ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΛΟΥΜΑ ΒΑΡΒΑΡΑ-ΡΗΓΙΝΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

“Μελέτη της ρύθμισης των μη κωδικοποιητικών μορίων RNA στην καρκινογένεση”

"Study of the regulation of non-coding RNA molecules in carcinogenesis"

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων Καθηγητής: Αντώνιος Γιακουντής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λιάκος Παναγιώτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στάγκος Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, είχα την τύχη να συνεργαστώ με ανθρώπους, των οποίων η συνεισφορά και η υποστήριξη ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Έτσι, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους αυτούς που συνεισφέραν με το δικό τους τρόπο στην προσπάθεια μου.

Πρωτίστως, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Γιακουντή Αντώνιο, τον επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, όπως και για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου μετέδωσε, το ενδιαφέρον του, τις συμβουλές του, τη συνεχή ενθάρρυνσή του, αλλά και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για να με καθοδηγήσει σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη την περίοδο της συνεργασίας μας, ήταν κίνητρο για τη συνεχή προσπάθεια βελτίωσής μου. Επιπλέον, με βοήθησε στο να αναπτύξω σωστή επιστημονική σκέψη και η μεθοδικότητα και η εργατικότητά του αποτέλεσαν παράδειγμα για εμένα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λιάκο Παναγιώτη και τον κ. Στάγκο Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή μου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, μέσα από την καρδιά μου θέλω να δώσω και στην υποψήφια διδάκτορα Μπεγκόλλι Ελένη-Ροντιόλα για την υπομονή, την πολύτιμη βοήθεια, καθώς και για το χρόνο που διέθετε για να ακούσει τις ανησυχίες μου και για να λύσει κάθε απορία μου. Είναι ένας πολύ ξεχωριστός άνθρωπος που είχα την τύχη να συνεργαστώ. Την ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή της, την εξαιρετική παρέα της και για την άψογη συνεργασία και επικοινωνία που υπήρξε μεταξύ μας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και την άμεση βοήθεια τους σε κάθε ερώτημα και δυσκολία που μου παρουσιαζόταν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου γιατί χωρίς την δική τους στήριξη, την ενθάρρυνσή τους, και την παρουσία τους σε κάθε δύσκολη στιγμή μου δεν θα είχα φτάσει μέχρι εδώ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο που χαρακτηρίζεται από έντονη ετερογένεια ανάμεσα στους ασθενείς και κατηγοριοποιείται σε πολλούς υπότυπους με βάση το ιστολογικό και το μοριακό του υπόβαθρο. Το βασικό πρόβλημα της νόσου έγκειται στην καθυστερημένη διάγνωση, η οποία στα αρχικά στάδια είναι ασυμπτωματική, με αποτέλεσμα την υψηλή συχνότητα εμφάνισης και τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας παγκοσμίως. Συνεπώς, καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη ευαίσθητων και εξειδικευμένων μοριακών βιοδεικτών, καθώς και αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ολοένα και περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται στο μοριακό και γενετικό υπόβαθρο του γαστρικού καρκίνου, ανακαλύπτοντας γονίδια τα οποία εμφανίζουν γενετική ποικιλομορφία ως προς τον αριθμό των αντιγράφων τους στον καρκίνο και χαρακτηρίζονται από ογκογόνο δράση. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4/GATA6/KLF5 οι οποίοι φυσιολογικά δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής γενεαλογίας (lineage-survival factors) αφού εμπλέκονται στη διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων στα αναπτυξιακά στάδια του στομάχου. Επιπρόσθετα, οι ρυθμιστές κυτταρικής γενεαλογίας του εντέρου CDX2/HNF4α έχουν συσχετιστεί με το συχνότερο εντερικό γαστρικό υπότυπο λόγω της συμβολής τους στο φαινόμενο της μετα-διαφοροποίησης στην ταυτότητα του στομάχου που συνήθως προηγείται του κακοήθους μετασχηματισμού. Λόγω της δράσης των παραπάνω μεταγραφικών σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς δεν είναι δυνατή η θεραπευτική τους στόχευση. Κατά συνέπεια, το ενδιαφέρον προσελκύουν γονίδια-στόχοι αυτών των ογκοεπαγωγικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως τα lncRNA, τα οποία παρουσιάζουν ιστοειδική και καρκινοειδική έκφραση.

Η παρούσα εργασία στοχεύει στην μελέτη της ρύθμισης lncRNA από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α στον γαστρικό καρκίνο. Η ρύθμιση των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 από τους μεταγραφικούς ελέγχθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο, όταν καθένας από αυτούς υπερεκφραζόταν καθώς και στην καταστολή μόνο των GATA4/GATA6/KLF5. Τα αποτελέσματα έδειξαν το πιθανό ρυθμιστικό ρόλο των τελευταίων και κυρίως μέσω της συνεργατικής δράσης τους. Επιπλέον, μέσω ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης αποδείχθηκε ότι ο GATA4 είναι άμεσος ρυθμιστής αυτών των lncRNA, κάτι που δεν ήταν δυνατόν να επιβεβαιωθεί και για το GATA6. Ταυτόχρονα, υπό την υπερέκφραση των CDX2/HNF4α μελετήθηκε ο πιθανός ρυθμιστικός ρόλος τους στα cRENA και cRENA2. Όπως και στην περίπτωση των GREAT4-1 και GREAT6-2, φάνηκε ότι αυτοί οι παράγοντες πιθανόν δρουν σαν σύμπλοκο λόγω του κοινού μοτίβου που έχουν στην αλλαγή της έκφρασης των lncRNA. Μελλοντικά απομένει να ελεγχθεί αν οι μεταγραφικοί παράγοντες δημιουργούν μεταγραφικά δίκτυα για τη ρύθμιση της έκφρασης των lncRNA-στόχων πραγματοποιώντας συνδυαστικά πειράματα τόσο υπερέκφρασης όσο και καταστολής. Τέλος, στους απώτερους στόχους περιλαμβάνονται πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, για να επιβεβαιωθεί ποιοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν άμεσα ή έμμεσα τα lncRNA.

Λέξεις-κλειδιά: καρκινογένεση, lineage–survival, μεταγραφικοί παράγοντες, lncRNA, ChIP

ABSTRACT

Gastric cancer is a multifactorial disease characterized by intense heterogeneity among patients and is categorized into many subtypes based on its histological and molecular background. The main problem of the disease lies in the delayed diagnosis, because in the early stages it is asymptomatic, resulting in high incidence and high mortality rates worldwide. Therefore, it is necessary to develop sensitive and specialized molecular biomarkers, as well as effective therapeutic approaches. More and more research is focusing on the molecular and genetic background of gastric cancer, discovering genes that exhibit genetic diversity in the number of copies in cancer and are characterized by oncogenic activity. This category includes the transcription factors GATA4/GATA6/KLF5, which normally act as regulators of cell lineage (lineage-survival factors) since they are involved in the maintenance of specific cell types in the developmental stages of the stomach. In addition, intestinal cell line regulators CDX2/HNF4α have been associated with the most common intestinal gastric subtype due to their contribution to the phenomenon of differentiation in gastric identity that usually precedes malignant transformation. Due to the action of the above transcription factors on normal and cancerous tissues, their therapeutic targeting is not possible. Therefore, the target genes of these oncogenic transcription factors are of interest, such as lncRNAs, which show tissue-specific and cancer-specific expression.

This dissertation aims to study the regulation of lncRNA by the transcription factors GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α in gastric cancer. The regulation of GREAT4-1 and GREAT6-2 lncRNAs by transcription factors was checked at the transcriptional level when each of them was overexpressed as well as in the suppression of GATA4/GATA6/KLF5 only. The results showed the possible regulatory role of the latter and mainly through their collaborative action. In addition, chromatin immunoprecipitation showed that GATA4 is a direct regulator of these lncRNAs, something that could not be confirmed for GATA6. At the same time, under the overexpression of CDX2/HNF4α, their potential regulatory role in cRENA and cRENA2 was studied. As in the case of GREAT4-1 and GREAT6-2, it appeared that these factors probably act as a complex due to their common pattern in altering lncRNA expression. In the future, it remains to be tested whether transcription factors create transcription networks to regulate the expression of lncRNA targets by performing combined experiments, both overexpression, and repression. Finally, the ultimate targets include chromatin immunoprecipitation experiments to confirm which transcription factors directly or indirectly regulate lncRNAs.

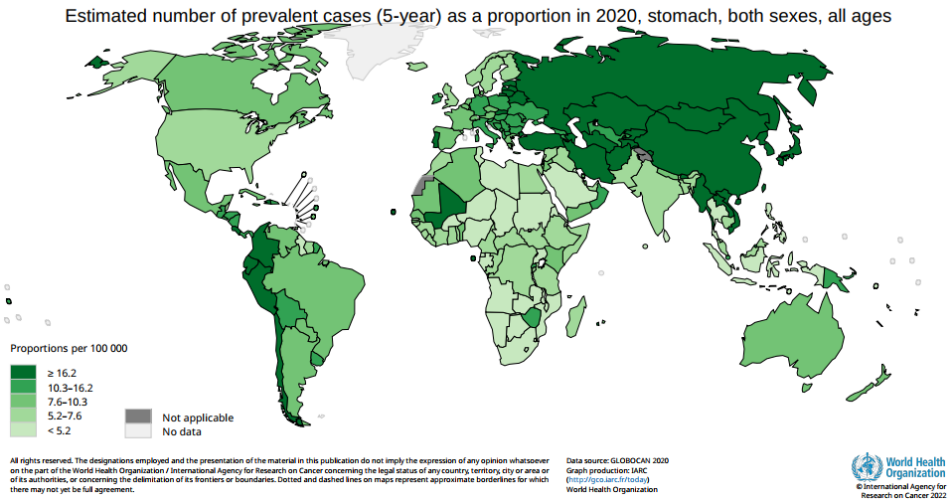
Keywords: carcinogenesis, lineage-survival, transcription factors, lncRNA, ChIP

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γαστρικός καρκίνος

Ο καρκίνος του στομάχου, γνωστός και ως γαστρικός καρκίνος (Gastric Cancer, GC), είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, που επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικά όσο και από γενετικά αίτια [1]. Σύμφωνα με τις τρέχουσες επιδημιολογικές αναλύσεις ο καρκίνος του στομάχου είναι η πέμπτη πιο συχνά διαγνωσμένη κακοήθεια παγκοσμίως. Όσον αφορά την θνησιμότητα, αυτή είναι υψηλή εξαιτίας του συχνά προχωρημένου σταδίου της διάγνωσης καθιστώντας τον καρκίνο του στομάχου την τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου που σχετίζεται με καρκίνο, με 768.793 θανάτους παγκοσμίως το 2020 [2]. Η επίπτωση και ο επιπολασμός του γαστρικού καρκίνου ποικίλλει σημαντικά γεωγραφικά. Αναλυτικότερα, τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρούνται στην Ανατολική Ασία, την Κεντρική Ευρώπη και την Ανατολική Ευρώπη αντιπροσωπεύοντας συνολικά το 87% όλων των νέων περιστατικών της νόσου παγκοσμίως, ενώ σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά παρατηρούνται στην Αφρική και τη Βόρεια Αμερική (**Εικόνα 1**) [3]. Σχετικά με την ηλικία εμφάνισης ο γαστρικός καρκίνος χαρακτηρίζεται ως μία ασθένεια των ηλικιωμένων καθώς εμφανίζεται συνήθως σε ηλικίες μεταξύ 55 και 80 ετών. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι κατά μέσο όρο τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του στομάχου είναι διπλάσια έως τριπλάσια για τους άνδρες από τις γυναίκες [4-6].



Εικόνα 1: ***Παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Ο χρωματικός κώδικας αντιπροσωπεύει την συχνότητα εμφάνισης με τις πιο έντονες αποχρώσεις να υποδεικνύουν και υψηλά ποσοστά*** [3]**.**

Οι κύριες αιτίες για την υψηλή θνησιμότητα του γαστρικού καρκίνου είναι η καθυστερημένη διάγνωση και η ανεπαρκής απόκριση στις διαθέσιμες θεραπευτικές αγωγές πιθανώς λόγω της υψηλής ετερογένειας τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ των διαφορετικών υπότυπων και σταδίων της νεοπλασίας [7]. Όσον αφορά τη κλινική διάγνωση, η ευρέως χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδος είναι η γαστροσκόπηση, η οποία ως μια επεμβατικού τύπου εξέταση, δεν είναι κατάλληλη για προσυμπτωματικό έλεγχο ρουτίνας. Σε αυτές τις περιπτώσεις γίνεται η χρήση παραδοσιακών βιοδεικτών που όμως και αυτοί είναι ακατάλληλοι λόγω έλλειψης ειδικότητας και ευαισθησίας [8]. Γι' αυτούς τους λόγους κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη και χρήση ιδιαίτερα εξειδικευμένων μοριακών δεικτών τα οποία θα μπορούν να λειτουργούν ως μη επεμβατικοί διαγνωστικοί στόχοι για την έγκαιρη ανίχνευση της ασθένειας, αποτελώντας παράλληλα πιθανούς στόχους μελλοντικών θεραπειών [9].

1.1.1 Αιτιολογική βάση του καρκίνου του στομάχου

Περίπου το 10% όλων των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου εμφανίζουν οικογενειακή συνάθροιση (familial aggregation, δηλαδή ομαδοποίηση ορισμένων χαρακτηριστικών, συμπεριφορών ή διαταραχών σε μια δεδομένη οικογένεια λόγω γενετικών, περιβαλλοντικών ή μολυσματικών παραγόντων) και το 1-3% των ασθενών με γαστρικό καρκίνο έχουν μεταλλάξεις βλαστικής σειράς [10, 11]. Ο πιο αναγνωρισμένος τύπος κληρονομικού καρκίνου του στομάχου είναι ο κληρονομικός διάχυτος γαστρικός καρκίνος (Hereditary Diffuse Gastric Cancer, HDGC), ο οποίος σε ποσοστό 30-40% προκαλείται από αλλοιώσεις του γονιδίου *καδχερίνης 1* (*Cadherin 1*, *CDH1*) [12, 13]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ο κίνδυνος γαστρικού καρκινώματος σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό είναι περίπου τρεις φορές υψηλότερος από ό,τι μεταξύ ατόμων χωρίς ιστορικό [12].

Την τελευταία δεκαετία έχει δημιουργηθεί ένας μοριακός-γενετικός κατάλογος “οδηγών” αλλαγών που έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του στομάχου, συμπεριλαμβανομένων μεταλλάξεων γονιδίων, αλλαγών αριθμού σωματικών αντιγράφων (somatic Copy Number Alterations, sCNAs), δομικών παραλλαγών, επιγενετικών αλλαγών και μεταγραφικών αλλαγών που περιλαμβάνουν το “αγγελιαφόρο” RNA (messenger RNA, mRNA) και τα μη-κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNA, ncRNAs) [14].

Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει αναλύσεις σε κλίμακα γονιδιώματος για τον εντοπισμό γονιδίων γαστρικού καρκίνου που επηρεάζονται από το sCNA [15, 16], επισημαίνοντας συγκεκριμένα γονίδια που στοχεύονται από αυτόν τον μηχανισμό. Αναλυτικότερα έχει αναφερθεί ότι τα γονίδια που ενισχύονται συχνά στον καρκίνο του στομάχου σχετίζονται:

α) με τη σηματοδότηση RTK/RAS/MAPK, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *HER2*, *EGFR*, *MET*, *FGFR2* και *RAS* [15, 17]

β) με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων των *CCND1*, *CCNE1* και *CDK6* [14]

γ) με την μεταγραφική ρύθμιση, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA (GATA4, GATA6), KLF5 και MYC [18, 19]. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription Factors, TFs) εκφράζονται στο αναπτυσσόμενο και φυσιολογικό στόμαχο [20] και μπορεί να λειτουργήσουν ως παράγοντες επιβίωσης της γενεαλογίας που λειτουργούν για την εκ νέου αφύπνιση των πρώιμων αναπτυξιακών προγραμμάτων που οδηγούν στην ογκογένεση του γαστρικού καρκίνου. Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατες μελέτες αλληλούχησης ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation-sequencing, ChIP-seq) παρέχουν στοιχεία ότι αυτοί οι TF, μπορεί στην πραγματικότητα να συνεργάζονται μεταξύ τους για να ρυθμίζουν κοινούς καθοδικούς υποκινητές σε γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου [18].

Από την άλλη στον καρκίνο του στομάχου συχνά συμβαίνουν και γονιδιωματικές διαγραφές σε ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως *WWOX*, *RB1*, *PARK2*, *FHIT* και *CDKN2A/B [15]*.

Επιπλέον, στην παθογένεση του καρκίνου του στομάχου και η επιγενετική απορρύθμιση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Συγκεκριμένα υπάρχει μια πλούσια βιβλιογραφία για το γαστρικό καρκίνο που σχετίζεται με τη μεθυλίωση του υποκινητή ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ *CDH1*, *RUNX3*, *p16* και *hMLH1*) και την επακόλουθη μεταγραφική σίγηση αυτών [21]. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να

επηρεάσουν τόσο την εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου όσο και την ανταπόκριση στη θεραπεία [14].

1.1.2 Υπότυποι γαστρικού καρκίνου

Η ιστολογία των γαστρικών νεοπλασιών αποτελεί κριτήριο για την ταξινόμηση των υπότυπων του καρκίνου του στομάχου, επειδή η νεοπλασία μπορεί να ξεκινήσει από διαφορετικά κυτταρικά στρώματα και σε διαφορετική τοπολογία του οργάνου. Επίσης καθοριστικό ρόλο στην συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων καρκινικών τύπων, παίζει και το μοριακό και γενετικό υπόβαθρο με την αντίστοιχη ταξινόμηση να βοηθάει στη πρόγνωση και στην θεραπευτική αντιμετώπιση.

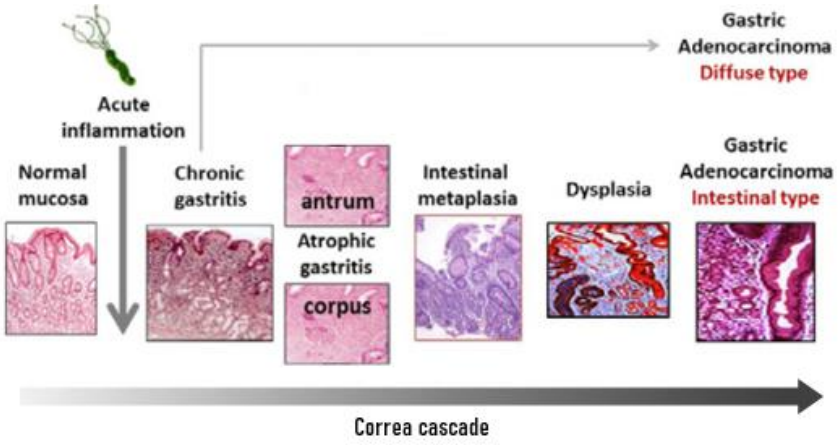
1.1.2.1 Ιστολογική ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Η πλειοψηφία των καρκίνων του στομάχου αφορά αδενοκαρκινώματα (περίπου 90%), τα οποία προέρχονται από τους αδένες του πιο επιφανειακού στρώματος ή του βλεννογόνου του στομάχου [22], με μεγάλη ετερογένεια ως προς την αιτία, την μορφολογία, την διαφοροποίηση των κυττάρων και τα μοριακά χαρακτηριστικά τους [23]. Αυτή η ετερογένεια εξηγεί και την ποικιλία ως προς την ιστοπαθολογική κατηγοριοποίησή τους. Η πλέον επικρατέστερη ιστολογική κατηγοριοποίηση είναι η ταξινόμηση με βάση το σύστημα Lauren.

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης Lauren (1965), ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να διαιρεθεί στον καλά διαφοροποιημένο εντερικό υπότυπο (intestinal type), στον ελάχιστα διαφοροποιημένο διάχυτο υπότυπο (diffuse type) και στον μικτό-ενδιάμεσο/μη ταξινομημένο υπότυπο (mixed-intermediate/unclassifiable type) [24, 25]. Οι διαφορές μεταξύ αυτών των υποκατηγοριών δεν αφορούν μόνο τη μορφολογία αλλά και την επιδημιολογία, το πρότυπο εξέλιξης, τη γενετική και την κλινική εικόνα. Μεταξύ αυτών πιο σπάνιος και λιγότερος επικρατέστερος υπότυπος είναι ο μικτός-ενδιάμεσος/μη ταξινομημένος [26].

Εντερικός υπότυπος

Ο εντερικός υπότυπος είναι ο πιο κοινός τύπος γαστρικού αδενοκαρκινώματος με ποσοστό εμφάνισης 54% περίπου, με μεγαλύτερη συχνότητα στους άντρες [26]. Ιστοπαθολογικά, χαρακτηρίζεται από κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα που παρουσιάζουν συνοχή και σχηματίζουν σωληνοειδείς δομές που μοιάζουν με αδένες [26, 27]. Όσον αφορά τις αλλοιώσεις συνήθως είναι ελκώδεις, εντοπίζονται σε περιοχές του στομάχου που παρουσιάζουν μικρότερη καμπυλότητα και συχνά αναπτύσσονται μετά από χρονοβόρες προκαρκινικές διεργασίες [27]. Αναλυτικότερα τα προκαρκινικά στάδια του εντερικού τύπου καρκίνου του στομάχου αντιπροσωπεύουν μια πολύπλοκη διαδικασία, μέρος της οποίας οδηγεί σε μετασχηματισμό του φυσιολογικού βλεννογόνου σε εντερικό μεταπλαστικό βλεννογόνο μέσω μιας σειράς βλαβών που ορίζεται ως ο καταρράκτης γαστρικής καρκινογένεσης του Correa (**Εικόνα 2**). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι μορφολογικές αλλαγές μπορούν να χωριστούν στα εξής στάδια: χρόνια γαστρίτιδα που σχετίζεται με χρόνια λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (Helicobacter pylori), βλεννογονική απώλεια κατάλληλων γαστρικών αδένων (ατροφία) και αντικατάσταση του γαστρικού επιθηλίου με εντερικό επιθήλιο (εντερική μεταπλασία) [28]. Στη συνέχεια με διαδοχικές μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γόνιδια, τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα αντικαθίστανται από κύτταρα με εντερικό φαινότυπο, τα οποία με την πάροδο του χρόνου αποκτούν αυτονομία, ευνοώντας την ανάπτυξη δυσπλαστικών αλλαγών (ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία) και τελικά γαστρικό αδενοκαρκίνωμα [29].



Εικόνα 2: ***Η πορεία παθογένεσης του εντερικού τύπου γαστρικού αδενοκαρκινώματος κατά Correa.***

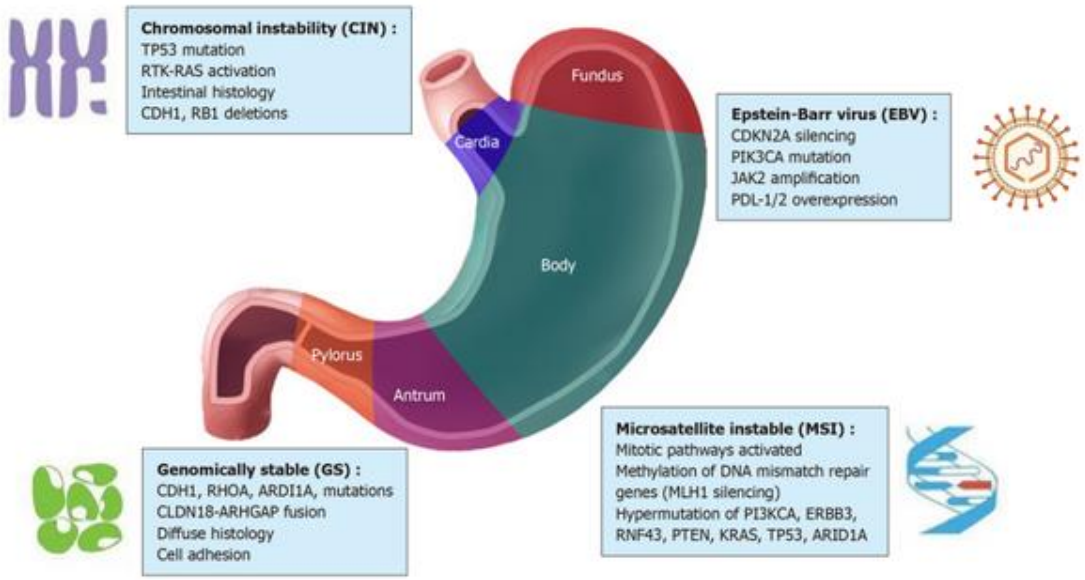
<u>Διάχυτος υπότυπος</u>

Από την άλλη ο διάχυτος υπότυπος παρατηρείται σε ποσοστό 32% στο σύνολο των περιπτώσεων, χαρακτηρίζεται από καρκινικά κύτταρα που παρουσιάζουν κακή διαφοροποίηση και μικρή κυτταρική συνοχή, με αποτέλεσμα να προκαλείται "ακανόνιστη" διήθηση στο τοίχωμα του στομάχου και να αποτρέπεται ο σχηματισμός συμπαγούς μάζας από μεμονωμένα κύτταρα [27, 30]. Η συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των δύο φύλων φαίνεται να είναι παρόμοια με αυξημένα ποσοστά σε νεαρές ηλικίες έναντι του εντερικού υπότυπου. Δυστυχώς, η μοριακή αιτιολογία του διάχυτου γαστρικού καρκίνου παραμένει πολύ πιο ασαφής, αλλά πιθανόν στηρίζεται σε κληρονομικούς και γενετικούς παράγοντες [30]. Επιπρόσθετα, φαίνεται να προκύπτει απευθείας από χρόνια γαστρίτιδα, χωρίς τα ενδιάμεσα στάδια της ατροφικής γαστρίτιδας και της γαστρικής εντερικής μεταπλασίας όπως συμβαίνει στον γαστρικό καρκίνο εντερικού τύπου [31]. Και σε αυτόν τον τύπο γαστρικού καρκίνου η χρόνια γαστρίτιδα που προκαλείται από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού είναι επίσης ένας παράγοντας κινδύνου [32].

1.1.2.2 Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Η ταυτοποίηση των διάφορων υπότυπων του γαστρικού καρκίνου σε μοριακό επίπεδο και η αξιοποίηση των διαφορών στο καρκινικό γονιδίωμα των όγκων δύναται να αξιοποιηθεί ως κριτήριο για την ομαδοποίηση των όγκων σε διαφορετικές υποκατηγορίες, βελτιώνοντας την πρόγνωση, την έκβαση της ασθένειας αλλά και την ανάπτυξη μίας πιο εξατομικευμένης θεραπείας για τον ασθενή.

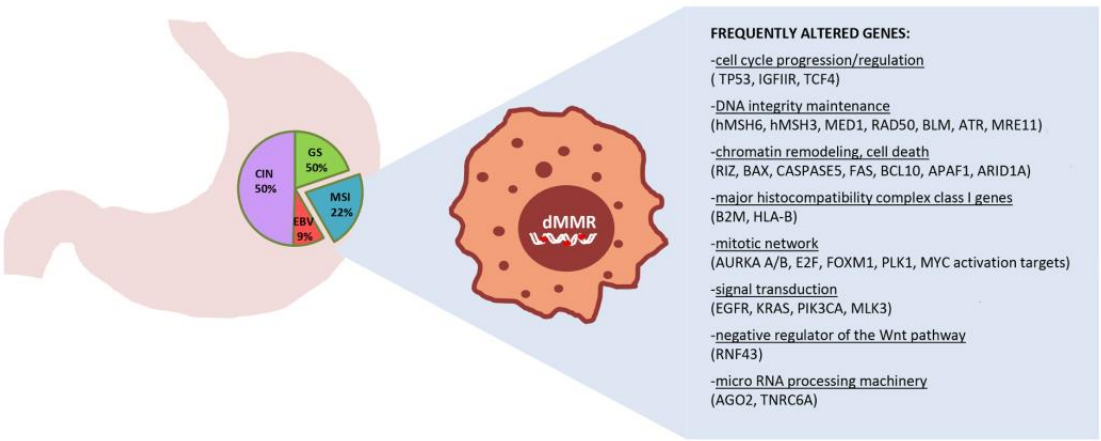
Μια ευρέως διαδεδομένη μοριακή ταξινόμηση προτάθηκε από την ερευνητική κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA) το 2014 [17]. Σύμφωνα με αυτό το σύστημα ταξινόμησης, τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις γονιδιωματικούς υπότυπους (**Εικόνα 3**): όγκοι μικροδορυφορικά ασταθείς (Microsatellite instable, MSI), όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (Epstein-Barr virus positive / EBV^+), όγκοι γονιδιωματικά σταθεροί (Genomically Stable, GS) και όγκοι χρωμοσωμικά ασταθείς (Chromosomal Instability, CIN) [33].



Εικόνα 3: ***Μοριακή ταξινόμηση υπότυπων καρκίνου του στομάχου με βάση την ανάλυση TCGA και οι μοριακές τροποποιήσεις που παρατηρούνται*** [34]**.**

<u>Όγκοι μικροδορυφορικά ασταθείς (Microsatellite instable, MSI)</u>

Το MSI ορίζεται ως ένας υπερ-μεταβλητός φαινότυπος που εμφανίζεται στο γονιδίωμα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, στους μικροδορυφόρους (Microsatellites, MS), παρουσία ελλιπούς μηχανισμού επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων (deficient MisMatch Repair, dMMR) [35]. Χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου τύπου είναι η αυξημένη μεθυλίωση των νησίδων CpG (CpG island methylator phenotype-CIMP) με πιο συχνά παρατηρούμενη τροποποίηση την επιγενετική σίγηση του γονιδίου *MLH1*, που κωδικοποιεί για ένα ένζυμο επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων, ως αποτέλεσμα της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου [36]. Επιπρόσθετα, στους γαστρικούς καρκίνους με μικροδορυφορική αστάθεια έχει παρατηρηθεί υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων σε κινάσες τυροσίνης όπως PIK3CA, ERBB3, ERBB2 και EGFR. Επίσης, από την ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε από το TCGA βρέθηκαν 37 γονίδια που έχουν μεταλλαχθεί σημαντικά σε αυτόν τον μοριακό υπότυπο. Αναλυτικότερα αυτά τα γονίδια εμπλέκονται σε μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών (**Εικόνα 4**) όπως στην πρόοδο/ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στη διατήρηση της ακεραιότητας του DNA, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, στον κυτταρικό θάνατο, στη μεταγραφική ρύθμιση και στη μεταγωγή σήματος [37].



Εικόνα 4: ***Αναπαράσταση των πιο συχνά μεταβαλλόμενων γονιδίων στο υπότυπο MSI του γαστρικού καρκίνου και των διάφορων μοριακών υπότυπών του (CIN, GS, EBV, MSI) με τα ποσοστά τους σύμφωνα με την μελέτη TCGA (dMMR = deficient MisMatch Repair system)*** [37].

<u>Όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (Epstein-Barr virus-positive / EBV+)</u>

Σύμφωνα με μετα-ανάλυση, που διεξήχθη το 2009 και στην οποία συμμετείχαν 9.738 ασθενείς με γαστρικό καρκίνο από 48 μελέτες, φάνηκε ότι το ποσοστό μόλυνσης από τον ιό Epstein-Barr είναι 8,8%. Ο συγκεκριμένος μοριακός υπότυπος είναι πιο συχνός σε νεότερους άνδρες ασθενείς, ανατομικά βρίσκεται σε εγγύς τμήματα του στομάχου —πιο συχνά στην καρδιά και στο γαστρικό σώμα— και ιστολογικά σχετίζεται με τον διάχυτο τύπο γαστρικού αδενοκαρκινώματος κατά Lauren [38]. Στους θετικούς όγκους για τον ιό Epstein-Barr έχει παρατηρηθεί υψηλή έκφραση εννέα καλά αναγνωρισμένων ιικών γονιδίων (*BARF0*, *BARF1*, *BcLF1*, *BHRF1*, *BLLF1*, *BRLF1*, *BZLF1*, *EBNA1* και *LMP2A*) από τα οποία τα *BARF1*, *BHRF1* και *LMP2A* παρουσιάζουν και ογκογόνο δυναμικό. Ειδικότερα, η έκφραση του *LMP2A* έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην ανοδική ρύθμιση της πρωτεΐνης survivin [το μικρότερο μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών του αναστολέα της απόπτωσης (Inhibitor of apoptosis, IAP)], η οποία συμβάλει στη διασφάλιση της κυτταρικής επιβίωσης και ενεργοποιεί την κυτταρική μεθυλοτρανσφεράση DNMT3b (DNA Methyltransferase 3 Beta, DNMT3b), προκαλώντας μεθυλίωση σε όλο το γονιδίωμα στα κύτταρα του ξενιστή [39]. Γενικά, για αυτόν τον τύπο γαστρικού καρκίνου υπάρχουν ενδείξεις για συσχέτιση με αυξημένη μεθυλίωση των νησίδων CpG [40]. Συγκεκριμένα, παρατηρείται καθολικά υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *CDKN2A*, που κωδικοποιεί την p16INK4a, μια πρωτεΐνη-αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin-dependent kinases, CDKs). Επιπλέον, σ' αυτή την κατηγορία σημαντικό ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων παρατηρούνται στο γονίδιο *PIK3CA* (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha, PIK3CA) (σε ποσοστό 80%) που συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την αύξηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση [41]. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο *ARID1A*, που συμμετέχει μέσω αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στην ενεργοποίηση της έκφρασης, στο αντι-αποπτωτικό γονίδιο *BCOR*, και σπανιότερα στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*. Αυξημένη έκφραση, λόγω γονιδιωματικής ενίσχυσης, παρατηρήθηκε στα γονίδια *JAK2*, που συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και *PD-L1/2* τα οποία λειτουργούν ως ανοσοκαταστολείς. Τέλος, με βάση αυτά τα ευρήματα, οι αναστολείς JAK2 και οι ανταγωνιστές PD-L1/2 θα μπορούσαν να διερευνηθούν ως επιλογές θεραπείας σε όγκους θετικούς για EBV [17].

<u>Όγκοι γονιδιωματικά σταθεροί (Genomically Stable, GS)</u>

Ο υπότυπος GS χαρακτηρίζεται από χαμηλά ποσοστά μετάλλαξης και από μικρό βαθμό αλλοιώσεων σε αριθμό αντιγράφων συγκεκριμένων γενετικών τόπων, συνεπώς είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί με βάση το πρότυπο των γονιδιακών μεταλλάξεων του. Ωστόσο, πολλές περιπτώσεις GS ταξινομούνται ως διάχυτος τύπος σύμφωνα με την ταξινόμηση Lauren [42]. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την μελέτη του TCGA για γαστρικό καρκίνο που έδειξε ότι το 73% των περιπτώσεων διάχυτου τύπου μπορούν να ταξινομηθούν ως υπότυπος GS, υποδηλώνοντας ότι τα γενετικά χαρακτηριστικά του GS σχετίζονται με τον διάχυτο φαινότυπο [17]. Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο υπότυπων είναι οι συχνές μεταλλάξεις στα γονίδια *CDH1* και *RHOA* [43]. Το γονίδιο *CDH1* κωδικοποιεί για το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης Ε-καδερίνη. Το γονίδιο *RHOA* κωδικοποιεί για ένα μέλος της οικογένειας των Rho μικρών GTPases που προάγουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και ρυθμίζουν το

σχήμα, την προσκόλληση και την κινητικότητα των κυττάρων. Δεδομένου του ρόλου του γονιδίου *RHOA* στην κινητικότητα των κυττάρων, η τροποποίηση του *RHOA* μπορεί να συμβάλει στα διαφορετικά μοτίβα ανάπτυξης και στην έλλειψη κυτταρικής συνοχής που είναι χαρακτηριστικά των διάχυτων όγκων [17].

Όγκοι χρωμοσωμικά ασταθείς (Chromosomal Instability, CIN)

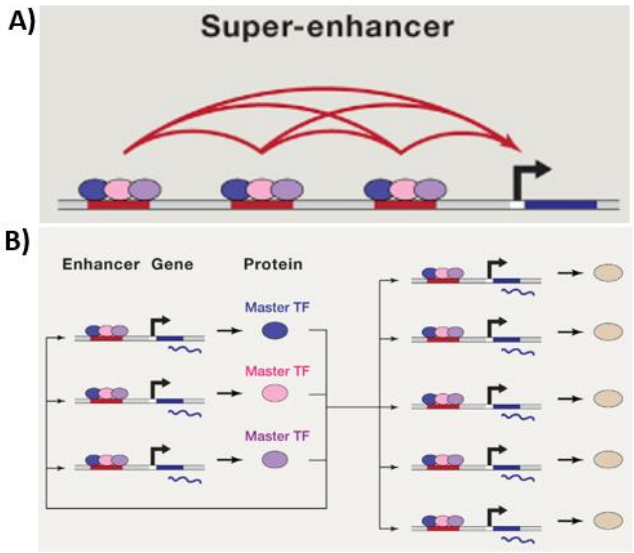
Η χρωμοσωμική αστάθεια μπορεί να αποτελεί μια μεταβολή στο αριθμό των χρωμοσωμάτων, ο οποίος μπορεί να είναι μειωμένος ή ενισχυμένος με αποτέλεσμα την ανευπλοειδία [44]. Οι συγκεκριμένοι όγκοι συσχετίζονται συχνότερα με τον εντερικό υπότυπο σύμφωνα με την ταξινόμηση Lauren, φιλοξενούν μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *P53* και ενεργοποιούν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης (Receptor tyrosine kinases, RTKs) [17]. Η τελευταία κατηγορία γονιδίων αντιστοιχεί περίπου στο 37% όλων των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη γονιδιωματική ενίσχυση των γονιδίων *EGFR*, *FGFR2*, *HER2* και *MET* [15, 45]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στον καρκίνο του στομάχου όπου παρατηρείται χρωμοσωμική αστάθεια ενισχύεται η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο (*CCNE1*, *CCND1*, *CDK6*) καθώς επίσης παρατηρείται και αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μεταγραφικών παραγόντων όπως MYC, GATA4 και GATA6, όπως έχει ήδη αναφερθεί [17].

