυθμίζονται από το μεταγραφικό αυτό σύμπλοκο. Η εύρεση 365 γονιδίων που ρυθμίζονται ταυτόχρονα από τους δύο αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4a διαθέτουν κοινούς στόχους πάνω στη χρωματίνη (L. Chen, Toke, Luo, Vasoya, Aita, et al., 2019). Η ανάλυση οντολογίας των παραπάνω γονιδίων ανέδειξε τη συμμετοχή των απορρυθμιζόμενων γονιδίων σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η ρύθμιση της μεταγραφής, η κυτταρική διαίρεση και η αντιγραφή του DNA. Η ανάλυση των μονοπατιών KEGG υπέδειξε την εμπλοκή των γονιδίων σε μεταβολικά μονοπάτια αλλά και στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι οι στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 είναι κυρίως γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την απόπτωση (Uesaka, Kageyama, & Watanabe, 2004). Όσον αφορά το μεταγραφικό παράγοντα HNF4a, τα γονίδια στόχοι του κυρίως εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, στον κυτταρικό μεταβολισμό (Stegmann et al., 2006), στον κυτταρικό κύκλο αλλά και στη διαδικασία της καρκινογένεσης (Z. Wang et al., 2020).

Από τα κοινά απορρυθμιζόμενα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a επιλέχθηκαν 2 lncRNAs, τα cRENA 1 & 2, στον υποκινητή των οποίων προσδένεται ο HNF4a, και μελετήθηκε η έκφρασή τους σε καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος, αλλά και οι ιδιότητές τους στο γαστρικό καρκίνο

συγκεκριμένα. Η βιοπληροφορική ανάλυση των cRENA 1 & 2 υπέδειξε ότι η έκφραση των συγκεκριμένων lncRNAs είναι σημαντικά αυξημένη στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους γαστρεντερικού καρκίνου. Το lncRNA cRENA 1, μέχρι στιγμής, έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, όπου υπερεκφράζεται και συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου (Shang, Zhou, & Chen, 2020). Αντιθέτως, το lncRNA cRENA 2 έχει βρεθεί πρόσφατα από το Mao και τους συνεργάτες του ως ένα lncRNA που υπερεκφράζεται στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών (Mao et al., 2020), χωρίς ωστόσο να συσχετίζεται με τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες ή να είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης του. Στο γαστρικό καρκίνο, η αυξημένη έκφραση των cRENA 1 & 2 παρατηρείται από τα αρχικά στάδια της νόσου, γεγονός το οποίο υποδεικνύει τη διαγνωστική αξία των συγκεκριμένων lncRNAs, τα οποία θα συμβάλλουν στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου όπου συνήθως δεν παρουσιάζονται συμπτώματα.

Επιπλέον, η ρύθμιση των cRENA 1 & 2 από το μεταγραφικό παράγοντα CDX2 ελέγχθηκε πειραματικά σε μεταγραφικό επίπεδο, τόσο στην περίπτωση της υπερέκφρασης όσο και στην περίπτωση της καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα. Ο έλεγχος της έκφρασης των lncRNAs πραγματοποιήθηκε στην κυτταρική σειρά AGS, λόγω του ότι σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται η υψηλότερη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a, από τους οποίους ρυθμίζονται. Παρατηρήθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις υπήρξε μείωση της έκφρασης των cRENA 1 & 2. Μια πιθανή εξήγηση αυτού του αποτελέσματος είναι το επικρατές αρνητικό φαινόμενο (“dominant negative effect”), το οποίο παρατηρείται κυρίως σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Συγκεκριμένα, οποιαδήποτε μεταβολή της στοιχειομετρίας των συστατικών του συμπλόκου προκαλεί την αδυναμία σχηματισμού του συμπλόκου αυτού, οδηγώντας σε ένα μη λειτουργικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Bergendahl et al., 2019). Συνεπώς, ενώ η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 αναμένεται να προκαλεί υπερέκφραση των lncRNAs cRENA 1 & 2, παρατηρείται το αντίθετο αποτέλεσμα, ενδεχομένως λόγω της αλλαγής της στοιχειομετρίας ανάμεσα στους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a, οδηγώντας έτσι σε μη λειτουργικό σύμπλοκο και κατ’ επέκταση μειωμένη έκφραση των cRENA 1 & 2 (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Υποθετικό σενάριο εφαρμογής του επικρατούς αρνητικού φαινομένου στην περίπτωση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a. Normal: Η φυσιολογική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 συμβάλλει στη δημιουργία του μεταγραφικού συμπλόκου στον υποκινητή του γονιδίου - στόχου, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή του. CDX2 Overexpression: Η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 προκαλεί αλλαγή στη στοιχειομετρία ανάμεσα στα συστατικά του συμπλόκου, επιφέροντας τη δημιουργία μη λειτουργικού συμπλόκου και κατ' επέκταση την καταστολή της μεταγραφής. CDX2 Knock Down: Η καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 οδηγεί σε αδυναμία σχηματισμού του συμπλόκου, καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή του γονιδίου - στόχου.

Εν κατακλείδι, τα δύο lncRNA στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a εκφράζονται υψηλότερα στο γαστρικό καρκίνο σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς και η αύξηση παρατηρείται από τα αρχικά στάδια της νόσου. Τα χαρακτηριστικά αυτά της έκφρασής τους τα καθιστούν ελκυστικά όσον αφορά τη διαγνωστική τους ικανότητα, καθώς είναι ειδικά σε σχέση με τους συγγενικούς γαστρεντερικούς καρκίνους και θα μπορούσαν να αποτελούν βιοδείκτες για τη διάγνωση της νόσου στα πρώιμα στάδια, τα οποία συνήθως είναι και ασυμπτωματικά. Παράλληλα με τη διαγνωστική τους χρήση, τα cRENA 1 & 2 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για το γαστρικό καρκίνο, δεδομένου ότι υπάρχει δυσκολία στη χρήση των μεταγραφικών παραγόντων στη θεραπεία του καρκίνου.

Απώτερο σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a, μέσω της διαδικασίας της RNA παρεμβολής (RNAi) και του συστήματος λεντι-ιών, στην κυτταρική σειρά AGS για την εύρεση των διαφορετικά εκφρασμένων lncRNAs. Αυτό θα απαιτούσε την κλωνοποίηση των shRNAs για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a στον πλασμιδιακό φορέα pLB, την απομόνωσή τους από μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα *E.coli* και τη εισαγωγή τους στα κύτταρα AGS μέσω των λεντι-ιών. Ωστόσο, οι προσπάθειες κλωνοποίησης των shRNA για τον HNF4a στον πλασμιδιακό φορέα pLB δεν ήταν επιτυχείς, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν δεδομένα σίγησης του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a στην κυτταρική σειρά AGS.

Μελλοντικούς στόχους του συγκεκριμένου πειράματος αποτελούν ο έλεγχος της έκφρασης των cRENA 1 & 2 στην περίπτωση της υπερέκφρασης και καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ρύθμιση των lncRNAs αυτών από το συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα, όπως επίσης και στην περίπτωση των δύο μεταγραφικών παραγόντων ταυτόχρονα, ώστε να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης όπου παρατηρείται ρύθμιση των cRENA 1 & 2 από το μεταγραφικό αυτό σύμπλοκο.

