



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

“Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης lncRNA από παράγοντες επιβίωσης κυτταρικών γενεαλογιών με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.”

Προπτυχιακή Φοιτήτρια: Τσαπαδίκου Αστερία, Απόστολος

Επιβλέπων Καθηγητής : Γιακουντής Αντώνιος

Εργαστήριο : Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



“Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης lncRNA από παράγοντες επιβίωσης κυτταρικών γενεαλογιών με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.”

“Study of transcriptional regulation of lncRNA from lineage-survival factors using chromatin immunoprecipitation.”

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χαχάμη Γεωργία: Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητα παγκοσμίως, εμφανίζοντας ετερογένεια μεταξύ των ασθενών. Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι υψηλά λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης της νόσου, αφού στα αρχικά της στάδια η ασθένεια είναι ασυμπτωματική. Για αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η εύρεση νέων διαγνωστικών βιοδεικτών, οι οποίοι θα παρουσιάζουν ιστοειδικότητα και καρκινοειδικότητα, παρέχοντας ευαισθησία και ακρίβεια κατά τη διάγνωση της νόσου στα αρχικά στάδια. Οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4α έχουν κρίσιμο ρόλο στην διαδικασία της εντερικής μεταπλασίας και δημιουργούν ένα ρυθμιστικό σύμπλοκο, που ελέγχει την μεταγραφή καθοδικών στόχων κατά την ογκογένεση. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες φυσιολογικά δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής γενεαλογίας (lineage-survival factors) έχοντας ρόλο στη διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων, στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της οργανογένεσης, ενώ η εκτοπική έκφραση τους συμβάλει στην διαδικασία της ανάπτυξης του καρκίνου. Η άμεση θεραπευτική τους στόχευση δεν είναι εφικτή λόγω της εμπλοκής τους στην φυσιολογία πολλών ιστών του γαστρεντερικού, συνεπώς το ενδιαφέρον στρέφεται σε καθοδικούς, καρκινοειδικούς στόχους τους όπως τα lncRNA. Τα lncRNA αποτελούν ιδανικό βιοδείκτη λόγω της ιστοειδικότητας και της εύρεσής τους στα σωματικά υγρά.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η επιβεβαίωση της ύπαρξης lncRNA στόχων που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό σύμπλοκο των CDX2 και HNF4α στο γαστρικό καρκίνο, έπειτα από διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε καρκινικά κύτταρα. Στα πλαίσια των πειραμάτων αποδείχθηκε η ρύθμιση ενός lncRNA από τον μεταγραφικό παράγοντα HNF4α, η οποία επιβεβαιώθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο, ενώ παράλληλα μελετήθηκε και η συμβολή άλλων ρυθμιστών της κυτταρικής γενεαλογίας στην ρύθμιση του. Επιπλέον δημιουργήθηκε ένα μοριακό εργαλείο μεταγραφικής σίγησης, που στηρίζεται στη χρήση του dCas9-KRAB-MeCP2 και το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί μελλοντικά για την μελέτη της ρύθμισης των lncRNA από μεταγραφικούς παράγοντες.

Abstract

Gastric cancer is a high incidence and high mortality disease worldwide, exhibiting heterogeneity among patients. The mortality rate of gastric cancer is high due to late diagnosis of the disease, since in its initial stages the disease is asymptomatic. Therefore, it is crucial to identify new, diagnostic markers, with increased tissue and cancer specificity, providing sensitivity and accuracy in early stages of the disease. Transcription factors CDX2 and HNF4 α , have a crucial role in regulating gastric intestinal metaplasia by forming a transcriptional complex that regulates the expression of target genes through tumorigenesis. Those specific transcription factors that are normally involved in the maintenance of specific cell types (lineage survival factors) during the early developmental stages of organogenesis while their ectopic expression contributes to the progression of cancer development. Unfortunately, their direct therapeutic targeting is not possible due to their crucial role in the physiology of gastric tissue, therefore research focus is shifted on their downstream targets such as lncRNAs that are characterized by cancer specificity expression. lncRNAs are ideal biomarkers because they are characterized by tissue-specific expression and they can be traced in many body fluids.

The aim of this study focused on the identification of lncRNAs that are regulated by the CDX2 and HNF4 α transcription complex in gastric cancer, using chromatin immunoprecipitation in cancer cell-lines. More specifically, it was experimentally confirmed that primarily HNF4 α and secondarily CDX2 regulate the transcription of lncHEAL (**H**nf4 α **r**egul**A**ted **L**ncrna). In parallel, we investigated the regulation of HEAL by other lineage-survival transcription factors. Furthermore we created a CRISPR-mediated molecular tool for epigenetic transcriptional silencing that includes a dCas9-KRAB-MeCP2 cassette and could be used as a tool to investigate the regulation of lncRNAs by transcription factors .

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κύριο Γιακουντή Αντώνιο . Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Γιακουντή για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του εργαστηρίου για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα, και να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την καθοδήγηση του με τη συνεχή βοήθεια και συμπαράσταση του. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα εργασίας καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου, Ελένη-Ροντιόλα Μπεγκόλλι, για την συνεχή υποστήριξη της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Στάγκο Δημήτριο και τη κα.Χαχάμη Γεωργία για την συμμετοχή τους στην συμβουλευτική μου επιτροπή. Τέλος, την οικογένειά μου που όλα αυτά τα χρόνια στέκονται δίπλα μου και χωρίς την πολύτιμη βοήθεια τους δεν θα τα είχα καταφέρει.

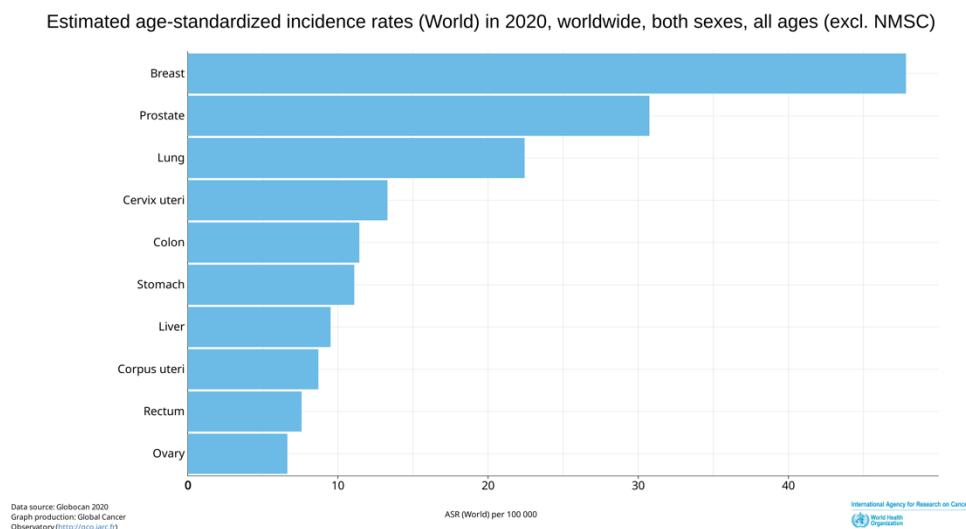
Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	4
Ευχαριστίες	5
1.Εισαγωγή	7
1.1 Ο καρκίνος του στομάχου	7
1.1.1 Επιδημιολογικά Στοιχεία	8
1.1.2 Υπότυποι γαστρικού καρκίνου	9
1.1.3 Ιστοπαθολογική ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου	10
1.1.4 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου	12
1.2 Μεταγραφικός παράγοντας CDX2	16
1.3 Μεταγραφικός παράγοντας HNF4α	17
1.4 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA	19
1.4.1 Γενικά στοιχεία για μακρά μη κωδικοποιητικά RNA	19
1.4.2 Μηχανισμοί δράσεις των lncRNAs στον καρκίνο	20
1.4.3 lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες και θεραπευτικοί στόχοι	22
2. Σκοπός εργασίας	24
3.Υλικά και Μέθοδοι	25
3.1.Απομόνωση RNA	25
3.2.Κατεργασία με DNase	25
3.3.Σύνθεση cDNA	26
3.4.Ποσοτική PCR	27
3.5 Απομόνωση πρωτεϊνών και ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο Bradford	28
3.6 SDS-page ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και Western Blot- Ανοσοαποτύπωση κατά Western	29
3.7 Κλωνοποίηση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM	32
3.8 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)	35
3.9 Δημιουργία μοριακού εργαλείου για την επιλεκτική σίγηση γονιδίων στόχων και μεταγραφικών παραγόντων	38
4.Πειραματικά Αποτελέσματα	39
4.1 Κλωνοποίηση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM	39
4.2 Πρωτεϊνική έκφραση επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α σε σύστημα παροδικής καταστολής της έκφρασης τους	41
4.3 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α	42
4.3.1 Έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης σε πρωτεϊνικό επίπεδο.	42
4.3.2 Ποσοτική PCR στον υποκινητή lncHEAL έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης έναντι των CDX2 και HNF4α.	44
4.4 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του HEAL σε πείραμα υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α	46
4.5 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του HEAL σε πείραμα σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και KLF5	49
4.6 Δημιουργία μοριακού εργαλείου για σίγηση γονιδίων με το σύστημα dCas9-KRAB-MeCP2	49
5.Συζήτηση-Συμπεράσματα	53
6.Βιβλιογραφία	55

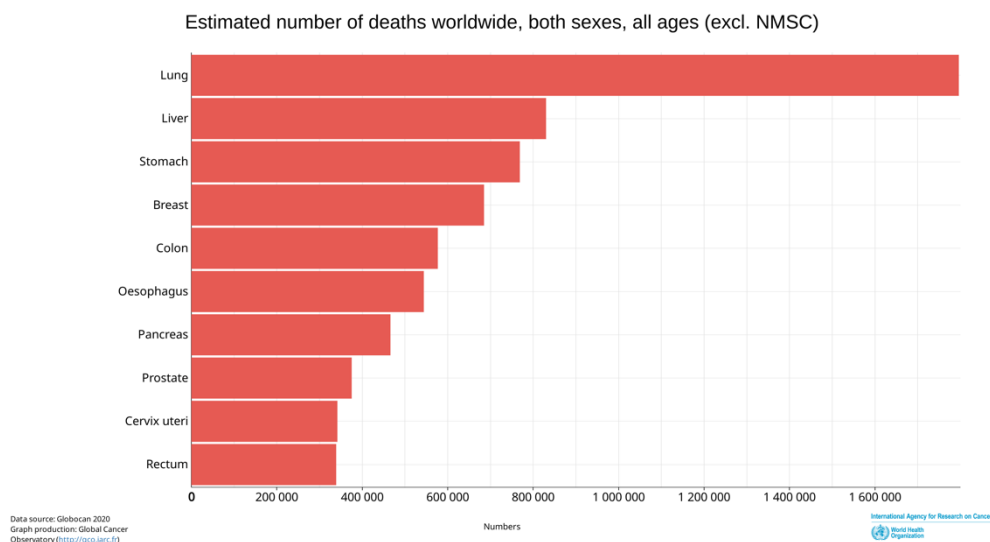
1.Εισαγωγή

1.1 Ο καρκίνος του στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μία από τις πιο επιθετικές μορφές εμφάνισης της νόσου. Σήμερα αποτελεί την πέμπτη σε συχνότητα εμφάνισης μορφή καρκίνου και κατέχει την τρίτη θέση σε θνησιμότητα παγκοσμίως, λαμβάνοντας υπόψη τη συχνότητα εμφάνισης και στα δύο φύλα (Εικόνα 1.1 και Εικόνα 1.2) (WHO, 2022). Το 2020 εμφανίστηκαν περίπου 1.100.000 νέα περιστατικά της νόσου και 800.000 θάνατοι, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 7,7% όλων των θανάτων παγκοσμίως (Ilic & Ilic, 2022). Παρόλη τη μείωση της εμφάνισης αλλά και της θνησιμότητας την τελευταία δεκαετία, ο καρκίνος του στομάχου παραμένει μία από τις κυριότερες προκλήσεις υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο.



Εικόνα1.1: Περιστατικά εμφάνισης κακοηθειών σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2020 (WHO,2022)



Εικόνα 1.2: Θάνατοι από κακοήθειες σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2020 (WHO,2022)

Παρά την ανάπτυξη νέων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας του καρκίνου του στομάχου το προσδόκιμο ζωής των ασθενών μέχρι τα 5 πρώτα χρόνια από την εμφάνιση της νόσου παραμένει μικρότερο του 20% παγκοσμίως, με εξαιρέσεις την Κίνα και την Ιαπωνία, όπου το ποσοστό ξεπερνά το 50% (Ferlay et al., 2021). Αυτό ωστόσο έρχεται ως απόρροια του θεσμικού προγράμματος ανίχνευσης του γαστρικού καρκίνου, όπου θεσπίστηκε το 1999 (National Cancer Screening Program - NCSP), οδηγώντας στην προσυμπτωματική διάγνωση του γαστρικού καρκίνου (National Cancer Screening Program [website](#)).

Ένα από τα κυριότερα αίτια για το μειωμένο προσδόκιμο ζωής είναι η διάγνωση της νόσου σε προχωρημένο στάδιο, οδηγώντας έτσι σε δυσμενή πρόγνωση. Τα περισσότερα περιστατικά διαγιγνώσκονται στο τρίτο ή τέταρτο στάδιο καρκίνου που η νόσος έχει επεκταθεί (Pasechnikov et al., 2014). Οι σύγχρονοι μέθοδοι διάγνωσης περιλαμβάνουν οισοφαγο-γαστροσκόπηση με λήψη βιοψιών, εργαστηριακές εξετάσεις και αξονική τομογραφία. Οι μέθοδοι αντιμετώπισης της νόσου εστιάζουν στην χειρουργική εκτομή και ταυτόχρονα θεραπεία ακτινοβολιών είτε χημειοθεραπείες (Waddell et al., 2013). Ωστόσο ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο ετερογενείς μορφές καρκίνου, κάνοντας την θεραπευτική προσέγγιση ιδιαίτερα δύσκολη και πολύπλοκη καθώς και πολλές φορές αναποτελεσματική (Necula et al., 2019). Είναι σημαντικό να αναπτυχθούν νέα διαγνωστικά μέσα, μη επεμβατικού τύπου, τα οποία θα βοηθούν στην έγκαιρη ανίχνευση της νόσου στα αρχικά στάδια αλλά και να βρεθούν νέες αποτελεσματικές θεραπευτικές επιλογές που θα συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της.

Τα αίτια εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), το διατροφικό πρότυπο και την κληρονομική προδιάθεση να κατέχουν τον κύριο ρόλο (Li et al., 2021). Η μόλυνση από το *Helicobacter pylori* είναι η πρώτη αιτία εμφάνισης της νόσου, καθώς προκαλεί χρόνια γαστρίτιδα και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, με τα διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου να προκαλούν διαφορετικές αλλοιώσεις συμβάλλοντας στην ετερογένεια της νόσου (Wroblewski et al., 2010).

Πέρα από αυτά όμως έχει αποδειχθεί ότι ένα διατροφικό πρότυπο πλούσιο σε κατανάλωση άλατος,, κονσερβοποιημένα τρόφιμα, καπνιστά, αλκοόλ και κατεργασμένο κόκκινο κρέας φαίνεται να αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου στο στομάχι (Richa et al., 2022). Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ένα σωστό και ισορροπημένο διατροφικό πρότυπο λειτουργεί προληπτικά συμβάλλοντας στην μείωση της πιθανότητας εμφάνισης. Ως προστατευτικά διατροφικά συστατικά χαρακτηρίζονται τα πράσινα λαχανικά, φρούτα και κυρίως εσπεριδοειδή και το πράσινο τσάι.

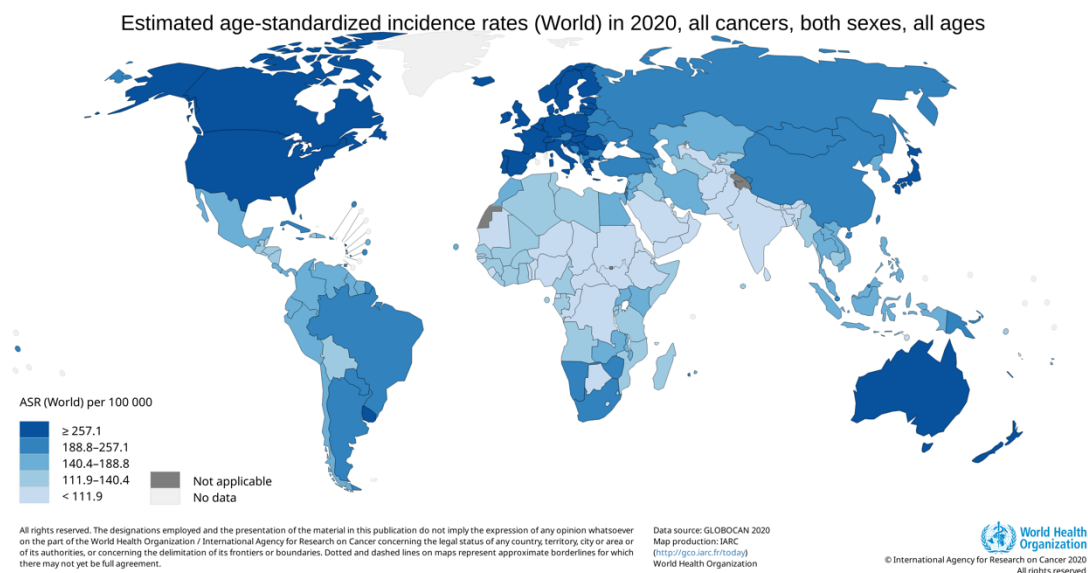
1.1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, ο καρκίνος του στομάχου αποτελούσε την κύρια αιτία θανάτου από κακοήθεις όγκους τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες αλλά και στην Ευρώπη. Τις τελευταίες δεκαετίες ωστόσο η θνησιμότητα έχει μειωθεί λόγω της βελτίωσης των κοινωνικοπολιτικών συνθηκών διαβίωσης, της βελτίωσης της διατροφής και της

καλύτερης και αποτελεσματικότερης συντήρησης των τροφίμων (Morgan et al., 2022). Ωστόσο έχουν αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες τα κρούσματα σε άτομα μικρότερα των 50 ετών (Balakrishnan et.al.,2017).