1.2 Ογκογονίδια προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας

Για πολλά χρόνια έχει επικρατήσει η άποψη ότι η πολύπλοκη διαδικασία της ανάπτυξης και προόδου του καρκίνου είναι αποτέλεσμα της εξάρτησης ορισμένων καρκινικών κυττάρων από μία μόνο ενεργοποιημένη ογκογόνο πρωτεΐνη ή μονοπάτι για τη διατήρηση του πολλαπλασιασμού και/ή της επιβίωσης [46].

Τα τελευταία χρόνια, όμως, έχει προταθεί ένα άλλο μοντέλο για την προαγωγή της ογκογένεσης, το επονομαζόμενο μοντέλο εξάρτησης από τη γενεαλογία των κυττάρων (lineage-addiction), που έχει περιγραφεί από τους Garraway και Sellers. Με βάση αυτή την προσέγγιση τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται από μηχανισμούς επιβίωσης που προγραμματίζονται σε πρόδρομα κύτταρα γενεαλογίας κατά την ανάπτυξη, τα οποία μπορεί να επηρεαστούν από επίκτητες γενετικές αλλοιώσεις. Οι μηχανισμοί αυτοί ελέγχονται από ογκογονίδια κυτταρικής γενεαλογίας (lineage-survival oncogenes) και συχνά εμφανίζουν διαταραγμένη λειτουργία στον καρκίνο, ενώ οι γενετικοί τους τόποι ενισχύονται σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες ως επί το πλείστον δρουν ως πρωτοπόροι (pioneer) μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση μιας συγκεκριμένης γενεαλογίας κυττάρων κατά την ανάπτυξη [47, 48]. Συνεπώς, η ταυτότητα του εκάστοτε διαφοροποιημένου τύπου κυττάρου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη συνδυαστική δράση τέτοιων μεταγραφικών παραγόντων. Μεταξύ αυτών ένας μικρός αριθμός κυρίων μεταγραφικών παραγόντων (Master Transcription Factors, MTFs), που ονομάζονται ρυθμιστές γενεαλογίας (lineage regulators), είναι επαρκείς για να τεθεί ο έλεγχος των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης που ορίζουν την ταυτότητα των κυττάρων [49]. Το χαρακτηριστικό αυτών των μεταγραφικών είναι ότι τείνουν να αλληλοεπιδρούν με ρυθμιστικά στοιχεία εντός υπερ-ενισχυτών (Super-Enhancer, SE), μαζί με άλλους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες δημιουργώντας μεταγραφικά δίκτυα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5Α**. Οι υπερ-ενισχυτές αφορούν ρυθμιστικές γονιδιωματικές περιοχές, που συγκροτούνται από ομάδες ενισχυτών και προσελκύουν μια σειρά παραγόντων μεταγραφής, αλλά και μεσολαβητών (mediators), διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στην οργάνωση των προτύπων έκφρασης γονιδίων

που ρυθμίζουν την ταυτότητα των κυττάρων [50-52]. Αυτές οι γονιδιωματικές περιοχές είναι πολύ σημαντικές, διότι η διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας και της δυναμικής των κυτταρικών καταστάσεων εξαρτάται από σήματα που λαμβάνονται από το μικροπεριβάλλον των ιστών τα οποία τελικά επάγουν μεταγραφικές αποκρίσεις μέσω αυτών των ιστοειδικών ενισχυτών [49]. Μία άλλη ιδιότητα των MTF είναι ότι μπορούν να ρυθμίζουν και τα δικά τους γονίδια μέσω ενός αυτορρυθμιστικού βρόχου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5Β** [53].



Εικόνα 5: ***Βασικά Χαρακτηριστικά των κυρίων μεταγραφικών παραγόντων (Master Transcription Factors, MTFs).*** **Α)** Απεικονίζεται η συν-πρόσδεση MTF σε ένα υπερ-ενισχυτή (Super-Enhancer, SE) και με κόκκινα τόξα υποδεικνύονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενισχυτών του SE καθώς και μεταξύ του SE και ενός γονιδίου στόχου. **Β)** Αναπαρίσταται ένα μοντέλο ρυθμιστικού πυρήνα ειδικού για έναν κυτταρικό τύπο, στο οποίο τα κύρια TF συν-ρυθμίζουν τα δικά τους γονίδια, σχηματίζοντας έναν διασυνδεδεμένο αυτορρυθμιστικό βρόχο (αριστερά), όπως και πολλών άλλων γονιδίων ειδικών του κυτταρικού τύπου (δεξιά) [49].

Όσον αφορά τον καρκίνο, έχει αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, τα ογκογονίδια επιβίωσης της γενεαλογίας μπορούν να απορρυθμιστούν. Αυτή η έκτοπη απορρύθμιση προκύπτει από γενετικές αλλοιώσεις που καθορίζουν την ασθένεια είτε έμμεσα, μέσω μετάλλαξης σε παράγοντες σηματοδότησης που συγκλίνουν στον μεταγραφικό έλεγχο, είτε άμεσα, μέσω γενετικών αλλαγών στους ίδιους τους παράγοντες ελέγχου ενός γονιδίου. Οι γενετικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με τον καρκίνο μπορούν να επηρεάσουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σχεδόν σε όλα τα επίπεδα μεταγραφικού ελέγχου, συμπεριλαμβανομένων των *trans*-παραγόντων (παράγοντες μεταγραφής, πρωτεΐνες σηματοδότησης, συμπαράγοντες, ρυθμιστές χρωματίνης και πρωτεΐνες δομής χρωμοσωμάτων) και *cis*-στοιχείων (ενισχυτές, υποκινητές και μονωτές). Είναι γνωστό ότι οι γενετικές ανωμαλίες επαναπρογραμματίζουν πάντα το μεταγραφικό σύστημα προκειμένου να εδραιωθεί και να διατηρηθεί η καρκινική ταυτότητα/κατάσταση [49]. Αποδεικνύεται ότι αυτά τα απορρυθμισμένα μεταγραφικά προγράμματα στον καρκίνο επάγονται από ένα δίκτυο διασυνδεδεμένων MTF που σχηματίζουν αυτορρυθμιστικούς βρόχους θετικής ανατροφοδότησης και λειτουργούν με συνδυαστικό τρόπο για να ενισχύσουν την έκφραση των γονιδίων που προάγουν την νεοπλασία. Ένα τέτοιο παράδειγμα συνιστά ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας KLF5 που εμφανίζεται ως κοινός πυρήνας μεταγραφικών παραγόντων τόσο στο αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου (Esophageal Adenocarcinoma, EAC) όσο και στο οισοφαγικό πλακώδες κυτταρικό καρκίνωμα (Esophageal Squamous-Cell Carcinoma, ESCC), αν και τα συνεργατικά MTF είναι

πολύ διαφορετικά. Επιπλέον, το KLF5 φαίνεται ότι συμμετέχει και σε μια αμοιβαία διασταυρούμενη αλληλεπίδραση με τους συνεργαζόμενους παράγοντες GATA4 και GATA6 για τη διατήρηση ενός ογκογόνου μεταγραφικού ρυθμιστικού δικτύου στον καρκίνο του στομάχου [54].

Εκτός των GATA και KLF μεταγραφικών παραγόντων, η έκτοπη έκφραση των μελών της οικογένειας homeobox τύπου Caudal (Caudal Type Homeobox, Cdx), προάγει τον καρκίνο, όπως αποδεικνύεται από τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα CDX2 (Caudal-type homeobox 2), που οδηγεί σε εντερική μεταπλασία πριν την εμφάνιση ενός υπότυπου του καρκίνου του στομάχου και του οισοφάγου [55].

1.2.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA

1.2.1.1 Χαρακτηριστικά των μεταγραφικών παραγόντων GATA

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας GATA είναι μια ομάδα εξελικτικά διατηρημένων μεταγραφικών ρυθμιστών που παίζουν κρίσιμους ρόλους στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Στα σπονδυλωτά, η οικογένεια GATA περιλαμβάνει έξι μέλη (που ονομάζονται GATA1 έως -6) που μπορούν να χωριστούν σε δύο υποομάδες με βάση τα χωρικά και χρονικά πρότυπα έκφρασής τους. Πιο συγκεκριμένα, οι GATA1/2/3 εκφράζονται σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ οι πρωτεΐνες GATA4/5/6 βρίσκονται κυρίως σε ιστούς μεσοδερμικής και ενδοδερμικής προέλευσης όπως η καρδιά, το έντερο, ο στόμαχος και οι γονάδες (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) [56]. Όλες οι πρωτεΐνες GATA περιέχουν μια υψηλά συντηρημένη επικράτεια δέσμευσης DNA που αποτελείται από δύο δακτύλους ψευδαργύρου που μεσολαβούν όχι μόνο για τη δέσμευση στο DNA αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και/ή συμπαράγοντες. Μέσω της συντηρημένης επικράτειας τους αναγνωρίζουν και προσδένονται στο μοτίβο της αλληλουχίας DNA (A/T)GATA(A/G) από το οποίο έχουν λάβει και το όνομά τους [57].

1.2.1.2 Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων GATA σε γαστρεντερικούς καρκίνους

Εκτός από τη φυσιολογική ανάπτυξη, οι πρωτεΐνες GATA έχουν προταθεί ότι σχετίζονται με μία ευρεία ποικιλία καρκίνων στον άνθρωπο. Ειδικότερα, η απορρύθμιση των GATA μεταγραφικών παραγόντων λόγω μετάλλαξης, υπερέκφρασης, απώλεια έκφρασης (συχνή είναι η περίπτωση της επιγενετικής σίγησης), ή λόγω αλληλεπίδρασης με κάποια πρωτεΐνη, έχει συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα όγκων, συμπεριλαμβανομένων της λευχαιμίας, του καρκίνου του μαστού και των καρκίνων του γαστρεντερικού [57]. Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα, παρουσία γαστρεντερικής φλεγμονής, όπως η οισοφαγίτιδα και η γαστρίτιδα, η ανανέωση του φυσιολογικού ιστού διαταράσσεται, οδηγώντας πιθανώς σε ανάπτυξη νεοπλαστικού ιστού. Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση των GATA4 και GATA6 φαίνεται να αυξάνεται σε δύο προκαρκινικές βλάβες όπως ο οισοφάγος Barrett και οι εντερικές μεταπλασίες του στομάχου [20]. Πράγματι, οι συγκεκριμένοι TF έχει αποδειχθεί ότι ενισχύονται στο 30% των γαστρικών και οισοφαγικών αδενοκαρκινωμάτων [19]. Ακόμη, οι GATA4 και GATA6 εκφράζονται σε υπερπλαστικά νευροενδοκρινικά κύτταρα που σχετίζονται με ατροφική γαστρίτιδα. Σε αντίθεση με τις μεταπλασίες της εγγύς γαστρεντερικής οδού, ο GATA4 δεν ανιχνεύεται σε όγκους του παχέος εντέρου, ενώ ο GATA6 εκφράζεται μέτρια στα αδενώματα του παχέος εντέρου, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό στα καρκινώματα [20]. Ενώ, μέχρι σήμερα, δεν έχουν ανακαλυφθεί μεταλλάξεις ή διαγραφές των γονιδίων *GATA4* και *GATA5* σε ανθρώπινους καρκίνους, μία μελέτη έχει προτείνει ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *GATA4* με μεθυλίωση θα μπορούσε να είναι κρίσιμη κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Συνεπώς, θα ήταν δυνατή η υπόθεση ότι ο GATA4, εκτός από την προώθηση της κυτταρικής διαφοροποίησης στο

ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα, εμπλέκεται επίσης στην καταστολή της ανώμαλης ανάπτυξης στην εγγύς γαστρεντερική οδό [58]. Ομοίως, και ο ρόλος του GATA6 στις νεοπλασίες είναι αμφιλεγόμενος. Για παράδειγμα, ο GATA6 υπάρχει στα αδενώματα του φλοιού των επινεφριδίων, αλλά μειώνεται στα καρκινώματα, υποδηλώνοντας ότι επίσης ο GATA6 μπορεί να μεθυλιωθεί κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης [59]. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι GATA4/6 θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως ογκοεπαγωγικές ή ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες ανάλογα με τον ιστό και τον κυτταρικό τύπο. Παρόλα αυτά στον καρκίνο του στομάχου φαίνεται να έχουν επαγωγικό ρόλο στην ογκογένεση, καθώς όπως προαναφέρθηκε έχει παρατηρηθεί γονιδιωματική ενίσχυση των γονιδίων *GATA4/6* σε ποσοστό 30% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων.

1.2.2 Οι μεταγραφικοί παράγοντες KLF (Kruppel-Like Factor)

1.2.2.1 Χαρακτηριστικά των μεταγραφικών παραγόντων KLF

Από την ταυτοποίηση του *EKLF* (επίσης γνωστό ως *KLF1*) ως ομόλογο σε θηλαστικό του γονιδίου Drosophila melanogaster *Krüppel* το 1993 [60], έχει εμφανιστεί μια ποικιλόμορφη οικογένεια ομόλογων γονιδίων, τώρα γνωστή ως οικογένεια παράγοντα τύπου Krüppel (KLF), που στον άνθρωπο απαρτίζεται από 17 μέλη [61].

Δομικά, όλες οι πρωτεΐνες KLF επιδεικνύουν ομολογία στις καρβοξυτελικές περιοχές δακτύλου ψευδάργυρου τους που επιτρέπουν στους παράγοντες KLF να δεσμεύουν θέσεις πλούσιες σε GC σε περιοχές υποκινητή και ενισχυτή των γονιδίων που ρυθμίζουν. Ως προς το αμινοτελικό άκρο διαφέρουν ανάλογα αν σε αυτό εντοπίζεται ένας τομέας ενεργοποίησης ή καταστολής. Αυτή η απόκλιση στο αμινοτελικό άκρο επιτρέπει, επίσης, τη σύνδεση διαφορετικών συν-ενεργοποιητών, συν-καταστολέων ή άλλων συμπαραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων τροποποίησης της ιστόνης, με αποτέλεσμα μία πρόσθετη λειτουργική ποικιλομορφία στα μέλη των μεταγραφικών παραγόντων KLF. Συνεπώς, μια άλλη πιθανή ομαδοποίηση είναι με βάση το λειτουργικό τους ρόλο, διαιρώντας τις πρωτεΐνες KLF σε μετα-ενεργοποιητές και καταστολείς [61]. Πρέπει, επίσης, να αναφερθεί ότι μπορεί να παρατηρηθούν πρόσθετες αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης και λόγω του εναλλακτικού ματίσματος ορισμένων KLF [62].

Όσον αφορά τα πρότυπα έκφρασης τους στους ιστούς, φαίνεται ότι αυτά ποικίλλουν. Ειδικότερα, ορισμένα μέλη εκφράζονται παντού (π.χ. KLF6, 10 και 11), ενώ άλλα εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς όπως για παράδειγμα ο KLF4 και KLF5 που είναι πολύ άφθονα στο γαστρεντερικό σωλήνα (για αυτό θα γίνει περισσότερο αναφορά για αυτά τα δύο μέλη στη συνέχεια) [63]. Αυτό, επομένως, οδηγεί σε ορισμένες περιπτώσεις οι λειτουργίες των 17 μελών της οικογένειας του KLF να αλληλοεπικαλύπτονται και σε άλλες ευρέως να αποκλίνουν.

Γενικά, όμως, όλες οι πρωτεΐνες KLF μοιράζονται κοινούς μηχανισμούς ρύθμισης, στρατολογώντας μεταγραφικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς, και άλλες πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης [61].

1.2.2.2 Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων KLF σε γαστρεντερικούς καρκίνους

Καθώς οι KLFs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των θηλαστικών, στη βιολογία των βλαστοκυττάρων και στην κυτταρική αναγέννηση (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ), δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι έχουν εμπλακεί και στη βιολογία του καρκίνου. Αυτό μπορεί να γινεί κατανοητό και από το γεγονός ότι οι KLF έχουν άμεσο αντίκτυπο σχεδόν σε κάθε φάση της καρκινογένεσης όπως στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στη σηματοδότηση Wnt/β-κατενίνης (έλεγχο του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού, της αύξησης, της μετανάστευσης και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων), στη σηματοδότηση RAS (ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την γονιδιακή έκφραση), στη σηματοδότηση NOTCH (ρόλο σε ένα εύρος αναπτυξιακών διαδικασιών) και στην μετάσταση. Σχετικά με την έκφραση και τη δράση τους στους ανθρώπινους καρκίνους, αυτές μεταβάλλονται μεμονωμένα και κάθε KLF μέλος μπορεί να δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο ή ογκογονίδιο, ανάλογα με τον ιστό, τον τύπο του όγκου ή το στάδιο του καρκίνου [62]. Για παράδειγμα, ο KLF4, ένας βασικός ρυθμιστής του φυσιολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου σε διάφορους καρκίνους όπως του παγκρέατος και του παχέος εντέρου, επάγοντας την έκφραση των αναστολέων CDK, και αναστέλλοντας την έκφραση της κυκλίνης D1 και FOXM1 (Forkhead box protein M1), που όλα συμβάλλουν στον κυτταρικό κύκλο [64-66]. Αντίθετα, ο KLF5 προάγει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων αυξορρυθμίζοντας τα *CCNA2*, *CDT1* και *E2F3*, τα οποία είναι όλα βασικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου [67, 68]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η απώλεια της έκφρασης του KLF5 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μειώνει την ενεργοποίηση της σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης, μια βασική οδό στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [69]. Ειδικά για τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5, μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης σε αριθμό αντιγράφων (Copy number variation, CNV) σε βιοψίες όγκων από 33 διαφορετικούς τύπους καρκίνου, αποδείχθηκε η σημαντική γονιδιωματική ενίσχυση του KLF5 σε καρκίνους του γαστρεντερικού, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του στομάχου και του ορθοκολικού καρκίνου [70, 71]. Συλλογικά τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο KLF5 μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του στομάχου δρώντας ογκοεπαγωγικά, ενώ σε πολλές περιπτώσεις γαστρικών όγκων έχει παρατηρηθεί παράλληλα και η ενίσχυση των GATA4/6 σε πολλαπλά γονιδιωματικά αντίγραφα. Πειράματα σε γαστρικές καρκινικές σειρές στις οποίες σιγήθηκαν και οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες (KLF5, GATA4 και 6), έδειξαν μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων γεγονός που υποδεικνύει μια συνεργασία για την προαγωγή της ανάπτυξης του όγκου. Γενικά, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση και των τριών μεταγραφικών παραγόντων έδινε έναν πιο ενισχυμένο καρκινικό φαινότυπο σε σύγκριση με τη μεμονωμένη τους παρουσία. Μεταγενέστερες ChIP-seq μελέτες έδειξαν ότι οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες συνεργάζονται και ρυθμίζουν κοινούς γονιδιακούς στόχους με ένα από αυτούς να αποτελεί το γονίδιο *HNF4α (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha)* (θα αναλυθεί στη συνέχεια). Τέλος, το κοινό μεταγραφικό δίκτυο που σχηματίζουν οι GATA4, GATA6 και KLF5 στοχεύοντας την προαγωγή του όγκου οδήγησε στο να θεωρηθούν αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ογκογονίδια προαγωγής της κυτταρικής γενεαλογίας [18].

1.2.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 (Caudal Type Homeobox 2)

1.2.3.1 Χαρακτηριστικά των ομοιοτικών γονιδίων (homeotic genes)

Το γονίδιο *CDX2* ανήκει στην οικογένεια των ομοιοτικών γονιδίων (homeotic genes), τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της φυσιολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης [72]. Η οικογένεια των ομοιοτικών γονιδίων αποτελείται από δύο κύριους τύπους: τα γονίδια Hox και τα γονίδια ParaHox, με όλα τα μέλη να διαθέτουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που ονομάζεται homeobox —για πρώτη φορά απομονώθηκε από τη *Drosophila melanogaster*— με αποτέλεσμα τα γονίδια αυτής της οικογένειας να είναι γνωστά και ως γονίδια “homeobox” [73]. Τα γονίδια Homeobox κωδικοποιούν παράγοντες πυρηνικής μεταγραφής που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των εμβρύων [74]. Η πρόσδεσή τους στο DNA επιτυγχάνεται μέσω μιας εξαιρετικά διατηρημένης περιοχής 60 αμινοξέων, που ονομάζεται homeodomain και προέρχεται από την αλληλουχία homeobox [75]. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες CDX

(Caudal Type Homeobox) CDX1 και CDX2 ανήκουν στον τύπο ParaHox και ρυθμίζουν την έκφραση ειδικών για το έντερο πρωτεϊνών προωθώντας τη μορφογένεση και το φαινότυπο των εντερικών κυττάρων (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) [76].

1.2.3.2 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 σε γαστρεντερικούς καρκίνους

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ένας από τους λίγους ανθρώπινους καρκίνους όπου ο νεοπλαστικός μετασχηματισμός επέρχεται μετά από μία προκαρκινική βλάβη, μια παρεκκλίνουσα διαφοροποίηση —εντερική μεταπλασία— και όχι αδενωματώδης ανάπτυξη, όπως συμβαίνει για τους περισσότερους καρκίνους του αδενικού επιθηλίου όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Η μεταπλασία εμφανίζεται στο πλαίσιο του χρόνιου τραύματος και της αναγέννησης και αποκτά κλινική σημασία γιατί προδιαθέτει για ανάπτυξη καρκίνου, καθιστώντας την ένα κρίσιμο σημείο στον καταρράκτη πολλαπλών βημάτων προς τον καρκίνο [28]. Έχει αποδειχθεί ότι το μοριακό έναυσμα για την εντερική διαφοροποίηση στο γαστρικό περιβάλλον είναι η έκτοπη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 [55].

Δύο σειρές ποντικιών έχουν αναπτυχθεί για να βοηθήσουν στην κατανόηση του αιτιολογικού ρόλου της έκτοπης έκφρασης του CDX2 στο στομάχι για εκτεταμένη ανάπτυξη εντερικής μεταπλασίας. Και τα δύο μοντέλα εμφάνισαν εκτεταμένη εντερική μεταπλασία, παρουσιάζοντας αρκετά προϊόντα γονιδίων του εντέρου, τυπικά των διαφορετικών γενεών [77, 78]. Πρόσφατες μελέτες σχετικές με την μεταγραφική ρύθμιση του CDX2 προτείνουν ότι η παρουσία του CDX2 σε ορισμένα κύτταρα του βλεννογόνου μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υπομεθυλίωσης του υποκινητή του CDX2, δημιουργώντας έτσι μια επιγενετική βάση για την ογκογένεση και μια προδιάθεση για το γαστρικό καρκίνο. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών η μεθυλίωση του υποκινητή του CDX2 στους ιστούς GC ήταν πολύ χαμηλότερη από ό,τι στους φυσιολογικούς, γεγονός που σχετίστηκε με ένα σχετικά υψηλό μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο CDX2 σε καρκίνο του στομάχου [79-81].

Επιπρόσθετα, η έκφραση του CDX2 σχετίζεται με την εντερική μεταπλασία του στομάχου, τη λεμφική μετάσταση, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση, την εισβολή και την αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα (Multiple Drug Resistance, MDR) στο γαστρικό καρκίνωμα. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί μέσω μίας σειράς πειραμάτων τόσο σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικιών CDX2 όσο και σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές *in vitro* και *in vivo* υποδεικνύοντας έναν ογκοεπαγωγικό ρόλο για το CDX2 στο καρκίνο του στομάχου. Ωστόσο, άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι το CDX2 μπορεί να δρα ογκοκατασταλτικά, καθώς φάνηκε ότι η έκφραση του συνήθως περιορίζεται στα πρώιμα στάδια του εντερικού τύπου γαστρικού καρκίνου και μειώνεται σημαντικά καθώς ο όγκος εξελίσσεται σε πιο προχωρημένα γαστρικά καρκινώματα [79, 82]. Αυτά τα αντικρουόμενα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο CDX2 παίζει πολύπλοκο ρυθμιστικό ρόλο στον καρκίνο του στομάχου.

1.2.4 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α (Hepatocyte nuclear factor 4A)

1.2.4.1 Χαρακτηριστικά του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α

Ο πυρηνικός παράγοντας ηπατοκυττάρων 4α (HNF4α), ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptor, NR) με περιορισμένο πρότυπο έκφρασης, αποτελεί το συνεχές πεδίο των μελετών σχετικά με τον ρόλο του στον έλεγχο της κυτταρικής ταυτότητας στα ενδοδερμικά όργανα (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) από τότε που αναγνωρίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90. Ως μέλος της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ο HNF4α διαθέτει, εκτός από μια περιοχή σύνδεσης DNA τύπου “δακτύλου ψευδαργύρου” (DNA

Binding Domain, DBD), μια καλά διατηρημένη περιοχή σύνδεσης προσδέτη (Ligand-Binding Domain, LBD) [83, 84].

Το γονίδιο *HNF4α* διαθέτει δύο υποκινητές, P1 και P2, κωδικοποιώντας τουλάχιστον εννέα διαφορετικές ισομορφές ως αποτέλεσμα της εναλλακτικής χρήσης των υποκινητών και του εναλλακτικού ματίσματος [85]. Η έκφραση των διαφορετικών ισομορφών του *HNF4α* μπορεί να ποικίλει στα αναπτυξιακά στάδια με ιστοειδικό τρόπο. Συγκεκριμένα, ο HNF4α που καθοδηγείται από τον υποκινητή P1 εκφράζεται στο ήπαρ και στους νεφρούς του εμβρύου και των ενηλίκων, ενώ ο HNF4α που καθοδηγείται από τον υποκινητή P2 εκφράζεται στο εμβρυϊκό ήπαρ και στο πάγκρεας, και στο στομάχι των ενηλίκων. Επιπλέον, ανεξαρτήτως του υποκινητή εκφράζεται στο παχύ και στο λεπτό έντερο [86]. Οι ισομορφές του HNF4α διαφέρουν, επίσης, ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με το DNA και τους μεταγραφικούς συμπαράγοντές τους [87-89], καθώς και ως προς τους φυσιολογικούς ρόλους στην ανάπτυξη και στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων-στόχων [85].

1.2.4.2 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α σε γαστρεντερικούς καρκίνους

Μεταξύ των λειτουργιών που προαναφέρθηκαν, ο HNF4α έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με διάφορους τύπους καρκίνου. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες ο HNF4α εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την διήθηση και τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, δρώντας άλλοτε ογκοεπαγωγικά και άλλοτε ογκοκατασταλτικά. Οι αντιφατικές αυτές ιδιότητες του στα πλαίσια του καρκίνου θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την ύπαρξη δύο τάξεων ισομορφών που παράγονται με μεταγραφή από δύο διαφορετικούς υποκινητές [90].

Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι υπερεκφράζεται σε καρκίνους του στομάχου και είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου όγκου *in vitro* και *in vivo*. Ο λειτουργικός ρόλος του στον καρκίνο του στομάχου έχει επιβεβαιωθεί μέσω πειράματος στο οποίο η σίγησή του με τη χρήση δύο ανεξάρτητων shRNA οδήγησε σε σημαντικά μειωμένους ρυθμούς πολλαπλασιασμού και *in vitro* σχηματισμού αποικιών. Η ίδια ερευνητική ομάδα τόνισε και τη δράση του HNF4α στη διατήρηση του μεταβολικού περιβάλλοντος στα κύτταρα γαστρικού καρκίνου μέσω της ρύθμισης της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης 1 (Isocitrate Dehydrogenases 1, IDH —ένζυμο με σημαντική δράση στον κύκλο του Krebs) [91]. Μία άλλη μελέτη έχει υποδείξει τη συσχέτιση του HNF4α με την χημειοανθεκτικότητα στο γαστρικό καρκίνο, προτείνοντας την πιθανή δράση του στην ενίσχυση της αντίστασης σε πολλά φάρμακα, καθώς και την συσχέτισή του με πιο προχωρημένο στάδιο όγκου και μετάσταση στους λεμφαδένες [92]. Επιπλέον, και σε μοριακό επίπεδο έχει φανεί η συσχέτιση του με τον καρκίνο του στομάχου. Συγκεκριμένα, δύο μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο HNF4α είναι ένας κοινός άμεσος στόχος γενετικά ενισχυμένων μεταγραφικών παραγόντων στον καρκίνο του στομάχου (KLF5 και GATA4/6) [18, 91], γεγονός που επεξηγεί το χαρακτηριστικό των MTF σχετικά με το σχηματισμό μεταγραφικών δικτύων, όπως προαναφέρθηκε. Σημαντικό είναι να αναφερθεί και ότι ο HNF4α έχει προταθεί ως ειδικός βιοδείκτης για τη διάκριση των γαστρικών καρκίνων από άλλους τύπους ιστών χάρη στην ειδικότητα που παρουσιάζει [93].

Με βάση τα πρότυπα έκφρασής του μεταξύ ιστολογικών υπότυπων και κλινικών σταδίων σε δύο ανεξάρτητες κοορτές γαστρικού καρκίνου (TCGA και Singapore) παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη έκφραση σε εντερικού τύπου γαστρικά αδενοκαρκινώματα [91]. Επιπροσθέτως, μέσω μίας λειτουργικής μελέτης που ανέλυσε τον εντερικό φαινότυπο των μη νεοπλαστικών και νεοπλαστικών κυττάρων γαστρικού αδένα παρατηρήθηκε ότι ο HNF4α μπορεί να εμπλέκεται στη δημιουργία ή/και τη

διατήρηση του εντερικού φαινοτύπου του γαστρικού βλεννογόνου και του αδενοκαρκινώματος. Αυτό μπορεί να στηριχτεί στο γεγονός ότι ο HNF4α που καθοδηγείται από τον υποκινητή P1 έχει παρατηρηθεί αποκλειστικά σε αδένες εντερικής μεταπλασίας, ενώ δεν ανιχνεύεται έκφραση στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο [94]. Ακόμη, η ρύθμιση της έκφρασης αρκετών γονιδίων ειδικών για το έντερο, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που κωδικοποιούν για την εντερική πρωτεΐνη που δεσμεύει λιπαρά οξέα [95] και την απολιποπρωτεΐνη Β [96] έχει συσχετιστεί με τον HNF4α. Έτσι, είναι πολύ πιθανό ότι ο επανεκφρασμένος HNF4α θα μπορούσε να ρυθμίσει μέρος της σωστής εντερικής λειτουργίας σε αδένες εντερικής μεταπλασίας.

Συμπερασματικά, η δραστηριότητα του HNF4α στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο και ο ογκοειδικός ρόλος του στην καρκινογένεση του στομάχου υποδεικνύουν ότι ο HNF4α πιθανόν λειτουργεί ως ένα ογκογονίδιο “επιβίωσης-γενεαλογίας” (“lineage-survival”), όπου συγκεκριμένες λειτουργίες του HNF4α αξιοποιούνται για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου στο στομάχι [47].

Η τόσο σημαντική συνεισφορά των ογκογονιδίων κυτταρικής γενεαλογίας —GATA4/6, KLF5, CDX2 και HNF4α— στην καρκινογένεση θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως ένας πιθανός τρόπος αντιμετώπισης της νόσου. Όμως η άμεση στόχευση τους θα επηρέαζε και τα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία εκφράζονται και δρουν, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αυξημένων παρενεργειών. Συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων θεραπευτικών στόχων και προγνωστικών δεικτών που θα χαρακτηρίζονται από εξειδικευμένη έκφραση σε ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο, αφενός για να γίνει πιο εύκολη η ταξινόμηση των περιπτώσεων στους διάφορους υπότυπους και αφετέρου για να επιτευχθεί μια πιο εξατομικευμένη θεραπεία, με λιγότερες παρενέργειες, και που όμως θα ρυθμίζονται από τα συγκεκριμένα ογκογονίδια κυτταρικής γενεαλογίας. Τέτοιου είδους μοριακοί δείκτες αποτελούν τα lncRNA.

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

1.3.1 Χαρακτηριστικά των lncRNA

Η έλευση των τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς σε γονιδιωματικές και μεταγραφομικές μελέτες αποκάλυψε ότι περισσότερο από το 70% του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι μεταγραφικά ενεργό και ότι η πλειονότητα μεταγράφεται σε μη κωδικοποιητικά RNA, που διακρίνονται περαιτέρω σε μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) μήκους άνω των 200 νουκλεοτιδίων [97-99]. Τα lncRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση ΙΙ, διαθέτουν 5’ καλύπτρα, είναι πολυαδενυλιωμένα στο 3’ άκρο και συχνά εμφανίζουν μοτίβα εναλλακτικού ματίσματος, παρόμοια με τα mRNA αλλά με τη σημαντική διαφορά ότι δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη [100]. Σε σύγκριση με τα κωδικοποιητικά μετάγραφα, τα lncRNA χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα συντήρησης της αλληλουχίας τους, χαμηλά επίπεδα έκφρασης και από σύνθετες δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές μέσω των οποίων ασκούν τις ρυθμιστικές τους λειτουργίες [101]. Άλλο ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των lncRNA σε σχέση με τα mRNA, είναι ότι τα πρώτα εκφράζονται με τρόπο ειδικό για τον τύπο του κυττάρου, τον ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο ή την παθολογία μιας ασθένειας. Αυτό προϋποθέτει αυστηρότερη ρύθμιση των lncRNA σε σχέση με τα mRNA, σύμφωνα και με τον προτεινόμενο ρόλο τους στην αρχιτεκτονική ρύθμιση [102].

1.3.2 Κατηγοριοποίηση των lncRNA

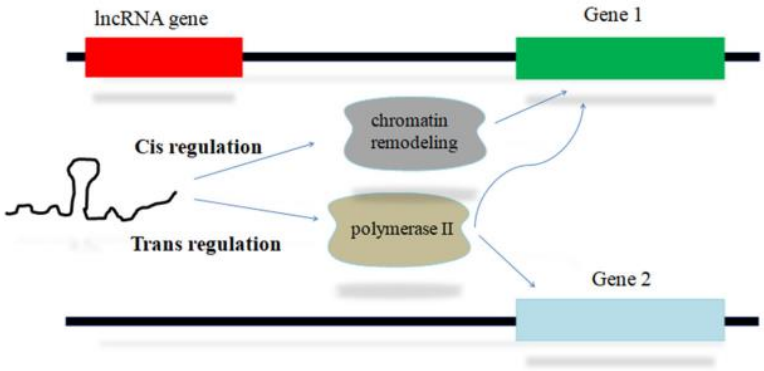
Ανάλογα με τον προσανατολισμό και την θέση τους σε σχέση με τα γειτονικά γονίδια, τα lncRNA μπορούν να χωριστούν σε: lncRNA που μεταγράφονται από μεσογονιδιακές περιοχές (intergenic lncRNAs, lincRNAs), lncRNA που μεταγράφονται από ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (intronic lncRNAs), lncRNA που

προέρχονται από αλληλουχίες ενισχυτών (enhancer lncRNAs, elncRNAs), lncRNA που η μεταγραφή τους ξεκινά από τον υποκινητή ενός γονιδίου πρωτεΐνης προς την αντίθετη κατεύθυνση (bidirectional lncRNAs), lncRNA που μεταγράφονται από την κωδική αλυσίδα κωδικών γονιδίων και τα οποία εμφανίζουν αλληλεπικάλυψη με ιντρόνια και εξόνια (sense-overlapping lncRNAs) και lncRNA που μεταγράφονται με αντίθετη κατεύθυνση από τη μη κωδική αλυσίδα του DNA (aslncRNA or natural antisense transcripts, NATs) [103].

Επιπλέον, τα lncRNA μπορούν να ταξινομηθούν σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά lncRNA (περίπου μόνο 15% στο σύνολο των lncRNA) με βάση τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, ο οποίος είναι κρίσιμος για τις λειτουργίες τους [104]. Ειδικότερα, τα πυρηνικά lncRNA ενεργούν ως ρυθμιστές χρωματίνης, ρυθμιστές μεταγραφής και ως μόρια που συμβάλλουν στην επεξεργασία του RNA. Από την άλλη, τα κυτταροπλασματικά lncRNA συμμετέχουν σε καταρράκτες κυτταρικής σηματοδότησης και έχουν ρυθμιστική επίδραση στη σταθερότητα ή την μετάφραση του mRNA [105].

1.3.3 Μοριακές λειτουργίες των lncRNA

Τα τελευταία χρόνια, συνεχώς αυξανόμενα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα lncRNA συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών και φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της διαφοροποίησης των κυττάρων και της εμβρυϊκής ανάπτυξης [106]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα lncRNA βασίζονται στον κυτταρικό εντοπισμό τους και αλληλοεπιδρούν με άλλα μόρια όπως το DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες για να εκδηλώσουν τις διάφορες λειτουργίες τους. Επίσης, ανάλογα με την εμβέλεια της επίδρασής τους, τα lncRNA μπορούν να διακριθούν σε *cis*-δραστικά —εάν δρουν κοντά στο σημείο μεταγραφής τους— και σε *trans*-δραστικά —εάν ρυθμίζουν την έκφραση απομακρυσμένων γονιδίων (**Εικόνα 6**) [107].