5. Βιβλιογραφία

- Ahn, S. H., Shah, Y. M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S., . . . Inoue, Y. (2008). Hepatocyte nuclear factor 4alpha in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, *14*(7), 908-920. doi:10.1002/ibd.20413
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*, *113*(1), 1-11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8
- Amini, N., Spolverato, G., Kim, Y., Squires, M. H., Poultides, G. A., Fields, R., . . . Pawlik, T. M. (2015). Clinicopathological features and prognosis of gastric cardia adenocarcinoma: a multi-institutional US study. *J Surg Oncol*, *111*(3), 285-292. doi:10.1002/jso.23799
- Asano, N., Imatani, A., Watanabe, T., Fushiya, J., Kondo, Y., Jin, X., . . . Shimosegawa, T. (2016). Cdx2 Expression and Intestinal Metaplasia Induced by H. pylori Infection of Gastric Cells Is Regulated by NOD1-Mediated Innate Immune Responses. *Cancer research*, *76*(5), 1135-1145. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2272
- Baba, Y., Noshio, K., Shima, K., Freed, E., Irahara, N., Philips, J., . . . Ogino, S. (2009). Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, *15*(14), 4665-4673. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-09-0401
- Babeu, J. P., & Boudreau, F. (2014). Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J Gastroenterol*, *20*(1), 22-30. doi:10.3748/wjg.v20.i1.22
- Bae, J. M., Lee, T. H., Cho, N. Y., Kim, T. Y., & Kang, G. H. (2015). Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*, *21*(5), 1457-1467. doi:10.3748/wjg.v21.i5.1457
- Bai, Y. Q., Yamamoto, H., Akiyama, Y., Tanaka, H., Takizawa, T., Koike, M., . . . Yuasa, Y. (2002). Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. *Cancer Lett*, *176*(1), 47-55. doi:10.1016/s0304-3835(01)00753-4
- Bailly, A., Torres-Padilla, M. E., Tinel, A. P., & Weiss, M. C. (2001). An enhancer element 6 kb upstream of the mouse HNF4alpha1 promoter is activated by glucocorticoids and liver-enriched transcription factors. *Nucleic Acids Res*, *29*(17), 3495-3505. doi:10.1093/nar/29.17.3495
- Bang, Y. J., Kim, Y. W., Yang, H. K., Chung, H. C., Park, Y. K., Lee, K. H., . . . Noh, S. H. (2012). Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, *379*(9813), 315-321. doi:10.1016/s0140-6736(11)61873-4
- Barros, R., da Costa, L. T., Pinto-de-Sousa, J., Duluc, I., Freund, J.-N., David, L., & Almeida, R. (2011). CDX2 autoregulation in human intestinal metaplasia of the stomach: impact on the stability of the phenotype. *Gut*, *60*(3), 290. doi:10.1136/gut.2010.222323
- Barros, R., Freund, J.-N., David, L., & Almeida, R. (2012). Gastric intestinal metaplasia revisited: function and regulation of CDX2. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(9), 555-563. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.07.006>
- Barsyte-Lovejoy, D., Lau, S. K., Boutros, P. C., Khosravi, F., Jurisica, I., Andrulis, I. L., . . . Penn, L. Z. (2006). The c-Myc Oncogene Directly Induces the H19

- Noncoding RNA by Allele-Specific Binding to Potentiate Tumorigenesis. *Cancer Research*, 66(10), 5330. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0037
- Bass, A. J., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, S. M., Miller, M., Bernard, B., . . . Center, U. N. C. L. C. C. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202-209. doi:10.1038/nature13480
- Beck, F., Erler, T., Russell, A., & James, R. (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn*, 204(3), 219-227. doi:10.1002/aja.1002040302
- Bergendahl, L. T., Gerasimavicius, L., Miles, J., Macdonald, L., Wells, J. N., Welburn, J. P. I., & Marsh, J. A. (2019). The role of protein complexes in human genetic disease. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 28(8), 1400-1411. doi:10.1002/pro.3667
- Bhat, S. A., Ahmad, S. M., Mumtaz, P. T., Malik, A. A., Dar, M. A., Urwat, U., . . . Ganai, N. A. (2016). Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA Research*, 1(1), 43-50. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2016.11.002>
- Bolha, L., Ravnik-Glavač, M., & Glavač, D. (2017). Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer. *Disease markers*, 2017, 7243968-7243968. doi:10.1155/2017/7243968
- Bollschweiler, E., Berlth, F., Baltin, C., Mönig, S., & Hölscher, A. H. (2014). Treatment of early gastric cancer in the Western World. *World J Gastroenterol*, 20(19), 5672-5678. doi:10.3748/wjg.v20.i19.5672
- Bolotin, E., Liao, H., Ta, T. C., Yang, C., Hwang-Verslues, W., Evans, J. R., . . . Sladek, F. M. (2010). Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4 α target genes using protein binding microarrays. *Hepatology*, 51(2), 642-653. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.23357>
- Boncinelli, E. (1997). Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev*, 7(3), 331-337. doi:10.1016/s0959-437x(97)80146-3
- Boyd, M., Bressendorff, S., Møller, J., Olsen, J., & Troelsen, J. T. (2009). Mapping of HNF4 α target genes in intestinal epithelial cells. *BMC gastroenterology*, 9, 68-68. doi:10.1186/1471-230X-9-68
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Bürglin, T. R., & Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*, 125(3), 497-521. doi:10.1007/s00412-015-0543-8
- Calon, A., Gross, I., Lhermitte, B., Martin, E., Beck, F., Duclos, B., . . . Freund, J. N. (2007). Different effects of the Cdx1 and Cdx2 homeobox genes in a murine model of intestinal inflammation. *Gut*, 56(12), 1688-1695. doi:10.1136/gut.2007.125542
- Carcas, L. P. (2014). Gastric cancer review. *J Carcinog*, 13, 14. doi:10.4103/1477-3163.146506
- Casamayor, M., Morlock, R., Maeda, H., & Ajani, J. (2018). Targeted literature review of the global burden of gastric cancer. *Ecancermedicalscience*, 12, 883. doi:10.3332/ecancer.2018.883
- Cattin, A. L., Le Beyec, J., Barreau, F., Saint-Just, S., Houllier, A., Gonzalez, F. J., . . . Ribeiro, A. (2009). Hepatocyte nuclear factor 4 α , a key factor for

- homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol*, 29(23), 6294-6308. doi:10.1128/mcb.00939-09
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb j*, 10(9), 940-954.
- Chandra Gupta, S., & Nandan Tripathi, Y. (2017). Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets. *International Journal of Cancer*, 140(9), 1955-1967. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.30546>
- Chang, H. R., Nam, S., Kook, M.-C., Kim, K.-T., Liu, X., Yao, H., . . . Kim, Y. H. (2016). HNF4 α is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer. *Gut*, 65(1), 19. doi:10.1136/gutjnl-2014-307918
- Chang, M. S., Uozaki, H., Chong, J. M., Ushiku, T., Sakuma, K., Ishikawa, S., . . . Fukayama, M. (2006). CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res*, 12(10), 2995-3002. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-05-1601
- Chawengsaksophak, K. (2019). Cdx2 Animal Models Reveal Developmental Origins of Cancers. *Genes*, 10(11), 928. doi:10.3390/genes10110928
- Chellappa, K., Deol, P., Evans, J. R., Vuong, L. M., Chen, G., Briançon, N., . . . Sladek, F. M. (2016). Opposing roles of nuclear receptor HNF4 α isoforms in colitis and colitis-associated colon cancer. *eLife*, 5, e10903. doi:10.7554/eLife.10903
- Chen, L., Toke, N. H., Luo, S., Vasoya, R. P., Aita, R., Parthasarathy, A., . . . Verzi, M. P. (2019). HNF4 factors control chromatin accessibility and are redundantly required for maturation of the fetal intestine. *Development*, 146(19), dev179432. doi:10.1242/dev.179432
- Chen, L., Toke, N. H., Luo, S., Vasoya, R. P., Fullem, R. L., Parthasarathy, A., . . . Verzi, M. P. (2019). A reinforcing HNF4-SMAD4 feed-forward module stabilizes enterocyte identity. *Nature genetics*, 51(5), 777-785. doi:10.1038/s41588-019-0384-0
- Chen, Y. C., Fang, W. L., Wang, R. F., Liu, C. A., Yang, M. H., Lo, S. S., . . . Huang, K. H. (2016). Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res*, 22(1), 197-202. doi:10.1007/s12253-015-9996-6
- Cheng, L., Wang, P., Tian, R., Wang, S., Guo, Q., Luo, M., . . . Jiang, Q. (2019). LncRNA2Target v2.0: a comprehensive database for target genes of lncRNAs in human and mouse. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D140-d144. doi:10.1093/nar/gky1051
- Chia, N.-Y., Deng, N., Das, K., Huang, D., Hu, L., Zhu, Y., . . . Tan, P. (2015). Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development. *Gut*, 64(5), 707. doi:10.1136/gutjnl-2013-306596
- Chou, W.-C., Prokova, V., Shiraishi, K., Valcourt, U., Moustakas, A., Hadzopoulou-Cladaras, M., . . . Kardassis, D. (2003). Mechanism of a transcriptional cross talk between transforming growth factor-beta-regulated Smad3 and Smad4 proteins and orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor-4. *Molecular biology of the cell*, 14(3), 1279-1294. doi:10.1091/mbc.e02-07-0375
- Colleypriest, B. J., Burke, Z. D., Griffiths, L. P., Chen, Y., Yu, W.-Y., Jover, R., . . . Tosh, D. (2017). Hnf4 α is a key gene that can generate columnar metaplasia in oesophageal epithelium. *Differentiation; research in biological diversity*, 93, 39-49. doi:10.1016/j.diff.2016.11.001