Τα περιστατικά καρκίνου του στομάχου που σημειώνονται ετησίως ξεπερνούν το 1 εκατομμύριο, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες έναντι των γυναικών. (Rawla & Barsouk, 2019). Η συχνότητα εμφάνισης στους άντρες είναι 2.2 φορές μεγαλύτερη έναντι των γυναικών, με τα περισσότερα περιστατικά να εκδηλώνονται μετά το 45ο έτος και ιδιαίτερα μετά την συμπλήρωση των 60 ετών (Bray et al., 2018).

Η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου διαφέρει ανάμεσα στο σύνολο των χωρών και, και σχετίζεται άμεσα τόσο με τον κίνδυνο λοιμώξεων από *H.pylori* όσο και με περιβαλλοντικούς παράγοντες και διατροφικά πρότυπα (Εικόνα 1.3). Η Ανατολική και Κεντρική Ασία, καθώς και η Λατινική Αμερική εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά, με την Κορέα να έχει το υψηλότερο ποσοστό συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου εθνική επίπτωση με σχεδόν 60 ανά 100.000 νέα κρούσματα ετησίως για τους άνδρες (Ferlay et.al 2021). Από την άλλη πλευρά ο Καναδάς, η Ινδία και η Κεντρική Ευρώπη, είναι περιοχές με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου (Arnold et.al 2014). Ο συγκεκριμένος τύπου καρκίνου, αποτελεί την 1^η αιτία θανάτου των ανδρών σε τουλάχιστον 10 χώρες παγκοσμίως και ιδιαίτερα στην Κεντρική και Ανατολική Ασία (Bray et al., 2018)



Εικόνα 1.3: Ποσοστά εμφάνισης γαστρικού καρκίνου στην υφήλιο για το έτος 2020 λαμβάνοντας υπόψιν και τα δύο φύλλα χωρίς ηλικιακό (WHO,2022)

1.1.2 Υπότυποι γαστρικού καρκίνου

Ο γαστρικός καρκίνος παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και μπορεί να διακριθεί στις εξής κατηγορίες :

- I. Αδενοκαρκίνωμα : προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και αποτελεί το

90-95% των περιπτώσεων της νόσου. Υποδιαιρείται σε γαστρικό καρκίνο στην καρδία και μη-καρδιακό γαστρικό καρκίνο, ανάλογα με τη θέση που λαμβάνουν μέσα στο στομάχο (Bosman et al., 2010).

- II. Λεμφικός τύπος καρκίνου /Non-Hodgkin Λέμφωμα : αποτελεί περίπου το 4% των νεοπλασμάτων του στομάχου. Είναι ο δεύτερος σε συχνότητα καρκίνος στομάχου μετά το αδενοκαρκίνωμα και προέρχονται κυρίως έπειτα από χρόνια φλεγμονή που σχετίζεται με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (Vlăduț et al., 2020).
- III. Σαρκώματα και στρωματικοί όγκοι (GIST- Gastrointestinal Stroma Tumor): σπάνιος τύπος καρκίνου που ξεκινά από τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στομάχου και του γαστρεντερικού συστήματος. Συνήθως αντιμετωπίζονται άμεσα με χειρουργική εκτομή, αν και έχουν έντονο μεταστατικό χαρακτήρα. (Machairiotis et al, 2013)
- IV. Νευροενδοκρινικοί όγκοι (NETs): οι όγκοι αυτοί προκύπτουν από κύτταρα του ενδοκρινικού συστήματος, και συχνά είναι καλοήθεις. Συναντώνται μόλις στο 0,6% των όγκων και η κύρια αιτία εμφάνισης τους στο στομάχι, είναι η χρόνια φλεγμονή και γαστρίτιδα (Yang et al., 2018).
- V. Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων και άλλοι ιστολογικοί τύποι

1.1.3 Ιστοπαθολογική ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου

Στην προσπάθεια κατηγοριοποίησης και ταξινόμησης των υποτύπων του καρκίνου, υπάρχουν αρκετά συστήματα ταξινόμησης που βασίζονται και διακρίνονται από ιστολογικά αλλά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της νόσου. Η ταξινόμηση Lauren (1965) αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τύπο ιστολογικής ταξινόμησης της νόσου (MA et al., 2016). Η κατηγοριοποίηση σύμφωνα με το σύστημα αυτό , γίνεται με ένα σύνολο χαρακτηριστικών που αποτελούνται τόσο από διακριτά κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά, όπως η ιστογένεση, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η επιδημιολογία, τα αίτια εμφάνισης της νόσου, η πορεία της καρκινογένεσης, και η πρόγνωση και μοριακά χαρακτηριστικά όπως η διαφορική έκφραση πρωτεϊνών και η διαφορετική απορρύθμιση των προστατευτικών μηχανισμών. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren οι γαστρικές νεοπλασίες διαχωρίζονται στον γαστρικό εντερικό υπότυπο (Intestinal Type), στον διάχυτο υπότυπο (Diffused Type), στον απροσδιόριστο υπότυπο (Indeterminate Type) και στον μικτό υπότυπο (Mixed Type) (MA et al., 2016).

Ο γαστρικός εντερικός υπότυπος είναι ο επικρατέστερος και πιο συνηθισμένος με ποσοστό συχνότητας εμφάνισης 50%, ενώ ακολουθεί ο διάχυτος υπότυπος με 30% (Iyer et al., 2020). Οι υπότυποι του γαστρικού καρκίνου, παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ως προς την κλινική τους εικόνα με αποτέλεσμα να χρειάζονται και διαφορετικές μεθόδους αντιμετώπισης.

Ο γαστρικός εντερικός υπότυπος, είναι άμεσα συνδεδεμένος με την μόλυνση από *H. pylori*, αλλά και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες και το διατροφικό πρότυπο (Iyer et al., 2020). Εμφανίζεται συνήθως σε άντρες μεγαλύτερης ηλικίας (μεγαλύτεροι των 60 ετών) (Assumpção et al., 2020). Η εμφάνιση κακοήθειας έρχεται ως απόρροια

μια σειράς προ-καρκινικών αλλοιώσεων όπως η επιφανειακή και ατροφική γαστρίτιδα, η εντερική μεταπλασία καταλήγοντας σε δυσπλασία (van der Woude et al., 2003). Η ατροφία που δημιουργείται λόγω της χρόνιας φλεγμονής οδηγεί σε βλάβη του επιθηλίου του στομάχου, που η εκτεταμένη μορφή του οδηγεί σε εντερική μεταπλασία και τελικά στο αδενοκαρκίνωμα. Τοπολογικά οι όγκοι συνήθως βρίσκονται στο περιφερικό τμήμα του στομάχου (distal stomach), δηλαδή το άντρο και τον πυλωρό (Waldum & Fossmark, 2018).

Σε μοριακό επίπεδο, ο γαστρικός εντερικός υπότυπος επάγει και συνεπώς προϋποθέτει την υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 (βλ. παρακάτω), που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2, εκφράζεται μόνο σε περιπτώσεις εντερικής μεταπλασίας του στομάχου, ενώ δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο. Μορφολογικά τα κύτταρα εμφανίζουν έντονη κυτταρική προσκόλληση, δημιουργώντας αδένες με κυλινδρικό σχήμα (Ha Kim et al., 2006).

Από την άλλη πλευρά ο διάχυτος υπότυπος γαστρικού καρκίνου φαίνεται να έχει διαφορετικά μοριακά χαρακτηριστικά, μορφολογικές διαφορές και αίτια εμφάνισης. Σε αντίθεση με τον γαστρικό εντερικό υπότυπο που σχετίζεται άμεσα με περίπτωση λοιμώξεων και γαστρίτιδες, ο διάχυτος τύπος φαίνεται να έχει κυρίως γενετικό υπόβαθρο, χωρίς ωστόσο να αποκλείονται και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (Bosman et al., 2010). Επιπλέον σχετίζεται άμεσα με την μόλυνση από τον ιό *Epstein-Barr* (EBV), χωρίς όμως η σύνδεση τους να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι σήμερα (Lee et al., 2009). Οι κακοήθειες εμφανίζονται στο πιο κεντρικό τμήμα του στομάχου (proximal stomach) επηρεάζοντας και αλλοιώνοντας πρώτα τον γαστρικό βλεννογόνο (Waldum & Fossmark, 2018, van der Post et al., 2015). Ο συγκεκριμένος υπότυπος είναι πιο επιθετικός τύπος και συνήθως έχει μικρότερο προσδόκιμο σε σχέση με τον γαστρικό εντερικό υπότυπο, λόγω συχνότερης μετάστασης, ενώ εμφανίζεται και σε νεαρότερα άτομα (μικρότερα των 40 ετών) (Lee et al., 2014).

Ιδιαίτερο μορφολογικό χαρακτηριστικό του διάχυτου τύπου είναι ότι τα κύτταρα χάνουν την ιδιότητα της κυτταρικής προσκόλλησης έχοντας ως αποτέλεσμα να διεισδύουν ως μεμονωμένα κύτταρα κατά τη διαδικασία δημιουργίας του όγκου. (Corso et al., 2018). Μοριακά, ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου σχετίζεται με την απώλεια έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική προσκόλληση και συνάφεια όπως *CDH1* (E-καδερίνη 1) (Corso et al., 2018).

Οι περιπτώσεις των περιστατικών που οφείλονται σε μεταλλάξεις που κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, χαρακτηρίζονται ως κληρονομικός διάχυτος υπότυπος (Hereditary Diffuse Gastric Cancer-HDGC) (Petrovich & Ford, 2016). Περίπου το 40% των περιστατικών κληρονομικού διάχυτου γαστρικού καρκίνου σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1* και η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άτομα με κληρονομική μετάλλαξη του *CDH1* φτάνει έως και 70% έως την ηλικία των 80 ετών. (van der Post et al., 2015). Επιπλέον μεταλλάξεις εμφανίζονται και στο γονίδιο *TP53*, το οποίο έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου της απόπτωσης και στην επιδιόρθωση του DNA (Ansari et al.,

2018). Τέλος ένα ακόμα γονίδιο που φαίνεται να σχετίζεται με τον διάχυτο τύπο και φέρει κληρονομικές μεταλλάξεις είναι το *CTNN1A*, γονίδιο που κωδικοποιεί τη α -κατενίνη και παίζει ρόλο στην δημιουργία των χασμοσυνδέσμων για την επικοινωνία και την συγκόλληση των κυττάρων, δημιουργώντας σύμπλοκο με την β -κατενίνη. (Cho et al., 2019, van der Post & Carneiro, 2017).

1.1.4 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου.

Ο ρόλος των ταξινομήσεων των βιοψιών καρκίνου με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά έχει αναδειχθεί σε καθοριστικό παράγοντα για την ανίχνευση της νόσου, τα τελευταία χρόνια με την τεχνολογική ανάπτυξη (αλληλούχηση νέας γενιάς, αλληλούχηση DNA και RNA, μελέτες για μεθυλίωση DNA και άλλες). Για τον λόγο αυτό έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες προσπάθειες μοριακής ταξινόμησης των υπότυπων του γαστρικού καρκίνου, με τις κοινοπραξίες The Cancer Genome Atlas (TCGA) και Asian Cancer Research Group (ACRG) να είναι οι πιο βασικές. Αν και η μοριακή ταξινόμηση αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την πολυπλοκότητα της διαδικασίας κατηγοριοποίησης, είναι απαραίτητη για την επιλογή μίας στοχευμένης και αποτελεσματικής πορείας (Wang et al., 2019).

Το 2014, το ερευνητικό πρόγραμμα The Cancer Genome Atlas (TCGA), ανέλυσε δείγματα αδenoκαρκινώματος από 295 ασθενείς, οι οποίοι προηγουμένως δεν είχαν υποβληθεί σε καμία μορφής χημειοθεραπείας ή ακτινοβολιών, και κατέληξε στις 4 εξής κατηγορίες με τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης (Εικόνα 1.6) (Bosman et al., 2010):

- I. Όγκοι θετικοί στον *EBV* (*Epstein Barr positive tumors*) – 8,8% των δειγμάτων
- II. Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite unstable tumors -MSI) - 21,7% των δειγμάτων
- III. Όγκοι γονιδιωματικά σταθεροί (Genomically Stable tumors – GS) -19,7% των δειγμάτων
- IV. Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomally Unstable tumors- CIN) - 49% των δειγμάτων

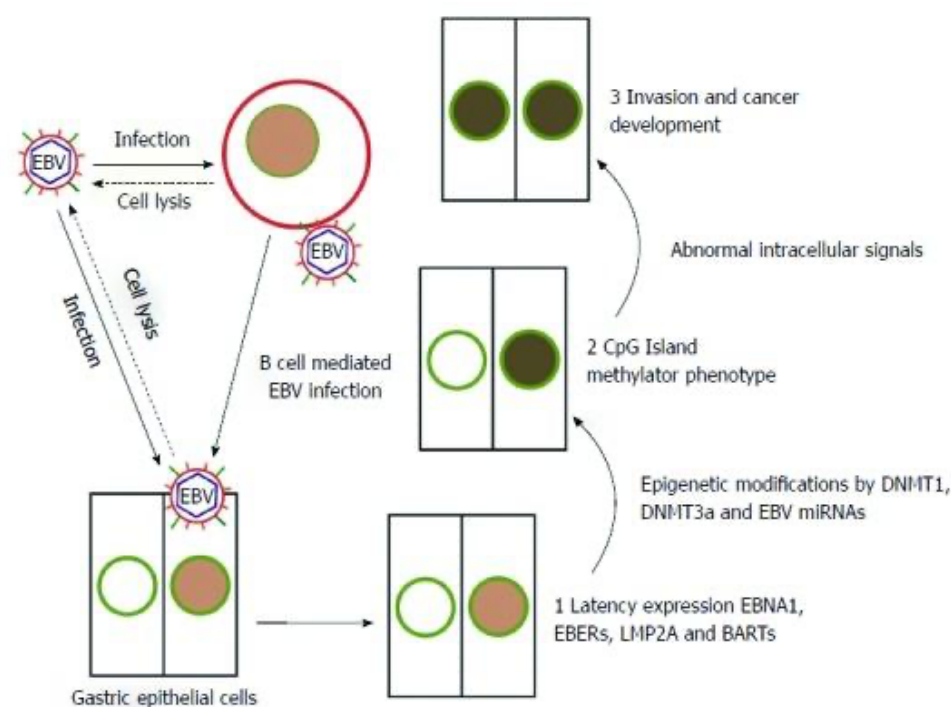
Ως μέθοδοι αξιολόγησης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μοριακές τεχνικές: ανάλυση σωματικού αριθμού αντιγράφων, αλληλούχηση εξονίων, δημιουργία προφίλ προτύπου μεθυλίωσης του DNA, αλλούχηση του mRNA και του miRNA και ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο RPPA (De Re et al., 2020).

I) Όγκοι θετικοί στον *EBV*

Οι όγκοι αυτοί οφείλονται σε μόλυνση από τον ιό *Epstein-Barr* και αποτελούν περίπου το 10% των περιστατικών καρκίνου του στομάχου παγκοσμίως (Fukayama et al., 2019). Εμφανίζεται συνήθως σε άντρες ασθενείς σε νεαρή ηλικία και εντοπίζεται στο άνω μέρος του στομάχου κυρίως στην περιοχή του θόλου και του κορμού. Χαρακτηριστικό των κακοηθειών αυτών είναι πως τα γαστρικά κύτταρα εμφανίζουν

αντίσταση στην απόπτωση και εκκρίνουν ανοσοτροποποιητικά μόρια όπως Ιντερλευκίνη-1, η οποία δρα αυτοκρινώς στα καρκινικά κύτταρα (Chong et al., 2002).

Η αναλογία των πολλαπλασιαστικών κυττάρων είναι μικρότερη από αυτά που εμφανίζουν αντίσταση στην απόπτωση, σε όγκους *EBV*-θετικούς σε σχέση με τους αρνητικούς όγκους (Yau, 2014). Ο ιός, μέσω υπερέκφρασης του ιικού γονιδίου *EBNA1*, καταφέρνει να εμποδίσει την ενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* το οποίο φυσιολογικά ενεργοποιεί την απόπτωση, έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα την μείωση της ακετυλίωσης του *p53* και την αναστολή του (Sivachandran et al., 2012). Ταυτόχρονα το ίδιο γονίδιο *EBNA1*, επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του αυξητικού παράγοντα-1 της ινσουλίνης, επιταχύνοντας και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των *EBV*-θετικών όγκων (Iwakiri et al., 2003).