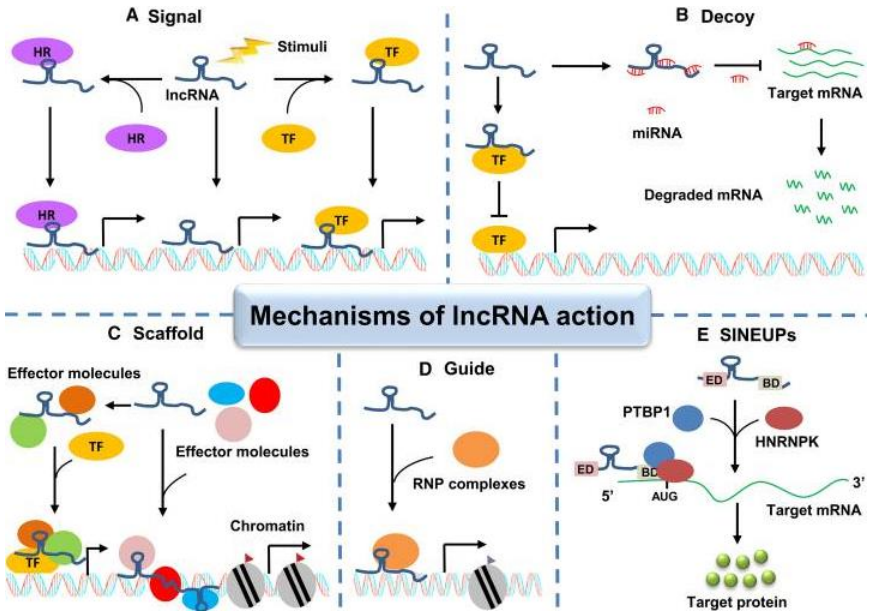
Εικόνα 6: ***Κατηγοριοποίηση των lncRNA σε cis-acting και trans-acting, με βάση την απόστασή τους από τα γονίδια-στόχους*** [108].

Τα lncRNA μπορούν είτε θετικά είτε αρνητικά να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων μέσω πολλαπλών μοριακών μηχανισμών βάσει των οποίων μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 κύριες κατηγορίες (**Εικόνα 7**) [109]:

- **Σηματοδοτικά lncRNA (signaling lncRNAs):** Λειτουργούν ως μοριακά σήματα σε απόκριση διάφορων ερεθισμάτων ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων στο χώρο και στο χρόνο, δεσμευόμενα απευθείας με το DNA ή ως σύμπλοκο με πρωτεΐνες.
- **LncRNA-δολώματα (decoy lncRNAs):** Λειτουργούν ως μοριακά δολώματα για microRNA (miRNAs), παράγοντες μεταγραφής ή πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (RNA-Binding Proteins, RBPs) για να προάγουν την ενεργοποίηση ή τη

σίγηση των γονιδίων-στόχων τους. Αυτά τα lncRNA είναι γνωστά και ως “ανταγωνιστικά” ενδογενή RNA (Competitive endogenous RNA, ceRNA).

- **LncRNA-ικριώματα (scaffold lncRNAs):** Δρουν ως ένας κεντρικός σκελετός που μπορεί να δεσμεύσει διάφορες πρωτεΐνες (μεταγραφικούς παράγοντες ή μόρια τελεστές) βοηθώντας τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, ώστε να είναι δυνατή η ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων, καθώς και της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης. Συνεπώς, αυτή η κατηγορία αφορά ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης σε επιγενετικό και μεταγραφικό επίπεδο.
- **LncRNA-οδηγοί (guide lncRNAs):** Ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε επίπεδο μεταγραφής, καθώς καθοδηγούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες στον υποκινητή του γονιδίου στόχου ή σε γονιδιωματικούς τόπους.
- **SINEUPs lncRNAs:** Αυτή η κατηγορία lncRNA περιέχει ένα ενσωματωμένο ανεστραμμένο στοιχείο SINE (περιοχή τελεστή) που προσδίδει βιολογική δραστικότητα καθώς και μια περιοχή σύνδεσης προσδίδοντας ειδικότητα στόχου. Όσον αφορά το ρόλο τους, μπορούν να αυξήσουν τη μετάφραση των mRNA-στόχων τους αλληλοεπιδρώντας με νουκλεοκυτταροπλασματικές πρωτεΐνες όπως η PTBP1 (Polypyrimidine tract-binding protein 1) και η HNRNPK (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K), ώστε να σχηματιστούν σύμπλοκα έναρξης μετάφρασης.



Εικόνα 7: ***Κατηγοριοποίηση των lncRNA με βάση τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης τους*** [109]**.**

1.3.4 Ο ρόλος των lncRNA στον γαστρικό καρκίνο

Ενδελεχείς μελέτες πάνω στα αίτια της πρόκλησης του καρκίνου έχουν αποκαλύψει ότι οι μεταλλάξεις στο μη κωδικοποιητικό γονιδίωμα είναι κύριοι καθοριστικοί παράγοντες. Πράγματι, μεταλλάξεις σε αυτούς τους ρυθμιστικούς γονιδιακούς τόπους μπορούν να επηρεάσουν ευρέως την μεταγραφή αλλάζοντας τη δραστικότητα των ενισχυτών και των υποκινητών ή την κατάσταση της χρωματίνης οδηγώντας σε διαφορική έκφραση των lncRNA στον καρκίνο [105].

Ειδικότερα για τον γαστρικό καρκίνο, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι τα lncRNA παίζουν κρίσιμους ρόλους στην εξέλιξη της νόσου δρώντας ως ρυθμιστές σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Έχει τεκμηριωθεί, επίσης, ότι τα lncRNA μπορούν να λειτουργήσουν ως ογκοεπαγωγικά ή ογκοκατασταλτικά

γονίδια για να ρυθμίσουν τις βιολογικές διεργασίες του γαστρικού καρκίνου. Ειδικότερα, αποτελούν ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της εισβολής, της μετάστασης, της μετατροπής των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), του κυτταρικού κύκλου, της ανοσολογικής διαφυγής, της αγγειογένεσης και της αντίστασης στη χημειοθεραπεία. Η δράση τους αυτή επιτυγχάνεται στοχεύοντας καθοδικά γονίδια μέσω διαφορετικών οδών σηματοδότησης, όπως PI3K/AKT (πολλαπλασιασμός, μετάσταση, αντίσταση στα φάρμακα), Wnt/β-catenin (διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης), STAT3 (πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση, ανάπτυξη αντοχής στη χημειοθεραπεία) και MAPK (πολλαπλασιασμός, αντι-αποπτωτική δράση, μετανάστευση) [109, 110].

1.3.5 Η διαγνωστική αξία των lncRNA στον καρκίνο

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών δείχνει ότι τα lncRNA διαθέτουν μεγάλη δυνατότητα να είναι βιοδείκτες για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου λόγω της υψηλής σταθερότητας, ειδικότητας και ανιχνευσιμότητάς τους σε βιολογικά υγρά, όπως ο ορός, το πλάσμα, τα ούρα και το γαστρικό υγρό [111-114]. Για παράδειγμα, τα lncRNA κυκλοφορούν ελεύθερα στο πλάσμα και τα επίπεδά τους είναι σχεδόν ίδια με εκείνα στους πρωτογενείς ιστούς του όγκου, γεγονός που μπορεί να αντικατοπτρίζει ακριβώς τα χαρακτηριστικά των αντίστοιχων όγκων [115]. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τα lncRNA στο πλάσμα ιδανικούς διαγνωστικούς βιοδείκτες σε κλινικές εφαρμογές. Η διαγνωστική αξία ενός μεγάλου αριθμού lncRNA στο πλάσμα έχει ήδη αναγνωριστεί στο γαστρικό καρκίνο. Ενδεικτικά, ο Elsayed με την ομάδα του έδειξε ότι η έκφραση του lncRNA HOTAIR αυξορρυθμίστηκε σημαντικά στο πλάσμα των ασθενών με GC σε σύγκριση με εκείνη των υγιών μαρτύρων και ότι το συγκεκριμένο lncRNA μπορεί να συμβάλει στη διάγνωση με 88% ευαισθησία και 84% ειδικότητα σύμφωνα με την ανάλυση χαρακτηριστικής καμπύλης λειτουργίας δέκτη (Receiver Operating Characteristic, ROC —μέθοδος προσδιορισμού της διαγνωστικής ακρίβειας μίας δοκιμής) [116]. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί και ότι τα lncRNA δεν περιορίζονται λειτουργικά στο αρχικό τους κυτταρικό περιβάλλον, αλλά μπορούν να συσκευαστούν μέσα σε εξωσώματα, να εκκριθούν από καρκινικά κύτταρα και στη συνέχεια να δράσουν ως παρακρινικοί τελεστές σηματοδότησης σε απομακρυσμένους ιστούς. Το σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των lncRNA, είναι η προστασία και η σταθερότητά τους μέσα στα εξωσώματα ώστε να μπορούν να ανιχνεύονται εύκολα, προσφέροντας μια γρήγορη και αποτελεσματική πρόγνωση/διάγνωση χωρίς να είναι απαραίτητες οι επεμβατικές μέθοδοι. Λόγω όλων αυτών τα εξωσωμικά lncRNA έχουν αναγνωριστεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για τη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου [117, 118].

Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα των lncRNA εντοπίζεται στον τομέα της πρόγνωσης. Τα επίπεδα έκφρασης μη κωδικοποιητικών RNA μπορούν να συνδεθούν με κλινικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διήθησης, το παθολογικό στάδιο και την μετάσταση, υποδεικνύοντας τις μεγάλες δυνατότητες τους ως προγνωστικοί βιοδείκτες. Στον καρκίνο του στομάχου, για παράδειγμα, τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA H19, ANRIL, GHET1, HOTAIR, GAS5, LET, GAPLINC και FENDRR εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των πασχόντων [119].

Συμπληρωματικά του ρόλου τους στη διάγνωση και την πρόγνωση, τα lncRNA διαθέτουν πολλαπλά χαρακτηριστικά που τα αναδεικνύουν ως πολλά υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους. Τα μοναδικά μοτίβα έκφρασής τους, που διακρίνονται από την υψηλή ειδικότητα ιστού ή κυτταρικού τύπου, και ο ρόλος τους στη ρύθμιση

συγκεκριμένων πτυχών των κυτταρικών δικτύων τα καθιστούν εξαιρετικούς δείκτες για στόχευση υψηλής ακρίβειας υπότυπων καρκίνου. Επιπλέον, η στόχευση των lncRNA φαίνεται να οδηγεί πιο γρήγορα σε ένα θεραπευτικό αποτέλεσμα ακόμη και σε χαμηλή δόση του εκάστοτε φαρμάκου λόγω της έλλειψης μετάφρασης, του γρήγορου κύκλου εργασιών (fast turnover) και των χαμηλών επιπέδων έκφρασης [120]. Ωστόσο τα μοριακά αίτια που καθορίζουν την καρκινοειδική έκφραση πολλών lncRNA παραμένουν ακόμα και σήμερα ασαφή και χρήζουν περαιτέρω μελέτη.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ανάγκη ανάπτυξης νέων βιοδεικτών με στόχο την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου και την μελλοντική ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων, στρέφουν το ενδιαφέρον στη διεύρυνση της μοριακής εργαλειοθήκης του καρκίνου του στομάχου. Τα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6 και KLF5 συχνά βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα μέσω γονιδιωματικής ενίσχυσης σε γαστρικούς όγκους. Άλλοι δύο σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες για την προώθηση του συχνότερου εντερικού γαστρικού υπότυπου, είναι ο CDX2 και ο HNF4α. Αυτοί προκαλούν τη νόσο μέσω επαγωγής της εντερικής μεταπλασίας. Όλοι οι προαναφερθέντες TF αποτελούν ογκογονίδια που ρυθμίζουν τη διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων σε αναπτυξιακό επίπεδο ενώ η διατάραξη της έκφρασής τους οδηγεί σε ογκογένεση. Δεδομένου ότι αυτές οι πρωτεΐνες είναι δύσκολο να αποτελέσουν άμεσους διαγνωστικούς, προγνωστικούς ή θεραπευτικούς στόχους καθώς συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες πολλών υγιών ιστών, οι μελέτες προσανατολίζονται σε καρκινοειδικά γονίδια-στόχους αυτών, όπως τα lncRNA. Τα lncRNA αποτελούν μια ανερχόμενη τάξη λειτουργικών μεταγράφων, τα οποία λόγω υψηλής εξειδίκευσης σε ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο καθώς και λόγω διαφορικής και καρκινοειδικής έκφρασης μπορούν να αξιοποιηθούν τόσο ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες όσο και ως θεραπευτικοί στόχοι.

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής ήταν η μελέτη της ρύθμισης lncRNA-στόχων από τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες στο καρκίνο. Για το λόγο αυτό, αρχικά, έγινε ανάλυση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων σε γαστρικές καρκινικές σειρές. Ακολούθησε γενετική τροποποίηση σε κατάλληλα επιλεγμένα γαστρικά καρκινικά κύτταρα που υπερέκφραζαν ή κατέστελλαν την έκφραση των συγκεκριμένων TF είτε μεμονωμένα για κάθε παράγοντα, είτε σε συνδυασμούς μεταξύ τους. Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης τους σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για να επιβεβαιωθεί η πρόσδεση του εκάστοτε μεταγραφικού παράγοντα σε ανοδικές ρυθμιστικές αλληλουχίες δύο υποψήφιων lncRNA-στόχων και κατ' επέκταση να αποδειχθεί αν η ρυθμιστική δράση του είναι άμεση ή έμμεση. Τέλος, σε μεταγραφικό επίπεδο εξετάστηκαν και τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA-στόχων για να παρατηρηθεί το πώς επηρεάζονται από την απορρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων. Μελλοντικός στόχος είναι η πραγματοποίηση συνδυαστικών πειραμάτων μέσω των οποίων θα ελεγχθεί αν οι μεταγραφικοί παράγοντες δημιουργούν μεταγραφικά δίκτυα για τη ρύθμιση της έκφρασης των lncRNA-στόχων τους επιβεβαιώνοντας αυτό που έχει παρατηρηθεί από τη βιβλιογραφία ότι τα ογκογονίδια κυτταρικής γενεαλογίας πιθανόν δεν δρουν μεμονωμένα αλλά σε συνεργασία με άλλους κύριους ρυθμιστές της κυτταρικής ταυτότητας.

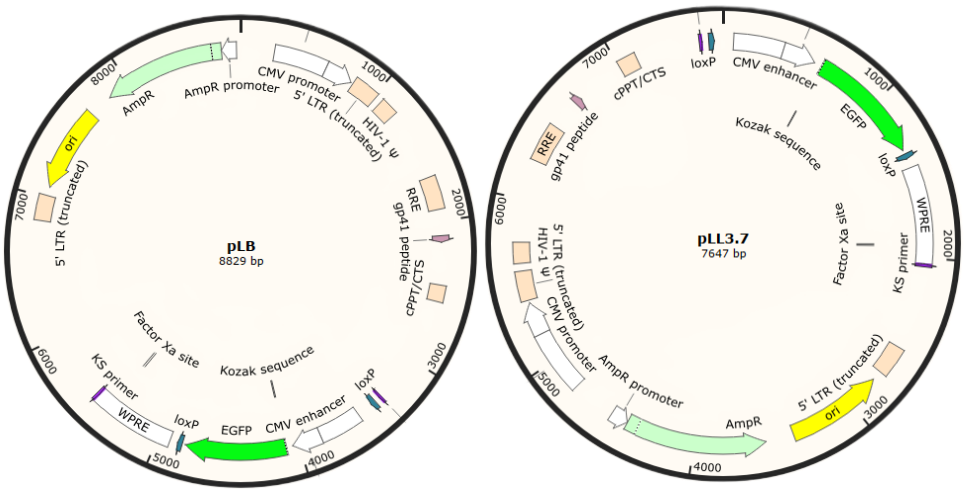
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πλασμιδιακοί φορείς

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί πλασμιδιακοί φορείς.

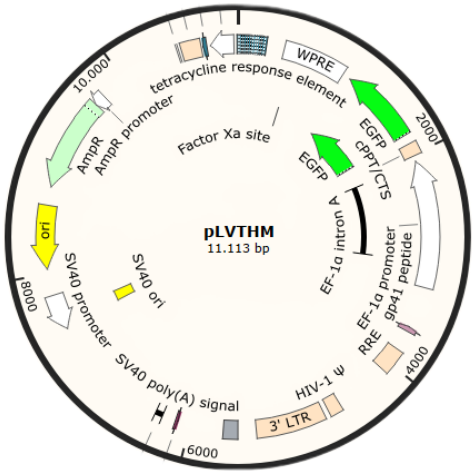
<u>Σίγηση RNAi των μεταγράφων-στόχων</u>

- **Φορέας pLB και pLL3 (Εικόνα 8):** Είχε πραγματοποιηθεί ένθεση των shRNA για τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4, GATA6 και KLF5 (μόνο στον pLL3) στα πλαίσια προηγούμενης διατριβής.



Εικόνα 8: ***Ο χάρτης του πλασμιδίου pLB και pLL3*** (Addgene).

- **Φορέας pLVTHM (Εικόνα 9):** Σχεδιάστηκαν siRNA αλληλουχίες για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2, οι οποίες μετατράπηκαν σε shRNA με τα κατάλληλα άκρα για να ενσωματωθούν στον συγκεκριμένο φορέα.

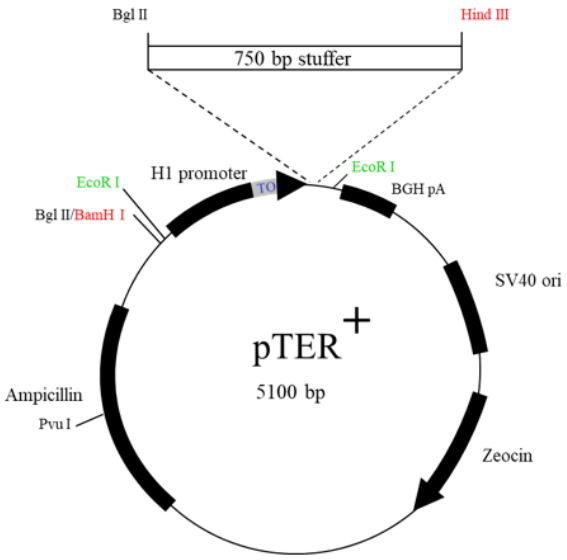


Εικόνα 9: ***Ο χάρτης του πλασμιδίου pLVTHM*** (Addgene).

Οι συγκεκριμένοι φορείς είναι κατάλληλοι για γενετική τροποποίηση ευκαρυωτικών κυττάρων με λεντιιούς με σκοπό την παροδική έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε αυτά τα κύτταρα.

- **Φορέας pTER (Εικόνα 10):** Σχεδιάστηκαν siRNA αλληλουχίες για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2, οι οποίες μετατράπηκαν σε shRNA με τα κατάλληλα άκρα για να ενσωματωθούν στον συγκεκριμένο φορέα. Ο

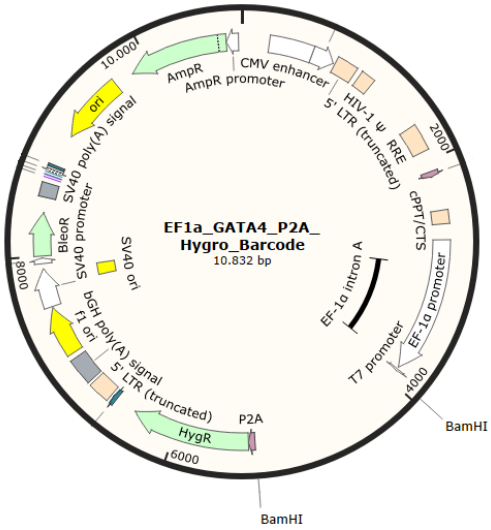
συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιείται ως σύστημα επαγόμενης έκφρασης για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών, μια διαδικασία που είναι περισσότερο χρονοβόρα (3-4 μήνες) συγκριτικά με τον φορέα pLVTHM. Το χαρακτηριστικό του φορέα αυτού είναι ότι μπορεί να επάγει τη σίγηση του επιθυμητού μεταγράφου (RNAi) μέσω του συστήματος dox/tetR. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη των στοιχείων TRE (Tet-Responsive Element), που αποτελούν τον tet-χειριστή (tet operator, tetO), εντός του υποκινητή H1 που είναι υπεύθυνος για την έκφραση του ενθέματος (shRNA). Ο tetO επιτρέπει τον πειραματικό έλεγχο της έκφρασης του shRNA σε μια κυτταρική σειρά που εκφράζει τον καταστολέα τετρακυκλίνης (tetracycline repressor, tetR). Σε αυτό το σύστημα, η αλληλεπίδραση tetR-tetO εμποδίζει την έκφραση του ενθέματος (shRNA). Όταν, όμως, γίνει επεξεργασία με δοξυκυκλίνη (doxycycline, dox —συνθετικό παράγωγο της τετρακυκλίνης), αυτή προσδένεται στη tetR εμποδίζοντας τη πρόσδεσή της στον tet-χειριστή με αποτέλεσμα την έκφραση του shRNA. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είχε τροποποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μην περιλαμβάνει την αλληλουχία “stuffer”.



Εικόνα 10: ***Ο χάρτης του πλασμιδίου pTER.***

<u>Υπερέκφραση των μεταγράφων-στόχων</u>

Για την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6, KLF5, CDX2 και HNF4α, οι φορείς με το αντίστοιχο διαγονίδιο παραλήφθηκαν από την εταιρεία Addgene (**Εικόνα 11**). Η έκφραση του κάθε μεταγράφου είναι υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή, ιδιοσύστατα ενεργού σε ένα ευρύ φάσμα τύπων κυττάρων, τον EF-1α. Επίσης, οι συγκεκριμένοι φορείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων από λεντιιούς με σκοπό την παροδική έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε αυτά τα κύτταρα.



Εικόνα 11: ***Ενδεικτικά παρατίθεται ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα που έχει ως ένθεμα το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα GATA4***. Το μόνο που αλλάζει σε κάθε περίπτωση είναι το διαγονίδιο (αντίστοιχος μεταγραφικός παράγοντας) που πλαισιώνεται από τις θέσεις περιορισμού BamHI (Addgene).

3.2 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν οι εξής:

HFE145: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά προερχόμενη από πρωτογενή καλλιέργεια φυσιολογικών κυττάρων του γαστρικού επιθηλίου

AGS: Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα

MKN45: Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από ηπατική μετάσταση γαστρικού αδενοκαρκινώματος

NUGC4: Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από μετάσταση γαστρικού αδενοκαρκινώματος σε παραγαστρικούς λεμφαδένες.

KATOIII: Καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από πλευρική μετάσταση γαστρικού αδενοκαρκινώματος

3.3 Κλωνοποίηση ενθέματος (shRNA) σε πλασμιδιακό φορέα

Πρώτο βήμα αποτελεί η προετοιμασία των ολιγονουκλεοτιδίων shRNA που περιλαμβάνει την ανάμιξη 2μl sense oligos (100μM), 2μl antisense oligos (100μM) και 96μl annealing buffer (KOAc - Potassium acetate 100mM, Hepes 30mM, MgAc 2mM). Το μείγμα τοποθετείται σε δοχείο ζέσεως με νερό σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών που σχηματίζουν τα ολιγονουκλεοτίδια. Έπειτα αφήνονται έως ότου η θερμοκρασία μειωθεί στους 30°C, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο σταδιακός υβριδισμός και ο σχηματισμός των δίκλωνων ενθεμάτων (annealed oligos).

Επόμενο βήμα αποτελεί η αντίδραση λιγάσης κατά την οποία το παραπάνω shRNA ενσωματώνεται σε πλασμιδιακό φορέα, η σύσταση της οποίας παρατίθεται στον **Πίνακα 1.** Η αντίδραση κρατάει 16 ώρες στους 16°C, και 5μl από την αντίδραση χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη διαδικασία μετασχηματισμού. Τέλος, στα δείγματα συμπεριλαμβάνεται και ένας αρνητικός μάρτυρας (self-ligation), στην αντίδραση του οποίου στη θέση του ενθέματος προστίθεται ddH_2O. Στην παρούσα

διπλωματική έγινε χρήση φορέων που είχαν υποστεί πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ώστε να έχουν τα κατάλληλα άκρα για την ενσωμάτωση του ενθέματος. Πιο συγκεκριμένα, ο φορέας κλωνοποίησης pLVTHM ήταν κομμένος με τα ένζυμα περιορισμού ClaI/MluI και ο pTER με BglII/HindII.

Πίνακας 1: Σύσταση αντίδρασης λιγάσης	
Αντιδραστήρια	**Όγκος ανά αντίδραση (10μl)**
Annealed oligos	4
Πλασμιδιακός φορέας (50ng/μl)	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση του φορέα
Buffer T4 ligase (10X) (NEB)	1
T4 DNA Ligase (400u/μl) (EnzyQuest)	0,5
ddH_2O	Μέχρι τα 10μl

3.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν προς μετασχηματισμό ήταν το στέλεχος Stbl3 και DH5a του βακτηρίου E.coli. Πιο συγκεκριμένα, για το φορέα pLVTHM χρησιμοποιήθηκε το πρώτο στέλεχος και για τον pTER το δεύτερο. Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής: αρχικά αναμειγνύεται το εναιώρημα βακτηριακών κυττάρων (50μl) με το πλασμιδιακό DNA (5μl) και επωάζονται στον πάγο για 20 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί θερμικό σοκ (heatshock) με επώαση για 50 δευτερόλεπτα σε υδατόλουτρο στου 42°C και με το πέρας του χρόνου πραγματοποιείται και μια επώαση 2 λεπτών στον πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 945μl LB (υγρό θρεπτικό μέσο) χωρίς αντιβιοτικό και επώαση για 50 λεπτά σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37°C/160rpm. Σκοπός της επώασης είναι ο διπλασιασμός των βακτηρίων τουλάχιστον μια φορά (ο φυσιολογικός χρόνος διπλασιασμού του E.coli είναι περίπου 40 λεπτά), καθώς και η μεταγραφή του συνόλου των γονιδίων τους, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Στη συνέχεια γίνεται η επίστρωση μιας ποσότητας από την υγρή καλλιέργεια σε τρυβλία με LB άγαρ παρουσία 100μg/ml αμπικιλλίνης, και ύστερα από ολονύκτια επώαση στους 37°C γίνεται επιλογή μοναδιαίων κλώνων. Οι επιλεγμένες αποικίες μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες μαζί με 2ml υγρού θρεπτικού LB που περιέχει αμπικιλλίνη και ακολουθεί επώαση σε αναδευόμενο επωαστήρα 37°C/210rpm για περίπου 16 ώρες.

3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

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

Για την απομόνωση με τη χρήση των διαθέσιμων αντιδραστηρίων ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη βακτηριακής καλλιέργειας σε σωληνάριο τύπου eppendorf των 1,5ml.
2. Φυγοκέντρηση 11.000rpm/4°C/2 λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου.
3. Προσθήκη 100μl παγωμένου διαλύματος Ι (50mM Tris, 10mM EDTA, 100μg/ml RNaseA) και vortex.
4. Προσθήκη 200μl διαλύματος ΙΙ (1% SDS, 0.2M NaOH) σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση.
   Το διάλυμα ΙΙ πρέπει να παρασκευάζεται εκ νέου για κάθε καινούρια διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση του SDS.

5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων.
6. Προσθήκη 150μl παγωμένου διαλύματος III (3M potassium Asc, pH 5.5) και ήπια ανάδευση.
7. Επώαση 5 λεπτών σε πάγο.
8. Φυγοκέντρηση max speed/4°C/15 λεπτά και μεταφορά υπερκείμενου σε νέο eppendorf των 1,5 ml.
9. Προσθήκη 1ml 100% EtOH, ήπια ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά στους -80°C.
10. Φυγοκέντρηση max speed/4°C/20 λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου.
11. Προσθήκη 600μl 70% EtOH.
12. Φυγοκέντρηση max speed/4°C/ 5 λεπτά.
13. Αφαίρεση υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος
14. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ddH_2O (για pLVTHM: 30μl, για pTER: 100μl)
15. Θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, vortex και spin down.

3.6 Διαγνωστική πέψη και διαγνωστική PCR

Η διαγνωστική πέψη και η διαγνωστική PCR είναι δύο τρόποι που αποσκοπούν στην επαλήθευση της ενσωμάτωσης του επιθυμητού ενθέματος στον φορέα κλωνοποίησης. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη για τον πλασμιαδικό φορέα pTER και διαγνωστική PCR για τον pLVTHM.

Στην περίπτωση της διαγνωστικής πέψης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού EcoRI για το οποίο υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης στον φορέα pTER και συγκεκριμένα εκατέρωθεν της θέσης όπου εντίθεται η κατασκευή που θα δώσει το shRNA. Αφού προστεθούν τα απαιτούμενα συστατικά, σύμφωνα με τον **Πίνακα 2**, τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστίθενται στα δείγματα 10μl χρωστικής 6X Loading Dye και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (2%). Επίσης, στις αντιδράσεις πέψης συμπεριλαμβάνονται δύο δείγματα που αξιοποιούνται το ένα ως θετικός και το άλλο ως αρνητικός έλεγχος (self-ligation). Ως δείγμα θετικού ελέγχου μπορεί να χρησιμοποιηθεί φορέας κλωνοποίησης, στον οποίο έχει εισαχθεί διαφορετικό ένθεμα, η εισαγωγή του οποίου έχει επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση.

Πίνακας 2: Σύσταση διαγνωστικής πέψης για τον φορέα pTER	
Αντιδραστήρια	**Όγκος ανά αντίδραση (10μl)**
Buffer CutSmart (10X) (NEB)	5
Ένζυμο EcoRI-HF (NEB)	1
Πλασμιδιακό DNA (pTER)	10
ddH_2O	Μέχρι 50μl

Στην περίπτωση της διαγνωστικής PCR έγινε χρήση εκκινητών που είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να υβριδίζουν και οι δύο σε αλληλουχίες του πλασμιδιακού φορέα που είναι εκατέρωθεν της θέσης όπου εντίθεται η κατασκευή που θα δώσει το shRNA. Ο σχεδιασμός της PCR και οι συνθήκες της παρατίθεται στον **Πίνακα 3** και **Πίνακα 4**, αντίστοιχα.

Πίνακας 3: Σύσταση διαγνωστικής PCR για τον φορέα pLVTHM	
Αντιδραστήρια	**Όγκος ανά αντίδραση (50μl)**
Buffer KAPATaq (10X)	5
dNTPs	0,5
H1F1 primer	1
Sp6 primer	1

Taq polymerase (KAPA)	0,15
Πλασμιδιακό DNA (pLVTHM) (αραίωση 1/20)	1
ddH_2O	Μέχρι 50μl

Αν χρησιμοποιηθούν περισσότερα του ενός δείγματα, τότε παρασκευάζεται ένα master mix που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το DNA, που είναι διαφορετικό από δείγμα σε δείγμα, σε ποσότητα πολλαπλάσια τόσες φορές όσα είναι τα δείγματα συν 10% επιπλέον για τυχόν μικροαπώλειες λόγω λαθών στο πιπετάρισμα.

Πίνακας 4: Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

Βήματα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min	
Αποδιάταξη	95°C	10 sec	25 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκνητών	55°C	10 sec	
Επέκταση	72°C	30 sec	
Τελική επέκταση	72°C	2 min	
Διατήρηση	4°C	∞	

Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστίθενται στα δείγματα 10μl χρωστικής 6X Loading Dye και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (2%). Επίσης, όπως και στις αντιδράσεις πέψης συμπεριλαμβάνεται αρνητικός έλεγχος (self-ligation).

Τέλος, σε κάθε περίπτωση τα δείγματα που προέκυψαν ως θετικά από τις διαγνωστική πέψη και PCR έγινε ανακαλλιέργεια ενός από τους θετικούς κλώνους σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 4ml υγρού θρεπτικού LB που περιέχει αμπικιλλίνη και ακολούθησε επώαση σε αναδευόμενο επωαστήρα 37°C/210rpm για περίπου 16 ώρες. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το κιτ “Macherey-Nagel: Plasmid DNA purification, Protocol: NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid): Isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli ” σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο πλασμιδιακός φορέας pLVTHM που θα επιβεβαιωθεί ότι έλαβε το ένθεμα, όπως συνέβη και με τους υπόλοιπους πλασμιδιακούς φορείς (βλ. § 3.1) χρησιμοποιούνται στο σύστημα διαμόλυνσης καρκινικών κυτταρικών σειρών στομάχου με λεντιιούς. Η διαμόλυνση των κυττάρων από τους λεντιιούς θα έχει ως αποτέλεσμα είτε την έκφραση του shRNA και κατ’ επέκταση τη σίγηση του μεταγράφου-στόχου είτε την υπερέκφραση του μεταγράφου-στόχου ανάλογα τον πλασμιδιακό φορέα. Η αποτελεσματικότητα του εκάστοτε πειράματος ελέγχεται με την απομόνωση RNA και την πραγματοποίηση ποσοτικής PCR (qPCR) καθώς και Western Blot. Από την άλλη ο πλασμιδιακός φορέας pTER που θα επιβεβαιωθεί ότι έλαβε το ένθεμα (shRNA) θα χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών.

3.7 Απομόνωση RNA (RNA Extraction)

Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) χρησιμοποιείται ευρέως σε δοκιμασίες μοριακής βιολογίας όπως για παράδειγμα η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης οποιοδήποτε μεταγράφου μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time quantitative PCR - qPCR). Συνεπώς, η απομόνωση του ολικού RNA του κυττάρου είναι απαραίτητη.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι για την απομόνωση του RNA: η φαινόλη-χλωροφόρμιο που είναι η πιο κοινή λόγω του χαμηλού κόστους και τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ. Στα πλαίσια

της συγκεκριμένης εργασίας εφαρμόστηκε η πρώτη μέθοδος. Οι εκχυλίσεις φαινόλης-χλωροφορμίου χρησιμοποιούν την ιδιότητα της φαινόλης για να διαχωρίσουν τις πρωτεΐνες από τα νουκλεϊκά οξέα, επιτρέποντας την εύκολη απομόνωση των τελευταίων με καθίζηση αιθανόλης. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το δείγμα αρχικά ομογενοποιείται σε ένα διάλυμα που περιέχει φαινόλη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRI Reagent® του προμηθευτή MRC και η διαδικασία απομόνωσης ολοκληρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

Το TRIzol (ή TRI Reagent) είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης (Guanidinium thiocyanate, GTC). Το άλας γουανιδινίου χρησιμεύει τόσο ως χαοτροπικός παράγοντας για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένου και της ριβονουκλέασης —Ribonucleases, RNases) όσο και ως προστατευτικό του RNA διατηρώντας την ακεραιότητα του καθ΄ όλη τη διάρκεια των σταδίων απομόνωσης. Επιπλέον, το χαμηλό pH (όξινο) του TRI Reagent® διαχωρίζει το δείγμα σε τρεις φάσεις: μια κατώτερη οργανική φάση, μια μεσαία φάση που περιέχει μετουσιωμένες πρωτεΐνες και γονιδιωαμτικό DNA (gDNA) και μια ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το ολικό RNA.

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης, η συγκέντρωση και η καθαρότητα του συνολικού RNA προσδιορίσθηκε χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 και έπειτα τα δείγματα αποθηκευτήκαν στους -80ºC.

3.8 Επεξεργασία με DNase (DNase treatment)

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης του RNA με την μέθοδο που προαναφέρθηκε, συνήθως υπάρχουν κατάλοιπα gDNA, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την αντίστροφη μεταγραφή που ακολουθεί σαν τεχνική οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ευαίσθητες εφαρμογές όπως η qPCR. Η παραδοσιακή μέθοδος απομάκρυνσης του gDNA αξιοποιεί τη δράση μιας δεσοξυριβονουκλεάσης, ενός ενζύμου που υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στα μόρια του DNA. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση στο υδατόλουτρο στους 37ºC για 1 ώρα και η σύστασή της παρατίθεται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5: Σύσταση ενζυμικής αντίδρασης DNase

Αντιδραστήρια	**Όγκος ανά αντίδραση (30μl)**
Reaction Buffer with $MgCl_2$ for DNase I (10X) (ThermoFisher)	3
DNase I, RNase-free (ThermoFisher)	1
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor [1], 40u/μl (Invitrogen™)	0,5
Δείγμα RNA	25
ddH_2O	Μέχρι τα 30μl

[1] Η προσθήκη της RNaseOUT είναι απαραίτητη καθώς εμποδίζει την δράση των ενζύμων που καταστρέφουν το RNA.

Αν χρησιμοποιηθούν περισσότερα του ενός δείγματα, τότε παρασκευάζεται ένα master mix που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το RNA.

Για να είναι δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία του RNA προς cDNA πρέπει να γίνει καθαρισμός του δείγματος για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε υπολειμματικό ένζυμο θα αποικοδομούσε το μονόκλωνο DNA. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την απομάκρυνση της DNase I είναι η μέθοδος της φαινόλης-χλωροφορμίου.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Μετά την επώαση στους 37°C, μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο και προσθήκη 40μl οξικού νατρίου (pH=5.6, 3M) και 330μl ddH_2O.
2. Προσθήκη 400μl φαινόλη/χλωροφόρμιο.
3. Vortex και φυγοκέντρηση στους 4°C/14.000rpm για 5 λεπτά.
4. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο eppendorf tube.
5. Προσθήκη 1000μl παγωμένης αιθανόλης 100%.
6. Ήπια ανάδευση και επώαση στους -80°C για 1 ώρα.
7. Φυγοκέντρηση στους 4°C/14.000rpm για 30 λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου.
8. Προσθήκη 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%.
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C/14.000rpm για 5 λεπτά.
10. Αφαίρεση υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος.
11. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ddH_2O.
12. Θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, vortex και spin down.
13. Ποσοτικοποίηση του συνολικού RNA (στην παρούσα εργασία έγινε με το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000)
14. Αποθήκευση στους -80°C.

3.9 Αντίστροφη μεταγραφή (Σύνθεση cDNA)

Η σύνθεση του cDNA ή αλλιώς η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής περιλαμβάνει την σύνθεση μορίων cDNA από τα δείγματα απομόνωσης RNA, μέσω ενός ενζύμου που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLV). Με βάση τις μετρήσεις από το προηγούμενο στάδιο τα δείγματα προετοιμάζονται κατάλληλα ώστε να περιέχονται 1000ng RNA διαλυμένα σε 10μl ddH_2O. Για την διαδικασία της κατεργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο mix, η σύσταση των οποίων παρατίθεται στους παρακάτω πίνακες (**Πίνακας 6** και **Πίνακας 7**).