- Correa, P. (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*, 52(24), 6735-6740.
- Cristescu, R., Lee, J., Nebozhyn, M., Kim, K. M., Ting, J. C., Wong, S. S., . . . Aggarwal, A. (2015). Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*, 21(5), 449-456. doi:10.1038/nm.3850
- Dalerba, P., Sahoo, D., Paik, S., Guo, X., Yothers, G., Song, N., . . . Clarke, M. F. (2016). CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*, 374(3), 211-222. doi:10.1056/NEJMoa1506597
- Darnell, J. E. (2002). Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 740-749. doi:10.1038/nrc906
- Darsigny, M., Babeu, J.-P., Seidman, E. G., Gendron, F.-P., Levy, E., Carrier, J., . . . Boudreau, F. (2010). Hepatocyte Nuclear Factor-4 α Promotes Gut Neoplasia in Mice and Protects against the Production of Reactive Oxygen Species. *Cancer Research*, 70(22), 9423. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1697
- Darsigny, M., Babeu, J. P., Dupuis, A. A., Furth, E. E., Seidman, E. G., Lévy, E., . . . Boudreau, F. (2009). Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4alpha affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One*, 4(10), e7609. doi:10.1371/journal.pone.0007609
- Darsigny, M., Babeu, J. P., Seidman, E. G., Gendron, F. P., Levy, E., Carrier, J., . . . Boudreau, F. (2010). Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes gut neoplasia in mice and protects against the production of reactive oxygen species. *Cancer Res*, 70(22), 9423-9433. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-1697
- Dean, S., Tang, J. I., Seckl, J. R., & Nyirenda, M. J. (2010). Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents. *Gene expression*, 14(6), 337-344. doi:10.3727/105221610x12717040569901
- Dempsey, J. L., & Cui, J. Y. (2017). Long Non-Coding RNAs: A Novel Paradigm for Toxicology. *Toxicol Sci*, 155(1), 3-21. doi:10.1093/toxsci/kfw203
- Dhamija, S., & Diederichs, S. (2016). From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis. *International Journal of Cancer*, 139(2), 269-280. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.30039>
- Dhanao, J. K., Sethi, R. S., Verma, R., Arora, J. S., & Mukhopadhyay, C. S. (2018). Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review. *Journal of animal science and technology*, 60, 25-25. doi:10.1186/s40781-018-0183-7
- Do, H., & Kim, W. (2018). Roles of Oncogenic Long Non-coding RNAs in Cancer Development. *Genomics & informatics*, 16(4), e18-e18. doi:10.5808/GI.2018.16.4.e18
- Duncan, S. A., Manova, K., Chen, W. S., Hoodless, P., Weinstein, D. C., Bachvarova, R. F., & Darnell, J. E., Jr. (1994). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(16), 7598-7602. doi:10.1073/pnas.91.16.7598
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854), 889-895. doi:10.1126/science.3283939

- Fang, X. Y., Pan, H. F., Leng, R. X., & Ye, D. Q. (2015). Long noncoding RNAs: novel insights into gastric cancer. *Cancer Lett*, 356(2 Pt B), 357-366. doi:10.1016/j.canlet.2014.11.005
- Fattahi, S., Kosari-Monfared, M., Golpour, M., Emami, Z., Ghasemiyan, M., Nouri, M., & Akhavan-Niaki, H. (2020). LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: A novel approach to personalized medicine. *J Cell Physiol*, 235(4), 3189-3206. doi:10.1002/jcp.29260
- Feldman, M. (2010). *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. In.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
- Ferro, A., Peleteiro, B., Malvezzi, M., Bosetti, C., Bertuccio, P., Levi, F., . . . Lunet, N. (2014). Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur J Cancer*, 50(7), 1330-1344. doi:10.1016/j.ejca.2014.01.029
- Figueiredo, C., Camargo, M. C., Leite, M., Fuentes-Pananá, E. M., Rabkin, C. S., & Machado, J. C. (2017). Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification. In N. Tegtmeyer & S. Backert (Eds.), *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori* (pp. 277-304). Cham: Springer International Publishing.
- Fock, K. M. (2014). Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 40(3), 250-260. doi:10.1111/apt.12814
- Freund, J.-N., Duluc, I., Reimund, J.-M., Gross, I., & Domon-Dell, C. (2015). Extending the functions of the homeotic transcription factor Cdx2 in the digestive system through nontranscriptional activities. *World journal of gastroenterology*, 21(5), 1436-1443. doi:10.3748/wjg.v21.i5.1436
- Garraway, L. A., & Sellers, W. R. (2006). Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(8), 593-602. doi:10.1038/nrc1947
- Garrison, W. D., Battle, M. A., Yang, C., Kaestner, K. H., Sladek, F. M., & Duncan, S. A. (2006). Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology*, 130(4), 1207-1220. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.003
- Gonzalez, F. J. (2008). Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4α-mediated Transcription. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(1), 2-7. doi:10.2133/dmpk.23.2
- Gross, I., Duluc, I., Benameur, T., Calon, A., Martin, E., Brabletz, T., . . . Freund, J. N. (2008). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene*, 27(1), 107-115. doi:10.1038/sj.onc.1210601
- Gross, I., Lhermitte, B., Domon-Dell, C., Duluc, I., Martin, E., Gaiddon, C., . . . Freund, J.-N. (2005). Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene*, 24(54), 7955-7963. doi:10.1038/sj.onc.1208945
- Gugnoni, M., & Ciarrocchi, A. (2019). Long Noncoding RNA and Epithelial Mesenchymal Transition in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1924. doi:10.3390/ijms20081924

- Guo, R. J., Funakoshi, S., Lee, H. H., Kong, J., & Lynch, J. P. (2010). The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. *Carcinogenesis*, *31*(2), 159-166. doi:10.1093/carcin/bgp213
- Guo, R. J., Suh, E. R., & Lynch, J. P. (2004). The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol Ther*, *3*(7), 593-601. doi:10.4161/cbt.3.7.913
- Guo, S., & Lu, H. (2017). Conjunction of potential G-quadruplex and adjacent cis-elements in the 5' UTR of hepatocyte nuclear factor 4-alpha strongly inhibit protein expression. *Sci Rep*, *7*(1), 17444. doi:10.1038/s41598-017-17629-y
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. J. c. (2000). The hallmarks of cancer. *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. J. c. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *144*(5), 646-674.
- Haria, D., & Naora, H. (2013). Homeobox Gene Deregulation: Impact on the Hallmarks of Cancer. *Cancer Hallm*, *1*(2-3), 67-76. doi:10.1166/ch.2013.1007
- He, H. H., Meyer, C. A., Shin, H., Bailey, S. T., Wei, G., Wang, Q., . . . Liu, X. S. (2010). Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. *Nat Genet*, *42*(4), 343-347. doi:10.1038/ng.545
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, *5*(7), 522-531. doi:10.1038/nrg1379
- Ho, T.-T., Zhou, N., Huang, J., Koirala, P., Xu, M., Fung, R., . . . Mo, Y.-Y. (2015). Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic acids research*, *43*(3), e17-e17. doi:10.1093/nar/gku1198
- Holmes, K., Egan, B., Swan, N., & O'Morain, C. (2007). Genetic Mechanisms and Aberrant Gene Expression during the Development of Gastric Intestinal Metaplasia and Adenocarcinoma. *Current genomics*, *8*(6), 379-397. doi:10.2174/138920207783406460
- Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of gastrointestinal oncology*, *3*(3), 251-261. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
- Huang, S., Ernberg, I., & Kauffman, S. (2009). Cancer attractors: A systems view of tumors from a gene network dynamics and developmental perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *20*(7), 869-876. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.07.003>
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M. J., Kenzelmann-Broz, D., . . . Rinn, J. L. (2010). A Large Intergenic Noncoding RNA Induced by p53 Mediates Global Gene Repression in the p53 Response. *Cell*, *142*(3), 409-419. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.040>
- James, R., Erler, T., & Kazenwadel, J. (1994). Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem*, *269*(21), 15229-15237.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, *61*(2), 69-90. doi:10.3322/caac.20107
- Jiang, C. F., Wen, L. Z., Yin, C., Xu, W. P., Shi, B., Zhang, X., & Xie, W. F. (2016). Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates the inhibitory effect of hepatocyte nuclear factor-4 α on hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *7*(19), 27408-27421. doi:10.18632/oncotarget.8478