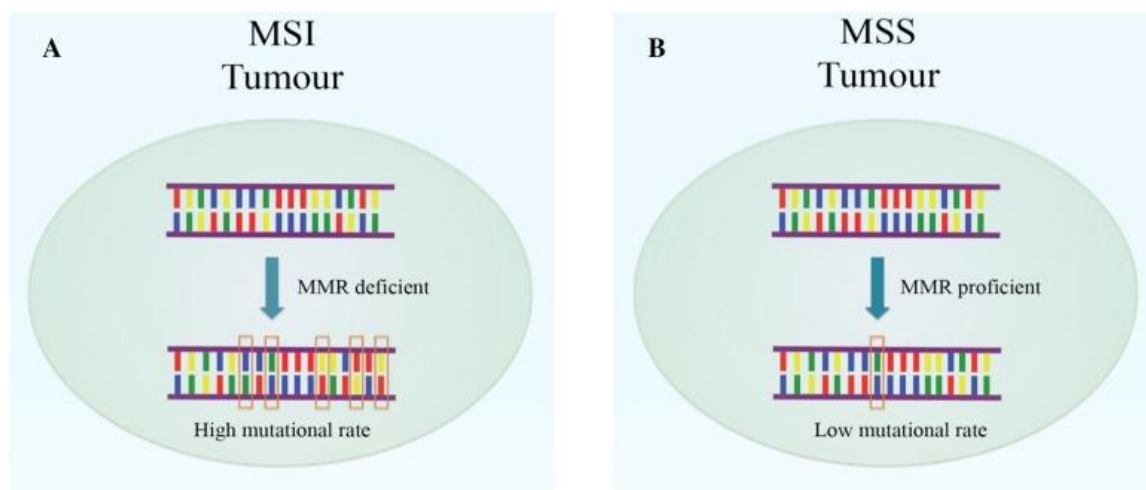
Εικόνα 1.4: Τρόπος δράσης μόλυνσης των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων από τον ιό Epstein-Barr, μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Ο EBV μολύνει τα B-λεμφοκύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μολύνουν τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω άμεσης επαφής. Η μόλυνση από EBV οδηγεί στην έκφραση των *EBNA1*, *EBER*, *LMP2A* και *BART*. Επιπλέον επηρεάζει την έκφραση των *DNMTs* και *miRNAs*. Τέλος,, τα μη φυσιολογικά ενδοκυτταρικά σήματα οδηγούν σε καρκινογένεση και ανάπτυξη όγκου. (Yau, 2014)

Χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας όγκων είναι η υπερμεθυλίωση νησίδων CpG σε υποκινητές γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου όπως γονίδια E-καδερινών (Sakuma, et al., 2004). Επιπλέον εντοπίζονται μεταλλάξεις στην κινάση *PI3K* και συγκεκριμένα στο γονίδιο *PIK3CA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *p110 alpha*, συμμετέχοντας στην καταλυτική υπομονάδα της κινάσης, η οποία εμπλέκεται σε μονοπάτια κυτταρικής ανάπτυξης (Kim et al., 2017). Τέλος μεταλλάξεις συναντώνται και στα γονίδια *PI3KCA* (80% των περιστατικών), *ARID1A* (55%) και *BCOR* (23%), υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *CDKN2A* (45%) που οδηγεί σε έκφραση

του, ενίσχυση του μονοπατιού της κινάσης *JAK2* (25%) και υπερέκφραση των γονιδίων *PDL1* και *PDL2* (Rodriquenz et al., 2020, Liu et al., 2020).

II) Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια – (Microsatellite Instability -MSI)

Ο συγκεκριμένος μοριακός γαστρικός υπότυπος εμφανίζεται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και συχνότερα σε θηλυκά άτομα και υπολογίζεται στο 22% των περιπτώσεων κακοηθειών στο στομάχι (Rodriquenz et al., 2020). Ο συγκεκριμένος υπότυπος οφείλεται στη συσσώρευση μεταλλάξεων στις αλληλουχίες των μικροδορυφόρων, λόγω ανεπάρκειας του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA. Οι μικροδορυφόροι είναι σύντομες και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, τυχαία τοποθετημένες σε όλο το γονιδίωμα (Baretti & Le, 2018). Το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (Mismatch repair-MMR), αποτελείται από τα προϊόντα των γονιδίων *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* και *hPMS2*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την επιτήρηση της σωστής αντιγραφής του DNA. Όταν παρατηρηθεί ανεπάρκεια ή απορρύθμιση του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (Mismatch Repair Deficiency - MMRD), παρατηρούνται προσθήκες ή διαγραφές νουκλεοτιδίων στις περιοχές των μικροδορυφόρων κατά την αντιγραφή του DNA (Εικόνα 1.5). Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) (Yuza et al., 2017). Λόγω της εμφάνισης πολλών μικροδορυφόρων, οδηγούμαστε σε μεγάλο ρυθμό μεταλλάξεων προκαλώντας την ενεργοποίηση ογκογονιδίων (Ratti et.al.,2018). Η ανεπάρκεια του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA, προκαλείται κυρίως από μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά ή από επιγενετικές τροποποιήσεις που προκαλούν σίγηση σε γονίδια του συστήματος *MMR* (Yamamoto & Imai, 2015).



Εικόνα 1.5 :Απεικόνιση μεταλλάξεων σε MSI όγκους (Ratti et.al.,2018)

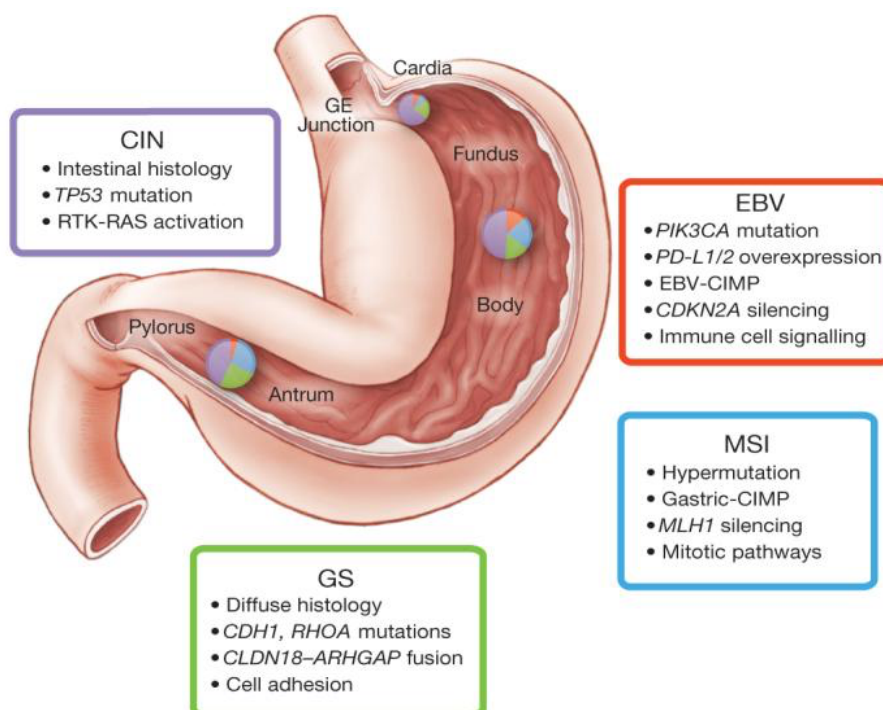
III) Όγκοι με γονιδιωματική σταθερότητα (Genomically Stable tumors – GS)

Με τον όρο γονιδιωματικά σταθερός όγκος αναφερόμαστε σε περιπτώσεις κακοήθειας που δεν παρατηρούνται χρωμοσωμικές αλλαγές (έλλειψη, προσθήκη, μεταθέσεις κτλ). Η αλλαγή στον αριθμό αντιγράφων σε σωματικά κύτταρα (Somatic

Copy Number Alterations-SCNAs), έχει ως αποτέλεσμα να τροποποιεί το πλήθος των αντιγράφων γονιδίων τα οποία συμβάλλουν στην διαδικασία της ογκογένεσης, και είναι ένα φαινόμενο ιδιαίτερα διαδεδομένο στους διάφορους τύπους καρκίνου (Harbers et al., 2021). Ο συγκεκριμένος υπότυπος είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί από γενετικές μεταλλάξεις αφού οι μεταλλάξεις είναι σποραδικές και υπάρχουν σε χαμηλούς αριθμούς. Ωστόσο έχει πολλά κοινά ιστοπαθολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά με τον διάχυτο τύπο (ταξινόμηση κατά Lauren) και για θεωρείται ότι είναι και υποκατηγορία του τελευταίου (Ling et al., 2020).

Η μελέτη TCGA έδειξε ότι το 73% των περιπτώσεων διάχυτου τύπου μπορούν να ταξινομηθούν ως υποτύπος GS, υποδηλώνοντας ότι τα γενετικά χαρακτηριστικά του GS σχετίζονται με τον διάχυτο φαινότυπο (Bass et al., 2014). Κοινό σημείο μεταξύ τους αποτελούν οι μεταλλάξεις στα γονίδια *CDH1*, μόριο κυτταρικής συνάφειας το οποίο αναφέρθηκε και προηγουμένως στον διάχυτο υπότυπο, αλλά και το γονίδιο *RHOA*, το οποίο κωδικοποιεί μικρή GTPάση, για την εναλλαγή του *GDP* με το *GTP* και λειτουργεί στα πλαίσια της σηματοδότησης *RAS* (Ling et al., 2020). Η υπερέκφραση του τελευταίου γονιδίου σχετίζεται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και το φαινόμενο της μετάστασης (Nam et al., 2019).

IV) Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomally Unstable tumors- CIN)
Η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) είναι ο πιο κοινός τύπος γονιδιωματικής αστάθειας που παρατηρείται σε κακοήθειες (Buffart et al., 2011). Ιστολογικά σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren, ανήκουν στον γαστρεντερικό εντερικό υπότυπο (Tsai et al., 2018). Οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια χαρακτηρίζονται από εκτεταμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως προσθήκη ή έλλειψη ολόκληρων χρωμοσωμάτων (ανεupλοειδία) ή/και τμήματος χρωμοσωμάτων (απώλεια ετεροζυγωτίας, ενισχύσεις τμημάτων και μετατοπίσεις) (Martin et al., 2010). Οι γονιδιωματικές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων και άλλων γονιδίων, όπως γονίδια που εμπλέκονται στην διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA και γονίδια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Grabsch et al., 2004). Περίπου το 70% των περιπτώσεων αυτού του τύπου εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53, που ακολουθείται από μεταλλάξεις στα εξής γονίδια *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA* και *APC* (Lee & Kim, 2017). Ο συγκεκριμένος μοριακός υπότυπος αποτελεί τον πιο διαδεδομένο από τους παραπάνω, με συχνότητα εμφάνισης περίπου 50% στο σύνολο των κακοηθειών του στομάχου (Bass et al., 2014).



Εικόνα 1.6 : Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων μοριακών υποτύπων γαστρικού καρκίνου με τα χαρακτηριστικά τους (Bass et al., 2014)

1.2 Μεταγραφικός παράγοντας CDX2

Το γονίδιο του *CDX2* παρουσιάζει ομοιότητα με το ομοιοτικό γονίδιο *Caudal*, που αναγνωρίστηκε στη *Drosophila*, ωστόσο έχουν βρεθεί ομόλογοι μεταγραφικοί παράγοντες σε πλήθος οργανισμών, με καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και συντήρηση του εντερικού επιθηλίου (Houde et al., 2001). Μεταξύ αυτών, τα ομόλογα γονίδια *CDX1*, *CDX2* και *CDX3* έχουν ταυτοποιηθεί σε εμβρυικά στάδια ανάπτυξης των θηλαστικών συμβάλλοντας στην διαμόρφωση του πρόσθιο-οπίσθιου άξονα (Martin et al., 1998).

Φυσιολογικά η πρωτεΐνη *CDX2* (Caudal-related homeobox transcription factor 2) εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η κυτταρική προσκόλληση (Wu et al., 2020). Είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της εντερικής ομοιόστασης και της διατήρησης του φαινοτύπου των εντερικών κυττάρων. Η απορρύθμιση της οδηγεί σε διατάραξη της αρχιτεκτονικής του εντερικού βλεννογόνου οδηγώντας σε αναπτυξιακές διαταραχές και ασθένειες καθώς συσχετίζεται με την εντερική φλεγμονή (Guo et al., 2009).

Στον καρκίνο, το γονίδιο *CDX2* λειτουργεί ογκοκατασταλτικά σε νεοπλασίες παχέος εντέρου, εμφανίζοντας μειωμένη έκφραση. Έκτοπη υπερέκφραση του *CDX2* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου φαίνεται να αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και να μειώνει τον ρυθμό της μετάστασης (Mallo et al., 1998). Πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι τα ετερόζυγα *Cdx2*^{+/-} μεταλλάγματα, αναπτύσσουν εντερικούς πολύποδες, αλλά όχι κακοήθεις όγκους. Ωστόσο, η πλήρης καταστολή του *Cdx2* ενισχύει την ευαισθησία των ποντικών σε χημικά επαγόμενη καρκινογένεση του

παχέος εντέρου ενώ σε μελέτες με συμμετοχή ασθενών τα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης CDX2 έχουν συσχετισθεί με μικρότερο προσδόκιμο ζωής και έντονη μεταστατική δραστηριότητα στο 10%-30% των περιπτώσεων (Bonhomme et al., 2003, Matsuda et al., 2010). Μέσω πειραμάτων έχει αποδειχθεί ότι το CDX2 εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση της β-κατενίνης με τον TCF (T-cell factor) οδηγώντας στην καταστολή της σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Guo et al., 2009).

Αντιθέτως, στην περίπτωση της γαστρικής εντερικής μεταπλασίας το γονίδιο CDX2 έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο. Η γαστρική εντερική μεταπλασία αποτελεί κομβικό σημείο στην διαδικασία της γαστρικής καρκινογένεσης με το CDX2 να είναι κύριος ρυθμιστής του εντερικού φαινοτύπου. Ωστόσο η έκφραση του φαίνεται να παρουσιάζει ιστοειδικότητα, με αποτέλεσμα σε φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς να εκφράζεται στο λεπτό και παχύ έντερο αλλά όχι στο στομάχι και τον οισοφάγο (Chawengsaksophak, 2019). Η έκτοπη υπερέκφραση του σε ιστούς του γαστρικού βλεννογόνου έχει βρεθεί να συσχετίζεται με την εμφάνιση γαστρικής εντερικής μεταπλασίας (Bai et al., 2002, Almeida et al., 2003).

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του γονιδίου CDX2 είναι η αυτορρύθμιση του που μηχανιστικά επιτυγχάνεται μέσω τροποποιήσεων σε επίπεδο ιστονών στον υποκινητή του (Sun et al., 2017). Η ενεργότητα σε πρωτεϊνικό επίπεδο μπορεί να ελεγχθεί από την ύπαρξη ή μη φωσφορυλιωμένου αμινοτελικού άκρου, δρώντας ως στόχος της κινάσης MAPK (Houde et al., 2001). Ταυτόχρονα όμως εμπλέκεται και σε σηματοδοτικά μονοπάτια προάγοντας την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων.

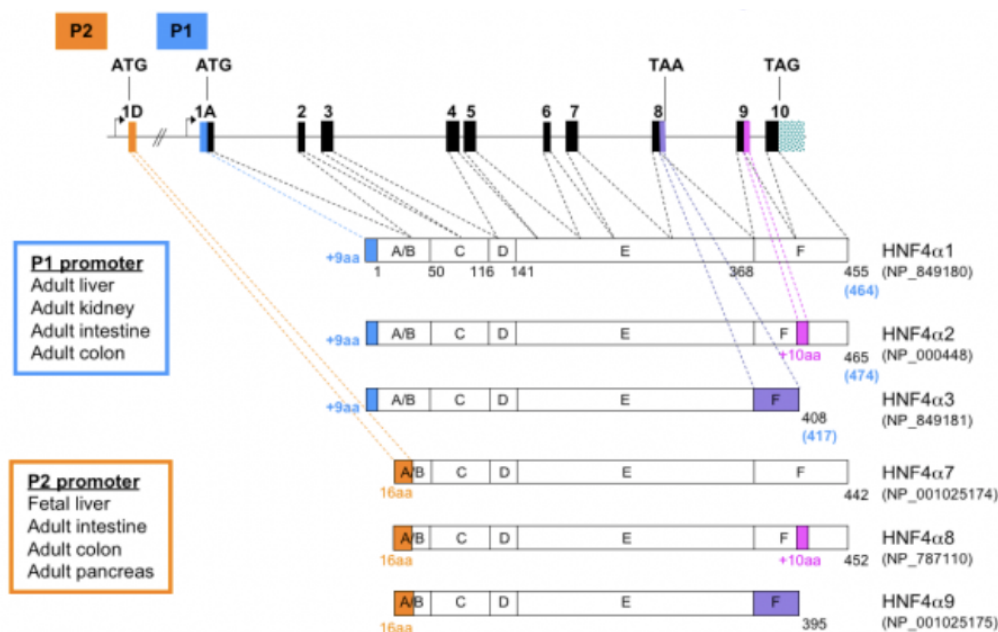
Καθοδικοί στόχοι της πρωτεΐνης CDX2 αποτελούν γονίδια υδρολυτικών και πεπτικών ενζύμων (υδρολάσες μεταφορείς μορίων). Συχνά παρατηρούνται σύμπλοκα του με τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF4α (σε διαφοροποιημένα κύτταρα λάχνων) ή GATA6, προάγοντας την καρκινογένεση του στομάχου (Verzi et al., 2010)

1.3 Μεταγραφικός παράγοντας HNF4α

Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor 4α) ανήκει στην υπεροικογένεια υποδοχέων στεροειδών/θυρεοειδικών ορμονών και σε φυσιολογικούς ιστούς εμπλέκεται στην ανάπτυξη και λειτουργία πλήθους οργάνων όπως το ήπαρ, το πάγκρεας, οι νεφροί και το έντερο (Odom et al., 2004). Όπως και το σύνολο των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας αυτής, ο HNF4α, εμπλέκεται επίσης και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ως απόκριση σε ορμόνες.