Σε κάθε δείγμα RNA όγκου 10μl προστίθενται 2μl από το mix1 και ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 5 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη του μορίου RNA (λόγω των πιθανών δευτεροταγών δομών του) και υβριδοποίηση του εκκινητή πάνω στην συμπληρωματική αλληλουχία ενώ παραμένει ανοιχτή η δομή του RNA. Στη συνέχεια προστίθενται 8μl από το mix2 και ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η ενζυμική αντίδραση της σύνθεσης cDNA. Με το πέρας της επώασης προστίθεται 380μl ddH_2O και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Πίνακας 6: Σύσταση mix1 για την αντίδραση σύνθεσης cDNA	
Αντιδραστήρια	**Ποσότητα ανά δείγμα (μl)**
Εκκινητές random hexamer (100μM, Takara)	1
dNTPs (10mM dNTP Mix, Invitrogen™)	1
Τελικός όγκος	**2μl**

Πίνακας 7: Σύσταση mix2 για την αντίδραση σύνθεσης cDNA	
Αντιδραστήρια	**Ποσότητα ανά δείγμα (μl)**
First Strand Buffer (5X) (Invitrogen™)	4
DTT, 0,1M (Invitrogen™) [2]	2
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 40u/μl (Invitrogen™)	0,5
M-MLV Reverse Transcriptase, 200u/μl (Invitrogen™)	1

ddH_2O	Μέχρι τα 8μl

[2] Αναγωγικός παράγοντας που βελτιστοποιεί τη δραστικότητα των ενζύμων.

3.10 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real time quantitative PCR - qPCR)

Η qPCR αποτελεί μια μέθοδο προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης γονιδίων προς μελέτη στο αρχικό δείγμα. Η μέθοδος αξιοποιεί την ικανότητα της χρωστικής SYBR green να προσδένεται ισχυρά στο δίκλωνο DNA εκπέμποντας ισχυρότερο φθορισμό σε σχέση με την πρόσδεσή του στο μονόκλωνο DNA. Αυτή η ιδιότητα της χρωστικής αξιοποιείται, ώστε να επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων που ενισχύονται με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών οι οποίοι υβριδίζουν στα επιθυμητά μόρια cDNA. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται στην εκθετική φάση της καμπύλης ενίσχυσης, κατά την οποία τα προϊόντα διπλασιάζονται σε αριθμό και ξεπερνούν ένα κατώφλι φθορισμού, το οποίο αντιστοιχεί σε έναν συγκεκριμένο κύκλο διπλασιασμού (C_t).

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της qPCR υπάρχουν δύο μέθοδοι: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης. Στην παρούσα εργασία οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA των γονιδίων-στόχων προσδιορίστηκαν με τη σχετική μέθοδο, στην οποία γίνεται ανάλυση των αλλαγών στην έκφραση του γονιδίου σε ένα δεδομένο δείγμα σε σχέση με ένα άλλο δείγμα αναφοράς (όπως είναι ένα δείγμα ελέγχου-control, στο πείραμα η κυτταρική σειρά HFE145). Ωστόσο, στην περίπτωση ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, στην qPCR που εφαρμόστηκε για την αναγνώριση των αλληλουχιών DNA που σχετίζονται με την κατακρημνισμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκαν 4 δείγματα DNA σε υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις, ως standard δείγματα για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς για να επιτευχθεί η απόλυτη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων (αντιστοίχιση των Cq με ποσότητες).

Επιπλέον, γίνεται χρήση γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes) που παρουσιάζουν σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς του οργανισμού και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και θεωρητικά δεν επηρεάζονται από αλλαγές στις πειραματικές συνθήκες. Κατά την διεξαγωγή της qPCR μπορούν να προκύψουν κάποια λάθη λόγω μικροδιαφορών στην αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων, στην ποιότητα του RNA ή στην σύνθεση του cDNA, καθώς και στην ενίσχυση του προϊόντος. Επομένως, η χρήση των ιδιοσύστατων γονιδίων είναι απαραίτητη για την αποφυγή αυτών των λαθών και την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το GAPDH και το RPLP1. Στην περίπτωση της ChIP-qPCR η κανονικοποίηση γίνεται με διαφορετικό τρόπο και περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο αφορά την εξομάλυνση στις διαφορές ως προς την αποτελεσματικότητα των εκκινητών που έχουν σχεδιαστεί για τις προς μελέτη γονιδιωματικές περιοχές και γίνεται με δείγμα στο όποιο δεν έγινε ανοσοκατακρήμνιση (input DNA). Το τελευταίο βήμα ως προς την κανονικοποιήση είναι αντίστοιχο με τα ιδιοσύστατα γονίδια, άλλα πρόκειται για ενίσχυση γονιδιωματικών περιοχών που δεν αλληλοεπιδρούν με την πρωτεΐνη-ενδιαφέροντος, ώστε να υπολογισθεί το λεγόμενο “fold enrichment” που δείχνει πόσες φορές ποιο εμπλουτισμένο είναι το σήμα στην γονιδιωαμτική αλληλουχία ενδιαφέροντος σε σχέση με το σήμα που δίνει το υπόλοιπο γονιδίωμα (background), στο οποίο η πρωτεΐνη δεν προσδένεται.

Στο πείραμα η προετοιμασία και η οργάνωση των δειγμάτων, ο προγραμματισμός των πρωτοκόλλων για την εκτέλεση της qPCR καθώς και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα CFX manager της εταιρίας BioRad. Όσον αφορά τα δείγματα προετοιμάζονται σε ειδικά strips ή plates, τα οποία είναι

συγκεκριμένα για την διαδικασία της qPCR, και η σύσταση της αντίδρασης ανά δείγμα παρατίθεται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8: Σύσταση qPCR αντίδρασης	
Αντιδραστήρια	**Όγκος ανά αντίδραση (20μl)**
SYBRgreen Buffer Mix (2X) (ThermoFisher)	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
cDNA Template	4
ddH_2O	Μέχρι 20μl

3.11 Απομόνωση πρωτεϊνών

Η λύση των κυττάρων αποτελεί σημαντικό βήμα στην προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων για ανάλυση στυπώματος Western. Έτσι, με το που συλλεχθούν τα επιθυμητά κύτταρα από τα οποία θα γίνει η εξαγωγή πρωτεϊνών, προστίθεται 1-1,5ml θρεπτικού και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C/3.000rpm για 5 λεπτά. Έπειτα αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος (κύτταρα) σε μία ποσότητα ενός ρυθμιστικού διαλύματος λύσης η επιλογή του οποίου εξαρτάται από την θέση των πρωτεϊνών-ενδιαφέροντος στα κύτταρα. Στα πλαίσια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA buffer) [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% Sodium Deoxycholate (NaDOC), 150 mM NaCl, 10% glycerol], που είναι κατάλληλο για την απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και οι μεταγραφικοί παράγοντες. Η σύσταση του διαλύματος RIPA είναι τέτοια που οδηγεί σε πλήρη ρήξη και απελευθέρωση όλων των κυτταρικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, και, επιπλέον, εξασφαλίζει την κατάλληλη ιοντική ισχύς ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

3.12 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

Η δοκιμασία Bradford είναι μια φασματοσκοπική αναλυτική διαδικασία για ταχεία ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλοκών μεταξύ της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και της πρωτεΐνης. Σε όξινο περιβάλλον, η βαφή αντιδρά με την πρωτεΐνη του διαλύματος, με αποτέλεσμα από την καφέ-κόκκινη μορφή της να μετατραπεί στη μπλε. Το σύμπλοκο βαφής-πρωτεΐνης μπορεί να φωτομετρηθεί στα 595nm που είναι η μέγιστη απορρόφηση του έγχρωμου συμπλόκου. Η αύξηση της απορρόφησης στα 595nm είναι ανάλογη με την ποσότητα της δεσμευμένης βαφής και επομένως με την ποσότητα (συγκέντρωση) πρωτεΐνης που υπάρχει στο δείγμα.

Στο πλαίσια του πειράματος έγινε χρήση του αντιδραστηρίου Bradford-Solution for Protein Determination της εταιρείας PanReac AppliChem (Κωδικός: A6932,0500). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ποσοτικοποίηση ήταν η εξής:

1. Προσθήκη 1μl από το διαλυμένο σε RIPA δείγμα σε eppendorf tube των 1,5ml (στο τυφλό 1μl RIPA).
2. Προσθήκη 99μl ddH_2O.
3. Προσθήκη 1ml αντιδραστηρίου Bradford.
4. Έντονο vortex και φωτομέτρηση στα 595nm.

Στη συνέχεια, ακολούθησε προετοιμασία των δειγμάτων και αποθήκευσή τους στους -20°C για μελλοντική χρήση σε Western Blot. Πιο συγκεκριμένα, έγινε μια σχετική κανονικοποίηση όλων των δειγμάτων, έτσι ώστε από κάθε δείγμα να ηλεκτροφορείται

πρωτεΐνη με παρόμοια τιμή απορρόφησης, και συνεπώς παρόμοια συγκέντρωση. Για αυτό τον λόγο το κάθε δείγμα αραιώθηκε με ποσότητα RIPA ανάλογα με την τιμή απορρόφησής του, προσαρμόζοντας την σε απορρόφηση 0,15. Ωστόσο, σε δείγματα αραιά (όπως για παράδειγμα σε δείγματα υπερέκφρασης) αυτό δεν ήταν δυνατόν. Τέλος, ανάλογα με την ποσότητα RIPA που προστέθηκε σε κάθε δείγμα, ακολούθησε προσθήκη 2X SDS Loading Buffer (**Πίνακας 9**) σε αναλογία 1:1 με τον όγκο του RIPA στο οποίο είναι διαλυμένο το πρωτεϊνικό δείγμα.

Πίνακας 9: Σύσταση διαλύματος 2X SDS Loading Buffer	
Αντιδραστήρια	**Ποσότητα (ml)**
1M Tris, pH 6.8 [3]	1,33
50% Glycerol [4]	4,6
10% SDS [5]	1,6
β-μερκαπτοαιθανόλη [6]	0,4
0,5% κυανού της βρωμοφαινόλης [7]	0,4
ddH_2O	1,67

[3] Διατηρεί το pH όμοιο με αυτό της πηκτή συσσώρευσης (stacking gel).

[4] Προσδίδει μεγάλη πυκνότητα στο δείγμα, ώστε να μη διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.

[5] Αποδιατακτικό και προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες.

[6] Ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης οδηγώντας σε μετουσίωση.

[7] Χρησιμεύει στην αξιολόγηση της μετακίνησης των δειγμάτων στην πηκτή.

3.13 Western Blot

Η τεχνική Western blot (ή ανοσοαποτύπωση) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης και ημιποσοτικού προσδιορισμού μιας επιθυμητής πρωτεΐνης μέσα σε ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών. Συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων.

Το πρώτο στάδιο στη Western blot είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος με βάση το μέγεθος τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (γνωστή ως ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE). Αναλυτικότερα, αρχικά πραγματοποιείται η συναρμολόγηση του συστήματος κάθετης ηλεκτροφόρησης και γίνεται η παρασκευή των πηκτών ηλεκτοφόρησης με μείγμα ακριλαμίδης 40% σύμφωνα με τον **Πίνακα 10** και **Πίνακα 11**. Ο πολυμερισμός της πηκτής διαχωρισμού (separating ή resolving gel) προηγείται και στη συνέχεια προετοιμάζεται η πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) που προστίθεται στην ήδη πολυμερισμένη πηκτή.

Πίνακας 10: Σύσταση της πηκτής διαχωρισμού (separating ή resolving gel) 10%	
Αντιδραστήρια	**Ποσότητα (ml)**
H_2O	4,8
40% Acrylamide Bis Solution (BIO-RAD)	2,5
1,5M Tris, pH 8.8	2,5
10% SDS	0,1
10% Ammonium Persulafte (APS) [8]	0,1
TEMED [PanReac AppliChem (Κωδικός: A1148,0100)]	0,004
Τελικός όγκος	**10ml**

[8] Παρασκευάστηκε με τη σκόνη Ammonium persulfate, reagent grade, 98% της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Πίνακας 11: Σύσταση της πηκτής συσσώρευσης (stacking gel) 5%	
Αντιδραστήρια	**Ποσότητα (ml)**
H_2O	2,96
40% Acrylamide Bis Solution	0,48
1M Tris, pH 6.8	0,5
10% SDS	0,04
10% Ammonium Persulafte (APS)	0,04
TEMED	0,004
Τελικός όγκος	**4ml**

Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, το σύστημα των κάθετων πλακών τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Η σύσταση του Running Buffer είναι η εξής: 900ml ddH_2O, 100ml Running Buffer 10X (-SDS) [με σύσταση: 30gr Tris base (Tris ultrapure, PanReac AppliChem Κωδικός: A1086,1000) και 144gr γλυκίνης (Glycine for molecular biology, PanReac AppliChem Κωδικός: A1067,1000), τα οποία διαλύονται σε όγκο 1Lt ddH_2O], και 10ml 10% SDS.

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των δειγμάτων για φόρτωμα στην πηκτή. Όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη ενότητα, στα δείγματα έχει ήδη προστεθεί 2X SDS Loading Buffer και είναι έτοιμα προς χρήση, αφού πρώτα θερμανθούν στους 95^oC για 10 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής. Από την στιγμή που αποδιατάσσονται οι πρωτεΐνες, τα δείγματα δεν αφήνονται στον πάγο διότι περιέχουν SDS το οποίο σε χαμηλές θερμοκρασίες καταβυθίζεται. Οπότε από την στιγμή της αποδιάταξης και μέχρι να φορτωθούν στην πηκτή, τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί το φόρτωμα 12-20μl (ανάλογα την πειραματική συνθήκη και την απορρόφηση) από τα δείγματα στην πηκτή, η οποία έχει ήδη τοποθετηθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Μαζί με τα δείγματα φορτώνονται και 5μl μάρτυρα μοριακού βάρους (BencMark^{TM} Pre-stained Protein Ladder, Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση αρχικά γίνεται στα 75V, μέχρι τα δείγματα να περάσουν στο separating gel, κι από εκεί και πέρα η τάση αυξάνεται στα 110V μέχρι η χρωστική να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται η πηκτή από τη συσκευή και απομακρύνεται το stacking gel για να ακολουθήσει η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αφού τοποθετηθούν τα διηθητικά χαρτιά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτή στη σωστή σειρά και κατεύθυνση στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, αυτή συνδέεται σε συσκευή ηλεκτροφοδοσίας και ολοκληρώνεται μετά από 90 λεπτά με εφαρμογή τάσης 110V. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται σε αυτή τη διαδικασία είναι το Transfer Buffer που πρέπει να είναι κρύο και περιέχει 200ml MeOH, 100ml Running Buffer 10X (-SDS) και 700ml ddH_2O. Ενδιάμεσα είναι σημαντικό να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία τους διαλύματος μεταφοράς με χρήση παγοκυστών. Με το πέρας της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αυτή ελέγχεται με την εμφάνιση του μάρτυρα στη μεμβράνη ο οποίος περιλαμβάνει χρωστική. Η εμφάνιση του μάρτυρα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υποδεικνύει και επιτυχή ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών.

Ακολούθως, γίνεται η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στη μεμβράνη για να ακολουθήσει στη συνέχεια η προσθήκη των αντισωμάτων. Οι μεμβράνες επωάζονται με 10ml διαλύματος blocking 5% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σκόνης σε TBST-T 1X [9ml H_2O, 0,1ml 10% Tween-20 και 1ml 10X TBS (με σύσταση 0,2M

Tris-HCl, pH 8 και 1,5M NaCl)] για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4^{o}C για 16 ώρες. Την επόμενη μέρα πραγματοποιούνται 4 πλύσεις των 5 λεπτών υπό ανάδευση με TBST-T 1X (2,5ml ανά πλύση). Έπειτα γίνεται η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν και πάλι 4 πλύσεις των 5 λεπτών υπό ανάδευση με TBST-T 1X (2,5ml ανά πλύση). Στην εργασία το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν συζευγμένο με κάποιο ένζυμο-δείκτη (υπεροξειδάση του χρένου / Horseradish Peroxidase, HRP) που αντιδρά με εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα και εκπέμπει φως (αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας) οπότε και επιτυγχάνεται η εμφάνιση των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών σε ειδικό φιλμ.

Ειδικότερα, για την εμφάνιση των πρωτεϊνών, αρχικά η μεμβράνη επωάζεται για 5 λεπτά με το μίγμα (1:1) χημειοφωταύγειας ECL (ECL™ Prime Western Bloting Detection Reagents, Amersham™). Στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδική κασετίνα εμφάνισης και η εμφάνιση του φιλμ (FUJIFILM, FUJI MEDICAL X-RAY FILM, Super RX-N) εκτελείται σε σκοτεινό θάλαμο με διαδοχική εμβάπτισή του σε δοχεία που περιέχουν διάλυμα εμφάνισης (Development, FUJIFILM) και διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer, FUJIFILM) και στο τέλος εκπλένεται με νερό κα αφήνεται να στεγνώσει.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν διαλυμένα σε TBS-T 1X, 5% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σκόνης και διατηρούνταν στους -20^{o}C.

Πρωτογενή

- Anti-CDX2 (Santa Cruz, Mouse monoclonal IgG, 200μg/ml), 1:1000
- Anti-HNF-4a (Santa Cruz, Mouse monoclonal IgG, 200 g/ml), 1:1000
- Anti-KLF5 (BTEB2, Santa Cruz, Mouse monoclonal IgG, 200μg/ml), 1:1000
- Anti-GATA-4 (Santa Cruz, Mouse monoclonal IgG, 200μg/ml), 1:1000
- Anti-GATA-6 (Santa Cruz, Mouse monoclonal IgG, 200μg/ml), 1:1000
- Anti-β-actin (Sigma), 1:1000 (χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για το αν τα δείγματα ήταν ισοφορτωμένα μεταξύ τους)

Δευτερογενές

- Anti-mouse HRP conjugated, 1/10.000

3.14 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης ή ChIP, είναι μια τεχνολογία βασισμένη σε αντισώματα που χρησιμοποιείται για τον επιλεκτικό εμπλουτισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών, που προσδένονται στο DNA, μαζί με τις γενωμικές αλληλουχίες-στόχους τους. Τα πειράματα αυτά δίνουν την δυνατότητα να εξεταστεί σε ζωντανά κύτταρα (*in vivo*), σε ποιο βαθμό ένα *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο του DNA καταλαμβάνεται από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη που το αναγνωρίζει. Συνεπώς, μέσω αυτής της πειραματικής μεθόδου, είναι δυνατόν να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα.

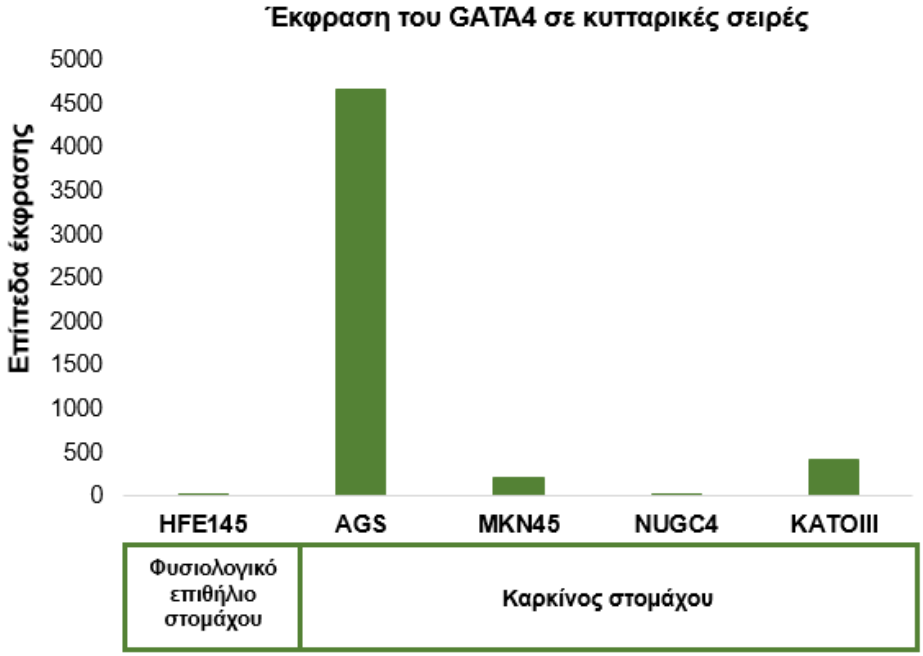
Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε όπως περιεγράφηκε προηγουμένως [121].

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

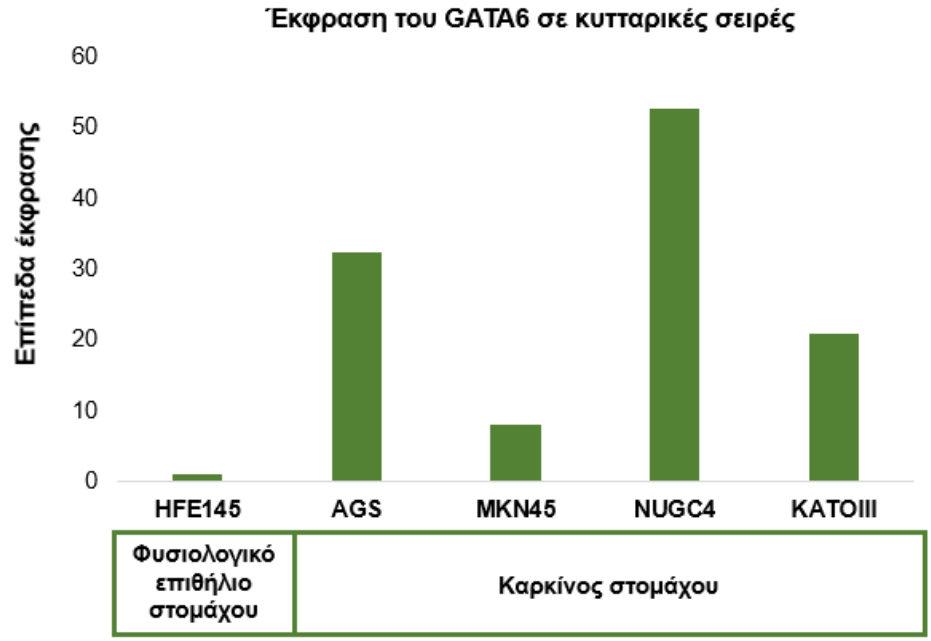
4.1 Μελέτη της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/ GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α σε γαστρικές κυτταρικές σειρές

Για να διεξαχθεί ένα πείραμα μεταγραφικής σίγησης ή υπερέκφρασης ενός γονιδίου σε κυτταρικές σειρές θα πρέπει πρώτα να εξασφαλιστεί η έκφραση του γονιδίου σε αυτές. Έτσι, ύστερα από εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA έγινε μια ποσοτική PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών για τον έλεγχο της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α στις εξής γαστρικές κυτταρικές σειρές: HFE145, AGS, MKN45, NUGC4 και KATOIII. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν ως προς το γονίδιο ιδιοσύστατης έκφρασης RPLP1.

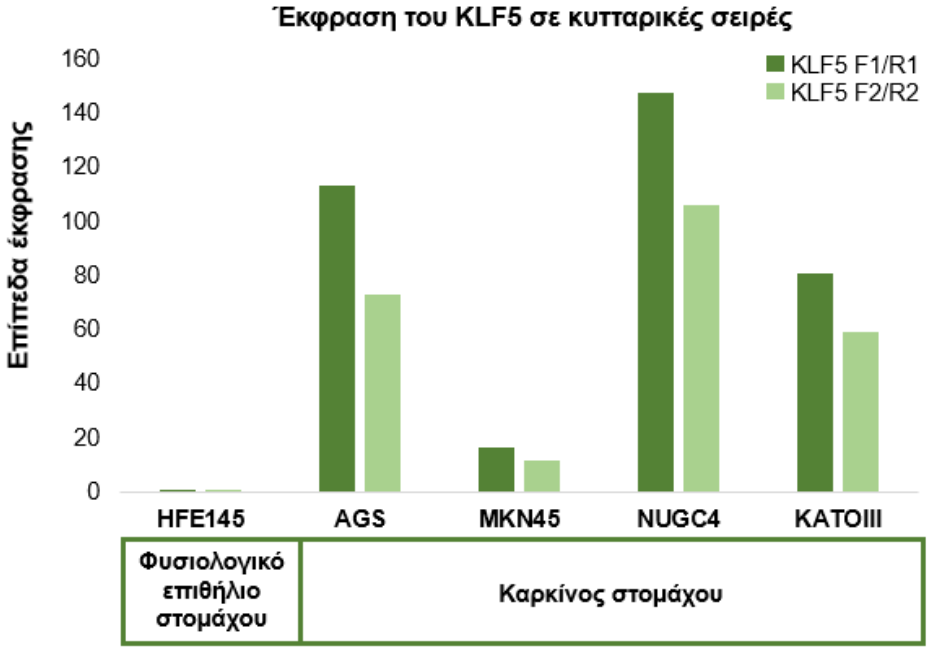
Τα διαγράμματα που ακολουθούν (**Εικόνα 12** έως **16**) δείχνουν πως όλοι οι παράγοντες εκφράζονται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα στις καρκινικές γαστρικές σειρές συγκριτικά με την φυσιολογική γαστρική (HFE145, πρόκειται για μοντέλο παρακαρκινικού ιστού και έχει θεωρηθεί ως αρνητικός μάρτυρας στα πειράματα). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι ο GATA4 και CDX2 εκφράζονται σε σημαντικό βαθμό στην καρκινική κυτταρική σειρά στομάχου AGS, ενώ για τους υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες αυτή είναι η δεύτερη κατά σειρά κυτταρική σειρά στην οποία ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα επιλέχθηκαν τα κύτταρα HFE145 για τα πειράματα υπερέκφρασης καθώς όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες δεν εκφράζονται. Επιπλέον, και στα κύτταρα AGS έγινε προσπάθεια υπερέκφρασης, παρά την υψηλή έκφραση των παραγόντων διότι αυτός ο τύπος κυτταρικής σειράς θεωρείται ως μοντέλο για τα αρχικά στάδια γαστρικού καρκίνου.



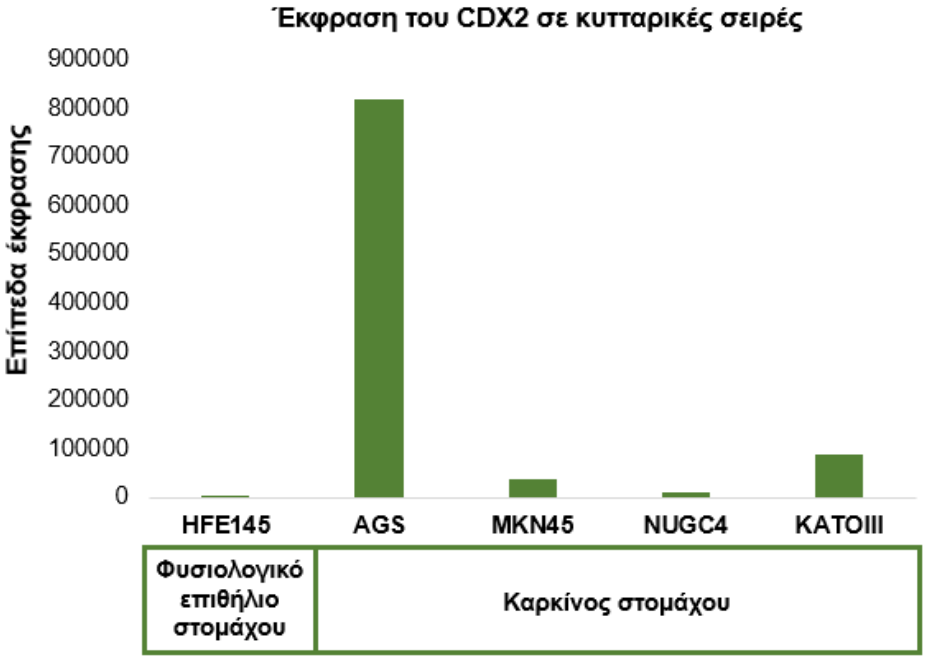
Εικόνα 12: ***Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της qPCR σε γαστρικές κυτταρικές σειρές με σκοπό την μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (HFE145).***



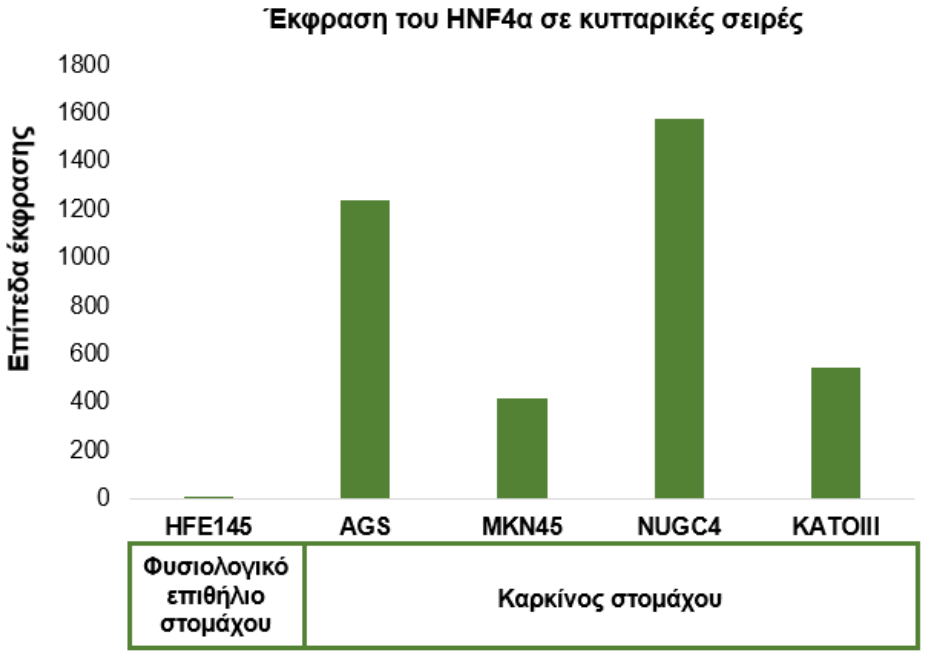
Εικόνα 13: ***Ανάλυση δεδομένων qPCR της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 σε γαστρικές κυτταρικές σειρές.***



Εικόνα 14: ***Διάγραμμα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 σε κυτταρικές σειρές.*** Τα μεταγραφικά επίπεδα ελέγχθηκαν με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που στο γράφημα απεικονίζονται με διαφορετικό χρώμα. Παρατηρείται το ίδιο μοτίβο έκφρασης σε όλες τις κυτταρικές σειρές και για τα δύο ζεύγη.



Εικόνα 15: ***Αποτελέσματα από την ανάλυση της qPCR για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2 σε γαστρικές κυτταρικές σειρές.***



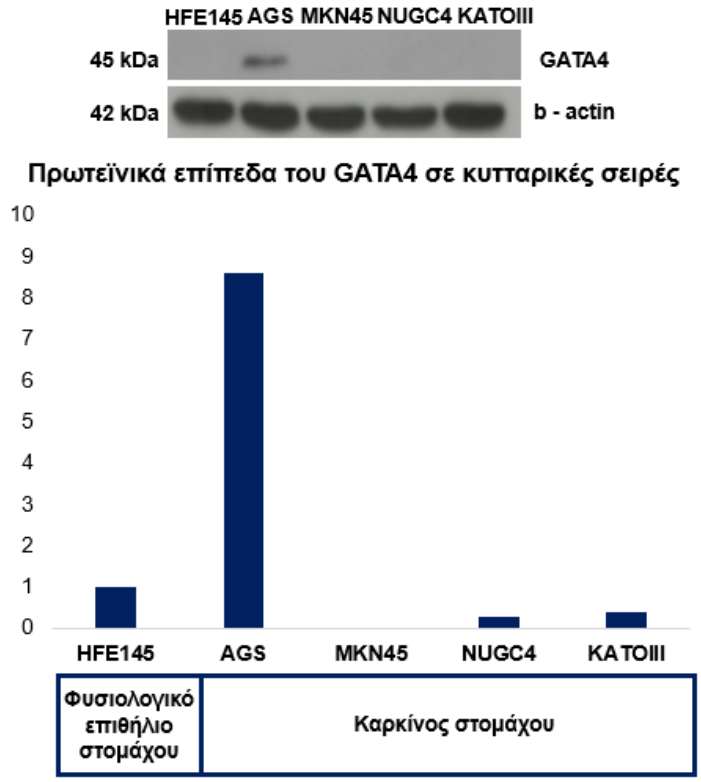
Εικόνα 16: ***Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της qPCR σε γαστρικές κυτταρικές σειρές με σκοπό την μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (HFE145).***

4.2 Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών των παραγόντων GATA4/ GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α σε γαστρικές κυτταρικές σειρές

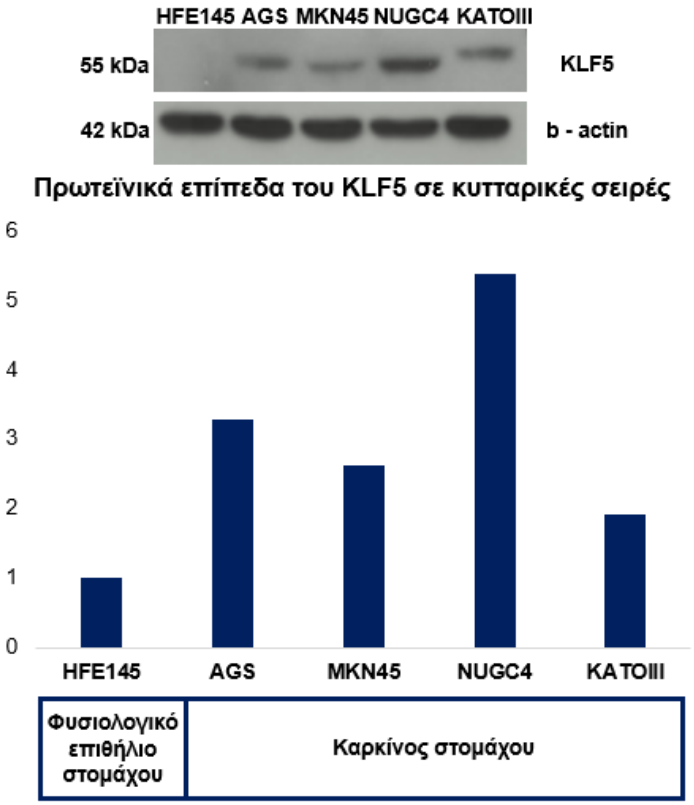
Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων ελέγχθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, πέρα από το επίπεδο mRNA. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν Western blot, στις οποίες ελέγχθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α σε φυσιολογικά γαστρικά κύτταρα (HFE145), καθώς επίσης και σε κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου (AGS, MKN45, NUGC4, KATOIII). Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε Western blot για την ανίχνευση της β-ακτίνης σε δείγματα ολικής

πρωτεΐνης από αυτές τις κυτταρικές σειρές, ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα που απαιτείται να φορτώνεται από κάθε δείγμα για να υπάρχει ίση ποσότητα σε όλα τα πηγάδια της πηκτής. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η σύγκριση των επιπέδων του κάθε μεταγραφικού μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων.

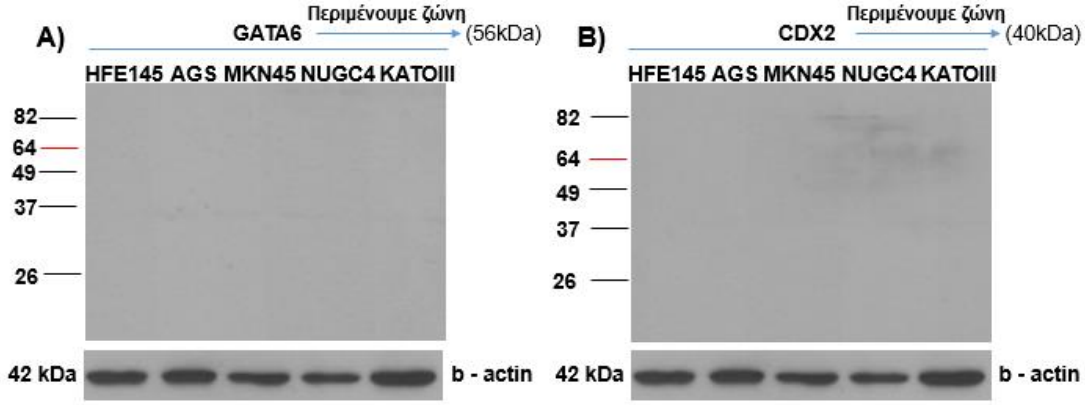
Με βάση τα αποτελέσματα (**Εικόνα 17** έως **20**) από την ποσοτικοποίηση του σήματος των ζωνών με το λογισμικό ImageJ και την κανονικοποίηση με την ιδιοσύστατη πρωτεΐνη φαίνεται ότι σε γενικές γραμμές τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα ακολουθούν το ίδιο πρότυπο. Αναλυτικότερα, αυτό παρατηρείται για τους μεταγραφικούς GATA4 και KLF5. Για τον CDX2 και GATA6 η πρωτεΐνη δεν ανιχνεύτηκε. Για τον GATA6 πιθανόν αυτό να οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του όπως φαίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο με αυτά να κυμαίνονται από 10-50 φορές περισσότερο ανάλογα την κυτταρική σειρά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Στην περίπτωση του HNF4α, στην πλειοψηφία των κυτταρικών σειρών ανιχνεύτηκαν δύο ζώνες. Οι ζώνες με το ελαφρώς υψηλότερο μοριακό βάρος από το αναμενόμενο μπορεί να αποδοθεί σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση ή σε εναλλακτικές παραλλαγές ματίσματος (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ). Λόγω της ύπαρξης δύο ζωνών η κανονικοποίηση έγινε ξεχωριστά για την κάθε μία και για αυτό παρατηρούνται διαφορές.