- Jiang, G., Nepomuceno, L., Yang, Q., & Sladek, F. M. (1997). Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Arch Biochem Biophys*, *340*(1), 1-9. doi:10.1006/abbi.1997.9914
- Jiang, S., Tanaka, T., Iwanari, H., Hotta, H., Yamashita, H., Kumakura, J., . . . Naito, M. (2003). Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms in human and rats. *Nucl Recept*, *1*, 5. doi:10.1186/1478-1336-1-5
- Johnston, S. J., & Carroll, J. S. (2015). Transcription factors and chromatin proteins as therapeutic targets in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1855*(2), 183-192. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.02.002>
- Joo, M. K., Park, J.-J., & Chun, H. J. (2016). Impact of homeobox genes in gastrointestinal cancer. *World journal of gastroenterology*, *22*(37), 8247-8256. doi:10.3748/wjg.v22.i37.8247
- Jucá, P. C. d. F. C., Corrêa, S., Vignal, G. M., Accioly, M. T. d. S., Lustosa, S. A. S., Abdelhay, E., & Matos, D. (2017). HNF4A expression as a potential diagnostic tool to discriminate primary gastric cancer from breast cancer metastasis in a Brazilian cohort. *Diagnostic pathology*, *12*(1), 43-43. doi:10.1186/s13000-017-0635-2
- Kazumori, H., Ishihara, S., Rumi, M. A. K., Kadowaki, Y., & Kinoshita, Y. (2006). Bile acids directly augment caudal related homeobox gene Cdx2 expression in oesophageal keratinocytes in Barrett's epithelium. *Gut*, *55*(1), 16. doi:10.1136/gut.2005.066209
- Kim, H.-J., Seo, E.-H., Bae, D. H., Haam, K., Jang, H.-R., Park, J.-L., . . . Kim, Y. S. (2020). Methylation of the CDX2 promoter in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa increases with age and its rapid demethylation in gastric tumors is associated with upregulated gene expression. *Carcinogenesis*, *41*(10), 1341-1352. doi:10.1093/carcin/bgaa083
- Kim, J., Lee, H. S., Bae, S. I., Lee, Y. M., & Kim, W. H. (2005). Silencing and CpG island methylation of GSTP1 is rare in ordinary gastric carcinomas but common in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Anticancer Res*, *25*(6b), 4013-4019.
- Kim, S. P., Park, J. W., Lee, S. H., Lim, J. H., Jang, B. C., Lee, S. H., . . . Kwon, T. K. (2004). Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, *315*(1), 93-99. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.020
- Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H., & Ohhata, T. (2013). Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *70*(24), 4785-4794. doi:10.1007/s00018-013-1423-0
- Krueger, F., Madeja, Z., Hemberger, M., McMahon, M., Cook, S. J., & Gaunt, S. J. (2009). Down-regulation of Cdx2 in colorectal carcinoma cells by the Raf-MEK-ERK 1/2 pathway. *Cellular signalling*, *21*(12), 1846-1856. doi:10.1016/j.cellsig.2009.07.020
- Kung, J. T., Colognori, D., & Lee, J. T. (2013). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*, *193*(3), 651-669. doi:10.1534/genetics.112.146704
- Kusano, M., Toyota, M., Suzuki, H., Akino, K., Aoki, F., Fujita, M., . . . Tokino, T. (2006). Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer*, *106*(7), 1467-1479. doi:10.1002/ncr.21789
- Kwon, E. J., Lee, H. A., You, Y. A., Park, H., Cho, S. J., Ha, E. H., & Kim, Y. J. (2016). DNA methylations of MC4R and HNF4 α are associated with increased

- triglyceride levels in cord blood of preterm infants. *Medicine (Baltimore)*, 95(35), e4590. doi:10.1097/md.00000000000004590
- Kwon, E. J., You, Y. A., Park, B., Ha, E. H., Kim, H. S., Park, H., & Kim, Y. J. (2018). Association between the DNA methylations of POMC, MC4R, and HNF4A and metabolic profiles in the blood of children aged 7-9 years. *BMC Pediatr*, 18(1), 121. doi:10.1186/s12887-018-1104-0
- Lauren, P. (1965). THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 64, 31-49. doi:10.1111/apm.1965.64.1.31
- Lazarevich, N. L., Shavochkina, D. A., Fleishman, D. I., Kustova, I. F., Morozova, O. V., Chuchuev, E. S., & Patyutko, Y. I. (2010). Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression. *Exp Oncol*, 32(3), 167-171.
- Li, D., Zhao, X., Xiao, Y., Mei, H., Pu, J., Xiang, X., . . . Tong, Q. (2015). Intelectin 1 suppresses tumor progression and is associated with improved survival in gastric cancer. *Oncotarget*, 6(18), 16168-16182. doi:10.18632/oncotarget.3753
- Li, J., Tian, H., Yang, J., & Gong, Z. (2016). Long Noncoding RNAs Regulate Cell Growth, Proliferation, and Apoptosis. *DNA and Cell Biology*, 35(9), 459-470. doi:10.1089/dna.2015.3187
- Liu, J., Ben, Q., Lu, E., He, X., Yang, X., Ma, J., . . . Wang, H. (2018). Long noncoding RNA PANDAR blocks CDKN1A gene transcription by competitive interaction with p53 protein in gastric cancer. *Cell Death Dis*, 9(2), 168. doi:10.1038/s41419-017-0246-6
- Losko, M., Kotlinowski, J., & Jura, J. (2016). Long Noncoding RNAs in Metabolic Syndrome Related Disorders. *Mediators Inflamm*, 2016, 5365209. doi:10.1155/2016/5365209
- Lu, H. (2016). Crosstalk of HNF4 α with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids. *Acta Pharm Sin B*, 6(5), 393-408. doi:10.1016/j.apsb.2016.07.003
- Lyons, K., Le, L. C., Pham, Y. T., Borron, C., Park, J. Y., Tran, C. T. D., . . . Luu, H. N. (2019). Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review. *Eur J Cancer Prev*, 28(5), 397-412. doi:10.1097/cej.0000000000000480
- Ma, H., Hao, Y., Dong, X., Gong, Q., Chen, J., Zhang, J., & Tian, W. (2012). Molecular mechanisms and function prediction of long noncoding RNA. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 541786-541786. doi:10.1100/2012/541786
- Mangelsdorf, D. J., & Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83(6), 841-850. doi:10.1016/0092-8674(95)90200-7
- Manzo, B. A., Crabtree, J. E., Fiona Campbell, M., Tweedle, D., Potten, C. S., Bajaj-Elliott, M., . . . Wilson, J. W. (2006). Helicobacter pylori regulates the expression of inhibitors of DNA binding (Id) proteins by gastric epithelial cells. *Microbes and Infection*, 8(4), 1064-1074. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.11.003>
- Mao, R., Wang, Z., Zhang, Y., Chen, Y., Liu, Q., Zhang, T., & Liu, Y. (2020). Development and validation of a novel prognostic signature in gastric adenocarcinoma. *Aging*, 12(21), 22233-22252. doi:10.18632/aging.104161

- Marqués-Lespier, J. M., González-Pons, M., & Cruz-Correa, M. (2016). Current Perspectives on Gastric Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 45(3), 413-428. doi:10.1016/j.gtc.2016.04.002
- Martín-Richard, M., Carmona-Bayonas, A., Custodio, A. B., Gallego, J., Jiménez-Fonseca, P., Reina, J. J., . . . Sastre, J. (2020). SEOM clinical guideline for the diagnosis and treatment of gastric cancer (GC) and gastroesophageal junction adenocarcinoma (GEJA) (2019). *Clinical and Translational Oncology*, 22(2), 236-244. doi:10.1007/s12094-019-02259-9
- Masood, M. A., Loya, A., & Yusuf, M. A. (2016). CDX2 as a prognostic marker in gastric cancer. *Acta Gastroenterol Belg*, 79(2), 197-200.
- Mattick, J. S. (2009). The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genet*, 5(4), e1000459. doi:10.1371/journal.pgen.1000459
- McGinnis, W., & Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 68(2), 283-302. doi:10.1016/0092-8674(92)90471-n
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 10(3), 155-159. doi:10.1038/nrg2521
- Mesquita, P., Almeida, R., Lunet, N., Reis, C. A., Silva, L. F. S., Serpa, J., . . . David, L. (2006). Metaplasia : A Transdifferentiation Process that Facilitates Cancer Development: The Model of Gastric Intestinal Metaplasia. *12(1-2)*, 3-26. doi:10.1615/CritRevOncog.v12.i1-2.20
- Moons, L. M. G., Bax, D. A., Kuipers, E. J., van Dekken, H., Haringsma, J., van Vliet, A. H. M., . . . Kusters, J. G. (2004). The homeodomain protein CDX2 is an early marker of Barrett's oesophagus. *Journal of Clinical Pathology*, 57(10), 1063. doi:10.1136/jcp.2003.015727
- Moskalev, E. A., Schubert, M., & Hoheisel, J. D. (2012). RNA-directed epigenomic reprogramming—an emerging principle of a more targeted cancer therapy? *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51(2), 105-110. doi:<https://doi.org/10.1002/gcc.20943>
- Mutoh, H., Hakamata, Y., Sato, K., Eda, A., Yanaka, I., Honda, S., . . . Sugano, K. (2002). Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 470-479. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00480-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00480-1)
- Mutoh, H., Hayakawa, H., Sakamoto, H., & Sugano, K. (2007). Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor-kappaB. *J Gastroenterol*, 42(9), 719-729. doi:10.1007/s00535-007-2088-y
- Nagy, T. A., Frey, M. R., Yan, F., Israel, D. A., Polk, D. B., & Peek, R. M. (2009). Helicobacter pylori Regulates Cellular Migration and Apoptosis by Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(5), 641-651. doi:10.1086/596660
- Necula, L., Matei, L., Dragu, D., Neagu, A. I., Mambet, C., Nedeianu, S., . . . Chivu-Economescu, M. (2019). Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World journal of gastroenterology*, 25(17), 2029-2044. doi:10.3748/wjg.v25.i17.2029
- Ni, Z., Min, Y., Han, C., Yuan, T., Lu, W., Ashktorab, H., . . . Shi, Y. (2020). TGR5-HNF4α axis contributes to bile acid-induced gastric intestinal metaplasia markers expression. *Cell Death Discovery*, 6(1), 56. doi:10.1038/s41420-020-0290-3

- Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., . . . Young, R. A. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, *303*(5662), 1378-1381. doi:10.1126/science.1089769
- Ohno, S. (1972). So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol*, *23*, 366-370.
- Orgel, L. E., & Crick, F. H. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, *284*(5757), 604-607. doi:10.1038/284604a0
- Owen, R. P., White, M. J., Severson, D. T., Braden, B., Bailey, A., Goldin, R., . . . Lu, X. (2018). Single cell RNA-seq reveals profound transcriptional similarity between Barrett's oesophagus and oesophageal submucosal glands. *Nat Commun*, *9*(1), 4261. doi:10.1038/s41467-018-06796-9
- Phillips, R. W., Frierson, H. F., Jr., & Moskaluk, C. A. (2003). Cdx2 as a Marker of Epithelial Intestinal Differentiation in the Esophagus. *The American Journal of Surgical Pathology*, *27*(11).
- Qi, P., & Du, X. (2013). The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Modern Pathology*, *26*(2), 155-165. doi:10.1038/modpathol.2012.160
- Qiu, M. Z., Cai, M. Y., Zhang, D. S., Wang, Z. Q., Wang, D. S., Li, Y. H., & Xu, R. H. (2013). Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *J Transl Med*, *11*, 58. doi:10.1186/1479-5876-11-58
- Ramskold, D., Wang, E., Burge, C., & Sandberg, R. (2009). An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Computational Biol* 2009; *5*: e1000598; PMID: 20011106. In.
- Renouf, B., Soret, C., Saandi, T., Delalande, F., Martin, E., Vanier, M., . . . Domon-Dell, C. (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucleic Acids Research*, *40*(8), 3456-3469. doi:10.1093/nar/gkr1242
- Rings, E. H. H. M., Boudreau, F., Taylor, J. K., Moffett, J., Suh, E. R., & Traber, P. G. (2001). Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology*, *121*(6), 1437-1450. doi:<https://doi.org/10.1053/gast.2001.29618>
- Röcken, C. (2017). Molecular classification of gastric cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *17*(3), 293-301. doi:10.1080/14737159.2017.1286985
- Rogerson, C., Britton, E., Withey, S., Hanley, N., Ang, Y. S., & Sharrocks, A. D. (2019). Identification of a primitive intestinal transcription factor network shared between esophageal adenocarcinoma and its precancerous precursor state. *Genome research*, *29*(5), 723-736. doi:10.1101/gr.243345.118
- Saandi, T., Baraille, F., Derbal-Wolfrom, L., Cattin, A. L., Benahmed, F., Martin, E., . . . Duluc, I. (2013). Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4 α in intestinal cancer. *Oncogene*, *32*(32), 3782-3788. doi:10.1038/onc.2012.401
- Salari, K., Spulak, M. E., Cuff, J., Forster, A. D., Giacomini, C. P., Huang, S., . . . Pollack, J. R. (2012). CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(46), E3196. doi:10.1073/pnas.1206004109
- Salti, G. I., Manougian, T., Farolan, M., Shilkaitis, A., Majumdar, D., & Das Gupta, T. K. (2000). Microphthalmia Transcription Factor: A New Prognostic Marker in

- Intermediate-thickness Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Research*, 60(18), 5012.
- Schmitt, A. M., & Chang, H. Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell*, 29(4), 452-463. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.010
- Seno, H., Oshima, M., Taniguchi, M. A., Usami, K., Ishikawa, T. O., Chiba, T., & Taketo, M. M. (2002). CDX2 expression in the stomach with intestinal metaplasia and intestinal-type cancer: Prognostic implications. *Int J Oncol*, 21(4), 769-774. doi:10.3892/ijo.21.4.769
- Sexton, R. E., Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(4), 1179-1203. doi:10.1007/s10555-020-09925-3
- Shah, N., & Sukumar, S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*, 10(5), 361-371. doi:10.1038/nrc2826
- Shang, T., Zhou, X., & Chen, W. (2020). LINC01123 Promotes Progression of Colorectal Cancer via miR-625-5p/LASP1 Axis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. doi:10.1089/cbr.2020.3740
- Shen, X. H., Qi, P., & Du, X. (2015). Long non-coding RNAs in cancer invasion and metastasis. *Mod Pathol*, 28(1), 4-13. doi:10.1038/modpathol.2014.75
- Shi, T., Gao, G., & Cao, Y. (2016). Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics. *Dis Markers*, 2016, 9085195. doi:10.1155/2016/9085195
- Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., & Song, Y. (2013). Long non-coding RNAs: A new frontier in the study of human diseases. *Cancer Letters*, 339(2), 159-166. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.013>
- Shibata, D., & Weiss, L. M. (1992). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 140(4), 769-774.
- Silberg, D. G., Sullivan, J., Kang, E., Swain, G. P., Moffett, J., Sund, N. J., . . . Kaestner, K. H. (2002). Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology*, 122(3), 689-696. doi:10.1053/gast.2002.31902
- Silberg, D. G., Swain, G. P., Suh, E. R., & Traber, P. G. (2000). Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology*, 119(4), 961-971. doi:10.1053/gast.2000.18142
- Silva, A., Bullock, M., & Calin, G. (2015). The Clinical Relevance of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Cancers (Basel)*, 7(4), 2169-2182. doi:10.3390/cancers7040884
- Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G. J. A., Maciejewski, R., & Polkowski, W. P. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res*, 10, 239-248. doi:10.2147/cmar.S149619
- Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., & Darnell, J. E., Jr. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev*, 4(12b), 2353-2365. doi:10.1101/gad.4.12b.2353
- Smaldone, M. C., & Davies, B. J. (2010). BC-819, a plasmid comprising the H19 gene regulatory sequences and diphtheria toxin A, for the potential targeted therapy of cancers. *Curr Opin Mol Ther*, 12(5), 607-616.
- Soutoglou, E., Katrakili, N., & Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell*, 5(4), 745-751. doi:10.1016/s1097-2765(00)80253-1