Η πρωτεΐνη HNF4α εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ και τους νεφρούς και σε μικρότερο βαθμό στα β-κύτταρα του λεπτού εντέρου, του παχέος εντέρου και του παγκρέατος (Drewes et al., 1996). Κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, η πρωτεΐνη HNF4α εκφράζεται στο σπλαχνικό ενδόδερμα πριν από το στάδιο της γαστρίωσης και στα επιθηλιακά κύτταρα κατά την έναρξη του σχηματισμού ήπατος, παγκρέατος και εντέρου (Duncan et al., 1994).

Παρουσιάζει πλήθος ισομορφών, συγκεκριμένα 9 διαφορετικές ισομορφές, με εξειδικευμένη έκφραση ανάλογα το αναπτυξιακό στάδιο αλλά και τον κυτταρικό τύπο (Εικόνα 1.7). Το πλήθος των ισομορφών του είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού εναλλακτικού ματίσματος που πηγάζει από την παρουσία δύο διαφορετικών υποκινητών P1 και P2 που εντοπίζονται ανοδικά από τον γενετικό του τόπο (Sladek et al., 1990, Bolotin et al., 2010).



Εικόνα 1.7 : Οι ισομορφές του *HNF4α* με την ταυτοποίηση ανά ιστό (Bolotin et al., 2012)

Ο μεταγραφικός παράγοντας *HNF4α* αποτελεί και αυτός παράδειγμα ρυθμιστή των κυτταρικών γενεαλογιών, κατέχοντας ρόλο ογκογονιδίου στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου και αποτελώντας έναν από τους κύριους ρυθμιστές του παράγοντα *CDX2*. (Garraway & Sellers, 2006). Φυσιολογικά δεν εντοπίζεται στο γαστρικό επιθήλιο παρά μόνο σε περιπτώσεις εμφάνισης κακοήθειας.

Ανάμεσα στους δύο αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες φαίνεται να υπάρχει μία σχέση αλληλορύθμισης καθώς, έχει βρεθεί ότι τόσο η πρωτεΐνη *HNF4α* όσο και η πρωτεΐνη *CDX2* προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων τους ενισχύοντας την έκφραση τους στο εντερικό επιθήλιο μέσω του σχηματισμού ενός βρόγχου θετικής ανατροφοδότηση (Boyd et al., 2009, Verzi et al., 2013).

Συνοψίζοντας, οι μεταγραφικοί παράγοντες *CDX2* και *HNF4α* κατέχουν σημαντικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές διεργασίες ανάπτυξης οργάνων και καθορισμού ιστοειδικότητας κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια αλλά εμφανίζουν και κεντρικό ρόλο στην διαδικασία της γαστρικής εντερικής μεταπλασίας εμφανίζοντας έκτοπη έκφραση. Ωστόσο η έκφραση και λειτουργία τους σε φυσιολογικούς ιστούς του ευρύτερου γαστρεντερικού συστήματος, αποτρέπει την άμεση διαγνωστική και

θεραπευτική τους στόχευση, στρέφοντας το ενδιαφέρον στους καθοδικούς τους στόχους με καρκινοειδική έκφραση, όπως αυτών που αφορούν lncRNA μετάγραφα.

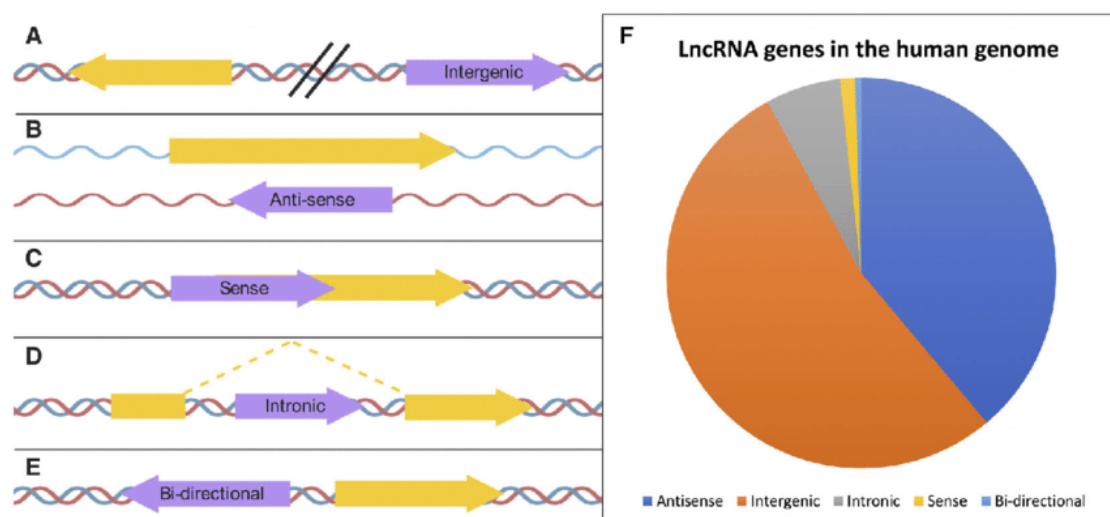
1.4 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA

1.4.1 Γενικά στοιχεία για μακρά μη κωδικοποιητικά RNA

Το ανθρώπινο γονιδίωμα και οι λειτουργίες του αποτελούσαν πάντα αντικείμενο μελέτης με αξιοποίηση των τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Μέσω των προγραμμάτων ENCODE και NONCODE αποκαλύφθηκε ότι το μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος το οποίο ταυτίζεται με περιοχές των κωδικοποιητικών mRNA είναι περίπου 2%, ενώ το ανθρώπινο μεταγράψωμα ταυτίζεται σχεδόν εξολοκλήρου με το γονιδίωμα του (Ferlita et al., 2018). Το 98% του ανθρώπινου γονιδιώματος το οποίο μεταγράφεται αλλά δεν μεταφράζεται, απαρτίζεται από δομικά (rRNAs) αλλά και ρυθμιστικά μη-κωδικοποιητικά μετάγραφα (non-codings RNA, ncRNAs), τα οποία κατέχουν κρίσιμο ρόλο σε πλήθος βιολογικών διεργασιών όπως η γονιδιακή ρύθμιση, η σταθεροποίηση πρωτεϊνών και η υποκυτταρική οργάνωση και σχετίζονται με ασθένειες (Prensner et.al.,2011).

Τα ρυθμιστικά μη-κωδικοποιητικά μετάγραφα διακρίνονται σε 2 υποκατηγορίες με βάση το μήκος των προϊόντων τους (Tsagakis et.al.,2020).

- 200nt μήκος : μικρά μη κωδικοποιητικά RNA . Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα microRNA, piRNA και siRNA
- 200-1000 nt μήκος : μακρά μη κωδικοποιητικά RNA. Η κατηγοριοποίηση τους γίνεται με βάση τη γονιδιωματική τους θέση, τον προσανατολισμό και τη σχετική θέση τους σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Διακρίνονται σε : a) μεσογονιδιακά (intergenic) b) αντινοσηματικά (anti-sense), c) νοσηματικά (sense), d) ιντρονικά (intronic) και e) αμφίδρομα (bi-directional) (Εικόνα 1.8)



Εικόνα 1.8: Κατηγορίες των lncRNA και κατηγοριοποίηση τους σύμφωνα με τη γενωμική περιοχή που βρίσκονται. Διακρίνονται σε : a) διαγονιδιακά (intergenic) b) αντινοσηματικά (anti-sense), c) νοσηματικά (sense), d) ιντρονικά (intronic) και e) αμφίδρομα (bi-directional) (Tsagakis et.al.,2020)

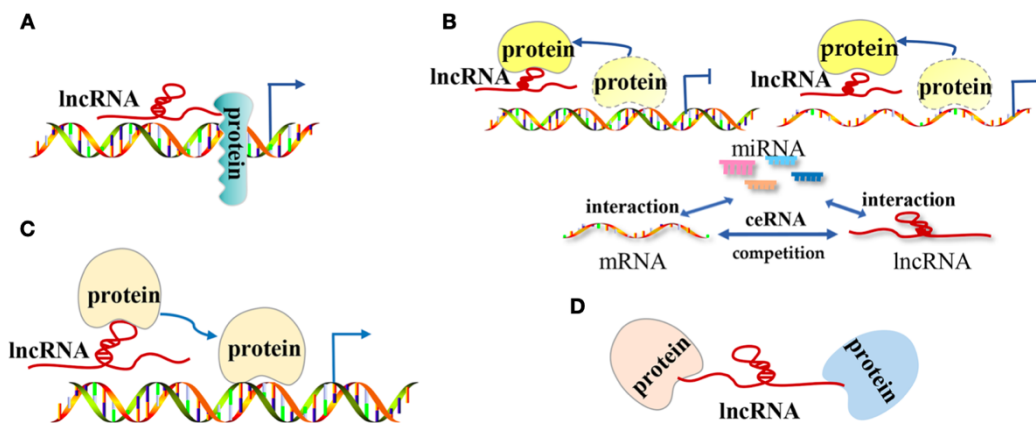
Τα μεσογονιδιακά lncRNA (lincRNAs) είναι εκείνα που δεν επικαλύπτονται με άλλα γονίδια (που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή μη κωδικοποιητικά) και απέχουν >1 kb από τα γειτονικά τους γονίδια (Εικόνα 1.8Α). Πολλά lncRNA ωστόσο επικαλύπτουν άλλα γονίδια και η φορά μεταγραφής τους μπορεί να είναι είτε με τον νοηματικό είτε με αντινοηματικό προσανατολισμό ως προς αυτά. Τα αντινοηματικά lncRNA διαθέτουν αλληλουχία που είναι συμπληρωματική με τα mRNA από γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Εικόνα 1.8Β). Τα νοηματικά lncRNA μοιράζονται μέρος της μεταγραφόμενης αλληλουχίας τους με άλλα γονίδια αφού ταυτίζεται η φορά μεταγραφής τους (Εικόνα 1.8C). Η περίπτωση των lncRNA που μεταγράφονται μέσα από ιντρόνια άλλων γονιδίων αφορά την κατηγορία των ιντρονικών lncRNA (Εικόνα 1.8D). Η τελευταία ομάδα είναι τα lncRNA, τα οποία μεταγράφονται από την ίδια περιοχή στο γονιδίωμα με ένα άλλο γονίδιο, αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση και ονομάζονται αμφίδρομα lncRNA (Εικόνα 1.8Ε). Από τις παραπάνω υποκατηγορίες τα μεσογονιδιακά και τα αντινοηματικά lncRNA είναι οι πιο συχνοί τύποι που συναντάμε στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Εικόνα 1.8F) (Tsagakis et al., 2020).

Ως προς την δράση και τη βιολογική τους λειτουργία τα lncRNAs στηρίζονται στην δευτεροταγή και τριτοταγή δομή τους με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα συντήρησης της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (Wu et al., 2016, Zhang et al., 2019). Τα περισσότερα χαρακτηρισμένα lncRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και ως εκ τούτου έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα mRNA, ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης τους είναι πιο χαμηλά σε σχέση με τα mRNA (Wierzbicki et al., 2008).

1.4.2 Μηχανισμοί δράσης των lncRNAs στον καρκίνο

Τα lncRNA συχνά φαίνεται να εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις και πολυπαραγοντικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος. Οι μηχανισμοί δράσης τους στον καρκίνο συνοψίζονται σε 4 κατηγορίες: σηματοδοτικά μόρια (signal molecules), σήματα οδηγού (guide molecules), μόρια «σκαλωσιάς» (scaffold molecules), μόρια παρεμποδιστές (decoy molecules) (Εικόνα 1.9) (Gao et al., 2020).

Ως μόρια σηματοδότες στον καρκίνο, τα lncRNAs συχνά θεωρούνται ότι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία βρίσκονται καθοδικά και υπό τον έλεγχο τους. Τα lncRNA δρουν είτε μόνα τους ή είτε σχηματίζοντας σύμπλοκα με άλλα πρωτεϊνικά μόρια, όπως παράγοντες μεταγραφής για τη ρύθμιση των γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί το lncRNA-p21 που επάγεται από το p53 και αλληλεπιδρά με την πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη-K για να αναστείλει την έκφραση των γονιδίων καθοδικά του μονοπατιού του p53 (Huarte et al., 2010). Συχνά τα lncRNA διευκολύνουν την αλληλεπίδραση μορίων και πρωτεϊνών, λειτουργώντας και ως «μόρια σκαλωσιάς». Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει τη συναρμολόγηση διαφορετικών τύπων μακρομοριακών συμπλεγμάτων, ενισχύοντας έτσι την σηματοδότηση και διασύνδεση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Wu et al., 2016).



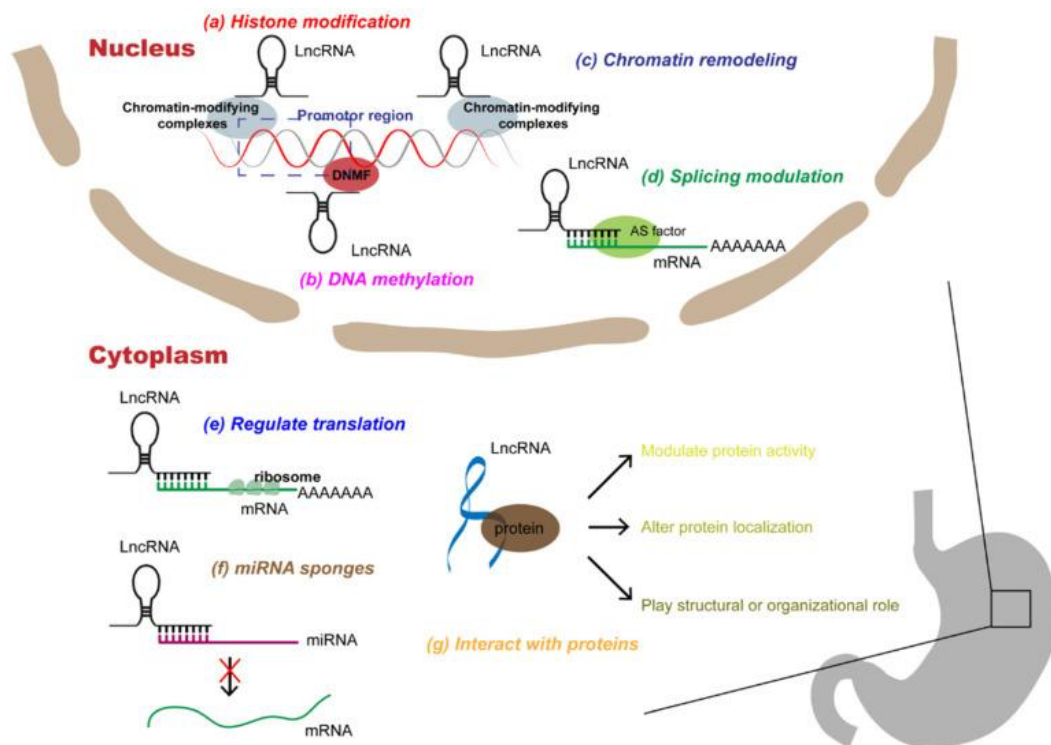
Εικόνα 1.9:Μηχανισμοί δράσεις των lncRNA στον καρκίνο, Α)ως μόρια σηματοδότες ,συνδυαστικά με την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες (πχ μεταγραφικοί παράγοντες) , μπορούν να ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων, Β) ως μόρια παρεμποδιστές, δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων ή δεσμεύονται άμεσα σε mRNA ή miRNA , εμποδίζοντας την ανασταλτική δράση των miRNA, C)ως σήματα οδηγοί , όπου δεσμεύονται σε πρωτεΐνες και τις κατευθύνουν σε συγκεκριμένα σημεία του γονιδιώματος, D)ως μόρια «σκαλωσιάς», επιτρέποντας την αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών και τη δημιουργία συμπλόκου (Gao et al., 2020)

Ωστόσο η θέση του γενετικού τόπου των lncRNA επηρεάζει και το τρόπο δράσης τους στην ρύθμιση γονιδίων στόχων, καθώς μπορούν να δρουν τόσο ως *cis-acting* δραστικών στοιχείων ρυθμίζοντας την έκφραση γειτονικών γονιδίων όσο και ως *trans-acting* στοιχεία μέσω της ρύθμιση «απομακρυσμένων» ως προς τον γενετικό τους τόπο κωδικοποιητικών mRNA (Hung et al., 2011, Wang et al., 2015). Παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι το lncRNA *HOTAIR* το οποίο αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο *PRC2* και προκαλεί τροποποιήσεις μεθυλίωσης ιστονών σε πολλά γονίδια στόχους, οδηγώντας σε σίγηση μέσω επιγενετικής τροποποίησης (Gurta et al., 2010).