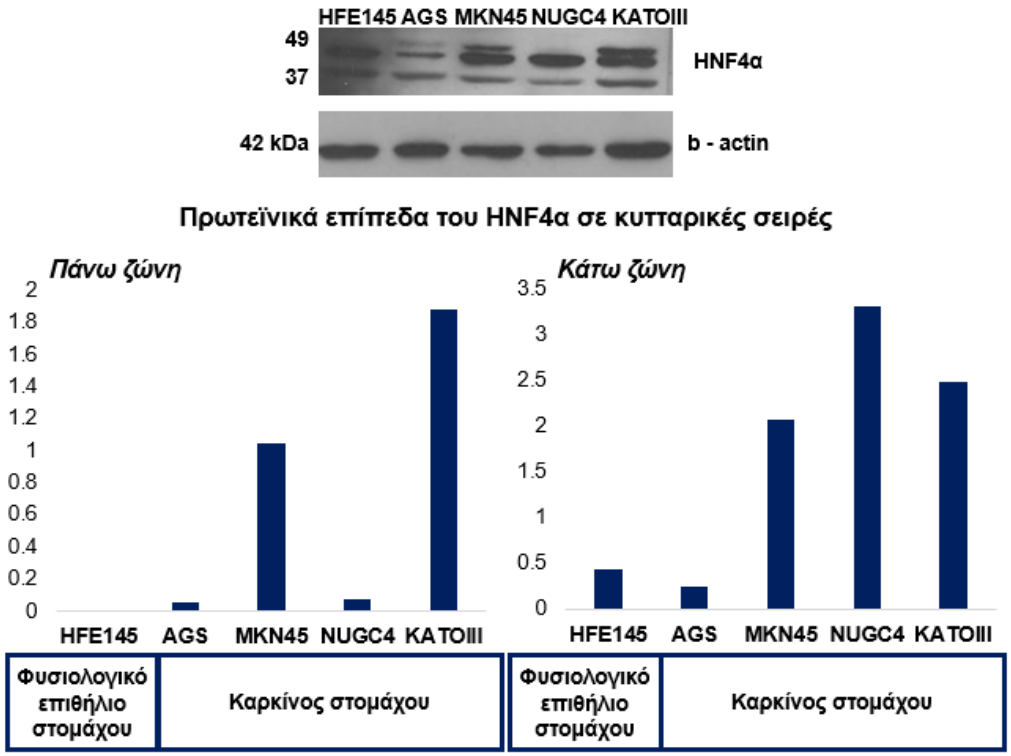
Εικόνα 17: ***Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του GATA4 σε γαστρικές κυτταρικές σειρές.*** Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζονται οι ζώνες του GATA4 (45 kDa) και της ακτίνης (42 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά τη διαδικασία του Western blotting. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Στο κάτω μέρος παρουσιάζονται σε διάγραμμα τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα (σε σχέση με το δείγμα control, HFE145) αφού πρώτα έγινε κανονικοποίηση ως προς τη ιδιοσύστατη πρωτεΐνη (β-ακτίνη).



Εικόνα 18: ***Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του KLF5 σε γαστρικές κυτταρικές σειρές.*** Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το αποτέλεσμα από τη Western blot με χρήση αντισωμάτων έναντι του KLF5 και β-ακτίνης. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται σε διάγραμμα η κανονικοποιημένη πρωτεϊνική έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 ως προς την πρωτεΐνη β-ακτίνη και σε σχέση με το δείγμα control, HFE145.



Εικόνα 19: ***Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του GATA6 και CDX2 σε γαστρικές κυτταρικές σειρές.*** **Α)** Western blotting με χρήση αντισωμάτων έναντι του GATA6 και β-ακτίνης. **Β)** Western blotting με χρήση αντισωμάτων έναντι του CDX2 και β-ακτίνης. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων.



Εικόνα 20: ***Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του HNF4α σε γαστρικές κυτταρικές σειρές.*** Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το αποτέλεσμα από τη Western blot με χρήση αντισωμάτων έναντι του HNF4α και β-ακτίνης. Στο κάτω μέρος του σχήματος, αριστερά παρουσιάζεται σε διάγραμμα η κανονικοποιημένη πρωτεϊνική έκφραση της πάνω ζώνης του HNF4α ως προς την πρωτεΐνη β-ακτίνη και δεξία της κάτω ζώνης που ανιχνεύθηκε κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης.

Συμπερασματικά, καθώς και τα δεδομένα από την ανοσοαποτύπωση σε γενικές γραμμές επιβεβαίωσαν τα δεδομένα από την qPCR τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν.

4.3 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο

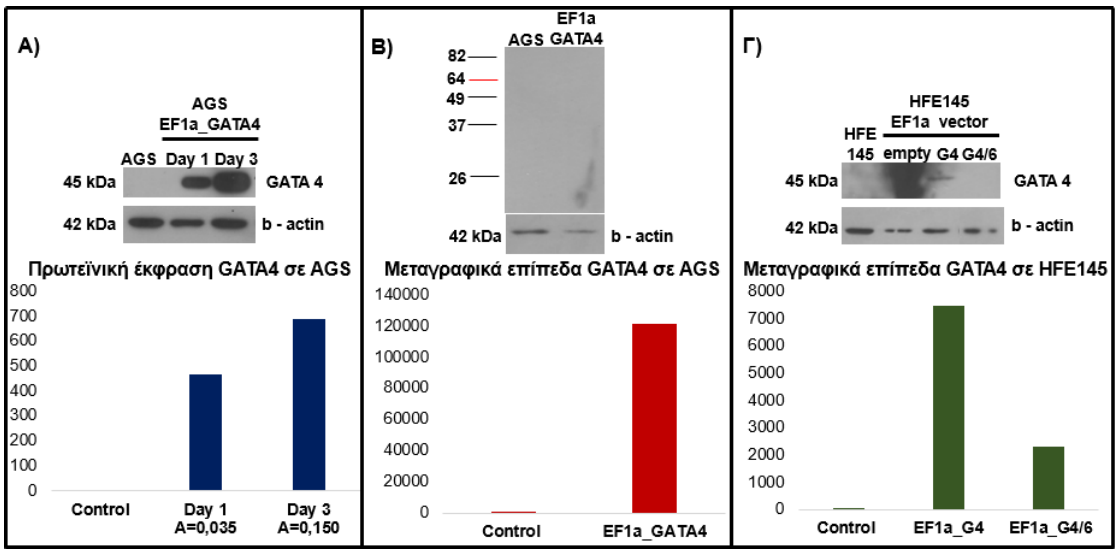
Βασική προϋπόθεση για την πλήρη αποσαφήνιση ενός lncRNA ως κατάλληλου καρκινοειδικού βιοδείκτη στη διάγνωση του καρκίνου αποτελεί η διερεύνηση των ανοδικών ρυθμιστών του και κατ' επέκταση ο τρόπος της καρκινοειδικής ρύθμισής του από αυτούς. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης των προς μελέτη μεταγραφικών παραγόντων προκειμένου να ελεγχθεί σε επόμενο στάδιο το πώς τα επίπεδα έκφρασης των πιθανών lncRNA-στόχων τους επηρεάζονται από την απορρύθμιση τους.

Αναλυτικότερα, για την παροδική υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς στους οποίους ο έλεγχος της έκφρασης του εκάστοτε διαγονιδίου γινόταν μέσω του υποκινητή EF-1α. Ο συγκεκριμένος υποκινητής χαρακτηρίζεται από ισχυρή δραστηριότητα που περιλαμβάνει θέσεις δέσμευσης για μεταγραφικούς παράγοντες επιτρέποντας μια πιο αποτελεσματική δέσμευση του ενζύμου RNA πολυμεράσης ΙΙ. Επίσης, ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος πλασμιδιακός φορέας χωρίς κλωνοποιημένο ένθεμα. Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις ως δεύτερος αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν και μη μετασχηματισμένα κύτταρα. Για το συγκεκριμένο πείραμα, επιλέχτηκαν οι γαστρικές κυτταρικές σειρές AGS και HFE145 για γενετική τροποποίηση μέσω παραγωγής και

χρήσης λεντιιών. Σχεδόν για όλους τους μεταγραφικούς πραγματοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις για την υπερέκφρασή τους σε AGS και μία σε HFE145. Σε κάθε περίπτωση, ύστερα από συλλογή των κυττάρων σε τριζόλη, εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA, πραγματοποιήθηκαν qPCR με εκκινητές ειδικούς για το μετάγραφο του εκάστοτε μεταγραφικού. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν ως προς το γονίδιο ιδιοσύστατης έκφρασης GAPDH. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών για κάθε δείγμα, ώστε να ελεγχθεί και σε επίπεδο πρωτεΐνης αν πέτυχε η υπερέκφραση.

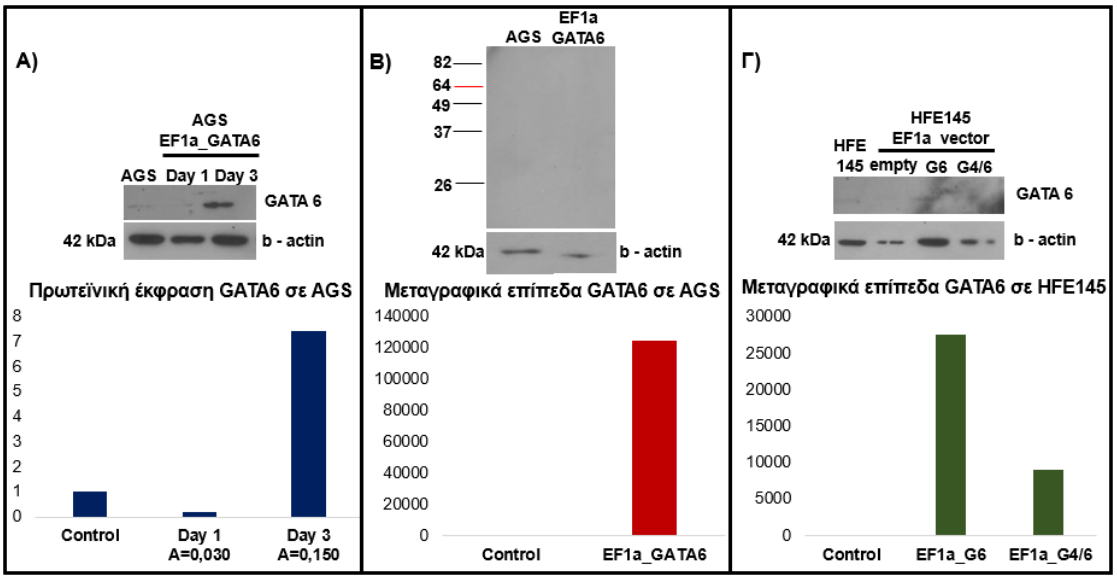
Υπερέκφραση των GATA μεταγραφικών παραγόντων

Όσον αφορά τους μεταγραφικούς GATA4 και GATA6 η πρώτη δοκιμή για την υπερέκφρασή τους στα κύτταρα AGS ελέγχθηκε μόνο σε επίπεδο πρωτεΐνης μέσω Western blot. Φάνηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα για τον GATA4 ήταν υψηλά τόσο κατά την πρώτη μέρα όσο και κατά την τρίτη μέρα (η μέρα αφορά στο πότε τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά την αφαίρεση 24ωρης επώασης με τον ιό που έφερε τον πλασμιδιακό φορέα) (**Εικόνα 21Α**). Από την άλλη στον GATA6 ήταν δυνατή η ανίχνευσή του μόνο την τρίτη μέρα, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί και από τη δυσκολία ανίχνευσής του και στις κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 22Α**). Από τη βιολογική επανάληψη αυτού του πειράματος, παρατηρήθηκε αποτελεσματική υπερέκφραση και των δύο παραγόντων σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά δεν ήταν δυνατόν ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων (**Εικόνα 21Β** και **Εικόνα 22Β**). Στην περίπτωση της υπερέκφρασης στην κυτταρική σειρά HFE145, πέρα από την μεμονωμένη υπερέκφραση του κάθε μεταγραφικού, έγινε διαμόλυνση των κυττάρων και με ιό που έφερε και τους δύο πλασμιδιακούς φορείς με σκοπό την ταυτόχρονη υπερέκφραση των GATA4 και GATA6 (EF1a_G4/6). Σε επίπεδο πρωτεΐνης, η υπερέκφραση δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αντίθετα, σε επίπεδο mRNA παρατηρήθηκε αποτελεσματική υπερέκφραση και για τους δύο παράγοντες αλλά όχι σαν αυτή στα AGS (**Εικόνα 21Γ** και **Εικόνα 22Γ**).



Εικόνα 21: ***Διερεύνηση της υπερέκφρασης του GATA4.*** **Α)** Υπερέκφραση του GATA4 σε κύτταρα AGS. Στο σχήμα απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες του GATA4 και της β-ακτίνης καθώς και το διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού, μετά από κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη. Α: απορρόφηση, Control: κυτταρική σειρά AGS (όχι από το πείραμα). **Β)** Βιολογική επανάληψη της υπερέκφρασης στα AGS. Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το αποτέλεσμα από τη Western blot με χρήση αντισωμάτων έναντι του GATA4 και της β-ακτίνης. Στο κάτω μέρος του σχήματος, φαίνεται η αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του GATA4 σε μεταγραφικό επίπεδο ύστερα από την διεξαγωγή qPCR. Control:

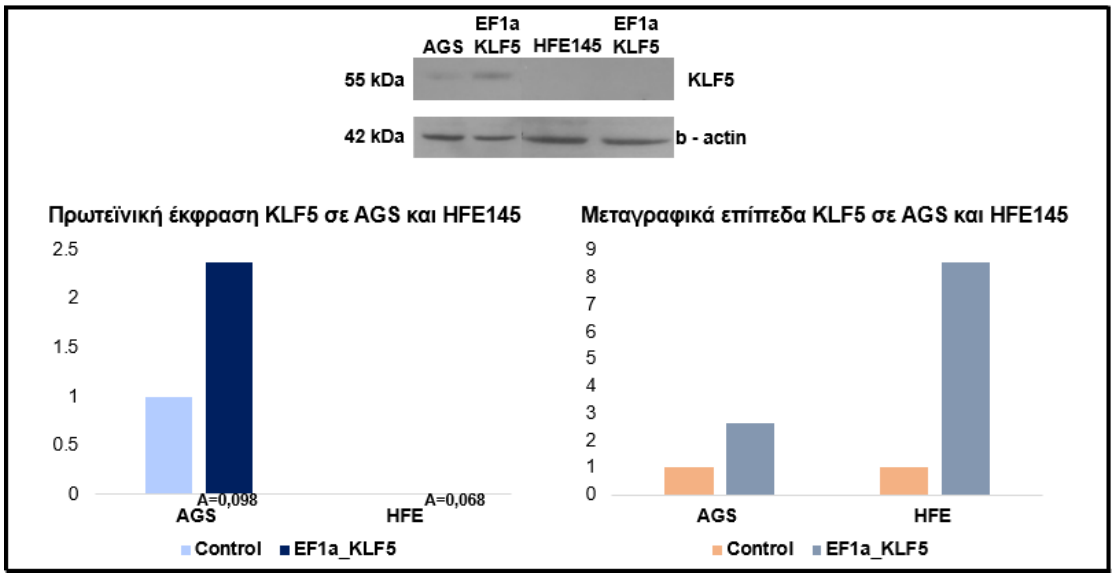
EF1a_empty. **Γ)** Υπερέκφραση του GATA4 σε κύτταρα HFE145. Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζονται το αποτέλεσμα από τη Western blot με χρήση αντισωμάτων έναντι του GATA4 και β-ακτίνης. Χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα ως μάρτυρες σε πρωτεϊνικό επίπεδο: HFE145 EF1a_empty και η κυτταρική σειρά HFE145 (όχι από το πείραμα). Στο κάτω μέρος του σχήματος, φαίνεται η αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του GATA4 σε μεταγραφικό επίπεδο ύστερα από την διεξαγωγή qPCR. Control: EF1a_empty, G4: GATA4, G4/6: GATA4/GATA6.



Εικόνα 22: ***Διερεύνηση της υπερέκφρασης του GATA6.*** **Α)** Υπερέκφραση του GATA6 σε κύτταρα AGS. Στο σχήμα απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες του GATA6 και της β-ακτίνης καθώς και το διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού, μετά από κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη. Α: απορρόφηση, Control: κυτταρική σειρά AGS (όχι από το πείραμα). **Β)** Βιολογική επανάληψη της υπερέκφρασης στα AGS. Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το αποτέλεσμα από τη Western blot με χρήση αντισωμάτων έναντι του GATA6 και της β-ακτίνης. Στο κάτω μέρος του σχήματος, φαίνεται η αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του GATA6 σε μεταγραφικό επίπεδο ύστερα από την διεξαγωγή qPCR. Control: EF1a_empty. **Γ)** Υπερέκφραση του GATA6 σε κύτταρα HFE145. Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το αποτέλεσμα από τη Western blot με χρήση αντισωμάτων έναντι του GATA6 και β-ακτίνης. Χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα ως μάρτυρες σε πρωτεϊνικό επίπεδο: HFE145 EF1a_empty και η κυτταρική σειρά HFE145 (όχι από το πείραμα). Στο κάτω μέρος του σχήματος, φαίνεται η αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του GATA6 σε μεταγραφικό επίπεδο ύστερα από την διεξαγωγή qPCR. Control: EF1a_empty, G6: GATA6, G4/6: GATA4/GATA6.

Υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF5

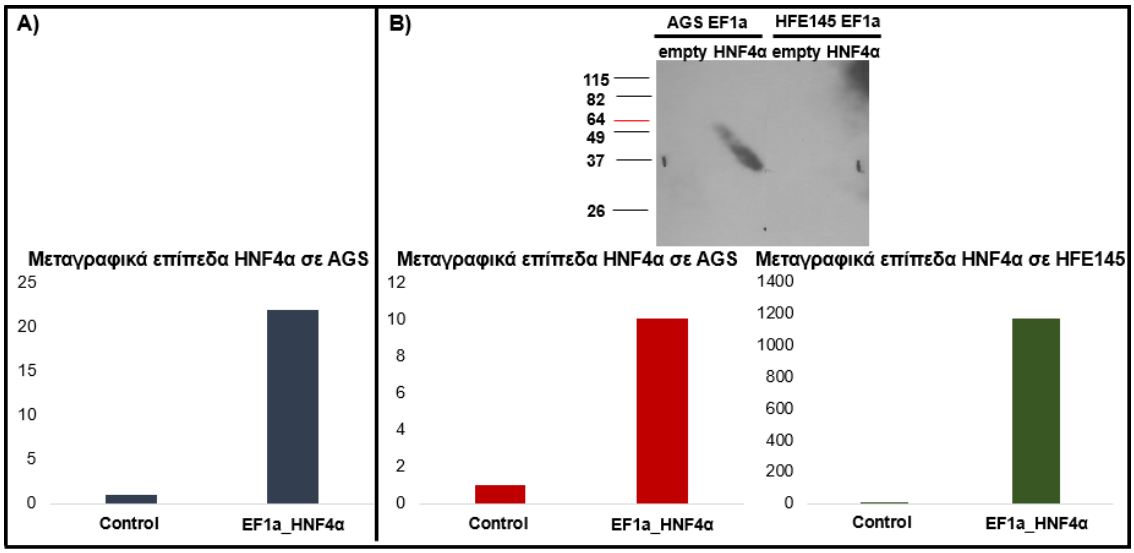
Στην **Εικόνα 23** απεικονίζεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον KLF5. Φαίνεται ότι στα HFE145, αλλά κυρίως στα AGS η υπερέκφραση ήταν πολύ περιορισμένη. Παράδοξο ήταν ότι σε επίπεδο πρωτεΐνης δεν ανιχνεύτηκε υπερέκφραση στα HFE145 που με βάση τα επίπεδα mRNA θα ήταν αυτό αναμενόμενο. Σε κάθε περίπτωση το συγκεκριμένο αποτέλεσμα πιθανότατα οφείλεται στην περιορισμένη ικανότητα του συγκεκριμένου πλασμιδιακού φορέα να υπερεκφράζει το συγκεκριμένο κλωνοποιημένο ένθεμα του KLF5.



Εικόνα 23: ***Αποτελέσματα της υπερέκφρασης του KLF5 σε κύτταρα AGS και HFE145.*** Στο πάνω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το αποτέλεσμα από τη Western blot. Στο κάτω μέρος του σχήματος, αριστερά παρουσιάζεται σε διάγραμμα η κανονικοποιημένη πρωτεϊνική έκφραση του KLF5 ως προς την πρωτεΐνη β-ακτίνη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και δεξία η ανάλυση των δεδομένων qPCR της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 σε AGS και HFE145. Control για πρωτεΐνη: η κυτταρική σειρά AGS και HFE145 (όχι από το πείραμα). Control για mRNA: EF1a_empty.

Υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α

Όσον αφορά τον παράγοντα HNF4α παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα mRNA του είχαν το αναμενόμενο αποτέλεσμα στα HFE145, ειδικότερα η έκφρασή του ήταν περίπου 1000 φόρες πιο πάνω σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην περίπτωση των AGS, το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και από τις δύο βιολογικές επαναλήψεις σημειώνοντας μία αποτελεσματική υπέρκφραση αλλά όχι σαν αυτήν των HFE145 στα οποία δεν εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α. Το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης δεν ήταν δυνατόν να ελεγχθεί σε πρωτεϊνικό επίπεδο, διότι η αλληλουχία του διαγονιδίου στον φορέα περιέχει μερικώς τον επίτοπο που αναγνωρίζει το αντίσωμα έναντι αυτής της πρωτεΐνης (**Εικόνα 24)**.

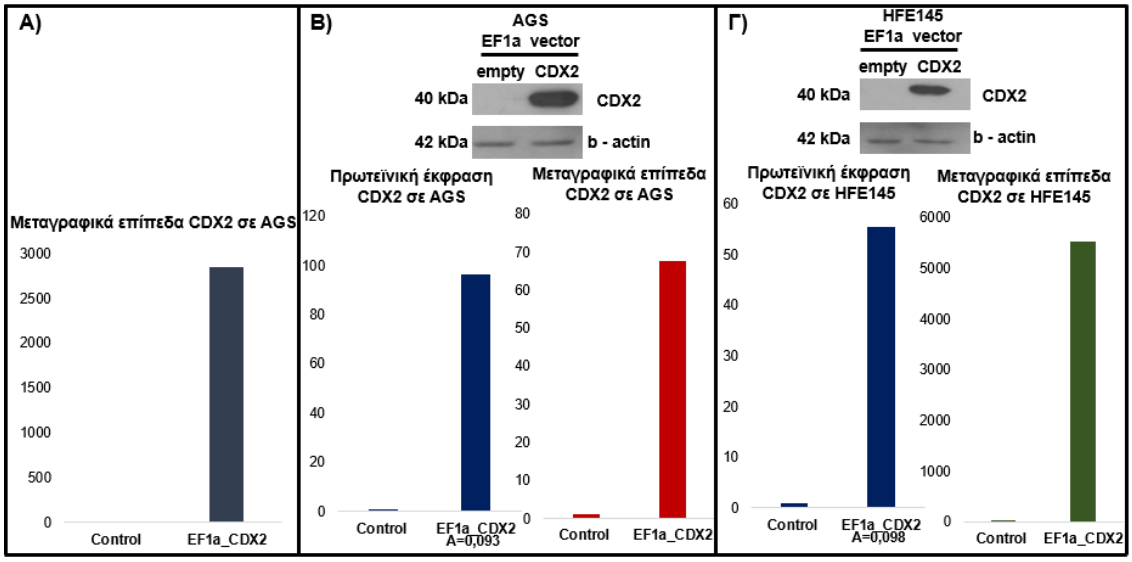


Εικόνα 24: ***Διερεύνηση της υπερέκφρασης του HNF4α σε κύτταρα AGS και HFE145.*** Στο κάτω μέρος της εικόνας (**A** και **B**) απεικονίζονται σε διάγραμμα τα επίπεδα έκφρασης του HNF4α σε σχέση με το control (EF1a_empty) μετά από την κανονικοποίηση με το ιδιοσύστατο

γονιδιο GAPDH. Στο πάνω μέρος της εικόνας (**Β**) το αποτέλεσμα από τη Western blot με χρήση αντισωμάτων έναντι του HNF4α και β-ακτίνης.

Υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων του παράγοντα CDX2 φάνηκε τόσο σε μεταγραφικό όσο και πρωτεϊνικό επίπεδο η αποτελεσματική υπερέκφραση του και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, στα HFE145 τα επίπεδα mRNA ήταν περίπου 5.500 φόρες πιο πάνω σε σχέση με τον μάρτυρα (**Εικόνα 25Γ**) . Στην περίπτωση των AGS, το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και από τις δύο βιολογικές επαναλήψεις σημειώνοντας μία αποτελεσματική υπέρκφραση αλλά όχι σαν αυτήν των HFE145 στα οποία δεν εκφράζεται ο CDX2. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, παρατηρήθηκε αυτά να είναι πιο υψηλά περίπου δύο φορές στα AGS από ότι στα HFE145, αλλά και πάλι το αποτέλεσμα είναι υποεκτιμημένο λόγω της ποσοτικοποίησης (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25: ***Αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του CDX2.*** **Α)** Επίπεδα έκφρασης μεταγράφου CDX2 μετά από την υπερέκφρασή του σε κύτταρα AGS. **Β)** Βιολογική επανάληψη της υπερέκφρασης στα AGS. **Γ)** Υπερέκφραση σε κύτταρα HFE145. Τόσο στην **εικόνα Β** όσο και στη **Γ** πάνω απεικονίζονται οι ζώνες του CDX2 (40 kDa) και της ακτίνης (42 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά τη διαδικασία του Western blotting. Στο κάτω μέρος, με μπλε μπάρα αναπαριστόνται τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του CDX2 (**εικόνα Β** και **Γ**), ενώ με κόκκινη (**Β**) και πράσινη (**Γ**) τα τα σχετικά μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης. Control: EF1a_empty.

4.4 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)

Στο πλαίσιο του γενικότερου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου, προηγούμενες μελέτες συνδύασαν δεδομένα βιοπληροφορικής RNA-Seq και ChIP-seq από βιοψίες γαστρικών όγκων προκειμένου να βρεθούν lncRNA-στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α, στους υποκινητές των οποίων υπάρχουν πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων. Από αυτήν τη μελέτη προέκυψαν τα lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 (GATA REgulated lncRNA GasTric) με διαφορική έκφραση στον καρκίνο του στομάχου τα οποία φάνηκε να έχουν θετική συσχέτιση με τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4/GATA6. Για να επιβεβαιωθεί ότι τα συγκεκριμένα lncRNA ρυθμίζονται άμεσα από τους παράγοντες GATA4/GATA6, στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP), προκειμένου να μελετηθεί η πρόσδεση των GATA4/GATA6 στα GREAT lncRNA. Για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε η

κυτταρική σειρά AGS καθώς είχε αποδειχθεί ότι οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση τόσο σε επίπεδο mRNA (GATA4 και GATA6) όσο και σε πρωτεϊνικό (GATA4).

4.4.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών κατακερματισμού

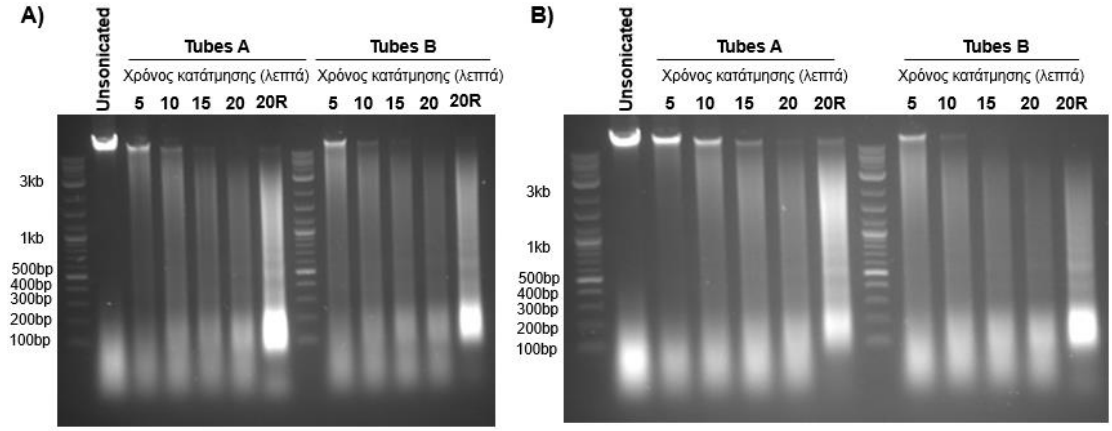
Σε πρώτη φάση πριν τη διεξαγωγή του πειράματος ChIP, πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές για την βελτιστοποίηση των συνθηκών του κατακερματισμού της χρωματίνης με το μηχάνημα QSONICA Q800R3 Sonicator. Το βήμα αυτό της βελτιστοποίηση είναι απαραίτητο να γίνεται κάθε φορά που αλλάζει η κυτταρική σειρά, καθώς είναι δύσκολο οι ίδιες συνθήκες να αναπαραχθούν από πείραμα σε πείραμα. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει όλη αυτή η διαδικασία είναι ότι η κατεργασία με τους υπερήχους αποτελεί ένα κρίσιμο πρώτο βήμα στις περισσότερες αναλύσεις ChIP.

Ειδικότερα, στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε έλεγχος του κατακερματισμού σε δύο είδους σωληνάρια τύπου eppendorf διαφορετικού υλικού καθώς και σε 4 διαφορετικές συνθήκες για το κάθε υλικό. Μεταξύ των συνθηκών διέφερε μόνο ο συνολικός χρόνος της κατεργασίας με τους υπερήχους. Όσον αφορά την ένταση με την οποία γίνεται η κατεργασία (amplitude) ήταν 55% και όσον αφορά τον παλμό ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της εξόδου υπερήχων σε κάθε κύκλο ήταν 15sec on/ 15sec off αντίστοιχα. Οι χρόνοι που δοκιμάστηκαν ήταν: 5, 10, 15 και 20 λεπτά. Όλο το πείραμα επαναλήφθηκε προκειμένου να ελεγχθεί αν υπάρχει επαναληψιμότητα στο αποτέλεσμα ή ήταν τυχαίο.

Αναλυτικότερα, για τον σκοπό αυτό έγινε απομόνωση και κατάτμηση χρωματίνης από κύτταρα AGS (confluency ~75-80%) που είχαν στρωθεί ($2 X 10^6$) τρεις μέρες νωρίτερα σε πιάτο 150 mm. Για το συγκεκριμένο πείραμα, η συνολική ποσότητα της χρωματίνης ήταν 1.700μl (δηλαδή πριν την κατεργασία με υπερήχους το ίζημα από τη λύση των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 1.700μl διαλύματος κατάτμησης). Από αυτή την ποσότητα τα 100μl χρησιμοποιήθηκαν ως μη κατακερματισμένος μάρτυρας (unsonicated control) εφόσον δεν έγινε κατεργασία με υπέρηχους. Η υπόλοιπη ποσότητα χωρίστηκε σε τέσσερα μέρη, δύο για το κάθε eppendorf διαφορετικού υλικού. Στη συνέχεια, ακολούθησε κατακερματισμός με τις εξής συνθήκες: Amplitude 55%, Pulse 15sec on/15sec off, Time 5 min. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος έγινε συλλογή δείγματος που αντιστοιχούσε στη συνθήκη 5 λεπτών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου συλλεχθεί και δείγμα που θα αντιστοιχεί στη συνθήκη 20 λεπτών. Στην κάθε συνθήκη συνολικά υπήρχε ποσότητα 50 μl. Στο τέλος όλης της διεργασίας συλλέχθηκε και ποσότητα 200μl (20 λεπτά χρόνος) στην οποία σε επόμενο βήμα ακολούθησε και επεξεργασία με RNAseA. Μετά τη διαδικασία εξαγωγής του DNA, την επεξεργασία με RNAseA (1 ώρα και 47 λεπτά στους 37^{o}C) και τον καθαρισμό των δειγμάτων με φαινόλη-χλωροφόρμιο έγινε έλεγχος του κατακερματισμού σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Σύμφωνα με την **Εικόνα 26** φαίνεται ότι σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (unsonicated) έχει επιτευχθεί κατάτμηση της χρωματίνης (smear) σε όλες τις συνθήκες καθώς και στα δύο είδη eppendorf. Όσον αφορά το υλικό του eppendorf παρατηρείται ότι στον τύπου Β οι υπέρηχοι μπορούν να διαπεράσουν πιο εύκολα το υλικό προκαλώντας καλύτερη θραύση της χρωματίνης. Όσον αφορά τους διαφορετικούς χρόνους υποδεικνύεται ότι όσο αυξάνεται η διάρκεια τόσο περισσότερη χρωματίνη συγκεντρώνεται σε μοριακό βάρος κάτω από τις 300bp που είναι περίπου εκεί που απαιτείται για να μπορεί να γίνει στη συνέχεια κατακρήμνιση. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και στην επανάληψη του πειράματος επιβεβαιώνοντας τις αρχικές παρατηρήσεις. Συνεπώς, στα πειράματα ChIP το στάδιο του κατακερματισμός της

χρωματίνης διεξάχθηκε στις συνθήκες: Amplitude 55%, Pulse 15sec on/ 15sec off, Time 20 min, και έγινε χρήση των eppendorf τύπου B.



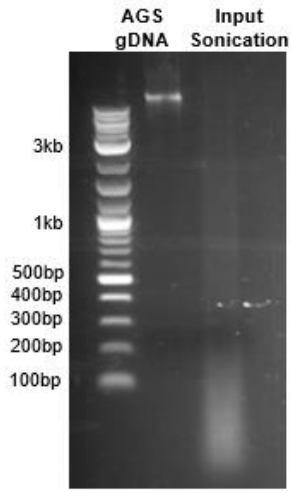
Εικόνα 26: ***Αποτελέσματα ηλέκτροφόρησης από τις διάφορες συνθήκες κατεργασίας της χρωματίνης με υπερήχους***. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1% και για κάθε συνθήκη (5, 10, 15 και 20 λεπτά) αναλύθηκαν 50μl χρωματίνης, για το Unsonicated (μη κατακερματισμένη χρωμάτινη) 100μl και για τη συνθήκη 20R (20 λεπτά κατεργασία με υπερήχους και επεξεργασία με RNAseA για 1 ώρα και 47 λεπτά στους 37^{o}C) 200μl. Οι συνθήκες κατακερματισμού ήταν: Amplitude 55%, Pulse 15sec on/ 15sec off, Time 5 min, και έγινε χρήση κυττάρων AGS (confluence ~ 75-80%). Το σχήμα **A** και **B** αφορούν δύο βιολογικές επαναλήψεις του πειραμάτος. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb^{plus} της εταιρείας NEB.

4.4.2 Αποτελέσματα του ChIP

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος ChIP πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε τρία επίπεδα.

1. Έλεγχος του κατακερματισμού της χρωματίνης

Για το σκοπό αυτό δείγμα που είχε συλλεχθεί μετά την κατεργασία με τους υπερήχους (input sonication), ελέγχθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% αφού πρώτα έγινε εξαγωγή και καθαρισμός DNA. Ως μάρτυρας (δείγμα χωρίς κατακερματισμό χρωματίνης) χρησιμοποιήθηκε gDNA από το ίδιο τύπο κυττάρων στα όποια έγινε και ChIP (AGS). Το βήμα αυτό είναι υψίστης σημασίας, όπως προαναφέρθηκε, για να επιβεβαιωθεί αν το μέγεθος του μεγαλύτερου ποσοστού των τμημάτων της χρωματίνης κυμαίνεται από 200 έως 600 ζεύγη βάσεων. Με βάση αυτό που απεικονίζεται στην **Εικόνα 27** φαίνεται ότι μετά από την θραύση της χρωματίνης με την χρήση υπερήχων, τα θραύσματα ήταν συγκεντρωμένα στο ελάχιστο επιθυμητό μέγεθος καθώς και ότι η χρωματίνη στην οποία διεξάχθηκε η ανοσοκατακρήμνιση ήταν αρκετά αραιή (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ).

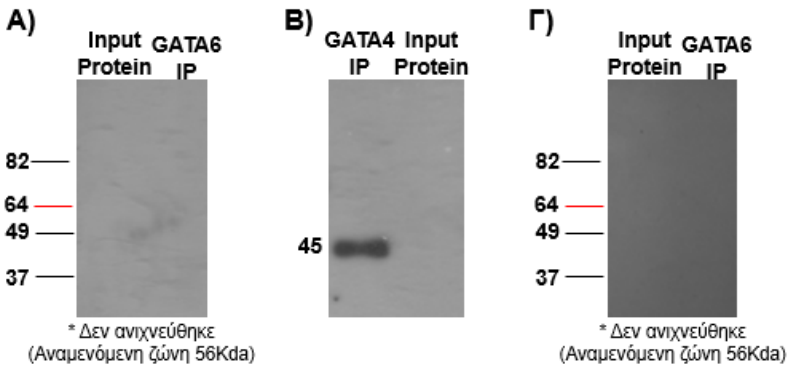


Εικόνα 27: ***Έλεγχος του κατακερματισμού της χρωματίνης σε πηκτή αγαρόζης 1%.*** AGS gDNA: δείγμα χωρίς κατάτμηση, Input Sonicaiton: κατακερματισμένη χρωμάτινη, Μάρτυρας μοριακού βάρους: 1kb^{plus} της εταιρείας NEB.

2. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της ανοσοκατακρήμνισης

Για να ελεγχθεί το κατά πόσο επιτευχθεί η κατακρήμνιση της χρωματίνης που καταλαμβάνει ο μεταγραφικός παράγοντας-ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε Western Blot. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί τόσο η ειδικότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε έναντι του μεταγραφικού παράγοντα καθώς και να επιβεβαιωθεί αν η ζώνη που ανιχνεύεται αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος που αναμενόταν. Συνεπώς, έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθεί αν το ChIP δούλεψε καλά ή όχι. Ένα ακόμη κριτήριο για αυτό είναι αν η ένταση της ζώνης στο δείγμα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου είναι πιο έντονη γεγονός που υποδεικνύει ότι έχει επιτευχθεί εμπλουτισμός της υποψήφιας γονιδιωματικής περιοχής.

Σύμφωνα με την **Εικόνα 28** φαίνεται ότι το ChIP που έγινε για τον GATA4 δούλεψε, σε αντίθεση με τον GATA6 παρόλο που οι συνθήκες του πειράματος ήταν οι ίδιες και για τις δύο πρωτεΐνες (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ). Συνεπώς, για τον GATA6 απαιτείται βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επανάληψη για το συγκεκριμένο μεταγραφικό, χρησιμοποιώντας περισσότερη χρωματίνη και αντίσωμα, αλλά το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο, δηλαδή δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της πρωτεΐνης (**Εικόνα 28Γ**). Πιθανόν, αυτό να εξηγείται και από τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της GATA6 πρωτεΐνης (**Εικόνα 19Α**, βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ).



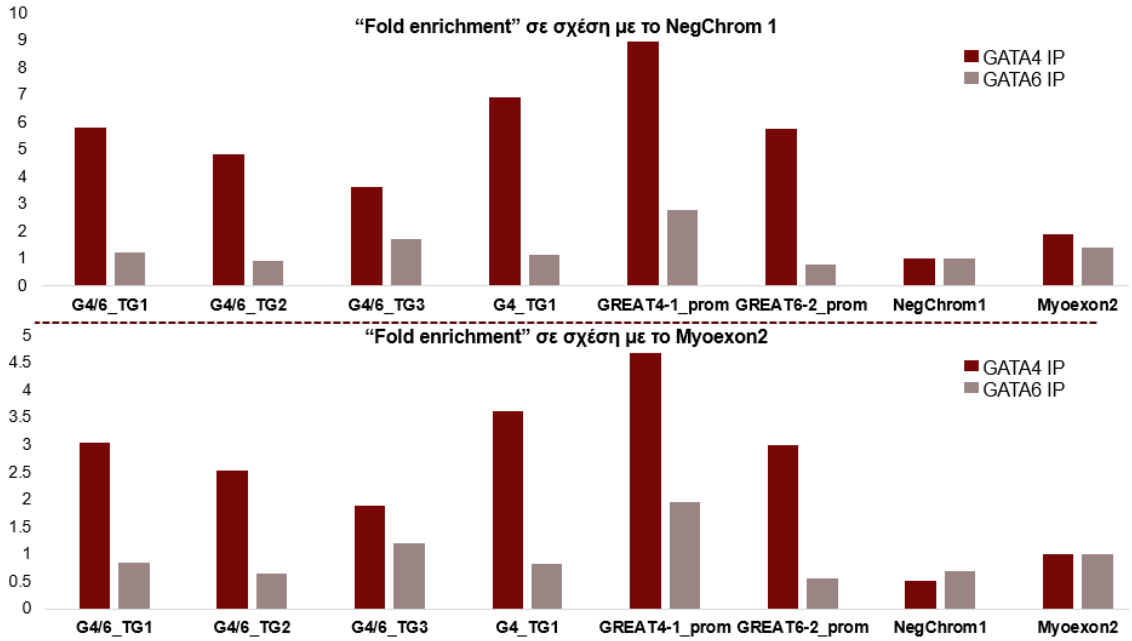
Εικόνα 28: ***Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της ανοσοκατακρήμνισης μέσω Western Blot.*** **Α)** Ανοσοκακρήμνιση της πρωτεΐνης GATA6. **Β)** Ανοσοκακρήμνιση της πρωτεΐνης

GATA4. **Γ)** Βιολογική επανάληψη για την ανοσοκακρήμνιση της πρωτεΐνης GATA6. Input Protein: δείγμα χωρίς ανοσοκατακρήμνιση.

3. Έλεγχος της πρόσδεσης της υπο-μελέτη πρωτεΐνης σε συγκεκριμένη γονιδιωματική περιοχή

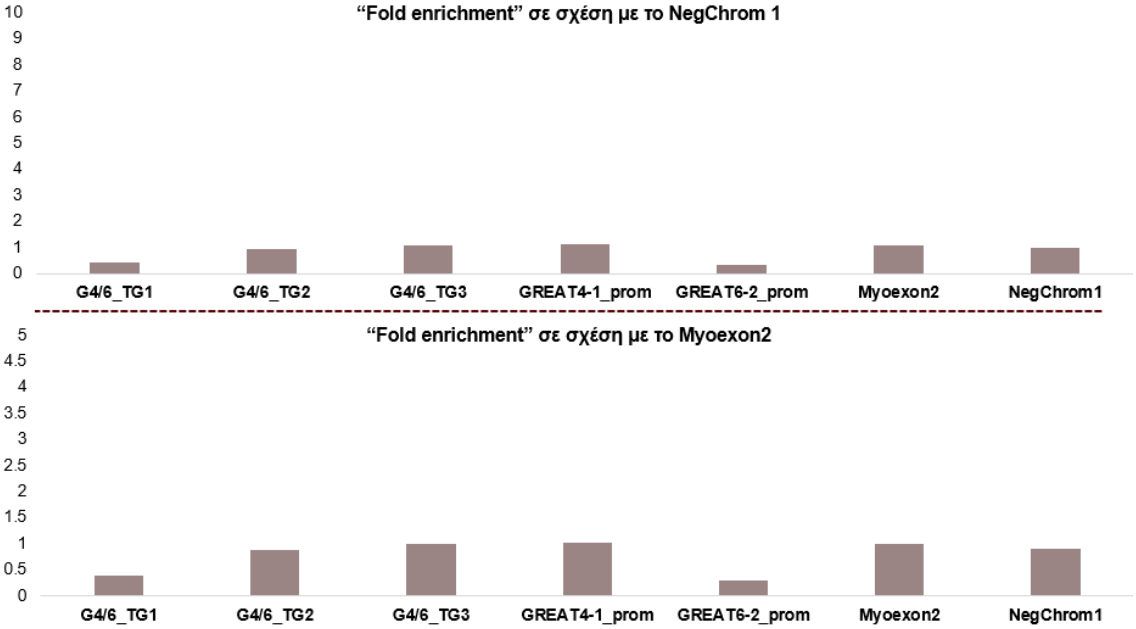
Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, ακολούθησε και qPCR για τον έλεγχο της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 στον υποκινητή των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2. Για τον έλεγχο της ειδικότητας της πρόσδεσης των παραγόντων στις περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκαν δύο αρνητικοί μάρτυρες (NegChrom1: αλληλουχία μεσογονιδιακού τμήματος και Myoexon2: αλληλουχία εξονίου mRNA). Ταυτόχρονα, για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης έγινε χρήση τεσσάρων υποκινητών ως θετικών μαρτύρων, στους οποίους είναι γνωστό ότι προσδένονται οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Οι τρεις υποκινητές-μάρτυρες (GATA4/6_TG1, GATA4/6_TG2, GATA4/6_TG3) ήταν κοινοί στόχοι των GATA4 και GATA6 ενώ ο τέταρτος υποκινητής-στόχος (GATA4_TG1) ήταν ειδικός για GATA4.

Στην εικόνα που ακολουθεί (**Εικόνα 29**) απεικονίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ανάλυση, όπως περιγράφηκε νωρίτερα (βλ. § 3.10). Αρχικά, παρατηρείται ότι η ανοσοκατακρήμνιση για τον GATA6 δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα καθώς ούτε για τους θετικούς μάρτυρες φάνηκε εμπλουτισμός των περιοχών πρόσδεσης του μεταγραφικού σε σχέση με τους αρνητικούς. Όσον αφορά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του GATA4 φαίνεται ότι δούλεψε καθώς υπάρχει ανίχνευση της πρόσδεσης της πρωτεΐνης σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Από αυτό διεξάγεται και το συμπέρασμα ότι οι αρνητικοί μάρτυρες που έχουν επιλεχθεί είναι κατάλληλοι, διότι δεν σημειώνεται εμπλουτισμός των περιοχών αυτών. Ειδικότερα, παρατηρείται πρόσδεση του GATA4 κυρίως με την κανονικοποίηση του αρνητικού μάρτυρα NegChrom1, με υψηλότερο σήμα να παρατηρείται στον υποκινητή του lncRNA GREAT4-1. Επίσης, το σήμα που παρατηρείται στους θετικούς μάρτυρες είναι υποεκτιμημένο γιατί για την πραγματοποίηση της qPCR έγινε χρήση δείγματος input DNA (δείχνει από πόση χρωματίνη ξεκίνησε το πείραμα) από άλλο πείραμα, αφού πρώτα είχε ρυθμιστεί σε ίδια συγκέντρωση με αυτό του κανονικού πειράματος ανοσοκακρήμνισης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6.



Εικόνα 29: ***Έλεγχος της πρόσδεσης του GATA4 και GATA6 στα lncRNA GREAT4-1 GREAT6-2 μέσω qPCR.*** Στο σχήμα απεικονίζεται το σήμα που παρατήρειται από την πρόσδεση του GATA4 και GATA6 σε αλληλουχίες που είναι γνωστό ότι προσδένονται (περιοχή υποκινητή των γονιδίων G4/6_TG1-TG3 και G4_TG1) και στις αλληλουχίες-στόχου [περιοχή υποκινητή του GREAT4-1 (GREAT4-1_prom) και GREAT6-2 (GREAT6-2_prom)] σε σχέση με το NegChrom1 (πάνω διάγραμμα) και Myoexon2 (κάτω διάγραμμα). Θετικοί μάρτυρες: G4/6_TG1-TG3 και G4_TG1, αρνητικοί μάρτυρες: NegChrom1 και Myoexon2. G4: GATA4, G4/6: GATA4/GATA6.

Λόγω του ότι η ανοσοκατακρήμνιση με τον GATA6 φάνηκε να μη δούλεψε, έγινε επανάληψη του πειράματος με πιο πυκνή χρωματίνη και μεγαλύτερη ποσότητα αντισώματος. Το αποτέλεσμα από την qPCR αναπαρίσταται στην **Εικόνα 30**. Φαίνεται ότι και αυτή τη φορά το αποτέλεσμα δεν ήταν το επιθυμητό, συνεπώς για το συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα χρειάζεται βελτιστοποίηση λόγω εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων έκφρασης.



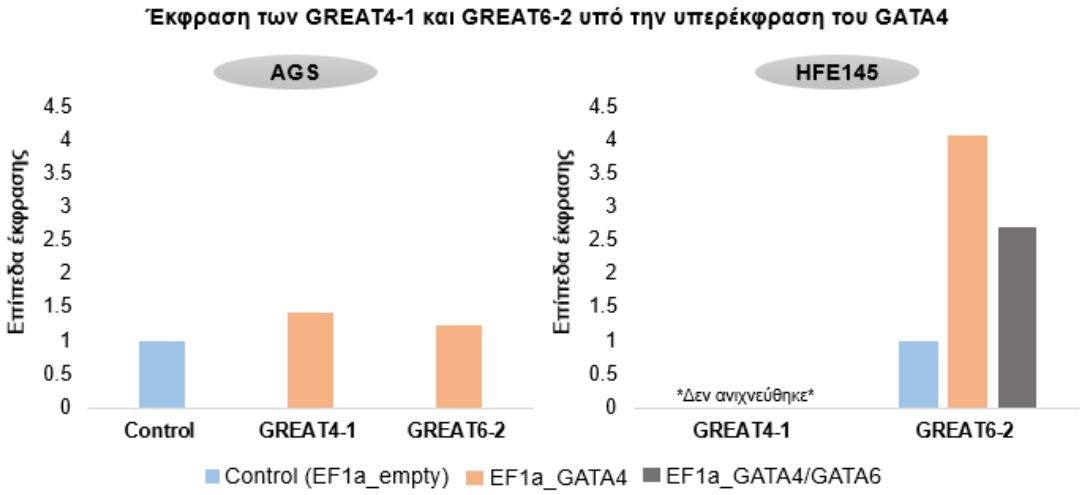
Εικόνα 30: ***Έλεγχος της πρόσδεσης του GATA6 στα lncRNA GREAT4-1 GREAT6-2 μέσω qPCR.*** Στο σχήμα απεικονίζεται το σήμα που παρατήρειται από την πρόσδεση του GATA6 σε

αλληλουχίες που είναι γνωστό ότι προσδένεται (περιοχή υποκινητή των γονιδίων G4/6_TG1-TG3 και G4_TG1) και στις αλληλουχίες-στόχου [περιοχή υποκινητή του GREAT4-1 (GREAT4-1_prom) και GREAT6-2 (GREAT6-2_prom)] σε σχέση με το NegChrom1 (πάνω διάγραμμα) και Myoexon2 (κάτω διάγραμμα). Θετικοί μάρτυρες: G4/6_TG1-TG3, αρνητικοί μάρτυρες: NegChrom1 και Myoexon2. G4/6: GATA4/GATA6.

4.5 Έλεγχος της έκφρασης των lncRNA-στόχων υπό την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α

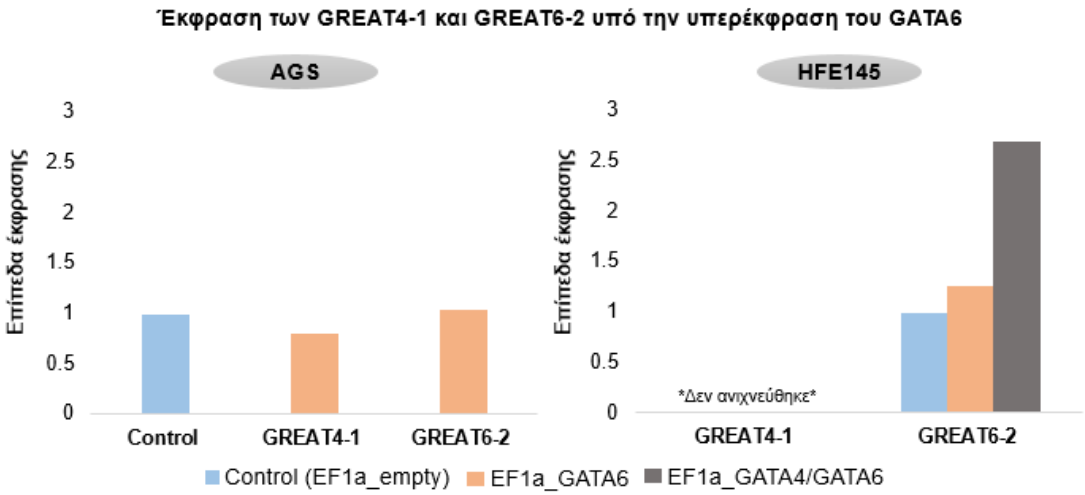
4.5.1 Ρύθμιση των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2

Μετά την απόδειξη της πρόσδεσης του GATA4 στον υποκινητή των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2, σκοπός ήταν η μελέτη των επιπτώσεων του μεταγραφικού παράγοντα στην έκφραση αυτών των lncRNA. Για αυτό τον λόγο ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των GREAT4-1 και GREAT6-2, όταν ο GATA4 απορρυθμίζεται και συγκεκριμένα όταν υπερεκφράζεται. Έτσι, πραγματοποιήθηκε qPCR σε δείγματα cDNA που είχε αποδειχθεί η υπερέκφραση του μεταγραφικού (βλ. **Εικόνα 21**). Όπως αποδεικνύεται από το διάγραμμα της **Εικόνας 31**, στην επιτυχή υπερέκφραση του GATA4 στα AGS, η επίδραση του και στα δύο lncRNA δεν δείχνει σημαντική μεταβολή. Από την άλλη στην επιτυχή υπερέκφραση του GATA4 στα HFE145, αποδείχθηκε ότι υπάρχει πιθανή ρύθμιση από τον GATA4 στο GREA6-2. Για το GREAT4-1 δεν ήταν δυνατόν να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα γιατί δεν ανιχνεύθηκε έκφραση (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ). Επιπλέον, ενδιαφέρον προκαλεί η μικρή αλλαγή που παρατηρήθηκε και από τη συνδυαστική υπερέκφραση των GATA4 και GATA6 (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ).



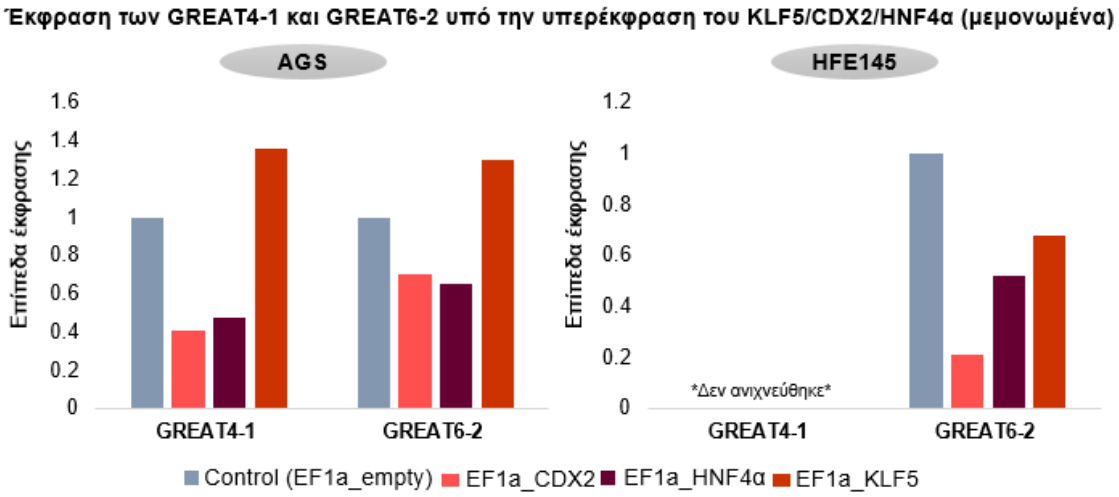
Εικόνα 31: ***Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (EF1a_empty), έπειτα από μεταγραφική υπερέκφραση του GATA4 στα κύτταρα AGS και HFE145 καθώς και της ταυτόχρονης υπερέκφρασης του GATA4 και GATA6 στα κύτταρα HFE145.*** Κανονικοποίηση με το ιδιοσύστατο γόνιδιο GAPDH.

Ταυτόχρονα, παρά το γεγονός ότι από το ChIP δεν αποδείχθηκε η πρόσδεση του GATA6 στον υποκινητή των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2, έγινε έλεγχος του αν έχει κάποιο βιολογικό ρόλο στη ρύθμιση των συγκεκριμένων lcRNA. Όπως και στο GATA4, πραγματοποιήθηκε qPCR σε δείγματα cDNA που είχε αποδειχθεί η υπερέκφραση του GATA6 (βλ. **Εικόνα 22**). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης (**Εικόνα 32**) φαίνεται ότι τόσο στα AGS όσο και στα HFE145 η υπερέκφρασή του δεν έχει κάποια επίπτωση στα μεταγραφικά επίπεδα των lncRNA. Και στην περίπτωση του GATA6, στα HFE145 δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του GREAT4-1 (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ).



Εικόνα 32: ***Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (EF1a_empty), έπειτα από μεταγραφική υπερέκφραση του GATA6 στα κύτταρα AGS και HFE145 καθώς και της ταυτόχρινης υπερέκφρασης του GATA4 και GATA6 στα κύτταρα HFE145.*** Κανονικοποίηση με το ιδιοσύστατο γόνιδιο GAPDH.

Εκτός από την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του GREAT4-1 και GREAT6-2 έπειτα από την υπερέκφραση των GATA4 και GATA6 στα κύτταρα AGS και HFE145, που από βιοπληροφορική ανάλυση είχε φανεί να έχουν θετική συσχέτιση με αυτά τα lncRNA, έγινε έλεγχος το πώς και η υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/CDX2/HNF4α επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση των συγκεκριμένων lncRNA. Έτσι, πραγματοποιήθηκε qPCR σε δείγματα cDNA που είχε αποδειχθεί η υπερέκφραση καθενός από τους KLF5/CDX2/HNF4α (βλ. **Εικόνα 23-25**). Με βάση την **Εικόνα 33**, αποδεικνύεται ότι στην κυτταρική σειρά AGS η υπερέκφραση του KLF5 δεν έχει κάποια σημαντική επίπτωση στα μεταγραφικά επίπεδα των lncRNA σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Αντίθετα, στα HFE145 φάνηκε ότι με την υπερέκφραση του KLF5 τα επίπεδα του GREAT6-2 μειώθηκαν περίπου 30% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Όσον αφορά τον CDX2 και HNF4α, παρατηρήθηκε ίδιο πρότυπο ως προς το πώς επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση των GREAT4-1 και GREAT6-2, ειδικότερα επάγουν την μείωση των μεταγραφικών επιπέδων τόσο στα AGS όσο και στα HFE145 κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, υπό την υπερέκφραση του CDX2 στα AGS παρατηρήθηκε μείωση σε ποσοστό 59% για το GREAT4-1 και 30% για το GREAT6-2. Το αποτέλεσμα αυτό έχει επιβεβαιωθεί και από βιολογική επανάληψη. Παρόμοια ήταν και η επίδραση της υπερέκφρασης του HNF4α, καθώς προκάλεσε μείωση σε ποσοστό 53% για το GREAT4-1 και 35% για το GREAT6-2. Όσον αφορά τα κύτταρα HFE145 φάνηκε ότι με την υπερέκφραση του CDX2 ή HNF4α τα επίπεδα του GREAT6-2 μειώθηκαν περίπου 79% και 48% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, αντίστοιχα. Τέλος, στην περίπτωση της υπερέκφρασης KLF5/CDX2/HNF4α στα HFE145, πάλι δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του GREAT4-1 (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ).



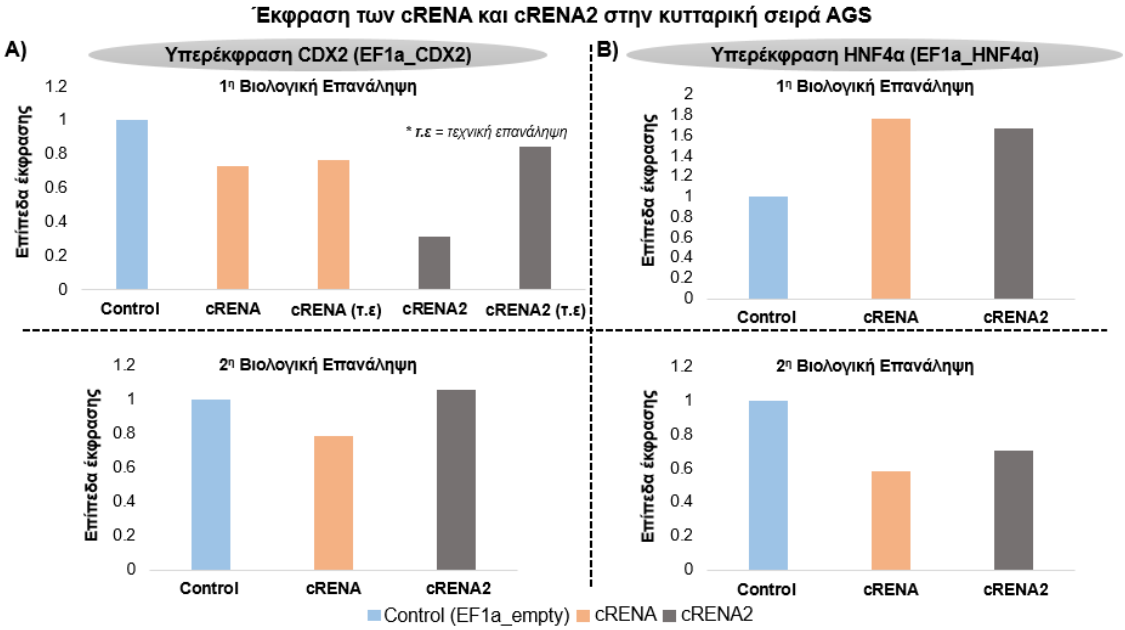
Εικόνα 33: ***Αποτελέσματα από την ανάλυση της qPCR για τα lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 σε κυτταρικές σειρές AGS και HFE145 στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/CDX2/HNF4α μεμονωμένα.*** Κανονικοποίηση με το ιδιοσύστατο γόνιδιο GAPDH.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά αυξάνουν την πιθανότητα να ισχύει η υπόθεση της θετικής ρύθμισης των συγκεκριμένων lncRNA από τους GATA μεταγραφικούς στον καρκίνο του στομάχου, ακόμη και αν στην περίπτωση των AGS δεν ήταν δυνατόν να αποδειχθεί (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ). Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Όσον αφορά τους άλλους μεταγραφικούς ενδιαφέρον φαίνεται να έχει η επίδραση των CDX2 και HNF4α τόσο λόγω του κοινού τρόπου που φαίνεται να ρυθμίζουν τα GREAT4-1 και GREAT6-2 όσο και το γεγονός ότι με την υπερέκφρασή τους επάγεται μείωση στην έκφραση των lncRNA.

4.5.2 Ρύθμιση των lncRNA cRENA και cRENA2

Παράλληλα, με τα lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2, έγινε έλεγχος για τα lncRNA cRENA και cRENA2 (CDX2 Regulated lncRNAs) τα οποία προέκυψαν από προηγούμενη μελέτη που στόχευε στην εύρεση lncRNA που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό σύμπλοκο των CDX2 και HNF4α. Έτσι, πραγματοποιήθηκε qPCR σε δείγματα cDNA από την επιτυχημένη υπερέκφραση καθενός από τους CDX2/HNF4α σε κύτταρα AGS, προκειμένου να παρατηρηθεί αν αποτελούν πιθανούς ρυθμιστές των cRENA και cRENA2.

Με βάση την **Εικόνα 34** φαίνεται ότι με την υπερέκφραση του CDX2 τα επίπεδα των lncRNA μειώνονται. Ειδικότερα, για το cRENA το αποτέλεσμα αυτό (μείωση περίπου 25% σε σχέση με τον μάρτυρα) επιβεβαιώνεται τόσο μεταξύ των τεχνικών επαναλήψεων στην πρώτη βιολογική επανάληψη όσο και μεταξύ των δύο βιολογικών επαναλήψεων. Για το cRENA2 υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο βιολογικών επαναλήψεων. Ωστόσο, στην πρώτη βιολογική επανάληψη που είχε επιτευχθεί καλύτερη υπερέκφραση (περίπου 3000 φόρες πάνω από τον μάρτυρα) σε σχέση με την δεύτερη (περίπου 70 φόρες πάνω από τον μάρτυρα) και οι δύο τεχνικές επαναλήψεις απέδειξαν μείωση των επιπέδων έκφρασης του cRENA2, με την μία από τις δύο τεχνικές να αποδίδει μείωση σε ποσοστό περίπου 70%. Όσον αφορά την περίπτωση του HNF4α το αποτέλεσμα μεταξύ των δύο βιολογικών επαναλήψεων είναι αντίθετο, συνεπώς απαιτείται να γίνει επανάληψη.



Εικόνα 34: ***Διάγραμματα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης των lncRNA cRENA και cRENA2 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (EF1a_empty), έπειτα από μεταγραφική υπερέκφραση του CDX2 ή HNF4α στα κύτταρα AGS.*** Τόσο στην **εικόνα Α** (υπερέκφραση του CDX2) όσο και στη **Β** (υπερέκφραση του HNF4α) πάνω απεικονίζονται τα διαγράμματα από την πρώτη βιολογική επάληψη και κάτω από τη δεύτερη. Κανονικοποίηση με το ιδιοσύστατο γόνιδιο GAPDH.

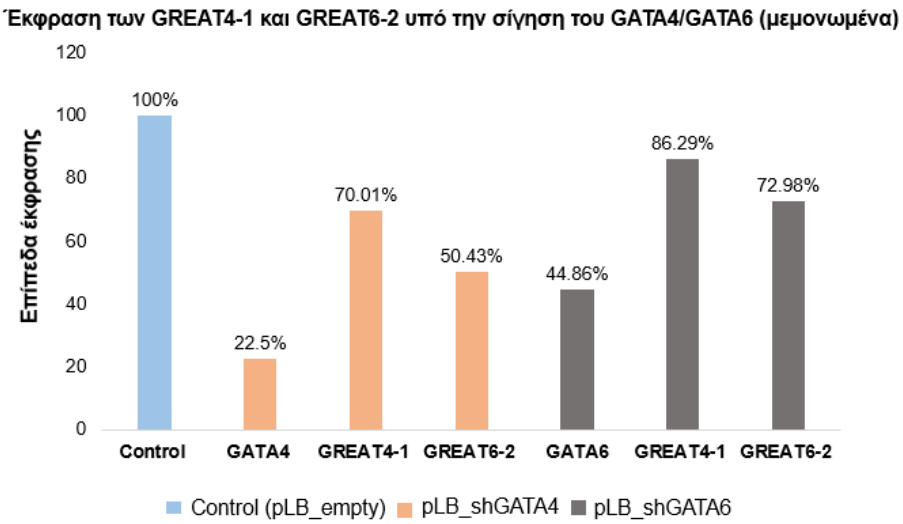
Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι CDX2/HNF4α είναι πιθανοί ρυθμιστές των συγκεκριμένων lncRNA. Ωστόσο, απαιτείται να γίνει επιβεβαίωση των πειραμάτων καθώς οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των βιολογικών/τεχνικών επαναλήψεων μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στα AGS έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα mRNA των παραγόντων (βλ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ). Επιπλέον, απαιτείται να πραγματοποιηθεί και ChIP ώστε να επιβεβαιωθεί η πρόσδεσή τους σε ένα *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο των cRENA και cRENA2.

4.6 Έλεγχος της έκφρασης των lncRNA-στόχων υπό την σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6/KLF5

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης —η θετική συσχέτιση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6 με τα lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2— εκτός από τον έλεγχο της μεταβολής της έκφρασης των συγκεκριμένων lncRNA υπό συνθήκες υπερέκφρασης έγινε έλεγχος και σε συνθήκες καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων.

Για το σκοπό αυτό, τα επίπεδα έκφρασης του GREAT4-1 και GREAT6-2 προσδιορίστηκαν μέσω qPCR σε κύτταρα AGS στα οποία είχε προηγηθεί επιτυχής μεταγραφική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6 από προηγούμενη διατριβή. Ειδικότερα, για την μεταγραφική σίγηση των πρωτεϊνών αυτών είχε γίνει χρήση του πλασμιδιακού φορέα pLB για τη δημιουργία δύο κατασκευών, όπου η κάθε μία περιείχε shRNA που στόχευε το μετάγραφο ενός από τους δύο παράγοντες. Επίσης ως αρνητικός μάρτυρας είχε χρησιμοποιηθεί φορέας χωρίς ένθεμα. Η παροδική καταστολή είχε πραγματοποιηθεί με τη διαμόλυνση AGS κυττάρων μέσω παραγωγής και χρήσης λεντιιών. Σύμφωνα με τα μεταγραφικά επίπεδα που απεικονίζονται στην **Εικόνα 35**, φαίνεται ότι σε μια επιτυχή σίγηση του GATA4 σε ποσοστό 77,5%, η έκφραση των GREAT4-1 και GREAT6-2 μειώθηκε σε ποσοστό 30% και 50% σε σύγκριση με τον μάρτυρα, αντίστοιχα. Και σε μια επιτυχή

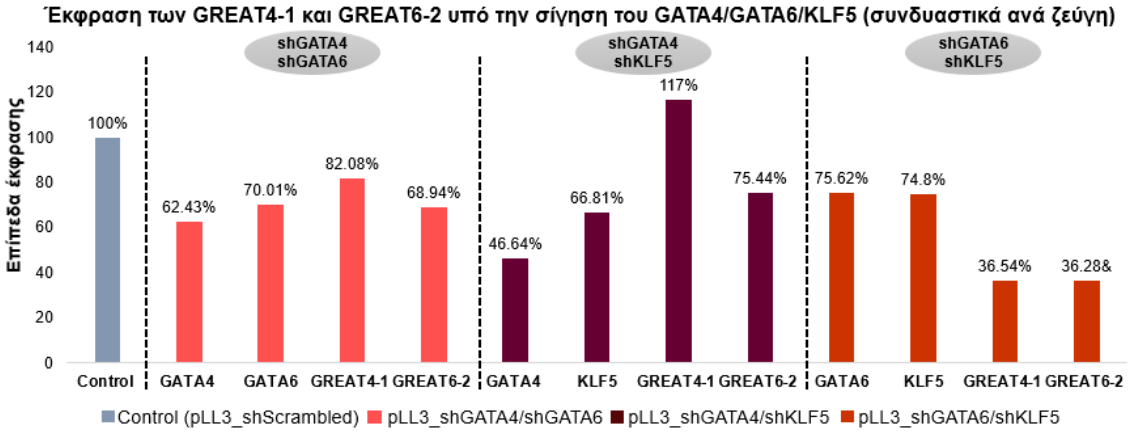
σίγηση του GATA6 σε ποσοστό 55,2%, η έκφραση των GREAT4-1 και GREAT6-2 μειώθηκε σε ποσοστό 14% και 27,1% σε σύγκριση με τον μάρτυρα, αντίστοιχα. Συμπερασματικά με βάση τα παραπάνω, αποδεικνύεται ότι οι GATA μεταγραφικοί παράγοντες και κυρίως ο GATA4 ελέγχει τα συγκεκριμένα lncRNA στον καρκίνο του στομάχου, και η απουσία του επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση τους.



Εικόνα 35: ***Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 σε κύτταρα AGS στα οποία έχει πραγματοποιηθεί σίγηση του GATA4 ή GATA6 με χρήση του φορέα pLB/shGATA4 ή pLB/shGATA4 αντίστοιχα, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (κύτταρα AGS τα οποία έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα pLB_empty).*** Στο διάγραμμα απεικονίζεται και το ποσοστό μείωσης της έκφρασης του GATA4 και GATA6 στη σίγηση του GATA4 και GATA6, αντίστοχα. Κανονικοποίηση με το ιδιοσύστατο γόνιδιο GAPDH.

Επιπρόσθετα, λόγω του ότι στις συνθήκες υπερέκφρασης η επίδραση της απορρύθμισης στη γονιδιακή έκφραση των GREAT4-1 και GREAT6-2 δεν ήταν σημαντική, θεωρήθηκε ότι πιθανόν υπάρχει συνεργατική δράση μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων. Έτσι, σε πρώτη φάση για να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση έγινε μελέτη των επιπτώσεων από ταυτόχρονη σίγηση μεταγραφικών παραγόντων (που είχε επιτευχθεί σε προηγούμενη διατριβή) στην έκφραση αυτών των lncRNA στα καρκινικά κύτταρα MKN45. Πιο συγκεκριμένα, έγινε έλεγχος σε τρεις συνθήκες: ταυτόχρονη σίγηση GATA4 και GATA6, ταυτόχρονη σίγηση GATA4 και KLF5, και ταυτόχρονη σίγηση GATA6 και KLF5. Ειδικότερα, για την μεταγραφική σίγηση των πρωτεϊνών GATA4, GATA6 και KLF5 είχε γίνει χρήση του πλασμιδιακού φορέα pLL3 για τη δημιουργία κατασκευών, όπου η κάθε μία περιείχε shRNA που στόχευε το μετάγραφο ενός από τους παράγοντες. Επίσης, ως αρνητικός μάρτυρας είχε χρησιμοποιηθεί δείγμα στο οποίο δεν είχε πραγματοποιηθεί σίγηση, καθώς το shRNA περιλάμβανε μια αλληλουχία που δεν στόχευε πουθενά στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Όσον αφορά την παροδική καταστολή είχε πραγματοποιηθεί με διαμόλυνση MKN45 με ιό που έφερε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς δύο πλασμιδιακών φορέων με σκοπό την ταυτόχρονη σίγηση δύο από τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες. Σύμφωνα με τα μεταγραφικά επίπεδα που απεικονίζονται στην **Εικόνα 36**, η ταυτόχρονη σίγηση των GATA4/GATA6 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του GATA4 κατά 37,57%, τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του GATA6 κατά 30%, τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του GREAT4-1 κατά 18% και του GREATA6-2 κατά 31% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Στην περίπτωση της ταυτόχρονης σίγησης των GATA4/KLF5, η έκφραση των GATA4 και KLF5 μειώθηκε σε ποσοστό 53,4% και 33,2%, αντίστοιχα σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Όσον αφορά τα μεταγραφικά επίπεδα

των lncRNA, στην περίπτωση του GREAT4-1 δεν παρουσίασαν αλλαγή σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ του GREAT6-2 μειώθηκαν σε ποσοστό 24,6%. Τέλος, από την επιτυχή σίγηση των GATA6 και KLF5, σε ποσοστό 24,4% και 25,2%, αντίστοιχα, η έκφραση των GREAT4-1 και GREAT6-2 μειώθηκε σε ποσοστό 63,5% και 63,8% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, αντίστοιχα. Συνολικά φαίνεται πως όταν μειώνονται τα επίπεδα των ογκοεπαγωγικών μεταγραφικών παραγόντων GATA4/GATA6/KLF5 σε ζευγάρια, μειώνονται και τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA, σε ποσοστά που μεταβάλλονται κάθε φορά. Το γεγονός αυτό αυξάνει την πιθανότητα να ισχύει η υπόθεση της θετικής ρύθμισης των lncRNA από συνεργατική δράση ογκοεπαγωγικών μεταγραφικών παραγόντων στον καρκίνο.



Εικόνα 36: ***Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 σε κύτταρα MKN45 στα οποία έχει πραγματοποιηθεί ταύτοχρονη σίγηση σε ζεύγη των GATA4/GATA6/KLF5 με χρήση του φορέα pLL3, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (κύτταρα MKN45 τα οποία έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα pLL3/shScrambled).*** Στο διάγραμμα απεικονίζεται και το ποσοστό μείωσης της έκφρασης του GATA4/GATA6/KLF5 στις συνθήκες που περιλαμβάνεται ο καθένας. Κανονικοποίηση με το ιδιοσύστατο γόνιδιο GAPDH.