- Stegmann, A., Hansen, M., Wang, Y., Larsen, J. B., Lund, L. R., Ritié, L., . . . Olsen, J. (2006). Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiological Genomics*, 27(2), 141-155. doi:10.1152/physiolgenomics.00314.2005
- Stoffel, M., & Duncan, S. A. (1997). The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 13209-13214. doi:10.1073/pnas.94.24.13209
- Sudo, M., Chong, J. M., Sakuma, K., Ushiku, T., Uozaki, H., Nagai, H., . . . Fukayama, M. (2004). Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer*, 109(2), 194-199. doi:10.1002/ijc.11701
- Sun, X., Yang, Q., Rogers, C. J., Du, M., & Zhu, M.-J. (2017). AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death & Differentiation*, 24(5), 819-831. doi:10.1038/cdd.2017.14
- Tamagawa, Y., Ishimura, N., Uno, G., Yuki, T., Kazumori, H., Ishihara, S., . . . Kinoshita, Y. (2012). Notch signaling pathway and Cdx2 expression in the development of Barrett's esophagus. *Laboratory Investigation*, 92(6), 896-909. doi:10.1038/labinvest.2012.56
- Tan, H., Zhang, S., Zhang, J., Zhu, L., Chen, Y., Yang, H., . . . Liu, B. (2020). Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications. *Theranostics*, 10(19), 8880-8902. doi:10.7150/thno.47548
- Tanaka, T., Jiang, S., Hotta, H., Takano, K., Iwanari, H., Sumi, K., . . . Kodama, T. (2006). Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol*, 208(5), 662-672. doi:10.1002/path.1928
- Taraviras, S., Paula Monaghan, A., Schütz, G., & Kelsey, G. (1994). Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 48(2), 67-79. doi:[https://doi.org/10.1016/0925-4773\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0925-4773(94)90017-5)
- Tavakoli, F., Khatami, S. S., Momeni, F., Azadbakht, J., & Ghasemi, F. (2020). Gastric Cancer Diagnosis: From Imaging techniques to Biochemical Biomarkers. *Curr Mol Med*. doi:10.2174/1566524020666200905115100
- Tong, W., Ye, F., He, L., Cui, L., Cui, M., Hu, Y., . . . Suo, J. (2016). Serum biomarker panels for diagnosis of gastric cancer. *Oncotargets Ther*, 9, 2455-2463. doi:10.2147/ott.S86139
- Torres-Padilla, M. E., Fougère-Deschatrette, C., & Weiss, M. C. (2001). Expression of HNF4 α isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mechanisms of Development*, 109(2), 183-193. doi:[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00521-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00521-4)
- Tsai, M. M., Wang, C. S., Tsai, C. Y., Huang, H. W., Chi, H. C., Lin, Y. H., . . . Lin, K. H. (2016). Potential Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Targets of MicroRNAs in Human Gastric Cancer. *Int J Mol Sci*, 17(6). doi:10.3390/ijms17060945
- Tsoi, L. C., Iyer, M. K., Stuart, P. E., Swindell, W. R., Gudjonsson, J. E., Tejasvi, T., . . . Elder, J. T. (2015). Analysis of long non-coding RNAs highlights tissue-specific expression patterns and epigenetic profiles in normal and psoriatic skin. *Genome Biology*, 16(1), 24. doi:10.1186/s13059-014-0570-4

- Uesaka, T., Kageyama, N., & Watanabe, H. (2004). Identifying Target Genes Regulated Downstream of Cdx2 by Microarray Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 337(3), 647-660. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.061>
- Uozaki, H., Barua, R. R., Minhua, S., Ushiku, T., Hino, R., Shinozaki, A., . . . Fukayama, M. (2011). Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein-Barr virus status in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 4(3), 230-240.
- van der Post, R. S., Bult, P., Vogelaar, I. P., Ligtenberg, M. J., Hoogerbrugge, N., & van Krieken, J. H. (2014). HNF4A immunohistochemistry facilitates distinction between primary and metastatic breast and gastric carcinoma. *Virchows Arch*, 464(6), 673-679. doi:10.1007/s00428-014-1574-x
- Vauhkonen, M., Vauhkonen, H., & Sipponen, P. (2006). Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20(4), 651-674. doi:10.1016/j.bpg.2006.03.016
- Velho, S., Fernandes, M. S., Leite, M., Figueiredo, C., & Seruca, R. (2014). Causes and consequences of microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 20(44), 16433-16442. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16433
- Verzi, M. P., Hatzis, P., Sulahian, R., Philips, J., Schuijers, J., Shin, H., . . . Shivdasani, R. A. (2010). TCF4 and CDX2, major transcription factors for intestinal function, converge on the same cis-regulatory regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), 15157-15162. doi:10.1073/pnas.1003822107
- Verzi, M. P., Shin, H., He, H. H., Sulahian, R., Meyer, C. A., Montgomery, R. K., . . . Shivdasani, R. A. (2010). Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Developmental cell*, 19(5), 713-726. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.006
- Verzi, M. P., Shin, H., Ho, L. L., Liu, X. S., & Shivdasani, R. A. (2011). Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Mol Cell Biol*, 31(10), 2026-2039. doi:10.1128/mcb.01250-10
- Verzi, M. P., Shin, H., San Roman, A. K., Liu, X. S., & Shivdasani, R. A. (2013). Intestinal master transcription factor CDX2 controls chromatin access for partner transcription factor binding. *Mol Cell Biol*, 33(2), 281-292. doi:10.1128/mcb.01185-12
- Viollet, B., Kahn, A., & Raymondjean, M. (1997). Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol*, 17(8), 4208-4219. doi:10.1128/mcb.17.8.4208
- Vuong, L. M., Chellappa, K., Dhahbi, J. M., Deans, J. R., Fang, B., Bolotin, E., . . . Sladek, F. M. (2015). Differential Effects of Hepatocyte Nuclear Factor 4a Isoforms on Tumor Growth and T-Cell Factor 4/AP-1 Interactions in Human Colorectal Cancer Cells. *Mol Cell Biol*, 35(20), 3471-3490. doi:10.1128/mcb.00030-15
- Wang, J., Sun, J., Wang, J., Song, Y., Gao, P., Shi, J., . . . Wang, Z. (2016). Long noncoding RNAs in gastric cancer: functions and clinical applications. *OncoTargets and therapy*, 9, 681-697. doi:10.2147/OTT.S95412
- Wang, K., Yuen, S. T., Xu, J., Lee, S. P., Yan, H. H., Shi, S. T., . . . Leung, S. Y. (2014). Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*, 46(6), 573-582. doi:10.1038/ng.2983
- Wang, Q., Liu, G., & Hu, C. (2019). Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology Res*, 12(6), 275-282. doi:10.14740/gr1187

- Wang, X.-T., Wei, W.-Y., Kong, F.-B., Lian, C., Luo, W., Xiao, Q., & Xie, Y.-B. (2012). Prognostic significance of Cdx2 immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis of published literatures. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, *31*(1), 98-98. doi:10.1186/1756-9966-31-98
- Wang, Z., Li, Y., Wu, D., Yu, S., Wang, Y., & Leung Chan, F. (2020). Nuclear receptor HNF4 α performs a tumor suppressor function in prostate cancer via its induction of p21-driven cellular senescence. *Oncogene*, *39*(7), 1572-1589. doi:10.1038/s41388-019-1080-3
- Washington, K. (2010). 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol*, *17*(12), 3077-3079. doi:10.1245/s10434-010-1362-z
- Watt, A. J., Garrison, W. D., & Duncan, S. A. (2003). HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology*, *37*(6), 1249-1253. doi:10.1053/jhep.2003.50273
- Wilbertz, T., Wagner, P., Petersen, K., Stiedl, A. C., Scheble, V. J., Maier, S., . . . Perner, S. (2011). SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol*, *24*(7), 944-953. doi:10.1038/modpathol.2011.49
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., & Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*, *23*(13), 1494-1504. doi:10.1101/gad.1800909
- Winslow, M. M., Dayton, T. L., Verhaak, R. G., Kim-Kiselak, C., Snyder, E. L., Feldser, D. M., . . . Jacks, T. (2011). Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature*, *473*(7345), 101-104. doi:10.1038/nature09881
- Winter, J. A., Letley, D. P., Cook, K. W., Rhead, J. L., Zaitoun, A. A., Ingram, R. J., . . . Atherton, J. C. (2014). A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and Helicobacter pylori-induced metaplasia in the stomach. *J Infect Dis*, *210*(6), 954-963. doi:10.1093/infdis/jiu154
- Wu, Q., Kim, Y. C., Lu, J., Xuan, Z., Chen, J., Zheng, Y., . . . Wang, S. M. (2008). Poly A- Transcripts Expressed in HeLa Cells. *PLOS ONE*, *3*(7), e2803. doi:10.1371/journal.pone.0002803
- Xiang, X., Zhao, X., Qu, H., Li, D., Yang, D., Pu, J., . . . Tong, Q. (2015). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha promotes the invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells via targeting matrix metalloproteinase 14. *Cancer Letters*, *359*(2), 187-197. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.008>
- Xu, T., Wu, K., Zhang, L., Zheng, S., Wang, X., Zuo, H., . . . Zhang, L. (2020). Long non-coding RNA LINC00858 exerts a tumor-promoting role in colon cancer via HNF4 α and WNK2 regulation. *Cellular Oncology*, *43*(2), 297-310. doi:10.1007/s13402-019-00490-8
- Xu, T. P., Huang, M. D., Xia, R., Liu, X. X., Sun, M., Yin, L., . . . Shu, Y. Q. (2014). Decreased expression of the long non-coding RNA FENDRR is associated with poor prognosis in gastric cancer and FENDRR regulates gastric cancer cell metastasis by affecting fibronectin1 expression. *J Hematol Oncol*, *7*, 63. doi:10.1186/s13045-014-0063-7
- Xu, T. P., Liu, X. X., Xia, R., Yin, L., Kong, R., Chen, W. M., . . . Shu, Y. Q. (2015). SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene*, *34*(45), 5648-5661. doi:10.1038/onc.2015.18
- Yagi, O. K., Akiyama, Y., & Yuasa, Y. (1999). Genomic structure and alterations of homeobox gene CDX2 in colorectal carcinomas. *British journal of cancer*, *79*(3-4), 440-444. doi:10.1038/sj.bjc.6690068