Τα lncRNAs έχουν σημαντικό ρόλο και στην διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος, καθώς συνδέονται σε πρωτεϊνικά μόρια και εμποδίζουν τη φυσιολογική λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης. Για παράδειγμα, το lncRNA *MALAT1*, το οποίο επιδρά σε απαραίτητους παράγοντες για την διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος στους ευκαρυώτες (Serine/arginine splicing factors), και εμποδίζει τη δράση του συμπλόκου (Tripathi et al., 2010). Πολύ σημαντική είναι και η ιδιότητα τους να πακετάρονται σε εκκριτικά κυστίδια (εξωσώματα) και να περνούν στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό τους δίνει το πλεονέκτημα να μεταφέρονται και να δρουν διασυστηματικά. Επιπλέον εμπλέκονται σε πολλές επιγενετικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης ιστονών, της μεθυλίωσης του DNA, της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τα οποία οδηγούν σε έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που καθορίζουν στην εξέλιξη του καρκίνου και σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, την διαδικασία της απόπτωσης, την αυτοφαγία και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Li et al., 2016).

Στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου τα lncRNAs παίζουν ρόλο στη διαδικασία της ρύθμισης έκφρασης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών, στην αθανатоποίηση των καρκινικών κυττάρων μέσω τροποποίησης των αποπτωτικών μηχανισμών, την

διαδικασία της αγγειογένεσης του όγκου αλλά και την μεταστατική του ιδιότητα (Εικόνα 1.10) (Gao et al., 2020).



Εικόνα 1.10: Η δράση των lncRNA στο γαστρικό καρκίνο. Στον πυρήνα, τα lncRNAs προσελκύουν τροποποιητές χρωματίνης, και οδηγούν σε (α) τροποποίηση ιστόνης, (b) μεθυλίωση DNA, (c) αναδιαμόρφωση χρωματίνης. Επιπλέον, τα lncRNA μπορούν να συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως (d) το εναλλακτικό ματίσμα. Στο κυτταρόπλασμα, τα lncRNAs αλληλεπιδρούν με τα mRNA και (e) ρυθμίζουν τη διαδικασία της μετάφρασης, αλλά λειτουργούν και ως (f) “δολώματα” για τα miRNAs (“miRNA sponges”) προσδένοντας σε αυτά και εμποδίζοντας τα από το να δράσουν. Επιπλέον, τα lncRNAs μπορούν άμεσα (g) να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες, επηρεάζοντας την πρωτεϊνική δραστηριότητα (Tan et.al.,2020).

1.4.3 lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες και θεραπευτικοί στόχοι

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στην αντιμετώπιση του γαστρικού καρκίνου είναι η καθυστερημένη διάγνωση της νόσου λόγω ανεπάρκειας των διαγνωστικών μεθόδων. Τα lncRNA αποτελούν την ιδανική μορφή μοριακών βιοδεικτών καθώς εκφράζονται με καρκινοειδικό τρόπο και συχνά εντοπίζονται στα σωματικά υγρά ασθενών όπως αίμα και ούρα, επιτρέποντας την μη επεμβατική διάγνωση (Pardini et al., 2019). Έτσι θα μπορούσαν να στελεχώσουν μια μοριακή εργαλειοθήκη ανίχνευσης και έγκαιρης διάγνωσης κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου. Επιπλέον πέρα από την αρχική διάγνωση θα μπορούσαν να συμμετέχουν και ως προγνωστικοί βιοδείκτες καθώς μπορούν να αξιοποιηθούν για την εκτίμηση του μεταστατικού κινδύνου όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η έκφραση των lncRNA παρουσιάζει απορρύθμιση σε παθολογικές καταστάσεις και περιπτώσεις καρκίνου εμφανίζοντας ιστοειδικότητα και διαφορετικά πρότυπα ανάλογα τον τύπο της νεοπλασίας. Πέρα

όμως από διαγνωστικοί στόχοι, τα lncRNA μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους με χρήση συνθετικών μορίων, όπως miRNA, που μέσω της συμπληρωματικότητας ως προς την αλληλουχία θα καταστείλουν την έκφραση τους στα πλαίσια θεραπευτικών RNAi προσεγγίσεων (Spizzo et al., 2012).

2. Σκοπός εργασίας

Ο καρκίνος του στομάχου χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη διάγνωση λόγω της πολυπλοκότητας της νόσου. Για αυτό τον λόγο είναι αναγκαία η έρευνα και ανάπτυξη νέων εξειδικευμένων βιοδεικτών που θα αποτελούν μια νέα διαγνωστική προσέγγιση και θα βοηθήσουν στην δημιουργία νέων θεραπευτικών στόχων. Σε μοριακό επίπεδο, οι μεταγραφικοί παράγοντες *CDX2* και *HNF4α* εξασφαλίζουν την ομοιοότητα του εντερικού συστήματος, διατηρούν συγκεκριμένες γενεαλογίες κυττάρων. Η απορρύθμιση τους οδηγεί σε ανάπτυξη χαρακτηριστικών εντερικής μεταπλασίας προωθώντας την γαστρική ογκογένεση. Παράλληλα η δράση τους έχει άμεσο ή έμμεσο αντίκτυπο και στα επίπεδα έκφρασης των lncRNA, τα οποία λόγω της ιστοειδικότητας και καρκινοειδικότητας τους μπορούν να αποτελέσουν άμεσους βιοδείκτες της γαστρικής νεοπλασίας.

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής ήταν η μελέτη της ρύθμισης lncRNA στόχων από τους μεταγραφικούς παράγοντες *CDX2* και *HNF4α*. Στα πλαίσια εκπόνησης της, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για την διερεύνηση της πρόσδεσης των δύο μεταγραφικών παραγόντων σε ρυθμιστική αλληλουχία ενός lncRNA στόχου, που ονομάστηκε **HEAL** (*Hnf4α* Regulated Lncrna) και που έχει προκύψει από προηγούμενη βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων λειτουργικής γονιδιωματικής στο εργαστήριο. Επίσης κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς με στόχο την καταστολή της έκφρασης των δύο μεταγραφικών παραγόντων μέσω γενετικής τροποποίησης σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια ακολούθησε παρατήρηση των μεταγραφικών επιπέδων του HEAL σε πειράματα υπερέκφρασης και σίγησης των υπό διερεύνηση μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να μελετηθεί η απόκριση του στα επίπεδα τους.

Τέλος έγινε προσπάθεια δημιουργίας ενός μοριακού εργαλείου *CRISPR* για την αποσιώπηση γονιδίων στόχων μέσω επαγωγής στοχευμένων επιγενετικών τροποποιήσεων. Αυτό το μοριακό εργαλείο μελλοντικά θα αποτελέσει μέσο διερεύνησης των επιπτώσεων της απορρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων, στα επίπεδα έκφρασης των lncRNA.

3.Υλικά και Μέθοδοι

3.1.Απομόνωση RNA

Προκειμένου να γίνει η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων αλλά και των lncRNA, είτε σε περιπτώσεις σίγησης είτε σε περιπτώσεις υπερέκφρασης τους, το πρώτο βήμα ήταν η απομόνωση του RNA από τα δείγματα των κυτταρικών σειρών, με το εξής πρωτόκολλο:

- Λήψη των δειγμάτων και τοποθέτηση σε σωλήνα τύπου errendorf (1,5ml Errendorf) και άμεση προσθήκη 1000μL τριζόλης (TRI), με επώαση για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά στον πάγο.
- Προσθήκη 200μl χλωροφόρμιο, έντονο vortex για 30'' και φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, στους 4°C/ 14000 rpm, για 5 λεπτά, για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων (υδατική και οργανική φάση) του δείγματος, με το RNA να βρίσκεται στο υπερκείμενο-υδατική φάση.
- Λήψη του υπερκειμένου, και μεταφορά του σε δεύτερο σωλήνα τύπου errendorf με την προσθήκη ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης 100% για πλύση
- Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση, 4°C /14000 rpm για 15 λεπτά
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη παγωμένης αιθανόλης 70%, vortex για 30'',
- Φυγοκέντρηση 4°C /14000 rpm για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση της αιθανόλης, και επώαση των δειγμάτων εκτός πάγου για περίπου 15 λεπτά ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης και το ίζημα που δημιουργήθηκε να γίνει διαφανές.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με τη προσθήκη 50 μL RNase free H₂O και θέρμανση του δείγματος στους 65°C για 5 λεπτά, έντονο vortex και spin down.
- Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

3.2.Κατεργασία με DNase

Μετά την απομόνωση του RNA ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος με ενζυμική αντίδραση δεοξυριβονουκλεάσης, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA από το δείγμα. Το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση κατακερμάτισε το DNA, αφήνοντας ανέπαφο το RNA στο εκάστοτε δείγμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 1 ώρα. Για τη σύσταση της αντίδρασης ακολουθήθηκαν τα βήματα σύμφωνα με τις οδηγίες του εκάστοτε κατασκευαστή (DNase I, RNase-free, 1U/μL, catalog number: EN0521, Thermo Scientific). Η σύσταση της αντίδρασης για κάθε δείγμα παρατίθεται στον πίνακα 3.1.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες Αντιδραστηρίων
Buffer 10x	3 μ L
DNase enzyme	1 μ L
RNAse out	0,5 μ L
Sample	25 μ L
ddH ₂ O	0,5 μ L

Πίνακας 3.1. Σύσταση αντίδρασης DNάσης (DNase treatment) ανά δείγμα.

Στο στάδιο αυτό έγινε προσθήκη του αντιδραστηρίου RNAse-out καθώς καταστέλλει την δράση των ριβονουκλεασών, ενζύμων τα οποία κατακερματίζουν το RNA και θα κατέστρεφαν το δείγμα (RNAse out / Ribonuclease Inhibitor ,40 U/ μ l, αριθμός καταλόγου: 10777019,Thermo Scientific/Invitrogen).

Μετά από επώαση 1 ώρας στο υδατόλουτο, σε κάθε ένα δείγμα έγινε προσθήκη 40 μ l Sodium Acetate, 3M, pH 5,6 και 330 μ L ddH₂O (RNAse free H₂O). Ακολούθησε προσθήκη 400 μ L φαινόλης/χλωροφορμίου, έντονο vortex και τέλος φυγοκέντρηση 4°C/14.000rpm για 5 λεπτά. Συλλογή του υπερκείμενου (υδατική φάση) του δείγματος και μεταφορά του σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 500 μ L παγωμένη αιθανόλη 70% και τέλος έγινε φυγοκέντρηση στους 4oC/14.000rpm για 5 λεπτά.

Μετά την φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και στα δείγματα προστέθηκε 1 ml παγωμένης αιθανόλης 100%, πραγματοποιώντας παράλληλα ήπια ανάδευση. Τα δείγματα με την αιθανόλη επώαστηκαν για τουλάχιστον μία ώρα σε θερμοκρασία -80°C.

Αμέσως μετά ακολούθησε η διαδικασία της καταβύθισης του RNA για την συλλογή του δείγματος. Κατά τη διαδικασία της καταβύθισης και μετά την επώαση στους -80°C., πραγματοποιήθηκαν κατά σειρά :

- Φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο με συνθήκες 4°C/14000 rpm για 30 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Προσθήκη 500 μ L παγωμένης αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντρηση 4oC/14.000rpm για 5 λεπτά
- Αφαίρεση όλου του υπερκείμενου και τα δείγματα παρέμειναν εκτός πάγου με ανοικτά καπάκια ώστε να εξατμιστούν οι σταγόνες αιθανόλης και να γίνει διαφανές το ίζημα
- Τέλος επαναδιάλυση του ιζήματος με ddH₂O, ακολουθούμενη από θέρμανση στους 65oC για 5 λεπτά και vortex/spin down. Η αποθήκευση των δειγμάτων έγινε στους -80°C.

3.3.Σύνθεση cDNA

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μέτρηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων, ώστε να υπολογιστούν οι απαραίτητες ποσότητες από τα δείγματα για να έχουν συγκέντρωση 1 μ g ποσότητας RNA σε τελικό όγκο 10 μ L, πραγματοποιήθηκαν επίσης αραιώσεις όπου κρίθηκε απαραίτητο. Η διαδικασία της αντίθετης μεταγραφής έγινε με το

ένζυμο MMLV (M-MLV,Reverse Transcriptase , 200U/μl, αριθμός καταλόγου:28025013, Thermo Scientific/Invitrogen). Συγκεκριμένα σε κάθε ένα δείγμα χωριστά προστέθηκε:

Μείγμα 1	Ποσότητες Αντιδραστηρίων
Sample	10 μL
Primer (oligo dTs ή random hexamer ή gene specific)	1 μL
dNTPs	1 μL

Πίνακας 3.2. Σύσταση μείγμα 1 αντίδρασης cDNA synthesis ανά δείγμα.

Το μείγμα 1 τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο στους 65°C για 5 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών που αποκτά το RNA και να γίνει ο υβριδισμός του εκκινητή στο μόριο RNA στην συμπληρωματική αλληλουχία.

Αμέσως μετά προστέθηκε σε κάθε δείγμα το μείγμα 2 και τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο για 2 ώρες στους 37°C. Στον πίνακα 3.3 αναγράφεται η σύσταση του μείγματος 2, έχοντας ως τελικό όγκο αντίδρασης, μετά την προσθήκη δείγματος και μειγμάτων 1 και 2, τα 20 μL.

Μείγμα 2	Ποσότητες αντιδραστηρίων
5x MMLV buffer	4 μL
100mM DTT	2 μL
RNase-out	0,5 μL
MMLV enzyme	1 μL

Πίνακας 3.3. Σύσταση μείγματος 2 της αντίδρασης για σύνθεση του DNA ,ανά δείγμα.

Το DTT είναι χηλικός παράγοντας, που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και χαλαρώνει τη δευτερογενή δομή του RNA βοηθώντας στην έναρξη της μεταγραφής έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του cDNA.

Με το τέλος της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής, στο δείγμα προστέθηκαν 380μl RNase free H₂O, ώστε να γίνει αρραίωση των αλάτων της αντίδρασης που προηγήθηκε, καθώς η υψηλή τους συγκέντρωση θα μπορούσε να λειτουργήσει ως αναστολέας των επόμενων αντιδράσεων.

3.4.Ποσοτική PCR

Για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων και των μακρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (lncRNA) χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική PCR (Quantitative PCR). Χρησιμοποιήθηκε επίσης η φθορίζουσα χρωστική SYBRgreen μαζί με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (SYBR™ Green PCR Master Mix, αριθμός καταλόγου : 4309155, Thermo Scientific ή KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit ,αριθμός καταλόγου:KR0389_S – v2.17).

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων από την έκφραση των γονιδίων στόχων, χρησιμοποιήθηκαν γονίδια ιδιοσύστατης έκφρασης όπως το *GAPDH*, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, που καταλύει την μετατροπή της 3 φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 διφωσφογλυκερικό, στο 3^ο στάδιο της γλυκόλυσης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα CFX manager (Biorad) και τα συστατικά της αντίδρασης παρατίθενται στον πίνακα 3.4.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες Αντιδραστηρίων
SYBRgreen Buffer Mix (2x)	10 μ L
Forward primer	1 μ L
Reverse primer	1 μ L
cDNA template	4 μ L
ddH ₂ O	16 μ L

Πίνακας 3.4. Σύσταση της αντίδρασης ποσοτικής PCR ανά δείγμα.

3.5 Απομόνωση πρωτεϊνών και ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο Bradford

Απομόνωση και κατεργασία πρωτεϊνών

1ml κυτταροκαλλιέργειας, υπέστη τη διαδικασία της φυγοκέντρησης σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 40C/3.000 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 20 μ L RIPA (10 mM Tris-Cl /pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 140 mM NaCl). Ακολούθησε ανάδευση για την ομογενοποίηση του δείγματος.

Η διαδικασία μέτρησης της συγκέντρωσης του δείγματος έγινε προσθέτοντας 1mL αντιδραστηρίου Bradford και 100 μ L ddH₂O σε 1 μ L δείγματος, το οποίο είχε διαλυθεί σε RIPA. Έγινε έντονη ανάδευση του συνόλου του δείγματος και φωτομέτρηση, σε φασματοφωτόμετρο με μήκος απορρόφησης λ =595nm με τη χρήση κατάλληλων κυψελίδων. Μετά την μέτρηση ακολούθησε σχετική κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων με περαιτέρω αραιώση τους με προσθήκη RIPA ώστε όλα τα δείγματα να έχουν περίπου τις ίδιες τιμές συγκεντρώσεων. Τέλος, προστέθηκε SDS Loading Buffer 2x, σε αναλογία 1:1 με το RIPA που είχε ήδη προστεθεί και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20o C για μελλοντική χρήση σε Western Blot.

2X SDS Loading Dye	
1M Tris pH=6.8	2mL
50% Glycerol	4,6mL
10% SDS	1,6mL
0,5% Bromophenol Blue	0,4mL
b-mercaptoethanol	0,4mL
ddH ₂ O	1mL

Πίνακας 3.5. Σύσταση του διαλύματος 2X SDS Loading

Ταυτόχρονα με τη διαδικασία ποσοτικοποίησης με την μέθοδο Bradford, χρησιμοποιήθηκε και 2^{ος} τρόπος μέτρησης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Quawell Q5000 UV-Vis Spectrophotometer. Το

μηχάνημα έχει ειδικό πρόγραμμα για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της πρωτεΐνης σε ένα δείγμα, με αυτόματη ρύθμιση του μήκους κύματος στα 280nm. Το μηχάνημα μετρά δείγματα με εύρος συγκεντρώσεων 0.05 – 100 mg/ml με εύρος απόκλισης : ± 0.10 mg/ml για δείγματα 0.10-10 mg/ml και $\pm 2\%$ για δείγματα >10mg/ml.