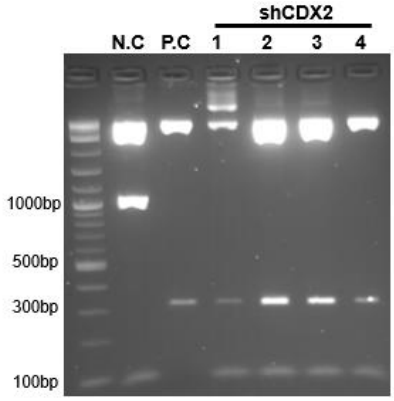
4.7 Καταστολή έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 με shRNA

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας έγινε επιπλέον προσπάθεια κλωνοποίησης shRNA για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2 σε δύο διαφορετικά πλασμίδια (pLVTHM και pTER). Απώτερος σκοπός αυτού του πειράματος ήταν η εισαγωγή του ενός πλασμιδίου (pLVTHM) σε κύτταρα AGS για την επίτευξη της παροδικής σίγησης και η χρήση του άλλου (pTER) για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών όπου μέσω του συστήματος dox/tetR θα ελέγχεται η έκφραση του shRNA που θα επάγει τη σίγηση του CDX2.

Φορέας pTER

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της ένθεσης του shRNA, που στοχεύει το CDX2, στον πλασμιδιακό φορέα pTER, έγινε διαγνωστική πέψη με τη χρήση του ενζύμου EcoRI. Έπειτα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%. Στην περίπτωση ανεπιτυχούς εισαγωγής του ενθέματος, ύστερα από την πέψη προκύπτουν 2 ζώνες με τη μεγαλύτερη να εμφανίζεται κοντά στις 3.350bp και τη δεύτερη περίπου 1000bp. Η διαφορά συγκριτικά με ένα δείγμα που έχει εισαχθεί το shRNA είναι το μέγεθος της δεύτερης ζώνης, που είναι κοντά στις 300bp. Για την επιτυχή εξαγωγή συμπερασμάτων λοιπόν, χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας (negative control) που είναι pTER φορέας ο οποίος δεν φέρει ένθεμα (self-ligation) και ένας θετικός μάρτυρας που είναι pTER φορέας που έχει ενσωματωμένο shKLF5, το οποίο έχει επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην **Εικόνα 37**. Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται ότι όλα τα απομονωμένα πλασμίδια είναι θετικά δείγματα, διότι η ζώνη που παρατηρείται στα δείγματα αυτά ευθυγραμμίζεται με την ζώνη του θετικού μάρτυρα (στις 300bp). Αντίθετα, στον αρνητικό μάρτυρα δεν παρατηρείται ζώνη στις ίδιες βάσεις με τα θετικά δείγματα. Από αυτά επιλέχθηκε το τρίτο δείγμα (shCDX2 (3)) για ανακαλλιέργεια, ώστε να απομονωθεί και με κιτ (βλ. § 3.6).

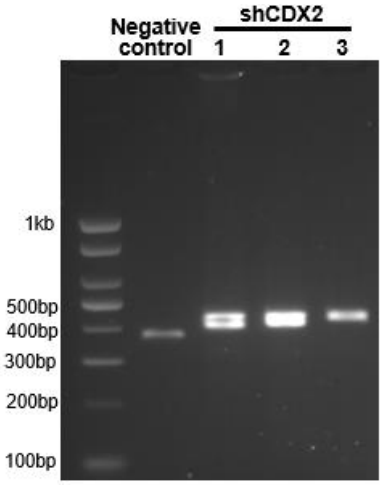


Εικόνα 37: ***Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής πέψης για τον φορέα pTER σε πηκτή αγαρόζης 2%.*** Κατά σειρά απεικονίζονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb^{plus} (NEB), ο αρνητικός μάρτυρας (negative control - φορέας χωρίς ένθεμα), ο θετικός μάρτυρας (positive control - pTER/shKLF5) και τα δείγματα shCDX2 (1), shCDX2 (2), shCDX2 (3) και shCDX2 (4).

Φορέας pLVTHM

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της ένθεσης του shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM, έγινε διαγνωστική PCR με δύο εκκινητές που υβριδίζουν στον σκελετό του πλασμιδίου. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στην περίπτωση ανεπιτυχούς εισαγωγής του ενθέματος, το προϊόν αναμένεται να είναι κοντά στις 400bp, όπως αναμένεται από το αρνητικό μάρτυρα (επανακυκλοποιημένος φορέας). Η διαφορά συγκριτικά με ένα δείγμα που έχει εισαχθεί το shRNA είναι πολύ μικρή σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, περίπου 50bp διαφορά.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην **Εικόνα 38**. Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται ότι όλα τα απομονωμένα πλασμίδια είναι θετικά δείγματα, διότι η ζώνη του προϊόντος της PCR που παρατηρείται στα δείγματα είναι για ελάχιστες βάσεις μεγαλύτερη από το αρνητικό μάρτυρα. Από αυτά επιλέχθηκε το τρίτο για ανακαλλιέργεια, ώστε να απομονωθεί και με κιτ (βλ. § 3.6).



Εικόνα 38: ***Ηλεκτροφόρηση προϊόντων διαγνωστικής PCR για τον pLVTHM φορέα σε πήκτη αγαρόζης 2%.*** Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας (negatice control) ο οποίος αντιστοιχεί σε φορέα χωρίς ένθεμα. Η εμφάνιση ζώνης λίγες βάσεις πιο πάνω από αυτή του αρνητικού μάρτυρα αντιστοιχεί σε επιτυχή ενσωμάτωση του ενθέματος (shRNA) στον pLVTHM φορέα.

Εν κατακλείδι, δημιουργήθηκαν με επιτυχία πλασμιδιακές κατασκευές pLVTHM και pTER που φέρουν shRNA για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2. Οι φορείς αυτοί θα χρησιμοποιηθούν για την RNA αποσιώπηση του γονιδίου στόχου για δύο διαφορετικά συστήματα: pLVTHM για παροδική καταστολή και pTER για σταθερές κυτταρικές σειρές επαγόμενης καταστολής, όπως προαναφέρθηκε.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του στομάχου, ως κακοήθεια υψηλής επιθετικότητας με ετερογενή φύση, παραμένει υψηλά στην λίστα των περιπτώσεων καρκίνου που εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά εμφάνισης και θνητότητας παρά τις προσπάθειες που καταβάλλουν οι επιστήμονες για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης ασθένειας [122, 123]. Ένα βασικό πρόβλημα που αφορά τον καρκίνο του στομάχου είναι η ασυμπτωματική του φύση, που εμποδίζει την έγκαιρη διάγνωση αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης μεταστάσεων. Επιπλέον, λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης και της ελλιπούς γνώσης των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται, η θεραπεία του καρκίνου του στομάχου είναι συχνά αναποτελεσματική [124]. Συνεπώς, είναι αναγκαία η εύρεση εξειδικευμένων, μοριακών βιοδεικτών μη επεμβατικού τύπου, οι οποίοι θα χρησιμεύσουν τόσο για την έγκαιρη διάγνωση όσο και ως θεραπευτικοί στόχοι της ασθένειας.

Ολοένα και περισσότερες έρευνες στρέφονται στο μοριακό και γενετικό υπόβαθρο της ασθένειας, με σκοπό την κατανόηση της ανάπτυξης της νεοπλασίας και την εύρεση κατάλληλων διαγνωστικών δεικτών. Ένα πολλά υποσχόμενο και εξειδικευμένο μοριακό εργαλείο για τη διάγνωση και τη θεραπεία μπορούν να είναι τα lncRNA. Τα lncRNA αποτελούν μια ανερχόμενη τάξη μορίων, που εκτός από την ποικίλη δράση τους σε φυσιολογικούς ιστούς, έχει βρεθεί πως εκφράζονται έκτοπα και στον καρκίνο. Έχει διαπιστωθεί πως τα lncRNA έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την προαγωγή ή/και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, σε διάφορους τύπους καρκίνου [125]. Μια σημαντική ιδιότητα των lncRNA που τα καθιστά ιδανικά ως δείκτες και θεραπευτικούς στόχους, είναι η εξειδικευμένη έκφραση και λειτουργία τους ως προς τον τύπο του καρκίνου, τον κυτταρικό τύπο, τον ιστό αλλά και τη χρονική στιγμή [102]. Επιπλέον η παρουσία τους στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά διευκολύνει τον εντοπισμό τους, χωρίς τη χρήση επεμβατικών μεθόδων [126].

Ειδικότερα για τον γαστρικό καρκίνο, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι τα lncRNA παίζουν κρίσιμους ρόλους στην εξέλιξη της νόσου δρώντας ως ρυθμιστές σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. *In vivo* πειράματα και βιοπληροφορικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει συγκεκριμένα lncRNA που εμπλέκονται στον καρκίνο του στομάχου καθώς και τον μηχανισμό δράσης τους. Ενδεικτικά, έχει αναφερθεί ότι η εξάλειψη του lncRNA UCA1 μέσω της ρύθμισης της οδού σηματοδότησης PI3K/Akt/mTOR ανέστειλε την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του στομάχου και αύξησε τον ρυθμό απόπτωσης, οδηγώντας στην υπόθεση ότι είναι ένα πιθανό ογκογονίδιο που μπορεί να παίξει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην κλινική εξέλιξη του καρκίνου του στομάχου [127]. Ένα άλλο παράδειγμα αναγνωρισμένου ογκοεπαγωγικού lncRNA σχετίζεται με το GAPLINC. Το συγκεκριμένο lncRNA δρα με έναν κυτταροπλασματικό μηχανισμό εμποδίζοντας την αποικοδόμηση του CD44, μέσω ενδογενούς ανταγωνισμού με το miR211-3p το οποίο στοχεύει τον CD44. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η ποσότητα του mRNA της CD44 που μεταφράζεται και έτσι η CD44 μπορεί να συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και τη μετάσταση του όγκου [128]. Στα ογκοεπαγωγικά εντάσσεται και το lncRNA ZFAS1 που έχει αποδειχθεί ότι προάγει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη μετανάστευση, την εισβολή και το EMT ενεργοποιώντας τη σηματοδότηση Wnt/β-κατενίνης σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα [129]. Εκτός από τα ογκογονίδια, στον καρκίνο του στομάχου έχουν αναγνωριστεί lncRNA με ογκοκατασταλτικό ρόλο. Μία τέτοια περίπτωση αποτελεί το lncRNA CASC2, το οποίο μπορεί να αναστείλει την κυτταρική ανάπτυξη με αδρανοποίηση της οδού MAPK στον καρκίνο του στομάχου [130]. Ακόμη ένα

παράδειγμα είναι το lncRNA GAS5, του οποίου η μειορρύθμιση έχει συσχετιστεί με κλινικοπαθολογικούς παράγοντες, όπως το μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, η ταχύτερη πρόοδος σε προχωρημένο παθολογικό στάδιο και το αυξημένο βάθος εισβολής. Από την άλλη έχει παρατηρηθεί ότι η έκτοπη έκφραση του αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του στομάχου και προκαλεί απόπτωση μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των παραγόντων E2F1 (προωθεί τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό) και P21 (αναστολέας του κυτταρικού κύκλου κυρίως μέσω άμεσης σύνδεσης με κυκλίνες και CDKs) [131]. Τα στοιχεία αυτά υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο των lncRNA στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του στομάχου καθώς και στην ανακάλυψη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων για την συγκεκριμένη νεοπλασία. Ωστόσο, αυτό το πεδίο βρίσκεται σε αρχικά στάδια με την παρουσία πολλών προκλήσεων. Πιο συγκεκριμένα, για να διερευνηθούν πλήρως οι δυνατότητες των lncRNA στη διάγνωση του καρκίνου και τη θεραπεία, είναι σημαντικό να χαρακτηριστεί κάθε πιθανό lncRNA λεπτομερώς και να προσδιοριστούν οι κυτταρικές λειτουργίες και οι ρόλοι του στη νόσο. Επιπρόσθετα, υψίστης σημασία είναι και η μελέτη των σχέσεων αιτίου-αποτελέσματος κάθε lncRNA, δηλαδή η διερεύνηση των ανοδικών ρυθμιστών του, προκειμένου να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του βαθμού εξειδίκευσης της έκφρασης αλλά και λειτουργίας σε συγκεκριμένους ιστούς ή κυτταρικούς τύπους, καθώς και της σύνδεσής τους με το στάδιο του όγκου [103].

Τον τελευταίο καιρό, έχει αναφερθεί ένα παρακλάδι της καρκινογένεσης που συνδέεται με τον όρο “πλαστικότητα της γενεαλογίας”. Στην ουσία αναφέρεται στην ικανότητα των κυττάρων να μεταδιαφοροποιούνται από μια δεσμευμένη αναπτυξιακή οδό σε μια άλλη και έχει προταθεί ως πηγή ενδοκαρκινικής ετερογένειας και προσαρμογής του όγκου σε ένα δυσμενές μικροπεριβάλλον. Η πλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων μπορεί λειτουργικά να οριστεί ως η ικανότητα ενός κυττάρου να τροποποιεί ουσιαστικά την ταυτότητά του και να αποκτά έναν νέο φαινότυπο που μοιάζει περισσότερο με μια ξεχωριστή αναπτυξιακή γενεαλογία. Αυτή η πλαστικότητα αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ότι παίζει βασικό ρόλο στην αντίσταση στα φάρμακα και στη μετάσταση, δύο κύριες αιτίες θνησιμότητας από καρκίνο [132]. Η προσέγγιση αυτή της εξέλιξη του όγκου είναι γνωστή ως “lineage survival carcinogenesis”. Το φαινόμενο αυτό της μετα-διαφοροποίησης σε ταυτότητες γειτονικών οργάνων έχει παρατηρηθεί ότι προηγείται του κακοήθους μετασχηματισμού σε επιλεγμένους καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος (Gastrointestinal (GI) system) και έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την έκτοπη έκφραση παραγόντων που καθορίζουν τη γενεαλογία. Συνεπώς, μια καλύτερη κατανόηση των αναπτυξιακών προγραμμάτων που καθορίζουν τη γενεαλογία του γαστρεντερικού συστήματος θα συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της ογκογένεσης του GI [133]. Γενικά, η μελέτη της συμβολή των παραγόντων μεταγραφής, ως ογκογονιδίων επιβίωσης γενεαλογίας, στην εξέλιξη του καρκίνου μέσω της ρύθμισης ιστοειδικών μεταγράφων όπως τα lncRNA θα είναι μια πιο ολοκληρωμένη και συνεκτική ερμηνεία των αλλαγών έκφρασης που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης και της ανάπτυξης οργάνων συμβάλλοντας στον εντοπισμό καινοτόμων βιοδεικτών [134].

Στοχευμένα στο γαστρικό καρκίνο, μεταγραφικοί παράγοντες-ογκογονίδια που εμπλέκονται στην διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων στα αναπτυξιακά στάδια του στομάχου (lineage survival oncogenes) με αναγνωρισμένο ρόλο στη παθογένεια της νόσου είναι οι GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α (βλ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ). Λόγω της έκφρασης και του ρόλου τους στα φυσιολογικά κύτταρα δεν είναι δυνατή η άμεση στόχευση τους. Έτσι, διεξάγονται μελέτες προς την εύρεση καθοδικών στόχων τους, συγκεκριμένα lncRNA, τα οποία λόγω των ιδιοτήτων τους μπορούν να

αποτελέσουν αξιόπιστους βιοδείκτες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί lncRNA που ρυθμίζονται από το KLF5. Για παράδειγμα, ένα lncRNA που ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 σε συνεργασία με το MYC στο γαστρικό καρκίνο, είναι το LINC00346141. Το συγκεκριμένο lncRNA έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται στο γαστρικό καρκίνο, καθώς βρίσκεται σε γονιδιωματική ενίσχυση, ενώ έχει συσχετισθεί με όγκους προχωρημένου σταδίου και με δυσμενή πρόγνωση για τους ασθενείς [135].

Στο πλαίσιο όλων των παραπάνω εντάσσεται και η παρούσα πτυχιακή εργασία, που αποσκοπεί στη μελέτη της ρύθμισης lncRNA-στόχων των ογκογονιδίων κυτταρικής γενεαλογίας GATA4/GATA6/KLF5/CDX2/HNF4α. Ειδικότερα, ελέγχθηκε η ρύθμιση των GREAT4-1 και GREAT6-2, καθώς και των cRENA και cRENA2, που με μεθόδους Γονιδιωματικής φάνηκε ότι πιθανόν συσχετίζονται με τους GATA μεταγραφικούς και CDX2/HNF4α, αντίστοιχα (προηγούμενη διατριβή). Σε πρώτη φάση, εξετάστηκαν τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα όλων των παραγόντων σε γαστρικές κυτταρικές σειρές, ώστε να ελεγχθεί αν τα επίπεδα mRNA επιβεβαιώνουν τα δεδομένα RNAseq καθώς και το πώς συμπεριφέρονται οι πρωτεΐνες σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του στομάχου. Αυτό το βήμα είναι απαραίτητο για να ακολουθήσουν πειράματα μελέτης του τρόπου με τον οποίο οι μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση των στόχων τους. Σε επίπεδο πρωτεΐνης ήταν δύσκολο να ανιχνευθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA6 και CDX2. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε γενικές γραμμές στο γεγονός ότι η ανίχνευση πυρηνικών πρωτεϊνών δεν είναι εύκολη όπως των κυτταροπλασματικών και των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Στην περίπτωση του GATA6 η αδυναμία ανίχνευσης της πρωτεΐνης μπορεί να εξηγηθεί και από τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης στις γαστρικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες προς μελέτη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε, η εμφάνιση των δύο ζωνών μετά την ανοσοαποτύπωση του HNF4α. Φαίνεται ότι η ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους ακολουθεί παρόμοιο πρότυπο με τα επίπεδα mRNA. Από την άλλη η δεύτερη ζώνη που πιθανόν αντιστοιχεί σε μετά-μεταφραστική τροποποίηση υποδεικνύει ότι ο HNF4α πιθανόν έχει λειτουργικό ρόλο κυρίως στις κυτταρικές σειρές MKN45 και KATOIII, αλλά και σε κύτταρα AGS σε μικρότερο βαθμό. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί και από τη βιβλιογραφία καθώς έχει αναφερθεί ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4α ρυθμίζεται σε πολλά διαφορετικά επίπεδα, με το κυριότερο να είναι μετα-μεταφραστική τροποποίηση με φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης του HNF4α μεταβάλλει τη δραστηριότητα δέσμευσής του στο DNA, το δυναμικό μετενεργοποίησης και την πυρηνική μετατόπιση και/ή αποικοδόμηση του. Τέλος, η δραστηριότητα του HNF4α φαίνεται να ρυθμίζεται και από μεθυλίωση και σουμοϋλίωση που αποτελούν άλλους μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς [136-139]. Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί αρκετές ισομορφές για το γονίδιο *HNF4α*, οι οποίες προκύπτουν από την εναλλακτική χρήση ματίσματος/υποκινητών και οι οποίες επίσης μπορεί να σχετίζονται με αυτή την εμφάνιση πολλαπλών ζωνών [85]. Με βάση τα αποτελέσματα από την ανάλυση της qPCR και της Western blot, επιλέχθηκαν τα κύτταρα HFE145 για τα πειράματα υπερέκφρασης καθώς όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες δεν εκφράζονται. Επιπλέον, και στα κύτταρα AGS έγινε προσπάθεια υπερέκφρασης, παρά την υψηλή έκφραση των παραγόντων σε μεταγραφικό αλλά και σε κάποιους και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, διότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελεί πρότυπο για γαστρικό όγκο σε αρχικά στάδια.

Το επόμενο πειραματικό βήμα ήταν η γονιδιακή υπερέκφραση όλων των μεταγραφικών παραγόντων στις προαναφερθέντες κυτταρικές σειρές με τη χρήση του συστήματος διαμόλυνσης με λεντιιούς. Σε επίπεδο mRNA αποδείχθηκε ότι η

υπερέκφραση ήταν αποτελεσματική για όλους τους μεταγραφικούς με εξαίρεση τον KLF5 που δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα κυρίως στα κύτταρα AGS. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης σε ένα εύρος 2.000–120.000 φορές πάνω σε σχέση με τον μάρτυρα ανάλογα τον μεταγραφικό και την κυτταρική σειρά. Μικρότερη αλλά αποτελεσματική υπερέκφραση παρατηρήθηκε στην περίπτωση του HNF4α και CDX2 στα AGS, 10-20 φορές πάνω και 60 σε σχέση με το μάρτυρα αντίστοιχα. Όσον αφορά τον έλεγχο σε πρωτεϊνικό επίπεδο, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση σε όλες τις περιπτώσεις. Στην περίπτωση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η αλληλουχία του διαγονιδίου δεν περιέχει τον επίτοπο που αναγνωρίζει το αντίσωμα.

Εν συνεχεία, πραγματοποιηθήκαν πειράματα ChIP ειδικά για τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρατήρηση από τα ChIP-seq δεδομένα, δηλαδή ότι στα GREAT4-1 και GREAT6-2 υπάρχουν μοτίβα πρόσδεσης των GATA4/GATA6. Το πρώτο και σημαντικό βήμα πριν τη διεξαγωγή ενός πειράματος ανοσοαποτύπωσης είναι να γίνει βελτιστοποίηση της συνθήκης κατακερματισμού, που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την αποτελεσματικότητα του πειράματος. Είναι γνωστό ότι αν ο κατακερματισμός της χρωματίνης δεν είναι αποτελεσματικός ή δεν παράγει αρκετή ποσότητα, το αποτέλεσμα της ανοσοκατακρήμνισης δεν θα είναι το επιθυμητό ανεξάρτητα από το πόσο καλό είναι το αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η αποδοτικότητα της κατεργασίας με υπερήχους σε δύο επίπεδα: μεταξύ δύο διαφορετικού υλικού eppendorf και μεταξύ διαφορετικών χρόνων στους οποίους ολοκληρώνεται η κατάτμηση. Από την ανάλυση αυτή παρατηρήθηκε ότι για την κυτταρική σειρά AGS η απόδοση των υπερήχων ήταν πιο αποτελεσματική στα eppendorf τύπου Β καθώς και ότι οι κατάλληλες συνθήκες ήταν: Amplitude 55%, Pulse 15sec on/ 15sec off, Time 20 min. Στις συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρήθηκε η πλειοψηφία της χρωματίνης να συγκεντρώνεται σε μέγεθος κάτω των 300bp, που είναι στο επιθυμητό εύρος μεγέθους των θραυσμάτων για να είναι δυνατή η ανάλυση σε μετέπειτα στάδιο. Γενικά, είναι επιθυμητά θραύσματα με μέγεθος που αντιστοιχούν σε ένα ή δυο νουκλεοσώματα, καθώς οι παράγοντες μεταγραφής, συχνά δεσμεύουν το ενδονουκλεοσωμικό DNA [140]. Σύμφωνα με αυτή τη βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης από την οποία υποδείχθηκε η πρόσδεση του GATA4 στον υποκινητή των lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2, με πιο υψηλό σήμα να ανιχνεύεται για το GREAT4-1. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση της άμεσης ρύθμισης αυτών των lncRNA από τον GATA4. Όσον αφορά την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για το GATA6 και οι δύο βιολογικές επαναλήψεις δεν επιβεβαίωσαν τα δεδομένα του ChIP-seq. Συνεπώς, δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο σίγουρο αποτέλεσμα για τη δράση του στη γονιδιακή ρύθμιση των GREAT4-1 και GREAT6-2. Φαίνεται ότι το ChIP και στις δύο περιπτώσεις για το GATA6 να μη δούλεψε. Το πρωτόκολλο για το συγκεκριμένο παράγοντα απαιτεί βελτιστοποίηση. Πιθανόν το αποτέλεσμα στην πρώτη επανάληψη να οφείλεται στην αραιή χρωματίνη στην οποία διεξήχθη το πείραμα (**Εικόνα 27**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όταν το σήμα είναι χαμηλό πιθανόν να χρειάζεται περισσότερη χρωματίνη καθώς και περισσότερη ποσότητα από το αντίσωμα. Τα παραπάνω ίσως να μπορούν να συσχετιστούν και με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του GATA6 όπως αποδείχθηκε στις κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, στη δεύτερη βιολογική επανάληψη που βελτιώθηκαν οι παραπάνω παρατηρήσεις το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο. Επιπλέον, ένας άλλος λόγος που να μην είναι δυνατή η ανίχνευση του GATA6, αλλά και ο εμπλουτισμός των αλληλουχιών στις οποίες προσδένεται, να οφείλεται στην κάλυψη ή την αποδιάταξη του επίτοπου, που αναγνωρίζει το αντίσωμα [140, 141]. Τέλος, μία υπόθεση για το

αποτέλεσμα που προέκυψε για το GATA6 μπορεί να είναι ότι για να αναλάβει δράση ο GATA6 να πρέπει πρώτα να έχει κατασταλεί η δράση του GATA4. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί και βιβλιογραφικά καθώς οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4/5/6 λόγω του ότι αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία DNA, συχνά συνεκφράζονται και έχουν αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες σε ορισμένους ιστούς μπορεί να μοιράζονται μεταγραφικούς στόχους με αποτέλεσμα όταν ο ένας κατασταλεί τότε ο άλλος είναι σε θέση να αντισταθμίσει την απώλεια αυτή [19, 57, 142].

Τέλος, εφόσον υποδείχθηκε ότι τα lncRNA GREAT4-1 και GREAT6-2 είναι άμεσοι στόχοι του GATA4 εξετάστηκε αν τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA επηρεάζονται από την απορρύθμιση —υπέρκφραση— όχι μόνο του GATA4 αλλά και των υπόλοιπων μεταγραφικών. Με βάση τα αποτελέσματα φάνηκε ότι στην περίπτωση των GATA μεταγραφικών στα AGS δεν παρατηρείται αλλαγή παρά την υπερέκφραση του παράγοντα μεταγραφής. Αυτό μπορεί πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι στα AGS οι συγκεκριμένοι παράγοντες εκφράζονται ήδη σε αυξημένα επίπεδα με αποτέλεσμα η όποια επιπρόσθετη διαγονιδιακή αύξηση των επιπέδων τους να μην επιφέρει κάποια αλλαγή στο στόχο τους ή να μην υπάρχουν θέσεις να προσδεθεί ή ακόμη το ασθενές σήμα να οφείλεται στο γεγονός ότι απαιτείται συνεργατική δράση με άλλο μεταγραφικό. Αυτές οι παρατηρήσεις συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα στα HFE145 στα οποία δεν εκφράζονται οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μία πιο αισθητή αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-2, 4 φορές πιο πάνω σε σχέση με τον μάρτυρα με την υπερέκφραση του GATA4. Παράλληλα παρατηρήθηκε μία μικρή αλλά ενδιαφέρουσα αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του GREAT6-2, περίπου 3 φορές πιο πάνω σε σχέση με το δείγμα ελέγχου από τη συνδυαστική υπερέκφραση των GATA4 και GATA6. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανόν ρυθμίζουν τα lncRNA υπό συνεργασία. Όσον αφορά τους άλλους μεταγραφικούς ενδιαφέρον φαίνεται να έχει η επίδραση των CDX2 και HNF4α τόσο λόγω του κοινού τρόπου που φαίνεται να ρυθμίζουν τα GREAT4-1 και GREAT6-2 όσο και το γεγονός ότι με την υπερέκφρασή τους επάγεται μείωση στην έκφραση των lncRNA τόσο στα AGS όσο και στα HFE145. Τέλος, από τα αποτελέσματα αυτά παρατηρήθηκε ότι το GREAT4-1 σε καμία συνθήκη δεν εκφράστηκε στα HFE145, γεγονός που πιθανόν δείχνει ότι στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά το εν λόγω lncRNA δεν δύναται να εκφραστεί επειδή η χρωματίνη του γενετικού του τόπου δεν είναι προσβάσιμη.

Παράλληλα έγινε έλεγχος της ρύθμιση των GREAT4-1 και GREAT6-2 και υπό συνθήκες καταστολής των GATA4 και GATA6 μεμονωμένα σε κύτταρα AGS. Μέσω qPCR αποδείχθηκε ότι οι συγκεκριμένοι παράγοντες έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση των lncRNA και σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS, καθώς η καταστολή τους συνεπάγεται μείωση των GREAT4-1 και GREAT6-2 επιπέδων σε σημαντικό ποσοστό (30 και 50%, αντίστοιχα). Επιπλέον, λόγω του ενδιαφέροντος που προκάλεσε η συνεργατική δράση των GATA4 και GATA6 στα HFE145, έγινε περαιτέρω έλεγχος της συνεργατικής δράσης και σε συνθήκες συνδυαστικής καταστολής. Πιο συγκεκριμένα, με qPCR ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA υπό τη ταυτόχρονη σίγηση δύο μεταγραφικών την φορά: GATA4/6, GATA4/KLF5 και GAT6/KLF5. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση (20-64% ανάλογα τη συνθήκη) των μεταγράφων GREAT, υποδηλώνοντας τη θετική ρύθμισή τους από τη ταυτόχρονη δράση δύο παραγόντων. Αυτό υποστηρίζεται και από τη βιβλιογραφία που αναφέρεται ότι οι ρυθμιστές γενεαλογίας συνήθως δημιουργούν μεταγραφικά δίκτυα για να ρυθμίσουν την έκφραση των καθοδικών στόχων τους [54], με ενδεικτικό παράδειγμα τη συνεργατική δράση των GATA4/GATA6/KLF5 στο γαστρικό καρκίνο [18].

Επιπρόσθετα, στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής έγινε ένας πρώτος έλεγχος της έκφρασης δύο lncRNA, cRENA και cRENA2 σε συνθήκες υπερέκφρασης των CDX2 και HNF4α, που με μεθόδους γονιδιωματικής φάνηκε να ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς CDX2/HNF4α. Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται ότι ο CDX2 είναι πιθανόν αρνητικός ρυθμιστής των συγκεκριμένων lncRNA, διότι όταν αυτός υπερεκφράζεται τα επίπεδα των cRENA και cRENA2 μειώνονται. Όσον αφορά τον HNF4α το αποτέλεσμα μεταξύ των δύο επαναλήψεων δεν ταυτίζεται, συνεπώς για να προκύψει κάποιο συμπέρασμα απαιτείται επανάληψη. Αυτές οι αποκλίσεις πιθανόν να οφείλονται στο γεγονός ότι στα AGS ο συγκεκριμένος παράγοντας εκφράζεται ήδη σε αυξημένα επίπεδα. Συνεπώς, η όποια επιπρόσθετη διαγονιδιακή αύξηση των επιπέδων του να μην επιφέρει κάποια σημαντική αλλαγή στο στόχο του, όπως πιθανόν να παρατηρούνταν στην περίπτωση υπερέκφρασής του σε μία κυτταρική σειρά που δεν εκφράζεται. Ωστόσο, καθώς το αποτέλεσμα από τη δεύτερη επανάληψη ήταν πιο έντονο, πιθανόν και ο HNF4α είναι και αυτός ένας αρνητικός ρυθμιστής. Αυτό το κοινό πρότυπο που παρατηρήθηκε τόσο στη πιθανή ρύθμιση των GREAT4-1 και GREAT6-2 όσο και των cRENA και cRENA2, υποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί δρουν πιθανόν σαν σύμπλοκο. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4α 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 προκαρκινικό στάδιο του γαστρικού καρκίνου [143]. Βέβαια απαιτείται να γίνει και ChIP ώστε να επιβεβαιωθεί η φυσική πρόσδεση τους σε ένα *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο των cRENA και cRENA2, καθώς και να ελεγχθεί το πώς επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA όταν γίνεται καταστολή των μεταγραφικών. Έτσι, τελικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας ήταν η δημιουργία των απαραίτητων πλασμιδιακών κατασκευών που θα παρήγαν shRNA έναντι του CDX2 ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή RNAi σίγηση τόσο σε παροδικό όσο και σταθερό σύστημα έκφρασης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προσελκύουν το ενδιαφέρον για την περαιτέρω μελέτη της ρύθμισης τόσο των GREAT4-1 και GREAT6-2 όσο και των cRENA και cRENA2 στον καρκίνο. Έτσι, στους μελλοντικούς στόχους περιλαμβάνονται πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και αλληλούχηση νέας γενιάς (Chip-seq), για να επιβεβαιωθεί ποιοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τα cRENA και cRENA2. Επίσης να γίνει ο έλεγχος της έκφρασης των cRENA στην περίπτωση της καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 τόσο υπό παροδική έκφραση όσο και μέσω του συστήματος dox/tetR. Τέλος, απώτερος στόχος είναι η πραγματοποίηση συνδυαστικών πειραμάτων μέσω των οποίων θα ελεγχθεί αν οι μεταγραφικοί παράγοντες δημιουργούν μεταγραφικά δίκτυα για τη ρύθμιση της έκφρασης των lncRNA-στόχων τους (GREAT4-1, GREAT6-2, cRENA και cRENA2) επιβεβαιώνοντας αυτό που έχει παρατηρηθεί από τη βιβλιογραφία για τον τρόπο με τον οποίο δρουν τα ογκογονίδια κυτταρικής γενεαλογίας.

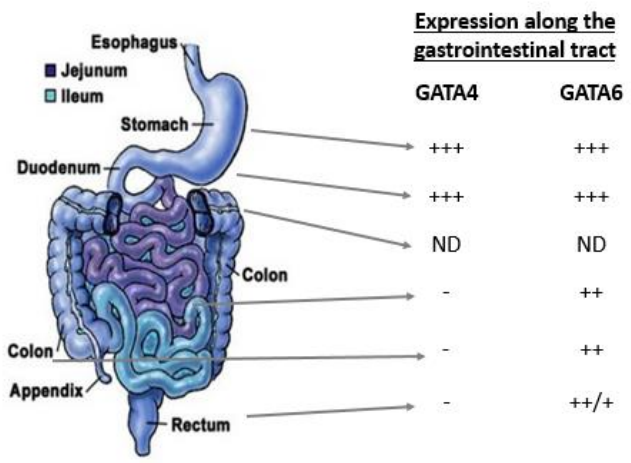
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων GATA στο γαστρεντερικό σύστημα

Το στομάχι περιλαμβάνει ιστούς που προέρχονται και από τα τρία εμβρυϊκά βλαστικά στρώματα συμπεριλαμβανομένων των εξωδερμικά προερχόμενων εντερικών νεύρων, των λείων μυών και των μεσεγχυματικών κυττάρων που προέρχονται από το μεσόδερμα και του ενδοδερμικά προερχόμενου επιθηλίου που επενδύει τον αυλό του στομάχου. Οι πρόγονοι του επιθηλίου του στομάχου προέρχονται από την περιοχή του πρόσθιου εντέρου του ενδοδερμίου, η οποία επίσης δημιουργεί το ήπαρ, το πάγκρεας, τους πνεύμονες και τα γαστρεντερικά όργανα του αυλού από τον φάρυγγα έως το πρόσθιο δωδεκαδάκτυλο [144]. Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της ενδοδερμικής προδιαγραφής ένα καλά συντηρημένο μεταγραφικό δίκτυο ενεργοποιείται και καθοδηγεί την ανάπτυξη και την επιβίωση των ενδοδερμικών κυττάρων πριν από τον διαμερισμό τους σε επιμέρους ιστολογικά διακριτές κυτταρικές επικράτειες [145]. Ειδικότερα στην περίπτωση της γαστρικής ανάπτυξης, η έκφραση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων στο πρώιμο ενδόδερμα είναι απαραίτητη για να δημιουργηθούν οι πρόγονοι του πρόσθιου εντέρου που δημιουργούν το στόμαχο. Καθώς το ενδόδερμα σχηματιστεί, ένας αριθμός μεταγραφικών παραγόντων εκφράζεται είτε σε όλο το πρόσθιο έντερο είτε τοπικά στην προγαστρική περιοχή. Στην περίπτωση αυτή οι μεταγραφικοί παράγοντες που θα μπορούσαν να διαδραματίσουν έναν κρίσιμο ρόλο είναι οι Foxa1/2/3, GATA4/6, HNF1b και Sox2 [146]. Αναλυτικότερα για τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA, έχει παρατηρηθεί ότι κατά τον σχηματισμό του ενδοδέρματος τόσο το γονίδιο *GATA4* όσο και το *GATA6* εκφράζονται στο πρόσθιο έντερο. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό του εξωεμβρυϊκού ενδοδερμίου και ότι εκφράζονται καθ' όλη τη διάρκεια του πρώιμου οριστικού ενδοδερμίου [147, 148]. Επιπρόσθετα, από τα πρότυπα έκφρασής τους, που εμφανίζουν ειδικότητα ως προς τον κυτταρικό τύπο κατά μήκος της γαστρεντερικής οδούς φαίνεται ότι έχουν διακριτές και κεντρικές λειτουργίες στο έντερο, με τον GATA6 να είναι πιθανό να έχει κάποια επίδραση σε όλο το γαστρεντερικό σωλήνα (**Εικόνα 39**) [20]. Γενικά, η δράση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4/6 στην γαστρεντερική οδό μπορεί να φανεί και από το ρυθμιστικό ρόλο τους σε γονίδια τα οποία συμμετέχουν σε πεπτικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την υδρογόνου/καλίου αδενοσινοτριφωσφατάση (H+/K+ ATPase) στο στομάχι, υπεύθυνο για την παραγωγή οξέος στα βρεγματικά κύτταρα, ρυθμίζεται από τους γαστρεντερικούς παράγοντες GATA [149]. Ακόμη, οι πρωτεΐνες GATA έχουν προταθεί ότι ρυθμίζουν γονίδια που κωδικοποιούν για TFF (Trefoil Factor Family) και πρωτεΐνες βλεννίνης που προστατεύουν τον βλεννογόνο από επιβλαβείς εξωγενείς παράγοντες [150, 151]. Μεταξύ των GATA4 και GATA6 ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ο GATA4 μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του πρόσθιου στομάχου έναντι του αδενικού λόγω του ότι εντοπίζεται στο πρόσθιο τμήμα της πεπτικής οδού που αποτελεί το μελλοντικό όριο του στομάχου. Ο ρόλος αυτός του GATA4 στην γαστρική ανάπτυξη έχει αποδειχθεί μέσω πειραμάτων σε διαγονιδιακά ποντίκια από τα οποία απενεργοποιήθηκε με μεθόδους γενετικής τροποποίησης το γονίδιο *GATA4*. Παρατηρήθηκε ότι τα GATA4-/- κύτταρα δεν μπορούν να υιοθετήσουν γαστρική ταυτότητα σε χιμαιρικά έμβρυα ποντικού διότι αποτυγχάνουν να συνεισφέρουν στην ωρίμανση διαφοροποιημένων τύπων κυττάρων του στομάχου, με αποτέλεσμα τα GATA4-/- ποντίκια να μην επιβιώνουν πέραν του σταδίου ανάπτυξης του στομάχου [152]. Επιπλέον, η συμβολή του GATA4 στη διαμόρφωση του στομάχου έχει μελετηθεί και με τη χρήση οργανοειδών, τα οποία είναι τρισδιάστατες καλλιέργειες πολλαπλών κυτταρικών τύπων που φέρουν βασικά

χαρακτηριστικά των οργάνων προέλευσης τους. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι παρόμοια με την πορεία της γαστρικής ανάπτυξης σε ποντίκια, ο GATA4 παρέμεινε παρόν σε όλα τα στάδια της ανθρώπινης γαστρικής διαφοροποίησης και εντοπίζεται στο οριστικό ενδόδερμα, στο οπίσθιο ενδόδερμα του πρόσθιου εντέρου και στα ώριμα γαστρικά οργανοειδή. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν φαίνεται ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4/6 είναι κρίσιμα μόρια για τη διερεύνηση της ανθρώπινης γαστρικής ανάπτυξης [153].