- Yang, F., Bi, J., Xue, X., Zheng, L., Zhi, K., Hua, J., & Fang, G. (2012). Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *Febs j*, 279(17), 3159-3165. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x
- Yang, G., Lu, X., & Yuan, L. (2014). LncRNA: A link between RNA and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(11), 1097-1109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.08.012>
- Yang, Z., Guo, X., Li, G., Shi, Y., & Li, L. (2016). Long noncoding RNAs as potential biomarkers in gastric cancer: Opportunities and challenges. *Cancer Lett*, 371(1), 62-70. doi:10.1016/j.canlet.2015.11.011
- Yuan, Y. (2013). A survey and evaluation of population-based screening for gastric cancer. *Cancer biology & medicine*, 10(2), 72-80. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2013.02.002
- Yuasa, Y., Nagasaki, H., Akiyama, Y., Sakai, H., Nakajima, T., Ohkura, Y., . . . Nakachi, K. (2005). Relationship between CDX2 gene methylation and dietary factors in gastric cancer patients. *Carcinogenesis*, 26(1), 193-200. doi:10.1093/carcin/bgh304
- Yuen, S. T., Chung, L. P., Leung, S. Y., Luk, I. S., Chan, S. Y., & Ho, J. (1994). In situ detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*, 18(11), 1158-1163. doi:10.1097/00000478-199411000-00010
- Zhang, B. Y., Jones, J. C., Briggler, A. M., Hubbard, J. M., Kipp, B. R., Sargent, D. J., . . . Grothey, A. (2017). Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 16(2), 124-128. doi:10.1016/j.clcc.2016.09.003
- Zhang, X., Hong, R., Chen, W., Xu, M., & Wang, L. (2019). The role of long noncoding RNA in major human disease. *Bioorganic Chemistry*, 92, 103214. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103214>
- Zhao, J., Liang, Q., Cheung, K. F., Kang, W., Lung, R. W., Tong, J. H., . . . Yu, J. (2013). Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells. *Cancer*, 119(2), 304-312. doi:10.1002/cncr.27724
- Zhen, S., Hua, L., Liu, Y. H., Sun, X. M., Jiang, M. M., Chen, W., . . . Li, X. (2017). Inhibition of long non-coding RNA UCA1 by CRISPR/Cas9 attenuated malignant phenotypes of bladder cancer. *Oncotarget*, 8(6), 9634-9646. doi:10.18632/oncotarget.14176
- Zhu, L., Li, Z., Wang, Y., Zhang, C., Liu, Y., & Qu, X. (2015). Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol*, 3(3), 699-705. doi:10.3892/mco.2015.506

6. Παράρτημα

6.1 Κώδικας δημιουργίας θερμικού χάρτη και διαγράμματος volcano

```
# Heatmap & volcano plot script
# This script creates a heatmap and volcano plot from a given RNA sequencing
# dataset. Statistical calculations and filtering take place before
# outputting the final plots, that are exported in a pdf file.
# Author: Evangelia Katsouli
# email: kats.eva.1996@gmail.com

# Loading packages
library(tidyverse)
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(ggrepel)
library(DESeq2)
library(EnhancedVolcano)
library(magrittr)
library(calibrate)
library(matrixStats)
library(ComplexHeatmap)

# Heatmap
heat_data <- read.table("RNA_seq_dataset.txt", header = TRUE) #Import data
heat_data <- heat_data %>% distinct(gene_name,
                                   .keep_all = TRUE) #Remove duplicate data
heat_data <- data.frame(heat_data, row.names = 1) #Change row names
heat_data <- log(heat_data) #Log2 transformation
data_zscore <- (heat_data - rowMeans(heat_data)) /
               (rowSds(as.matrix(heat_data)))[row(heat_data)] #Z-score
data_zscore <- na.omit(data_zscore) #Omit NaN values
data_zscore <- data.matrix(data_zscore,
                           rownames.force = NA) #Convert df to numeric matrix
pdf(file = "/Users/User/Desktop/Working_dir/Plots.pdf",
    width = 8.3,
    height = 11.7) #Save plot in pdf
Heatmap(data_zscore,
        name = "Heatmap",
        column_title = "Condition",
        row_title = "Genes",
        show_row_names = FALSE) #Create heatmap

# Volcano plot
countdata <- read.table("RNA_seq_dataset.txt", header = TRUE) #Import data
countdata <- countdata %>% distinct(gene_name,
                                   .keep_all = TRUE) #Remove duplicate data
my_data <- data.frame(countdata, row.names = 1) #Change row names
my_data <- as.matrix(my_data) #Convert df to matrix
```

```

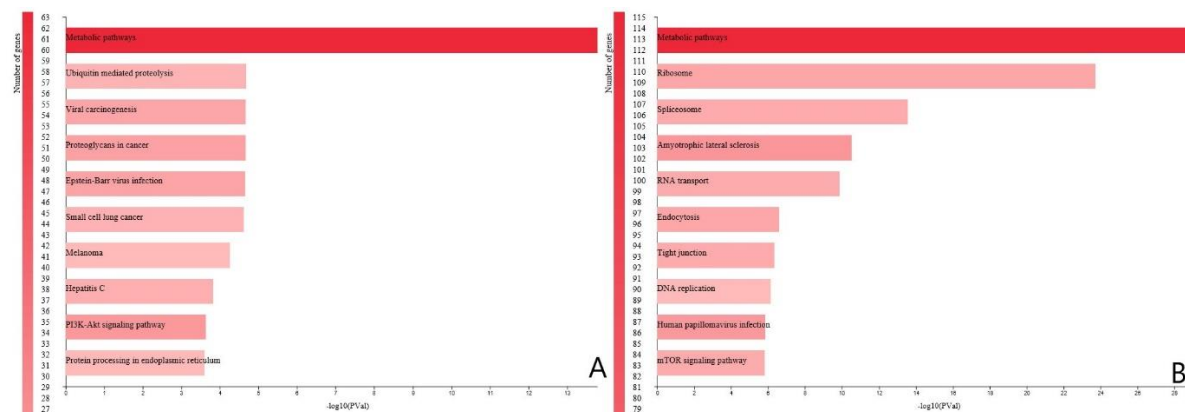
(condition <- factor(c(rep("Ctl", 2), rep("Kd", 2)))) #Assign condition
(coldata <- data.frame(row.names = colnames(my_data), condition))
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = my_data,
                              colData = coldata,
                              design = ~ condition)

dds <- DESeq(dds, betaPrior = FALSE)
res <- results(dds)
table(res$padj < 0.05)
res <- res[order(res$padj),]
resdata <- merge(as.data.frame(res),
                 as.data.frame(counts(dds, normalized = TRUE)),
                 by = "row.names",
                 sort = FALSE)
names(resdata)[1] <- "Gene"
write.table(resdata,
            file = "differential_expression_results.txt",
            row.names = FALSE,
            dec = ",",
            sep = ";",
            quote = FALSE)
resdata <- data.frame(resdata, row.names = 1)
EnhancedVolcano(resdata,
                 lab = rownames(resdata),
                 x = 'log2FoldChange',
                 y = 'pvalue',
                 xlim = c(-10, 10),
                 title = "Volcano plot",
                 subtitle = "Condition",
                 caption = NULL) #Create Volcano plot

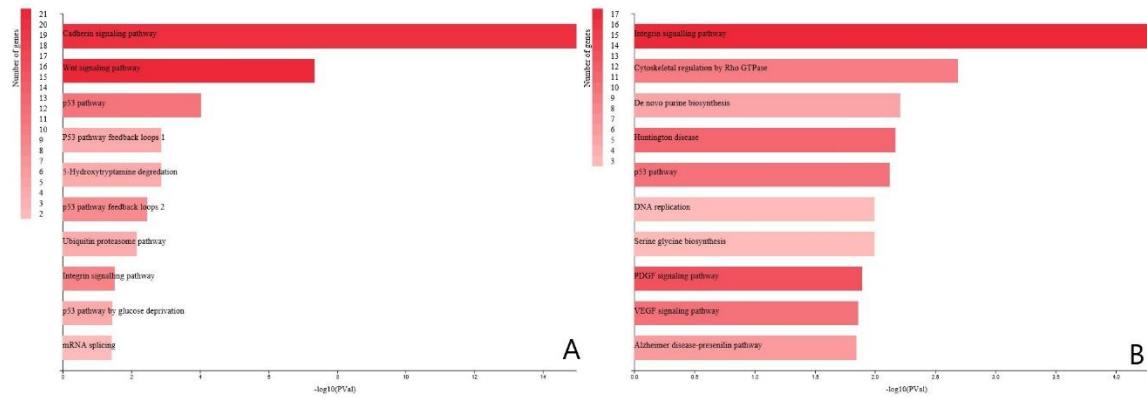
dev.off()