3.6 SDS-page ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και Western Blot- Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για την ανίχνευση μίας πρωτεΐνης μέσα σε ένα δείγμα το οποίο περιείχε μείγμα πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η ανοσοαποτύπωση Western. Ως τεχνική βασίζεται στην ειδικότητα αντισώματος - αντιγόνου και στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος.

Το πρώτο βήμα ήταν η συναρμολόγηση της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης και η δημιουργία του πηκτώματος SDS-πολυακρυλαμίδιου. Το συνολικό πήκτωμα αποτελείται από δυο διαφορετικής σύστασης πηκτώματα, το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα επιστοιβαξης.

Αρχικά παρασκευάστηκε σε ένα πλαστικό σωλήνα, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel). Η πυκνότητα του πηκτώματος διαχωρισμού καθορίζεται από την προς ανάλυση πρωτεΐνη. Πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους ηλεκτροφορούνται σε πιο πυκνά πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδιου, καθώς διαπερνούν τους πόρους πιο εύκολα, ενώ μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται σε πιο αραιά πηκτώματα καθώς δεν διαπερνούν τόσο εύκολα τους πόρους που δημιουργεί το πολυακρυλαμίδιο. Για πρωτεΐνες μοριακού βάρους έως 100kDa χρησιμοποιούνται πηκτώματα με συγκέντρωση 10%, ενώ για πρωτεΐνες έως 200kDa, η συγκέντρωση είναι 8%. Ο τελικός όγκος του διαλύματος, 10mL τοποθετήθηκε στο σύστημα των κάθετων πλακών μέχρι ένα προκαθορισμένο σημείο στην επιφάνεια της συσκευής. Αμέσως μετά επάνω από το πήκτωμα τοποθετήθηκε 1mL ισοπροπανόλη ώστε να ευθυγραμμιστεί η στάθμη του πηκτώματος και να αφαιρεθούν τυχόν φουσκάλες που δημιουργήθηκαν κατά την τοποθέσία του διαλύματος στις κάθετες πλάκες. Το πήκτωμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για 20-30 λεπτά.

Seperating Gel 10%

Συστατικά	Ποσότητες
dH ₂ O	4,8 mL
40% acrylamide/Bis	2,5 mL
1.5M Tris pH=8.8	2,5 mL
SDS 10%	100 μ L
APS 10%	100 μ L
TEMED	4 μ L
Τελικός όγκος	10 mL

Πίνακας 3.6. Σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού με συγκέντρωση 10%.

Seperating Gel 8%

Συστατικά	Ποσότητες
dH ₂ O	5,3 mL
40% acrylamide/Bis	2 mL
1.5M Tris pH=8.8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
APS 10%	100 µL
TEMED	4 µL
Τελικός όγκος	10 mL

Πίνακας 3.7. Σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού με συγκέντρωση 8%.

Αμέσως μετά, αφαιρέθηκε η ισοπροπανόλη και ξεκίνησε η παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάξης. Το πήκτωμα επιστοιβάξης είχε χαμηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% και ο συνολικός του όγκος ήταν 4 mL. Προστέθηκε στο ήδη πολυμερισμένο πήκτωμα διαχωρισμού και αφέθηκε να πολυμεριστεί για 20-30 λεπτά.

Stacking Gel 8%

Συστατικά	Ποσότητες
dH ₂ O	2,96 mL
40% acrylamide/Bis	480 µL
1.5M Tris pH=8.8	500 µL
SDS 10%	40 µL
APS 10%	40 µL
TEMED	4 µL
Τελικός όγκος	4 mL

Πίνακας 3.8. Σύσταση του πηκτώματος επιστοιβάξης με συγκέντρωση 5%.

Μετά τον πολυμερισμό του συνόλου του πηκτώματος, το σύστημα των καθέτων πλακών τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιείχε το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Η σύσταση του διαλύματος η εξής: 890mL ddH₂O, 100mL Running Buffer (10x-SDS), 10mL SDS 10% (Πίνακας 3.9).

Running Buffer 1x

ddH ₂ O	890 mL
Running Buffer 10x	100 mL
SDS 10%	10 mL

Πίνακας 3.9. Σύσταση του διαλύματος Running Buffer 1x.

Running Buffer 10x (-SDS)

Συστατικά	Ποσότητες
Tris-base	30gr
Glycine	144 gr
ddH ₂ O	Μέχρι 1 L

Πίνακας 3.10. Σύσταση του διαλύματος Running Buffer 10x χωρίς SDS.

Αμέσως μετά ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων ώστε να τοποθετηθούν στο πήκτωμα και να ξεκινήσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ξεπαγώσουν και έπειτα θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 100°C, ώστε να αποδιαταχθούν δευτεροταγή τους δομή οι πρωτεΐνες του δείγματος.. Σημαντικό βήμα για την ταυτοποίηση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών ήταν η χρήση ενός μάρτυρα μοριακού βάρους (χρήση 4μL από BenchMark™ Protein Ladder, αριθμός καταλόγου: 10747012, Thermo Scientific/Invitrogen), ο οποίος κατέστη ευδιάκριτος κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης λόγω του χρώματος του.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται πάντα σε δύο στάδια με διαφορετικές συνθήκες. Έτσι και κατά το πρώτο στάδιο αυτής της διαδικασίας τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα 70mV έως ότου διατρέξαν όλο το πήκτωμα επιστοίβαξης, και περάσαν στο πήκτωμα διαχωρισμού. Μόλις τα δείγματα έφτασαν στο πήκτωμα διαχωρισμού τότε η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 110mV έως το τέλος της διαδικασίας. Ο χρόνος ηλεκτροφόρησης ποικίλει ανάλογα τις συνθήκες αλλά και τα προς εξέταση δείγματα. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, η χρωστική των δειγμάτων θα πρέπει να έχει φτάσει στο τέλος του πηκτώματος όπως ακολούθηθηκε και στο συγκεκριμένο πείραμα. Σε αυτό το στάδιο ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς των δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Το πρώτο βήμα της ηλεκτρομεταφοράς ήταν η παρασκευή του διαλύματος το οποίο ονομάζεται Transfer Buffer, με σύσταση που αναγράφεται στον πίνακα 3.11

Transfer Buffer

Συστατικά	Ποσότητες
Running Buffer (-SDS)	100mL
Methanol	100mL
ddH ₂ O	700mL

Πίνακας 3.11. Σύσταση του διαλύματος Transfer Buffer.

Χρησιμοποιήθηκαν διηθητικά χαρτιά Whatman, τα οποία αρχικά εμποτίστηκαν και τοποθετήθηκαν εκατέρωθεν του πηκτώματος και της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, ώστε να προστατέψουν από πιέσεις το πήκτωμα και την μεμβράνη. Η σειρά με την οποία τοποθετήθηκαν ήταν, διηθητικό χαρτί Whatman, πήκτωμα, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ξανά διηθητικό χαρτί Whatman, με κατεύθυνση τέτοια ώστε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης να είναι πιο κοντά στον θετικό πόλο και το πήκτωμα στον αρνητικό, για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη

νιτροκυτταρίνης. Συνολικά η ηλεκτρομεταφορά διήρκησε 90 λεπτά και έγινε στα 110mV. Καθόλη τη διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς το σύστημα διατηρήθηκε παγωμένο με τη χρήση παγοκυστών και το σύνολό του ήτα τοποθετημένο σε ψυχόμενο χώρο. Με το πέρας της διαδικασίας έγινε έλεγχος της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς των πρωτεϊνών, με την εμφάνιση του θετικού μάρτυρα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ο οποίος όπως αναφέρθηκε περιλαμβάνει χρωστική για εύκολη ταυτοποίηση.

Το επόμενο βήμα στη διαδικασία ήταν η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στη μεμβράνη για να αποφευχθεί η σύνδεση του αντισώματος σε μη ειδική θέση. Αυτό έγινε με επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα TBST 5%, το οποίο αποτελείτο από: 100mL TBS 20x, Tween_20 σε τελική συγκέντρωση 0,1%, 5 gr αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης. Προστέθηκαν 10mL TBST 5%, σε κάθε μεμβράνη και έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση ρότορα που παρείχε συνεχή κίνηση ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται συνεχώς σε επαφή με το διάλυμα. Ακολούθησε η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο ήταν ήδη διαλυμένο σε TBST 5% και σε αραιώση 1:1000. Συνολικά προστέθηκαν 10mL από το πρωτογενές αντίσωμα σε κάθε μεμβράνη και έγινε επώαση όλο το βράδυ σε θερμοκρασία στους 4°C. Την επόμενη ημέρα ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις με TBST και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση με την προσθήκη 10mL δευτερογενούς αντισώματος. Το τελευταίο βήμα ήταν οι 4 διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με TBST, πριν τη διαδικασία της εμφάνισης.

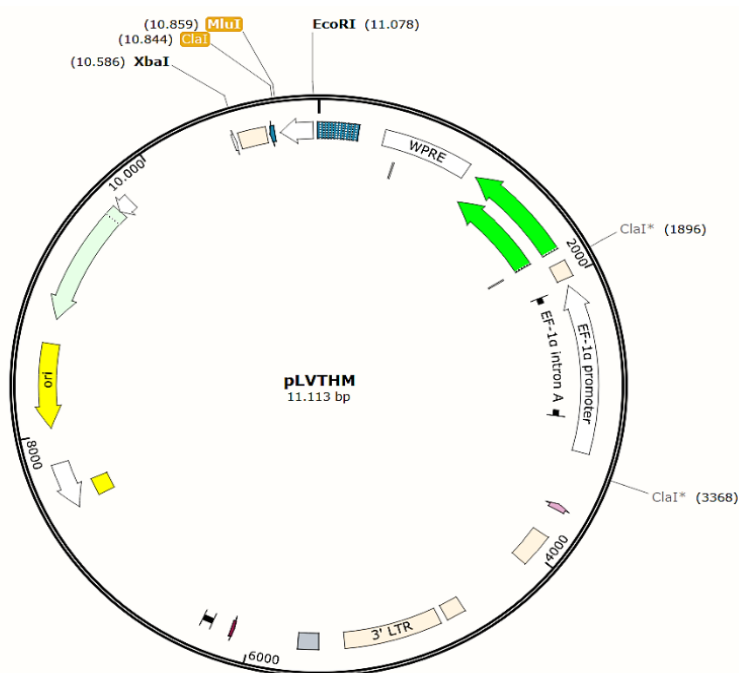
Το τελικό βήμα για την εμφάνιση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αποτέλεσε η εμφάνιση του φιλμ σε σκοτεινό δωμάτιο. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δωμάτιο το οποίο βρίσκεται σε απόλυτο σκοτάδι για την προστασία των φιλμ. Αρχικά η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε πλαστική καθαρή επιφάνεια και καλύφθηκε από υπόστρωμα χημειοφωταύγειας ECL (Amersham ECL Detection Reagent, αριθμός καταλόγου: RPN3004), το οποίο αποτελούνταν από δυο διαφορετικά συστατικά και το μείγμα παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αμέσως μετά έγινε η εμφάνιση με την εμφάνιση της μεμβράνης σε υγρό ανάπτυξης (Developer), υγρό μονιμοποίησης (Fixer) και τέλος νερό για έκπλυση.

Σε ορισμένες από τις πειραματικές δοκιμασίες της Western blot που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή AMERSHAM ImageQuant 800 αντί της κλασσικής μεθόδου εμφάνισης με την χρήση των χημικών αντιδραστηρίων, ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα μη αποτελεσματικής εμφάνισης των αποτελεσμάτων λόγω μη αποτελεσματικότητας των αντιδραστηρίων εμφάνισης.

3.7 Κλωνοποίηση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM

Για την κλωνοποίηση ενθεμάτων χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pLVTHM (εικόνα 3.1). Αρχικά σχεδιάστηκαν αλληλουχίες siRNA για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2, HNF4α, και KLF5. Στη συνέχεια οι αλληλουχίες αυτές μετατράπηκαν σε shRNA ώστε να ενσωματωθούν στον φορέα. Ο φορέας pLVTHM (Εικόνα 3.1) χρησιμοποιήθηκε για την καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων, με

τελικό στόχο τη δημιουργία κυτταρικών σειρών στην οποία θα επιτευχθεί σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων.



Εικόνα 3.1. Πλασμιδιακός Χάρτης του Φορέα Κλωνοποίησης pLVTHM.

Γραμμοποίηση πλασμιδιακού φορέα pLVTHM

Το πρώτο βήμα για την διαδικασία της κλωνοποίησης αποτελεί η γραμμοποίηση του φορέα ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις ενσωμάτωσης των ενθεμάτων. Για αυτό τον λόγο προχωρήσαμε σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Όπως φαίνεται και από την παραπάνω εικόνα χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα ClaI (New England Biolabs) και MluI-HF (New England Biolabs), για την γραμμοποίηση του φορέα. Τα συστατικά και οι ποσότητες της αντίδρασης αναγράφονται στον πίνακα 3.12 και 3.13

Αντιδραστήριο	Ποσότητες
Πλασμιδιακός φορέας	0,5 μ L
Buffer rCutSmart 10x (NEB)	5 μ L
ClaI (NEB)	1,5 μ L
ddH ₂ O	43 μ L
Τελικός όγκος	50 μ L

Πίνακας 3.12. Σύσταση της πέψης γραμμοποίησης του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM.

Αντιδραστήριο	Ποσότητες
Πλασμιδιακός φορέας	0,5 μ L
Buffer rCutSmart 10x (NEB)	5 μ L
MluI-HF (NEB)	1,5 μ L
ddH ₂ O	43 μ L
Τελικός όγκος	50 μ L

Πίνακας 3.13. Σύσταση της πέψης γραμμοποίησης του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM.

Ταυτόχρονα, έγινε και η προετοιμασία των ενθεμάτων ώστε να ενσωματωθούν στον φορέα κλωνοποίησης. Από τα διαλυτοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν 2 μl sense oligos και αναμειχθηκαν με 2 μl antisense oligos και 96μl Annealing Buffer 10x, επώσθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά ώστε να υβριδιστούν και να σχηματιστούν τα shRNA. Αμέσως μετά το πέρας των 5 λεπτών, τα δείγματα αφαιρέθηκαν από την πηγή της θερμότητας για να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις η θερμοκρασία έφτασε στους 30°C, το δείγμα χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα που ήταν η αντίδραση λιγάσης για την ενσωμάτωση τους στον φορέα κλωνοποίησης. Ως ένθεμα χρησιμοποιήθηκε το δίκλωνο προϊόν από την διαδικασία υβριδοποίησης.

Η αντίδραση λιγάσης, που αποτελεί και το τελευταίο βήμα της διαδικασίας κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε με ολονύκτια επώαση στους 16°C.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες Αντιδραστηρίων
Ένθεμα	4 μL
Buffer T4 ligase	1 μL
T4 ligase	0,5 μL
Πλασμιδιακός φορέας pLVTHM	1,2 μL
ddH ₂ O	3,3 μL
Τελικός όγκος	10 μL

Πίνακας 3.14. Σύσταση της αντίδρασης λιγάσης του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM με τα shCDX2, shKLF5 και shHNF4a.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης στην συνέχεια μετασχηματίστηκε σε δεκτικά βακτήρια με θερμικό -shock

Ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος της αντίδρασης (πλασμιδιακός φορέας με ενσωμάτωση του επιθυμητού ενθέματος) έγινε σε βακτήρια *E. coli* έπειτα από μετασχηματισμό με θερμικό-shock δεκτικών ως προς αυτόν τον τύπο βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *STBL3*, στέλεχος ειδικό για την μείωση των πλασμιδιακών ανασυνδυασμών .

Η διαδικασία του βακτηριακού μετασχηματισμού αναγράφεται στα επόμενα βήματα:

- τα βακτήρια *STBL3*, τα οποία βρέθηκαν υπό μορφή βακτηριακού εναιωρήματος φυλάχθηκαν σε κλάσματα των 50μl στους -80°C, τοποθετήθηκαν σε πάγο ώστε να ξεπαγώσουν
- αναμειχθηκαν 5μL της αντίδρασης λιγάσης με το βακτηριακό εναιώρημα και επώσθηκαν σε πάγο για 20 λεπτά
- ακολούθησε θερμικό-shock (heatshock), σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα, ώστε να επιτευχθεί παροδικό άνοιγμα πόρων στην μεμβράνη των βακτηρίων και να επιτρέπει η είσοδο των πλασμιδίων στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων.
- επώαση των βακτηρίων στον πάγο για 2 λεπτά ώστε να κλείσουν οι παροδικοί πόροι των μεμβρανών που δημιουργήθηκαν με το θερμικό shock

- προσθήκη ποσότητας θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό, μέχρι ο τελικός όγκος του δείγματος να φτάσει στο 1ml
- μεταφορά του δείγματος σε επωαστήρα για 50 λεπτά, ρυθμισμένο 160 rpm, στους 37°C.

Η προσθήκη θρεπτικού το οποίο δεν περιείχε αντιβιοτικό έγινε έτσι ώστε ο πληθυσμός των βακτηρίων να εκφράσει μία φορά το γενετικό του υλικό, και κατ' επέκταση και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό το οποίο έχουν. Αν το θρεπτικό είχε εξ αρχής αντιβιοτικό, τότε ο πληθυσμός δεν θα μπορούσε να αναπτυχθεί και θα πέθαιναν. Ο χρόνος των 50 λεπτών στην επώαση χωρίς αντιβιοτικό ήταν ο απαραίτητος χρόνος που χρειάζονται τα κύτταρα για έναν κύκλο διπλασιασμού του γενετικού τους υλικού.