Tissue	Cell type	GATA-4	GATA-6
Stomach Corpus			
	Surface epithelial cells	++	++
	Neck cells	+++	++
	Parietal cells	+++	++
	Neuroendocrine cells	-	-
Antrum			
	Surface epithelial cells	++	+
	Neck cells	+++	++
	Glandular cells	++	+++
	Neuroendocrine cells	-	-
Duodenum			
	Villus enterocytes	+++	++
	Crypt enterocytes	++	+++
	Neuroendocrine cells	-	-
	Goblet cells	-	+
	Paneth cells	-	++
Colon			
	Surface colonocytes	-	+
	Crypt cells	-	+++
	Goblet cells	-	++
	Neuroendocrine cells	-	-



Εικόνα 39: ***Πρότυπα έκφρασης του GATA-4 και GATA-6.*** Δεξιά φαίνεται η έκφραση κατά μήκος του γαστρεντερικού βλεννογόνου και αριστερά η έκφραση τους στους διάφορους κυτταρικούς τύπους των οργάνων του γαστρεντερικού συστήματος (– όχι έκφραση,+ χαμηλή έκφραση <20%, ++ μέτρια έκφραση 20–60%, +++ υψηλή έκφραση >60%) [20].

6.2 Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων KLF στο γαστρεντερικό σύστημα

Είναι σημαντικό ότι από την ανακάλυψή τους, οι μεταγραφικοί παράγοντες KLF έχουν εμπλακεί σε μια ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών, δρώντας για τη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση [154]. Επιπλέον, ένας μεγάλος όγκος στοιχείων έχει δείξει κρίσιμους ρόλους για διάφορα KLF κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Για παράδειγμα, ο KLF5 εκφράζεται νωρίς στο έμβρυο ποντικού πριν από την εμφύτευση, ξεκινώντας από το στάδιο των δύο κυττάρων, με έντονη έκφραση κατά τα στάδια μοριδίου και βλαστοκύστης. Είναι σημαντικό ότι ο KLF5 ρυθμίζει τον σχηματισμό των τριών κυτταρικών γενεαλογιών/τύπων που προκύπτουν κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη, προάγοντας το σχηματισμό τροφεκτοδερμίου (trophectoderm, TE) και της επιβλάστης (epiblast, EPI) και καταστέλλοντας την ανάπτυξη του πρωτόγονου ενδοδέρματος (primitive endoderm, PE) [155].

Οι KLF έχουν επίσης εμπλακεί σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης, σε γενεές που προέρχονται από το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα. Συγκεκριμένα, λόγω της υψηλής έκφρασής τους σε γαστρεντερικά επιθηλιακά κύτταρα κρύπτης αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά ως μεταγραφικοί πλούσιοι στο έντερο [156]. Στο έντερο, η έκφραση του KLF5 εμπλουτίζεται στα πολλαπλασιαζόμενα επιθηλιακά κύτταρα της κρύπτης. Από μελέτες έχει φανεί ότι ο KLF5 παίζει κρίσιμο ρόλο στην ομοιόσταση του εντερικού επιθηλίου, με την απώλεια του να επηρεάζει την αρχιτεκτονική της κρύπτης του βλεννογόνου και τη λειτουργία του φραγμού [157]. Αντίθετα, στην μορφογένεση του στομάχου δεν εμπλέκεται άμεσα, όμως ο αναπτυξιακός του ρόλος στο εντερικό επιθήλιο είναι σημαντικός μιας και όπως

αναφέρθηκε παραπάνω οι περισσότερες περιπτώσεις του γαστρικού καρκίνου αφορούν αδενοκαρκινώματα εντερικού γαστρικού υπότυπου.

6.3 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 στο γαστρεντερικό σύστημα

Οι πρωτεΐνες CDX (CDX1 και CDX2) εκφράζονται στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου και του παχέος εντέρου, όπου παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Το CDX1 εκφράζεται κυρίως στα αδιαφοροποίητα κύτταρα των εντερικών κρυπτών, ενώ το CDX2 είναι κυρίως παρόν στις λάχνες ή στο διαφοροποιημένο κυτταρικό διαμέρισμα του λεπτού εντέρου [158].

Ειδικότερα, για τον παράγοντα CDX2, ενώ η έκφραση του είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της κυτταρικής γενεαλογίας του ανθρώπινου εντέρου, δεν μπορεί να προσεγγίσει τα γονίδια-στόχους του στο μέσο έντερο απουσία των αλλαγών που προκαλούνται από τη σηματοδότηση WNT και FGF στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που διέπουν τη δέσμευση CDX2. Με αλλά λόγια, ο CDX2 δεν λειτουργεί ως ο “πρωτοπόρος” παράγοντας στο αναπτυσσόμενο έντερο, καθώς δεν μπορεί ο ίδιος να κατευθύνει τις απαραίτητες τροποποιήσεις στη δομή της χρωματίνης κατά την πορεία της ανάπτυξης του εντέρου. Ωστόσο, είναι σημαντικό ότι ο CDX2 απαιτείται για τη διατήρηση των πρόσφατα προσβάσιμων περιοχών χρωματίνης σε ώριμους ιστούς. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι ο CDX2 δεσμεύει διακριτές γονιδιωματικές περιοχές με τρόπο ειδικό για το στάδιο ανάπτυξης και ρυθμίζει γονίδια ειδικά για το εκάστοτε στάδιο όπως είναι γονίδια που συσχετίστηκαν με λειτουργίες στην ανάπτυξη, τη διαμόρφωση και τη μορφογένεση σε εμβρυϊκό επίπεδο και γονίδια σχετικά με φυσιολογικές λειτουργίες στο έντερο ενός ενήλικα [159]. Στα τελευταία φάνηκε ότι οι ρυθμιστικές περιοχές περιέχουν μοτίβα HNF4α που υποδηλώνει την συνεργατική δράση του CDX2 και HNF4α, σύμφωνα και με τη λειτουργία του HNF4α στο ώριμο έντερο [160]. Αυτή η απόκλιση υποδεικνύει διαφορετικά μεταγραφικά ρυθμιστικά δίκτυα στο εμβρυϊκό έντερο, όπου κυριαρχεί η αναπτυξιακή ικανότητα και η διαμόρφωση των ιστών [161] έναντι του ενήλικου εντερικού επιθηλίου, όπου η κυτταρική ταυτότητα είναι σταθερή και το CDX2 με τους συνεργατικούς του παράγοντες ελέγχουν τις φυσιολογικές λειτουργίες [162].

Η θεμελιώδης σημασία του γονιδίου *CDX2* στη ρύθμιση της εντερικής διαφοροποίησης στο αναπτυσσόμενο έντερο, καθώς και στη διατήρηση της διαφοροποίησης στο εντερικό επιθήλιο των ενηλίκων, είναι πλέον ευρέως αποδεκτή και αποδεικνύεται από πολλές μελέτες. Η πρώτη απόδειξη προήλθε από *in vitro* μελέτες όπου η υπό όρους έκφραση του CDX2 σε μία αδιαφοροποίητη εντερική κυτταρική σειρά οδήγησε στον σχηματισμό πολυκυτταρικών δομών με χαρακτηριστικά εντερικών επιθηλιακών κυττάρων [163]. Ο κρίσιμος ρόλος του CDX2 στην κατεύθυνση της μοίρας των εντερικών κυττάρων επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε ζωικά μοντέλα παρεμβαίνοντας, θετικά ή αρνητικά, στην έκφραση του CDX2 στη γαστρεντερική οδό. Αναλυτικότερα, φάνηκε ότι ομόζυγα *CDX2-/-* έμβρυα ποντικού δεν είναι βιώσιμα και πεθαίνουν στο προεμφυτευτικό στάδιο, πιθανώς λόγω του ρόλου του CDX2 στην γενεαλογία του τροφεκτοδερμίου. Ωστόσο, τα ετερόζυγα ποντίκια *CDX2+/-* επιβεβαίωσαν τον κρίσιμο ρόλο του CDX2 στην κατεύθυνση της μοίρας των εντερικών κυττάρων, καθώς αναπτύσσουν μη καρκινικές βλάβες που μοιάζουν με πολύποδα κατά μήκος του έντερο [164].

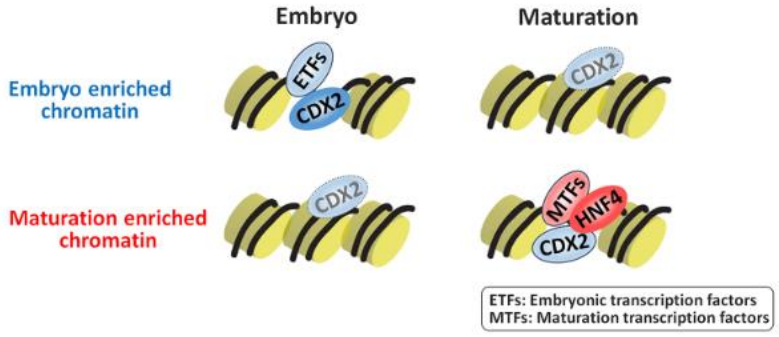
Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο CDX2 αποτελεί έναν κύριο μεταγραφικό παράγοντα για την κυτταρική γενεαλογία του εντέρου. Με την μορφογένεση του στομάχου δεν έχει συσχετιστεί, όμως ο αναπτυξιακός του ρόλος στο εντερικό επιθήλιο είναι τόσο

σημαντικός που τον καθιστά υψίστου ενδιαφέροντος προς μελέτη, διότι αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του στομάχου που απορρέει από την εντερική μεταπλασία [165, 166].

6.4 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α στο γαστρεντερικό σύστημα

Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α έχει αναγνωριστεί ως αναπτυξιακός ρυθμιστής του σπλαχνικού ενδοδερμίου. Στην εμβρυογένεση εμφανίζεται για πρώτη φορά σε ολόκληρο το πρωτογενές ενδόδερμα, αργότερα η έκφρασή του περιορίζεται στο σπλαχνικό ενδόδερμα και στη συνέχεια παρατηρείται έκφραση στο εμβρυϊκό ήπαρ, στους νεφρούς, στο πάγκρεας και στο έντερο [94]. Ιδιαίτερα κατά την ανάπτυξη του εμβρυϊκού παχέος εντέρου και τη διαφοροποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, ο HNF4α έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των β-κυττάρων του παγκρέατος, στο σχηματισμό κρυπτών, στην ωρίμανση των κυττάρων που παράγουν βλεννίνη και στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών ιστοειδικών γονιδίων. Επιπλέον, ο HNF4α μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, συστατικά έξω-κυτταρικής μήτρας, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, παράγοντες που εμπλέκονται στον έλεγχο της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και αρκετών άλλων μεταγραφικών παραγόντων HNF [90].

Στον έλεγχος της κυτταρικής ταυτότητας και της λειτουργίας των ενδοδερμικών οργάνων από τον HNF4α συνεισφέρουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες. Είναι γεγονός, ότι η έκφραση του HNF4α ελέγχεται συντονισμένα με εκείνη άλλων ρυθμιστών γενεαλογίας μέσω εκτεταμένων αυτόματων και διασταυρούμενων ρυθμιστικών βρόχων. Ο HNF4α έχει χαρακτηριστεί ως κεντρικός κόμβος σε μεταγραφικά ρυθμιστικά δίκτυα, που σχετίζονται με υπερ-ενισχυτή σε ήπαρ, πάγκρεας και έντερο και τα οποία προάγουν και σταθεροποιούν την κυτταρική ταυτότητα αυτών των ενδοδερμικών οργάνων. Κάθε δίκτυο είναι μοναδικό για την κάθε κυτταρική γενεαλογία και αυτό μπορεί να αποδειχθεί από τη λειτουργική αλληλεπίδραση για παράδειγμα μεταξύ HNF4α και GATA4 και CDX2 στα εντεροκύτταρα, που διαφέρει από αυτή στα παγκρεατικά όπου ο HNF4α αλληλεπιδρά με το PDX1 (Pancreatic And Duodenal Homeobox 1) [167]. Ειδικότερα, στην περίπτωση του καθορισμού της ταυτότητας του έντερου, φαίνεται ότι ο CDX2 συνδέεται και ενεργοποιεί τον γονιδιακό τόπο *HNF4α* για να αυξήσει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α στα εμβρυϊκά στάδια. Στη συνέχεια, οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF4α και CDX2 καταλαμβάνουν κοινές γονιδιωματικές ρυθμιστικές θέσεις για να προάγουν την προσβασιμότητα στη χρωματίνη και την ειδική για την ωρίμανση του εντέρου γονιδιακή έκφραση (**Εικόνα 40**) [143].



Εικόνα 40: ***Πιθανό μοντέλο της λειτουργίας του δικτύου των εντερικών μεταγραφικών παραγόντων κατά τη μετατροπή των εμβρυϊκών ιστών σε ώριμους.*** **Αριστερά:** Το CDX2

συμμετέχει στη διαφοροποίηση σε εντερικό φαινότυπο, και προσδένεται σε προσβάσιμες περιοχές της χρωματίνης μαζί με άλλους εμβρυϊκούς μεταγραφικούς παράγοντες. **Δεξιά:** Καθώς το έντερο ωριμάζει στα εμβρυϊκά στάδια, περιοχές εμπλουτισμένες κατά την ωρίμανση γίνονται περισσότερο προσβάσιμες. Ένα νέο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων, στο οποίο συμμετέχει και ο HNF4α, συνεργάζεται για να σταθεροποιήσει την χρωματίνη και να οδηγήσει την εντερική ωρίμανση [143].

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι όπως και ο CDX2, ο HNF4α αποτελεί ένα κρίσιμο παράγοντα προς μελέτη για την καρκινογένεση του στομάχου λόγω του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζει κατά την εντερική μεταπλασία του γαστρικού επιθηλίου.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Yusefi, A.R., et al., *Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review.* Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(3): p. 591-603.
2. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
3. Ferlay J, e.a. *Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.* 2020

]; Available from: https://gco.iarc.fr/today.

4. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
5. Luo, G., et al., *Global patterns and trends in stomach cancer incidence: Age, period and birth cohort analysis.* Int J Cancer, 2017. **141**(7): p. 1333-1344.
6. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019.* CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
7. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications.* Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
8. Xie, S., et al., *Non-coding RNAs in gastric cancer.* Cancer Lett, 2020. **493**: p. 55-70.
9. Matsuoka, T. and M. Yashiro, *Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective.* World J Gastroenterol, 2018. **24**(26): p. 2818-2832.
10. Boland, C.R. and M.B. Yurgelun, *Historical Perspective on Familial Gastric Cancer.* Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(2): p. 192-200.
11. Oliveira C., e.a., *Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management.* Lancet Oncology, 2015. **16**(2).
12. Pinheiro, H., et al., *Hereditary diffuse gastric cancer - pathophysiology and clinical management.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014. **28**(6): p. 1055-68.
13. van der Post, R.S., et al., *Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers.* J Med Genet, 2015. **52**(6): p. 361-74.
14. Tan, P. and K.G. Yeoh, *Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma.* Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1153-1162 e3.
15. Deng, N., et al., *A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets.* Gut, 2012. **61**(5): p. 673-84.
16. Dulak, A.M., et al., *Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis.* Cancer Res, 2012. **72**(17): p. 4383-93.
17. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma.* Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
18. Chia, N.Y., et al., *Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development.* Gut, 2015. **64**(5): p. 707-19.
19. Sulahian, R., et al., *An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer.* Oncogene, 2014. **33**(49): p. 5637-48.
20. Haveri, H., et al., *Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa.* BMC Gastroenterol, 2008. **8**: p. 9.
21. Wen, J., et al., *Promoter methylation of tumor-related genes as a potential biomarker using blood samples for gastric cancer detection.* Oncotarget, 2017. **8**(44): p. 77783-77793.

22. Karimi, P., et al., *Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(5): p. 700-13.
23. Van Cutsem, E., Sagaert, X., Topal, B., Haustermans, K., & Prenen, H. , *Gastric cancer.* Lancet, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
24. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology.* Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
25. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification.* Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
26. Marques-Lespier, J.M., M. Gonzalez-Pons, and M. Cruz-Correa, *Current Perspectives on Gastric Cancer.* Gastroenterol Clin North Am, 2016. **45**(3): p. 413-28.
27. Mayer, R.J., *Gastrointestinal tract cancer*, in *Loscalzo Harrison's Principles of Internal Medicine 2017. Harrison's Gastroenterology and Hepatology.*, A.S.F. D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo, and J. L. Jameson, Editor. 2017, NY: McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York.
28. Barros, R., et al., *Gastric intestinal metaplasia revisited: function and regulation of CDX2.* Trends Mol Med, 2012. **18**(9): p. 555-63.
29. Correa, P., *Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention.* Cancer Res, 1992. **52**(24): p. 6735-40.
30. Berlth, F., et al., *Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(19): p. 5679-84.
31. Toh, J.W.T. and R.B. Wilson, *Pathways of Gastric Carcinogenesis, Helicobacter pylori Virulence and Interactions with Antioxidant Systems, Vitamin C and Phytochemicals.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
32. Yakirevich, E. and M.B. Resnick, *Pathology of gastric cancer and its precursor lesions.* Gastroenterol Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 261-84.
33. Cristescu, R., et al., *Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes.* Nat Med, 2015. **21**(5): p. 449-56.
34. Bonelli, P., et al., *Precision medicine in gastric cancer.* World J Gastrointest Oncol, 2019. **11**(10): p. 804-829.
35. Baretti, M. and D.T. Le, *DNA mismatch repair in cancer.* Pharmacol Ther, 2018. **189**: p. 45-62.
36. Ling, Z.Q., et al., *Microsatellite instability with promoter methylation and silencing of hMLH1 can regionally occur during progression of gastric carcinoma.* Cancer Lett, 2010. **297**(2): p. 244-51.
37. Puliga, E., et al., *Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows.* Cancer Treat Rev, 2021. **95**: p. 102175.
38. Lee, J.H., et al., *Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis.* J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(3): p. 354-65.
39. Zhao, J., et al., *Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells.* Cancer, 2013. **119**(2): p. 304-12.
40. Jacome, A.A., et al., *Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: a distinct molecular subtype of the disease?* Rev Soc Bras Med Trop, 2016. **49**(2): p. 150-7.
41. Pinto, M.P.e.a., *A Molecular Stratification of Chilean Gastric Cancer Patients with Potential Clinical Applicability.* Cancers, 2020. **12**(7).
42. Cai H, J.C., Chang X, Ding D, Han T, Yang J, et al., *Mutational landscape of gastric cancer and clinical application of genomic profiling based on target next-generation sequencing.* J Transl Med, 2019. **17**.

43. Ling, Y., Watanabe, Y., Nagahashi, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Wakai, T., & Okuda, S., *Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer.* Computational and structural biotechnology journal, 2020. **18**: p. 3301-3308.
44. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology.* Neoplasia, 2017. **19**(5): p. 412-420.
45. Kiyose, S., et al., *Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence in situ hybridization.* Pathol Int, 2012. **62**(7): p. 477-84.
46. Weinstein, I.B., *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer.* Science, 2002. **297**(5578): p. 63-4.
47. Garraway, L.A. and W.R. Sellers, *Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(8): p. 593-602.
48. Garraway, L.A. and W.R. Sellers, *From integrated genomics to tumor lineage dependency.* Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2506-8.
49. Bradner, J.E., D. Hnisz, and R.A. Young, *Transcriptional Addiction in Cancer.* Cell, 2017. **168**(4): p. 629-643.
50. Hnisz, D., et al., *Super-enhancers in the control of cell identity and disease.* Cell, 2013. **155**(4): p. 934-47.
51. Wang, X., M.J. Cairns, and J. Yan, *Super-enhancers in transcriptional regulation and genome organization.* Nucleic Acids Res, 2019. **47**(22): p. 11481-11496.
52. Whyte, W.A., et al., *Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes.* Cell, 2013. **153**(2): p. 307-19.
53. Lee, T.I. and R.A. Young, *Transcriptional regulation and its misregulation in disease.* Cell, 2013. **152**(6): p. 1237-51.
54. Chen, Y., et al., *Core transcriptional regulatory circuitries in cancer.* Oncogene, 2020. **39**(43): p. 6633-6646.
55. Giroux, V. and A.K. Rustgi, *Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence.* Nat Rev Cancer, 2017. **17**(10): p. 594-604.
56. Viger, R.S., et al., *Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease.* Mol Endocrinol, 2008. **22**(4): p. 781-98.
57. Zheng, R. and G.A. Blobel, *GATA Transcription Factors and Cancer.* Genes Cancer, 2010. **1**(12): p. 1178-88.
58. Akiyama, Y., Watkins, N., Suzuki, H., ... Herman, J. G., & Baylin, S. B. , *GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. .* Molecular and cellular biology, 2003. **23**(23): p. 8429–8439.
59. Kiiveri, S., et al., *Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors.* Mol Cell Endocrinol, 2005. **233**(1-2): p. 47-56.
60. Miller, I.J. and J.J. Bieker, *A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(5): p. 2776-86.
61. McConnell, B.B. and V.W. Yang, *Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases.* Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1337-81.
62. Tetreault, M.P., Y. Yang, and J.P. Katz, *Kruppel-like factors in cancer.* Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 701-13.
63. Pearson, R., et al., *Kruppel-like transcription factors: a functional family.* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 1996-2001.
64. Kong, X., et al., *Dysregulated expression of FOXM1 isoforms drives progression of pancreatic cancer.* Cancer Res, 2013. **73**(13): p. 3987-96.
65. Shum, C.K., et al., *Kruppel-like factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation.* Oncogene, 2013. **32**(35): p. 4086-99.

66. Zammarchi, F., et al., *KLF4 is a novel candidate tumor suppressor gene in pancreatic ductal carcinoma.* Am J Pathol, 2011. **178**(1): p. 361-72.
67. Liu, R., et al., *The induction of KLF5 transcription factor by progesterone contributes to progesterone-induced breast cancer cell proliferation and dedifferentiation.* Mol Endocrinol, 2011. **25**(7): p. 1137-44.
68. Takagi, K., et al., *Kruppel-like factor 5 in human breast carcinoma: a potent prognostic factor induced by androgens.* Endocr Relat Cancer, 2012. **19**(6): p. 741-50.
69. Nandan, M.O., et al., *Kruppel-like factor 5 mediates cellular transformation during oncogenic KRAS-induced intestinal tumorigenesis.* Gastroenterology, 2008. **134**(1): p. 120-30.
70. Chen, W., et al., *KLF5 Is Activated by Gene Amplification in Gastric Cancer and Is Essential for Gastric Cell Proliferation.* Cells, 2021. **10**(5).
71. Zhang, X., et al., *Identification of focally amplified lineage-specific super-enhancers in human epithelial cancers.* Nat Genet, 2016. **48**(2): p. 176-82.
72. James, R., T. Erler, and J. Kazenwadel, *Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium.* J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 15229-37.
73. Garcia-Fernandez, J., *The genesis and evolution of homeobox gene clusters.* Nat Rev Genet, 2005. **6**(12): p. 881-92.
74. Beck, F., *Homeobox genes in gut development.* Gut, 2002. **51**(3): p. 450-4.
75. Gehring, W.J. and Y. Hiromi, *Homeotic genes and the homeobox.* Annu Rev Genet, 1986. **20**: p. 147-73.
76. Chen, H.Y., et al., *Caudal type homeoboxes as a driving force in Helicobacter pylori infection-induced gastric intestinal metaplasia.* Gut Microbes, 2020. **12**(1): p. 1-12.
77. Mutoh, H., et al., *Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(2): p. 470-9.
78. Silberg, D.G., et al., *Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice.* Gastroenterology, 2002. **122**(3): p. 689-96.
79. Kim, H.J., et al., *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, 2020. **41**(10): p. 1341-1352.
80. Samadani, A.A., et al., *CDX1/2 and KLF5 Expression and Epigenetic Modulation of Sonic Hedgehog Signaling in Gastric Adenocarcinoma.* Pathol Oncol Res, 2019. **25**(3): p. 1215-1222.
81. Ushijima, T., *Epigenetic field for cancerization.* J Biochem Mol Biol, 2007. **40**(2): p. 142-50.
82. Chai, D., et al., *CDX2 and Reg IV expression and correlation in gastric cancer.* BMC Gastroenterol, 2021. **21**(1): p. 92.
83. Chartier, F.L., et al., *Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver.* Gene, 1994. **147**(2): p. 269-72.
84. Sladek, F.M., et al., *Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily.* Genes Dev, 1990. **4**(12B): p. 2353-65.
85. Tanaka, T., et al., *Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer.* J Pathol, 2006. **208**(5): p. 662-72.
86. Dean, S., et al., *Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents.* Gene Expr, 2010. **14**(6): p. 337-44.
87. Chellappa, K., et al., *Opposing roles of nuclear receptor HNF4alpha isoforms in colitis and colitis-associated colon cancer.* Elife, 2016. **5**.

88. Ko, H.L., Z. Zhuo, and E.C. Ren, *HNF4alpha Combinatorial Isoform Heterodimers Activate Distinct Gene Targets that Differ from Their Corresponding Homodimers.* Cell Rep, 2019. **26**(10): p. 2549-2557 e3.
89. Lambert, E., et al., *Human Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha Encodes Isoforms with Distinct Transcriptional Functions.* Mol Cell Proteomics, 2020. **19**(5): p. 808-827.
90. Lv, D.D., L.Y. Zhou, and H. Tang, *Hepatocyte nuclear factor 4alpha and cancer-related cell signaling pathways: a promising insight into cancer treatment.* Exp Mol Med, 2021. **53**(1): p. 8-18.
91. Xu, C., et al., *HNF4alpha pathway mapping identifies wild-type IDH1 as a targetable metabolic node in gastric cancer.* Gut, 2020. **69**(2): p. 231-242.
92. Ma, Y., X. Wei, and Z. Wu, *HNF-4alpha promotes multidrug resistance of gastric cancer cells through the modulation of cell apoptosis.* Oncol Lett, 2017. **14**(6): p. 6477-6484.
93. van der Post, R.S., et al., *HNF4A immunohistochemistry facilitates distinction between primary and metastatic breast and gastric carcinoma.* Virchows Arch, 2014. **464**(6): p. 673-9.
94. Kojima, K., et al., *The expression of hepatocyte nuclear factor-4alpha, a developmental regulator of visceral endoderm, correlates with the intestinal phenotype of gastric adenocarcinomas.* Pathology, 2006. **38**(6): p. 548-54.
95. Rottman, J.N. and J.I. Gordon, *Comparison of the patterns of expression of rat intestinal fatty acid binding protein/human growth hormone fusion genes in cultured intestinal epithelial cell lines and in the gut epithelium of transgenic mice.* J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11994-2002.
96. Antes, T.J. and B. Levy-Wilson, *HNF-3 beta, C/EBP beta, and HNF-4 act in synergy to enhance transcription of the human apolipoprotein B gene in intestinal cells.* DNA Cell Biol, 2001. **20**(2): p. 67-74.
97. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells.* Nature, 2012. **489**(7414): p. 101-8.
98. Morris, K.V. and J.S. Mattick, *The rise of regulatory RNA.* Nat Rev Genet, 2014. **15**(6): p. 423-37.
99. Rinn, J.L. and H.Y. Chang, *Genome regulation by long noncoding RNAs.* Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 145-66.
100. Yoon, J.H., J. Kim, and M. Gorospe, *Long noncoding RNA turnover.* Biochimie, 2015. **117**: p. 15-21.
101. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential.* Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
102. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function.* Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
103. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm.* Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
104. Kapranov, P., et al., *RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription.* Science, 2007. **316**(5830): p. 1484-8.
105. Schmitt, A.M. and H.Y. Chang, *Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways.* Cancer Cell, 2016. **29**(4): p. 452-463.
106. Bhan, A. and S.S. Mandal, *Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease.* ChemMedChem, 2014. **9**(9): p. 1932-56.
107. Chen, L.L., *Linking Long Noncoding RNA Localization and Function.* Trends Biochem Sci, 2016. **41**(9): p. 761-772.
108. Fattahi, S., et al., *LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: A novel approach to personalized medicine.* J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3189-3206.

109. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer.* Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
110. Zong, W., et al., *Long non-coding RNA-mediated regulation of signaling pathways in gastric cancer.* Clin Chem Lab Med, 2018. **56**(11): p. 1828-1837.
111. Anfossi, S., et al., *Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update.* Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(9): p. 541-563.
112. Ghafouri-Fard, S. and M. Taheri, *Long non-coding RNA signature in gastric cancer.* Exp Mol Pathol, 2020. **113**: p. 104365.
113. Virgilio, E., et al., *Long non-coding RNAs in the gastric juice of gastric cancer patients.* Pathol Res Pract, 2018. **214**(9): p. 1239-1246.
114. Wei, L., et al., *Noncoding RNAs in gastric cancer: implications for drug resistance.* Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 62.
115. Yuan, L., et al., *Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance.* Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 96.
116. Elsayed, E.T., et al., *Plasma long non-coding RNA HOTAIR as a potential biomarker for gastric cancer.* Int J Biol Markers, 2018: p. 1724600818760244.
117. Wang, J., et al., *Plasma exosomes as novel biomarker for the early diagnosis of gastric cancer.* Cancer Biomark, 2018. **21**(4): p. 805-812.
118. Zhao, W., et al., *Multiple Roles of Exosomal Long Noncoding RNAs in Cancers.* Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 1460572.
119. Xie, S.S., et al., *Emerging roles of non-coding RNAs in gastric cancer: Pathogenesis and clinical implications.* World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1213-23.
120. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 96-118.
121. Giakountis, A., et al., *A Positive Regulatory Loop between a Wnt-Regulated Non-coding RNA and ASCL2 Controls Intestinal Stem Cell Fate.* Cell Rep, 2016. **15**(12): p. 2588-96.
122. den Hoed, C.M. and E.J. Kuipers, *Gastric Cancer: How Can We Reduce the Incidence of this Disease?* Curr Gastroenterol Rep, 2016. **18**(7): p. 34.
123. Gao, J.P., et al., *Tumor heterogeneity of gastric cancer: From the perspective of tumor-initiating cell.* World J Gastroenterol, 2018. **24**(24): p. 2567-2581.
124. Song, Z., et al., *Progress in the treatment of advanced gastric cancer.* Tumour Biol, 2017. **39**(7): p. 1010428317714626.
125. Gibb, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas.* Mol Cancer, 2011. **10**: p. 38.
126. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis.* World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
127. Li, C., et al., *Dysregulated lncRNA-UCA1 contributes to the progression of gastric cancer through regulation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway.* Oncotarget, 2017. **8**(55): p. 93476-93491.
128. Hu, Y., et al., *Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer.* Cancer Res, 2014. **74**(23): p. 6890-902.
129. Xu, W., et al., *Silencing of lncRNA ZFAS1 inhibits malignancies by blocking Wnt/beta-catenin signaling in gastric cancer cells.* Biosci Biotechnol Biochem, 2018. **82**(3): p. 456-465.
130. Li, P., et al., *Long non-coding RNA CASC2 suppresses the proliferation of gastric cancer cells by regulating the MAPK signaling pathway.* Am J Transl Res, 2016. **8**(8): p. 3522-9.

131. Sun, M., et al., *Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer.* BMC Cancer, 2014. **14**: p. 319.
132. Quintanal-Villalonga, A., et al., *Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance.* Nat Rev Clin Oncol, 2020. **17**(6): p. 360-371.
133. Francis, R., et al., *Gastrointestinal transcription factors drive lineage-specific developmental programs in organ specification and cancer.* Sci Adv, 2019. **5**(12): p. eaax8898.
134. Vias, M., A. Ramos-Montoya, and I.G. Mills, *Terminal and progenitor lineage-survival oncogenes as cancer markers.* Trends Mol Med, 2008. **14**(11): p. 486-94.
135. Xu, T.P., et al., *KLF5 and MYC modulated LINC00346 contributes to gastric cancer progression through acting as a competing endogeous RNA and indicates poor outcome.* Cell Death Differ, 2019. **26**(11): p. 2179-2193.
136. Veto, B., et al., *The transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 alpha is inhibited via phosphorylation by ERK1/2.* PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0172020.
137. Guo, H., et al., *Phosphorylation of Ser158 regulates inflammatory redox-dependent hepatocyte nuclear factor-4alpha transcriptional activity.* Biochem J, 2006. **394**(Pt 2): p. 379-87.
138. Sun, K., et al., *Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization.* Mol Endocrinol, 2007. **21**(6): p. 1297-311.
139. Tunçer, S.B., S., *HNF4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha)*. 2016: Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.
140. Kidder, B.L., G. Hu, and K. Zhao, *ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data.* Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 918-22.
141. Pchelintsev, N.A., P.D. Adams, and D.M. Nelson, *Critical Parameters for Efficient Sonication and Improved Chromatin Immunoprecipitation of High Molecular Weight Proteins.* PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0148023.
142. Sam, J., et al., *Specificity, redundancy and dosage thresholds among gata4/5/6 genes during zebrafish cardiogenesis.* Biol Open, 2020. **9**(6).
143. Chen, L., et al., *HNF4 factors control chromatin accessibility and are redundantly required for maturation of the fetal intestine.* Development, 2019. **146**(19).
144. Khurana, S. and J.C. Mills, *The gastric mucosa development and differentiation.* Prog Mol Biol Transl Sci, 2010. **96**: p. 93-115.
145. Grapin-Botton, A. and D. Constam, *Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation.* Mech Dev, 2007. **124**(4): p. 253-78.
146. Willet, S.G. and J.C. Mills, *Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: from Embryogenesis to Adult Homeostasis.* Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2016. **2**(5): p. 546-559.
147. Koutsourakis, M., et al., *The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development.* Development, 1999. **126**(9): p. 723-32.
148. Kuo, C.T., et al., *GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation.* Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1048-60.
149. Tamura, S., et al., *Gastric DNA-binding proteins recognize upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4609.
150. Al-azzeh, E.D., et al., *Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1490**(3): p. 324-32.
151. van der Sluis, M., et al., *The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(3): p. 952-60.

152. Jacobsen, C.M., et al., *Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium.* Dev Biol, 2002. **241**(1): p. 34-46.
153. DeLaForest, A., et al., *GATA4 Is Required for Budding Morphogenesis of Posterior Foregut Endoderm in a Model of Human Stomach Development.* Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 44.
154. Bialkowska, A.B., V.W. Yang, and S.K. Mallipattu, *Kruppel-like factors in mammalian stem cells and development.* Development, 2017. **144**(5): p. 737-754.
155. Lin, S.C., et al., *Klf5 regulates lineage formation in the pre-implantation mouse embryo.* Development, 2010. **137**(23): p. 3953-63.
156. Li, J.C., et al., *The Partial Role of KLF4 and KLF5 in Gastrointestinal Tumors.* Gastroenterol Res Pract, 2021. **2021**: p. 2425356.
157. McConnell, B.B., et al., *Kruppel-like factor 5 is important for maintenance of crypt architecture and barrier function in mouse intestine.* Gastroenterology, 2011. **141**(4): p. 1302-13, 1313 e1-6.
158. Almeida, R., et al., *Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas.* J Pathol, 2003. **199**(1): p. 36-40.
159. Kumar, N., et al., *The lineage-specific transcription factor CDX2 navigates dynamic chromatin to control distinct stages of intestine development.* Development, 2019. **146**(5).
160. Cattin, A.L., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(23): p. 6294-308.
161. Wang, A., et al., *Epigenetic priming of enhancers predicts developmental competence of hESC-derived endodermal lineage intermediates.* Cell Stem Cell, 2015. **16**(4): p. 386-99.
162. Verzi, M.P., et al., *Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2.* Dev Cell, 2010. **19**(5): p. 713-26.
163. Suh, E. and P.G. Traber, *An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(2): p. 619-25.
164. Chawengsaksophak, K., et al., *Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice.* Nature, 1997. **386**(6620): p. 84-7.
165. de Vries, A.C., et al., *Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands.* Gastroenterology, 2008. **134**(4): p. 945-52.
166. Uemura, N., et al., *Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer.* N Engl J Med, 2001. **345**(11): p. 784-9.
167. Dubois, V., et al., *Control of Cell Identity by the Nuclear Receptor HNF4 in Organ Pathophysiology.* Cells, 2020. **9**(10).