```

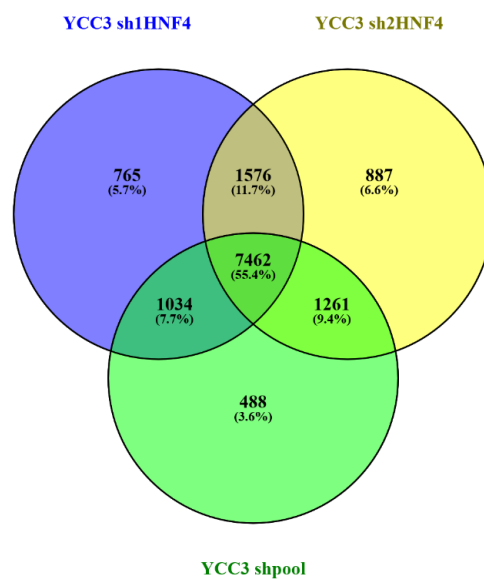
6.2 Συμπληρωματικά αποτελέσματα



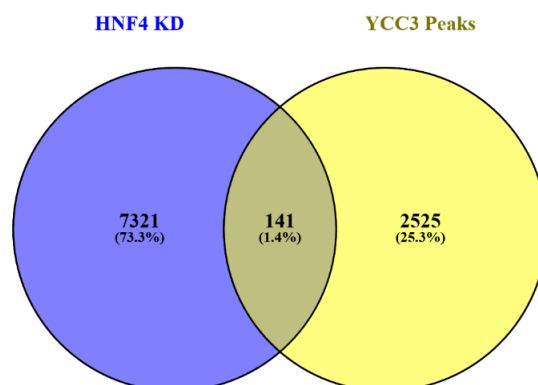
Διάγραμμα 21: Διαγράμματα ανάλυσης οντολογίας τα οποία παρουσιάζουν τα μοριακά μονοπάτια σχετιζόμενα με ασθένειες (KEGG Pathways) στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια που απορρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 (A) και HNF4α (B).



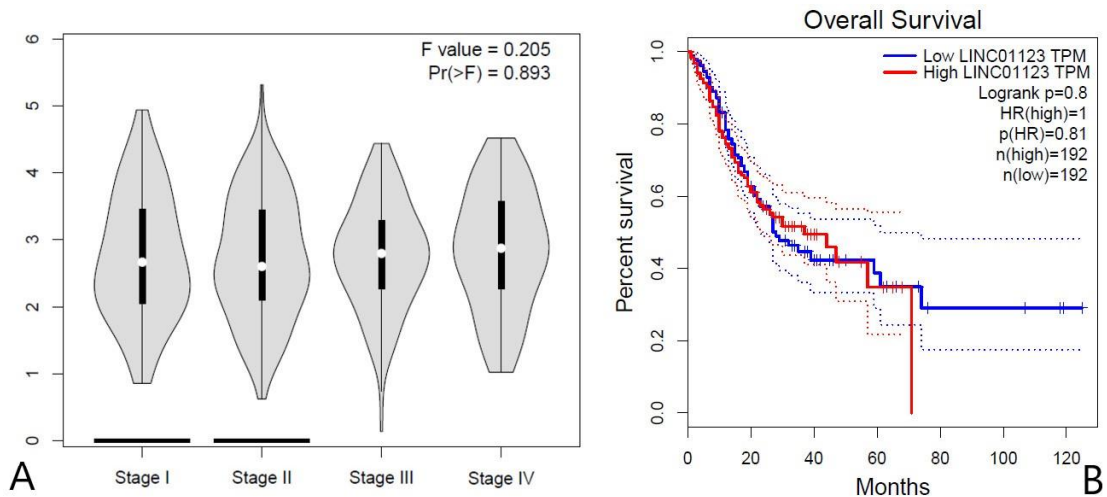
Διάγραμμα 22: Διαγράμματα ανάλυσης οντολογίας στα οποία παρουσιάζονται τα μοριακά μονοπάτια αλληλεπίδρασης των γονιδίων (*Panther pathways*) τα οποία απορρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες *CDX2* (A) και *HNF4a* (B).



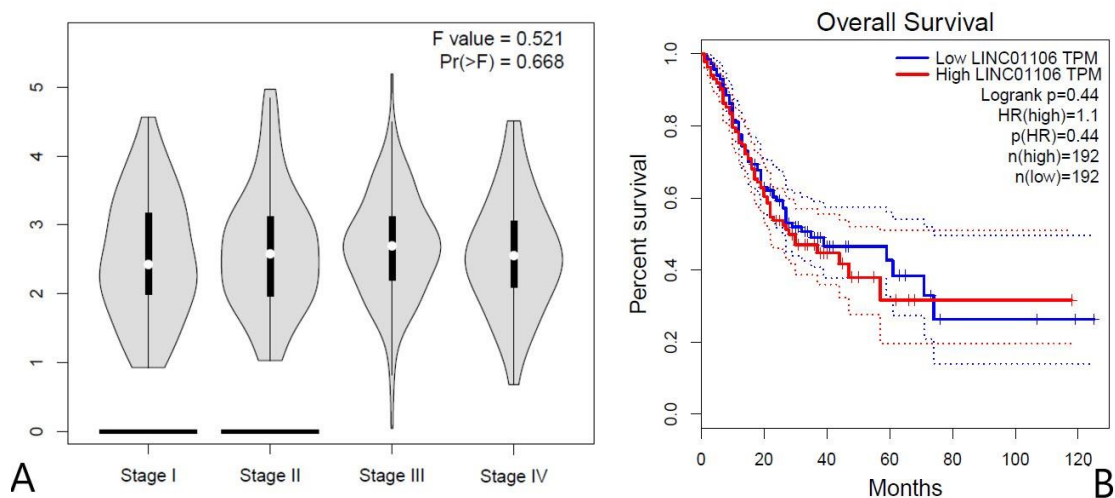
Διάγραμμα 23: Διάγραμμα Venn στο οποίο φαίνονται τα κοινά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στις 3 περιπτώσεις καταστολής του *HNF4a* (*sh1*, *sh2* & *shpool*).



Διάγραμμα 24: Διάγραμμα Venn στο οποίο φαίνονται τα *lncRNAs* στους υποκινητές των οποίων προσδέεται ο *HNF4a* στην κυτταρική σειρά *YCC3* και απορρυθμίζονται στην καταστολή του *HNF4a*.



Διάγραμμα 25: (A) Διάγραμμα έκφρασης του *cRENA 1* στα 4 κλινικά στάδια του γαστρικού αδενοκαρκινώματος. (B) Διάγραμμα Kaplan - Meier στο οποίο φαίνεται το ποσοστό επιβίωσης σε συνάρτηση με το χρόνο των ασθενών με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, οι οποίοι έχουν κατηγοριοποιηθεί σε ασθενείς με υψηλή έκφραση του *cRENA 1* (κόκκινη γραμμή) και σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση του *cRENA 1* (μπλε γραμμή).



Διάγραμμα 26: (A) Διάγραμμα έκφρασης του *cRENA 2* στα 4 κλινικά στάδια του γαστρικού αδενοκαρκινώματος. (B) Διάγραμμα Kaplan - Meier στο οποίο φαίνεται το ποσοστό επιβίωσης σε συνάρτηση με το χρόνο των ασθενών με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, οι οποίοι έχουν κατηγοριοποιηθεί σε ασθενείς με υψηλή έκφραση του *cRENA 2* (κόκκινη γραμμή) και σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση του *cRENA 2* (μπλε γραμμή).