- Έγινε επίστρωση ποσότητας από την βακτηριακή καλλιέργεια σε τρυβλία με LB-agar-100μg/mL Ampicillin, προς την επιλογή των θετικών ως προς το μετασχηματισμό κλώνων.
- τα τρυβλία επώασθηκαν σε ολη τη διάρκεια της νύχτας (~16-18 ώρες) σε ειδικό θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 37°C.
- επόμενο βήμα η επιλογή μοναδιαίων κλώνων που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο και ο μονοκλωνικός τους πολλαπλασιασμός ολονύκτια σε υγρή καλλιέργεια, υπό συνεχή ανάδευση σε ελεγχόμενα ρυθμισμένο περιβάλλον (37°C/ 210 rpm). Η υγρή καλλιέργεια ήταν περίπου 2ml και περιείχε θρεπτικό υλικό παρουσία αμπικιλίνης για την αποφυγή επιμολύνσεων.
- τελευταίο βήμα της πειραματικής διαδικασίας ήταν η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA, αριθμός καταλόγου: 740588.50, Macherey-Nagel).

3.8 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης βασίζεται στον εμπλουτισμό των πρωτεϊνών οι οποίες προσδένονται στο DNA. Αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες που μελετώνται. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την διερεύνηση της πρόσδεσης μίας πρωτεΐνης σε ένα ρυθμιστικό στοιχείο ενός γονιδίου στόχου επάνω στο DNA. Έτσι η τεχνική ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης μας επέτρεψε να μελετήσουμε την πρόσδεση των υπο εξέταση μεταγραφικών παραγόντων επάνω σε γονιδιωματικές αλληλουχίες και συγκεκριμένα σε υποκινητές γονιδίων και lncRNA στόχων.

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα συστατικά των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρακάτω.

Σύσταση διαλυμάτων ChIP

Είδος Διαλύματος	Ποσότητες Αντιδρατηρίων
Διάλυμα μονιμοποίησης	NaCl 100mM, EDTA 1mM, pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM-pH 8, FA 11%, milli-Q H ₂ O
Buffer B- διάλυμα λύσης	EDTA 10mM, pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM-pH 8, Triton-X 0,25%, milli-Q H ₂ O
Buffer C- διάλυμα λύσης	NaCl 150mM, EDTA 1mM-pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM, pH 8, milli-Q H ₂ O
ChIP Incubation Buffer 0,3% SDS-διάλυμα κατάτμησης	NaCl 150mM, EDTA 1mM-pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM-pH 8, Triton-X 1%, SDS 0,3%, milli-Q H ₂ O
ChIP Incubation Buffer (-SDS)	NaCl 150mM, EDTA 1mM-pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM-pH 8, Triton-X 1%, milli-Q H ₂ O
ChIP Elution Buffer-Διάλυμα έκλουσης	SDS 1%, NaHCO ₃ 0,1M, milli-Q H ₂ O
Wash Buffer 1	SDS 0,3%, DOC (Sodium Deoxycholate), 0,1%, Triton-X 1%, NaCl 150mM, EDTA 1mM-pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM-pH 8
Wash Buffer 2	SDS 0,3%, DOC 0,1%, Triton-X 1%, NaCl 500mM, EDTA 1mM, pH 8, EGTA 0,5mM, pH 8, HEPES 20mM, pH 8
Wash Buffer 3	LiCl 250mM, DOC 0,5%, NP-40 0,5%, EDTA 1mM-pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM-pH 8
Wash Buffer 4	EDTA 1mM-pH 8, EGTA 0,5mM-pH 8, HEPES 20mM-pH 8

Πίνακας 3.15. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο ChIP.

Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χωρίζεται στα εξής στάδια:

- **Προετοιμασία των σφαιριδίων αгарόξης**

Το πρώτο βήμα αποτελεί η προετοιμασία των σφαιριδίων αгарόξης τα οποία σε επόμενο στάδιο θα χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του συμπλόκου αντισώματος-πρωτεΐνης που είναι προσδεδεμένη σε χρωματινική περιοχή του DNA. Έγινε χρήση των σφαιριδίων αгарόξης (Protein G Merck Millipore, αριθμός καταλόγου: 16-266). Ποσότητα διαλύματος σφαιριδίων, έπειτα από έντονη ανάδευση, μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου erpendorf και σε αυτό προστέθηκε 1ml διαλύματος ChIP Incubation Buffer, αναδεύοντας για 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 1.200 rpm, για 5 λεπτά, ενώ με το τέλος της φυγοκέντρησης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε επανάληψη της διαδικασίας της πλύσης. Το διάλυμα των σφαιριδίων επωάστηκε στους 4°C για 2 ώρες σε διάλυμα ChIP Incubation Buffer 0,3% με την προσθήκη BSA 1%.

- **Προετοιμασία Κατακερματισμού της χρωματίνης**

Το πρώτο βήμα αποτελεί η επίστρωση των κυττάρων σε ειδικά πιάτα κυτταροκαλλιέργειών ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή πυκνότητα. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα AGS με συγκέντρωση 2×10^6 κύτταρα και 3 μέρες καλλιέργειας. Τα AGS είναι καρκινική σειρά κυττάρων με προέλευση από πρωτεύοντα γαστρικό όγκο. Την τρίτη ημέρα έγινε η συλλογή των κυττάρων με απομάκρυνση του θρεπτικού και πλύση τους με 1X PBS. Ακολούθησε η διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων με προσθήκη 20ml 1X PBS και 2ml διάλυμα μονιμοποίησης και επωάζεται το σύνολο του διαλύματος κυττάρων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα μονιμοποίησης περιείχε φορμαλδεΰδη, ώστε να

πραγματοποιηθεί η μονιμοποίηση της σύνδεσης πρωτεΐνης-DNA. Έγινε προσθήκη 2ml γλυκίνης ώστε να τερματιστεί η δράση του μονιμοποιητή. Ακολούθησε πλύση με PBS 1X και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το τελικό βήμα για την συλλογή των κυττάρων ήταν η προσθήκη 1x PBS και η μεταφορά τους σε falcon, έπειτα από τεχνητή αποκόλληση. Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις για απομάκρυνση του υπερκείμενου και επώαση σε διαλύματα λύσης ώστε να απομονωθεί το πυρηνικό εκχύλισμα.

- **Κατακερματισμός της χρωματίνης**

Έγινε κατακερματισμός της χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων υπό συνεχή περιστροφή υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία. Χρησιμοποιήθηκε μηχανήμα QSONICA Q800R3 Sonicator σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος ήταν οι παρακάτω : Amplitude 70%, 5 sec on, 45 sec off, 30min. Στο τέλος της διαδικασίας έγινε συλλογή των δειγμάτων και φυγοκέντρωση τους 14.000rpm/4°C/20 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν με τη μορφή ιζήματος τα κυτταρικά θραύσματα και μεγάλα τμήματα χρωματίνης που δεν κατακερματίστηκαν. Το υπερκείμενο, το οποίο περιείχε και την επιθυμητή κατακερματισμένη πρωτεΐνη, μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και επαναδιαλύθηκε σε ίση ποσότητα ChIP Incubation Buffer no SDS. Ακολούθησε ο διαμοιρασμός των δειγμάτων σε input sonication, input protein και input DNA, δείγματα ελέγχου για την αποτελεσματικότητα της ανοσοκατακρήμνισης .

- **Σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος-χρωματίνης**

Αρχικά έγινε φυγοκέντρωση 6000rpm/4°C/3 λεπτά των σφαιριδίων που επωάζονταν στο ψυγείο για τουλάχιστον 2ώρες. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα των σφαιριδίων επαναδιαλύθηκε στο σύνολο του διαλύματος της ανοσοκατακρήμνισμένης χρωματίνης του προηγούμενου σταδίου. Το σύνολο του διαλύματος επώαστηκε όλη τη νύχτα στους 4 °C με τη χρήση ρότορα για την παροχή συνεχούς ανάδευσης.

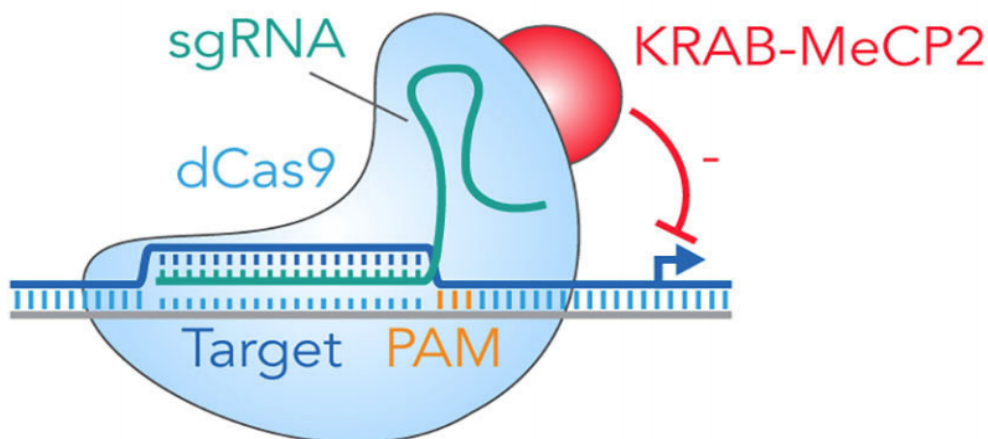
- **Τελική επεξεργασία δείγματος**

Αρχικά το δείγμα υπέστη φυγοκέντρωση ώστε να απομακρυνθούν τα μη ειδικά τμήματα. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις με τα Wash Buffer 1,2,3,4 ώστε να απομακρυνθούν τα μη ειδικά τμήματα DNA και πρωτεϊνών. Έγινε στη συνέχεια διάλυμα έκλουσης ChIP Elution Buffer και φυγοκέντρωσης σε 14.000rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετέπειτα προστέθηκε ίση ποσότητα 2X SDS Loading Buffer . Το υπόλοιπο μέρος του δείγματος, μαζί με τα δείγματα input DNA στα οποία προστέθηκαν ChIP Elution Buffer, ακολούθησαν τη διαδικασία αντιστροφής των συνδέσεων πρωτεϊνών-DNA. Έγινε προσθήκη 16 μl NaCl 5 M και επώαση τους σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 65 °C για ολονύκτια επώαση. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός των δειγμάτων με τη μέθοδο της φαινόλη-χλωροφόρμιου, όπως περιγράφεται πιο πάνω. Στα δείγματα των πρωτεϊνών η διαδικασία αντιστροφής πραγματοποιήθηκε με επώαση των δειγμάτων στους 95 °C για 50 λεπτά.

3.9 Δημιουργία μοριακού εργαλείου για την επιλεκτική σίγηση γονιδίων στόχων και μεταγραφικών παραγόντων

Το σύστημα dCas9-KRAB-MeCP2 (Evers et al., 2016) χρησιμοποιεί μία ενζυμικά ανενεργή Cas9, η οποία δεσμεύεται σε γονιδιωματικές αλληλουχίες. Κατ'αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών και υπάρχει φυσική παρεμπόδιση της RNA πολυμεράσης οδηγώντας σε σίγηση του γονιδίου στόχου (Ricci & Colasante, 2021). Καθοδικά της αλληλουχίας της dCas9, συντήχθηκε αλληλουχία που σχετίζεται με μεταγραφική σίγηση και ονομάζεται Krüppel-associated box (KRAB), με στόχο την αποσιώπηση γονιδίων στόχων μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης τους χωρίς να δημιουργεί ρήξη-τομή του γονιδίου, ωστόσο εμφανίζει ατελή σίγηση (Thakore et al., 2015). Για την βελτιστοποίηση των επιπέδων της σίγησης, καθοδικά της επικράτειας KRAB τοποθετήθηκε η αλληλουχία του MeCP2, αλληλουχία με κατασταλτικό ρόλο (transcription repression domain). Η MeCP2 επικράτεια δεσμεύεται σε μεθυλιωμένα δινοουκλεοτίδια CpG και στρατολογεί ένα σύνολο τροποποιητών ιστόνης, συμπεριλαμβανομένων των μεθυλοτρανσφερασών DNA (DNMT1 και DNMT3A) και των μεθυλοτρανσφερασών ιστόνης για την έναρξη γονιδιακής καταστολής (Rajavelu et al., 2018). Η συνεργειακή αυτή δράση των τριών αυτών στοιχείων δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα από τους διαφορετικούς συνδυασμούς.

CRISPR interference



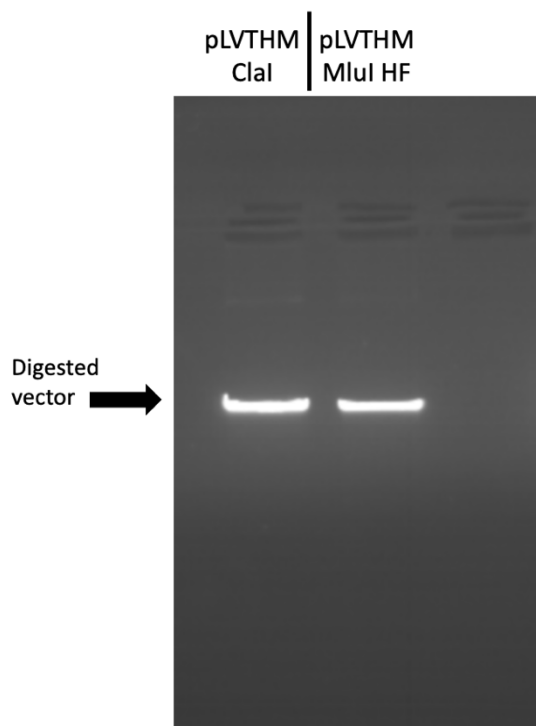
Εικόνα 3.2: Τρόπος δράσης του συστήματος dCas9-KRAB-MeCP2.

4. Πειραματικά Αποτελέσματα

4.1 Κλωνοποίηση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM

Το πρώτο βήμα ήταν η δημιουργία πλασμιδιακών φορέων που φέρουν τα κατάλληλα shRNA, τα οποία στοχεύουν τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα με απώτερο στόχο την καταστολή των επιπέδων του, ώστε να έχουμε καταστολή των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων σε κύτταρα καρκινικών σειρών. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας *pLVTHM* και έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης shRNAs έναντι των μεταγραφικών παραγόντων *CDX2*, *HNF4a* και *KLF5*.

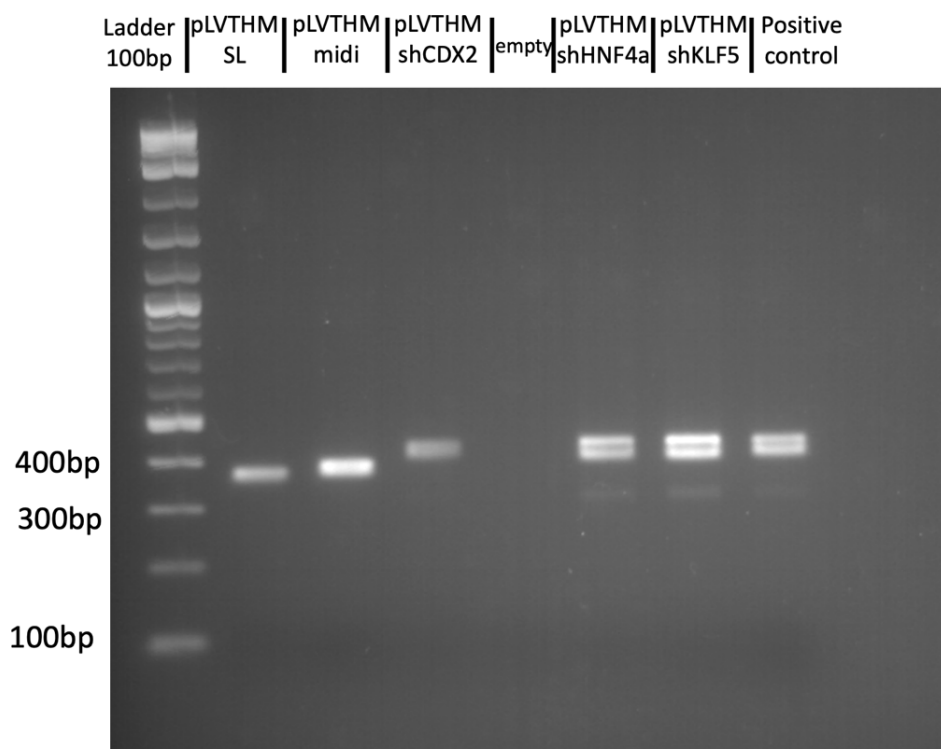
Αρχικά πραγματοποιήθηκε η γραμμοποίηση μέσω πέψης του φορέα για την κλωνοποίηση των ενθεμάτων. Ακολούθησε και δεύτερη διαδικασία πέψης και με το έτερο ένζυμο περιορισμού σε κάθε ένα δείγμα, ώστε και τα δύο δείγματα στο τέλος να έχουν υποστεί επεξεργασία και με τα δύο περιοριστικά ένζυμα *ClaI* και *MluI* HF, τα οποία δημιουργούν κλώδη άκρα για την κατευθυνόμενη ενσωμάτωση του shRNA, το οποίο και έχει σχεδιαστεί φέροντας τα αντίστοιχα συμπληρωματικά άκρα. (Εικόνα 4.1). Ακολούθως έγινε απομόνωση από πηκτή για ανάκτηση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου.



Εικόνα 4.1 : Πέψη του πλασμιδιακού φορέα *pLVTHM* με τα ένζυμα περιορισμού *ClaI* και *MluI* HF, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Το επόμενο βήμα ήταν η κλωνοποίηση των shRNA στον πλασμιδιακό φορέα *pLVTHM*, και πραγματοποίηση διαγνωστικών PCR για επιβεβαίωση της ορθής ένθεσης της κάθε αλληλουχίας, μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας και στην περίπτωση επιτυχούς ενσωμάτωσης του ενθέματος στο φορέα, μετά την διαγνωστική PCR, παρατηρείται ενίσχυση μιας ζώνης

στα 350bp, ενώ στην περίπτωση ανεπιτυχούς ενσωμάτωσης αντίστοιχα ενισχύεται μια ζώνη 300bp (Εικόνα 4.2).

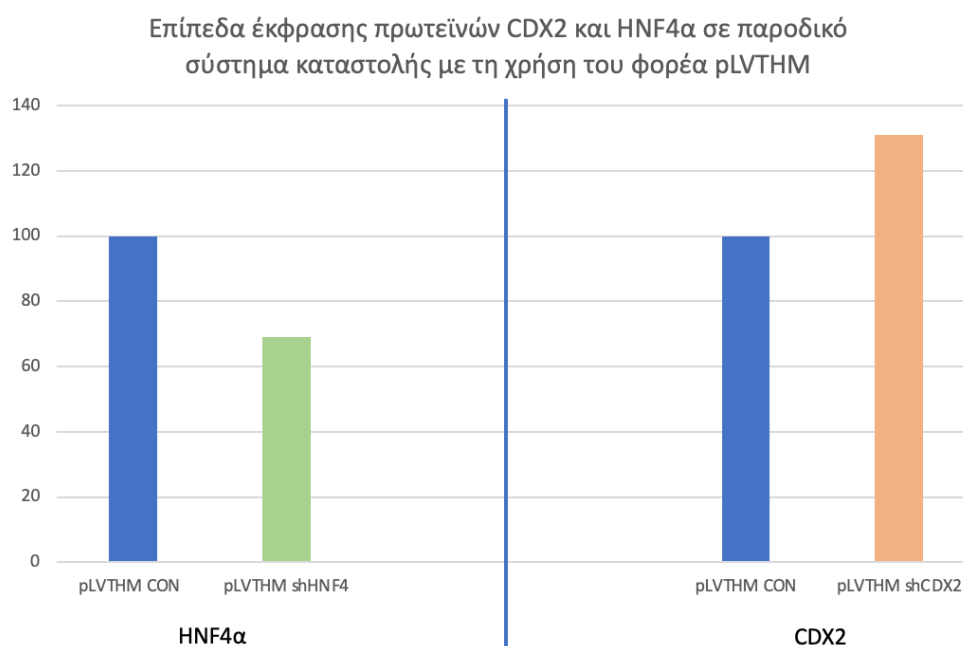


Εικόνα 4.2 : Διαγνωστική PCR για τον φορέα pLVTHM με ένθεμα shCDX2, shHNF4a, shKLF5 σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Ξεκινώντας από την αριστερή πλευρά του πηκτώματος που παρατίθεται στην εικόνα 4.2, στην πρώτη θέση του πηκτώματος υπάρχει ο δείκτης μοριακών μεγεθών 100bp, στη δεύτερη θέση βρίσκεται ως αρνητικός μάρτυρας ο επανακυκλοποιημένος φορέας pLVTHM (self ligation=SL), ενώ στην τρίτη θέση ο απομονωμένος φορέας πριν την διαδικασία της πέψης (pLVTHM midi). Στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα μετά τη διαδικασία της κλωνοποίησης που αντιστοιχούν σε pLVTHM-shCDX2, κενό πηγάδι, pLVTHM shHNF4a, pLVTHM shKLF5 και τέλος θετικός μάρτυρας με επιβεβαιωμένο κλωνοποιημένο ένθεμα shRNA σε pLVTHM. Στην περίπτωση μη επιτυχημένης εισαγωγής του ενθέματος, το προϊόν αναμένεται να είναι κοντά στις 400bp, (επανακυκλοποιημένος φορέας), ενώ η επιτυχής ένθεση με δείγμα που έχει εισαχθεί το shRNA είναι πολύ μικρή σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, περίπου 50bp διαφορά. Παρατηρούμε πως στην ζώνη ενίσχυσης των 450bp υπάρχουν τα θετικά δείγματα όλων των παραπάνω δειγμάτων, καθώς βρίσκονται στην ίδια ευθεία με τον θετικό μάρτυρα και επομένως τα δείγματα χαρακτηρίζονται ως επιτυχή ως προς την κλωνοποίηση των shCDX2, shHNF4a και shKLF5 στον φορέα pLVTHM. Οι φορείς αυτοί θα χρησιμοποιηθούν για την RNA αποσιώπηση των γονιδίων στόχων σε ευκαρυωτικά καρκινικά κύτταρα, μέσω συστήματος διαμόλυνσης μέσω λεντιϊών.

4.2 Πρωτεϊνική έκφραση επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α σε σύστημα παροδικής καταστολής της έκφρασης τους

Επόμενο πειραματικό βήμα αποτέλεσε ο έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α, σε σύστημα παροδικής καταστολής. Το σύστημα καταστολής αφορά μία γαστρική καρκινική σειρά στην οποία επάγεται καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα ,έπειτα από διαμόλυνση με τον πλασμιδιακό RNAi φορέα pLVTHM με χρήση λεντιϊών. Αυτή η διαδικασία αποσκοπεί στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του συγκεκριμένου φορέα ως προς τη μείωση των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων στο σύστημα. Η γαστρική καρκινική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν η AGS, καθώς διαπιστώθηκε από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ότι η έκφραση του CDX2 ήταν υψηλότερη στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου.



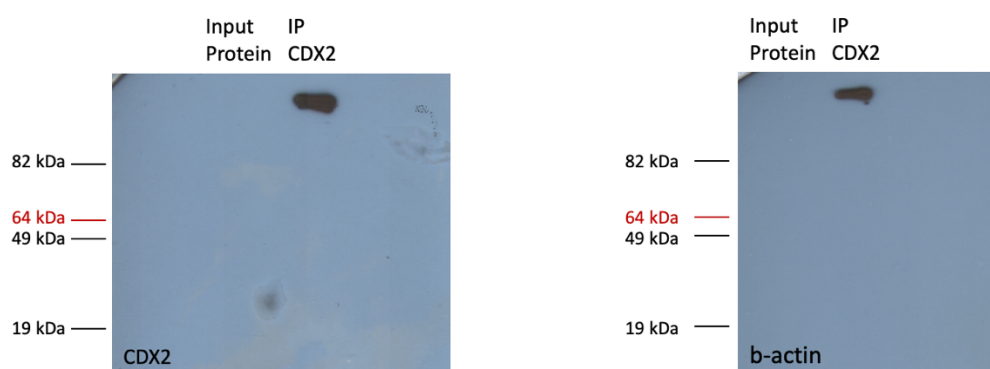
Διάγραμμα 4.1 : Διάγραμμα έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων HNF4α και CDX2 έπειτα από διαμόλυνση με τον φορέα pLVTHM Τα δείγματα con, αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος που αφορά διαμόλυνση με άδειο pLVTHM φορέα ,

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Διάγραμμα 4.1) έγινε φανερό ότι μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων μέσω λεντιϊών με τους επιθυμητούς φορείς, υπήρξε πολύ ήπια καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α σε ποσοστό περίπου 30% (πράσινη μπάρα), ενώ για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2 δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του (πορτοκαλί μπάρα). Το πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερο ποσοστό καταστολής της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να ελεγχθεί μετά και η επίπτωση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων επάνω σε lncRNA. Τα αποτελέσματα αυτά προέρχονται από μία βιολογική επανάληψη του πειράματος.

4.3 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a

4.3.1 Έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης σε πρωτεϊνικό επίπεδο

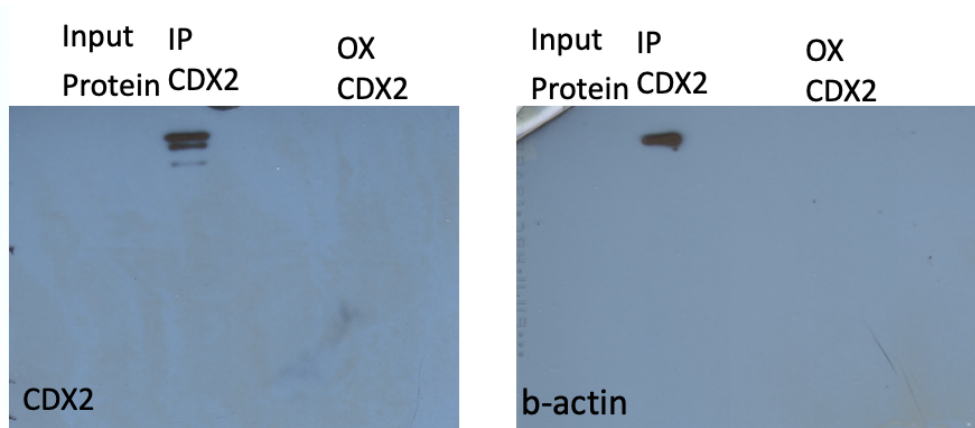
Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης των μεταγραφικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε η ανοσοπαυσίπωση κατά Western. Ως δείγμα ελέγχου αξιοποιήθηκε πυρηνική πρωτεΐνη των κυτταρικών εκχυλισμάτων (*Input Protein*), δηλαδή πρωτεϊνικό δείγμα χωρίς τον εμπλουτισμό του σήματος με χρήση κάποιου αντισώματος. Ο αρνητικός μάρτυρας συγκρίθηκε με δείγματα που προέκυψαν έπειτα από χωριστή ανοσοκατακρήμνιση των μεταγραφικών παραγόντων με χρήση κατάλληλου αντισώματος και αντιστοιχούν στα IP αντι-CDX2 και IP anti-HNF4a. Η κυτταρική σειρά που πραγματοποιήθηκε το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης είναι AGS, ενώ για την κανονικοποίηση των επιπέδων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα το οποίο προσδένεται στην ιδιόσυστατα εκφραζόμενη πρωτεΐνη β-ακτίνη (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Εικόνα αποτελέσματος Western Blot, της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2 και την ιδιόσυστατα εκφραζόμενη πρωτεΐνη β-ακτίνη

Από το αποτέλεσμα του western blot (Εικόνα 4.3), παρατηρήθηκε ένα μη αναμενόμενο πρότυπο εμφάνισης της πρωτεΐνης του μεταγραφικού παράγοντα όσο και της πρωτεΐνης β-ακτίνης, καθώς το αναμενόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι τα 40kDa. Αυτό ωστόσο παρατηρείται μόνο στο δείγμα ανοσοκατακρήμνισης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2, ενώ δεν προέκυψε αποτέλεσμα στα δείγματα που δεν είχαν προσθήκη αντισώματος (*Input protein*) Το παραπάνω αποτέλεσμα μας δείχνει ότι πιθανότατα στη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης είτε στην διαδικασία εμφάνισης των αποτελεσμάτων (*western blot*), υπήρξε κάποια εμπλοκή της πρόσδεσης του αντισώματος επάνω στις πρωτεΐνες των δειγμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη ευαισθησία του αντισώματος, μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος ή εξασθένηση του σήματος του, λόγω εκτεταμένης χρήσης του.

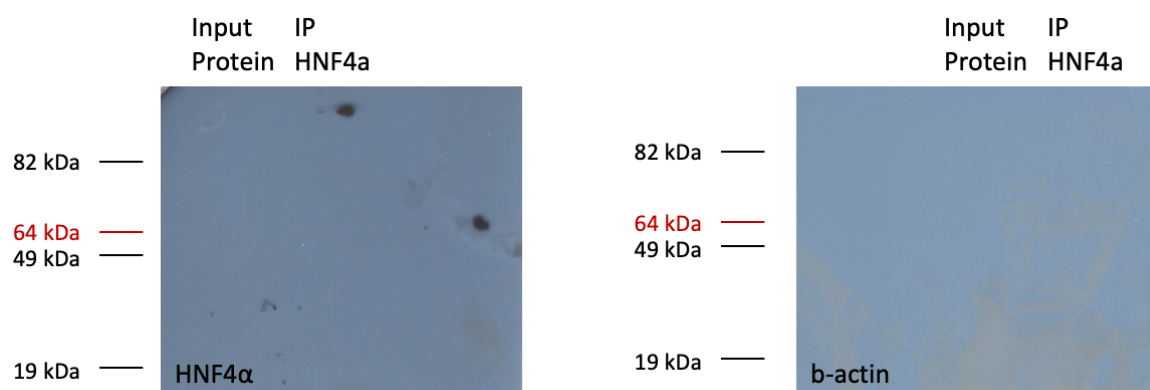
Για αυτό έγινε επανάληψη της διαδικασίας, αυτή τη φορά με τη χρήση ενός θετικού μάρτυρα δείγματος υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Εικόνα αποτελέσματος Western Blot, της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2 και από πείραμα υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 (OX=overexpression) και την ιδιόσυστατα εκφραζόμενη πρωτεΐνη β-ακτίνη.

Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης Western, παρατηρούμε ότι δεν υπήρξε το επιθυμητό σήμα ούτε στον θετικό μάρτυρα του πειράματος OX CDX2, που παλιότερα είχε επιβεβαιωθεί με προηγούμενη Western. Αυτό συνηγορεί με την εξασθένηση του αντισώματος και της μειωμένης ευαισθησίας του λόγω των επαναλαμβανόμενων χρήσεων. Μελλοντικά σε επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας με τη χρήση νέου αντισώματος και τη χρήση θετικού μάρτυρα θα μπορούσαμε να εξάγουμε πιο ασφαλή αποτελέσματα.

Η ίδια διαδικασία ανοσοαποτύπωσης Western πραγματοποιήθηκε και για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων από την ανοσοκατακρήμνιση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5: Εικόνα αποτελέσματος Western Blot, της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τον μεταγραφικό παράγοντα HNF4a και την ιδιόσυστατα εκφραζόμενη πρωτεΐνη β-ακτίνη.

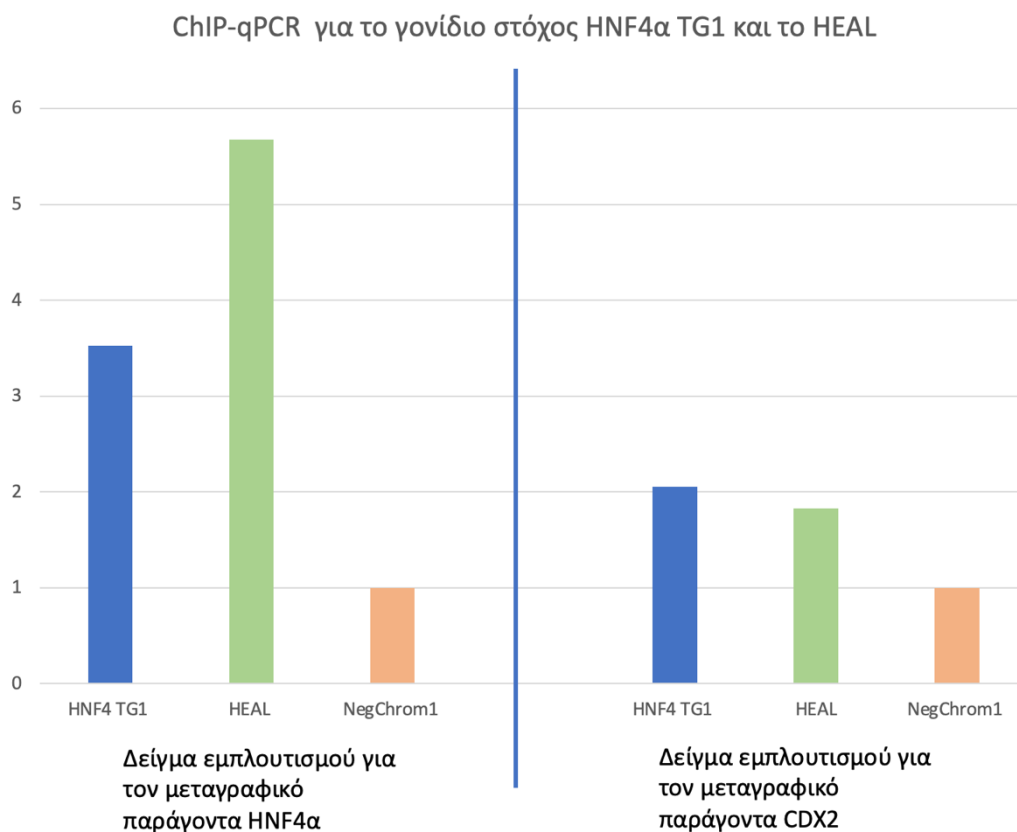
Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα Input Protein και IP Protein HNF4α , ενώ για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε χρήση αντισώματος ειδικού για την β-ακτίνη. Το αναμενόμενο πρότυπο εμφάνισης για την πρωτεΐνη του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α είναι τα 37kDa. Και σε αυτή την ανοσοαποτύπωση Western, όσο και σε αυτή που πραγματοποιήθηκε για την πρωτεΐνη CDX2, δεν παρατηρήσαμε ειδικό σήμα. Αυτό παρατηρήθηκε και με την χρήση του ειδικού αντισώματος για την πρωτεΐνη HNF4α και για τη β-ακτίνη. Η επανάληψη του πειράματος θα πρέπει να γίνει με τη χρήση νέων ειδικών αντισωμάτων ώστε να εξαλείψουμε την περίπτωση της μειωμένης ευαισθησίας και εξασθένησης του σήματος.

4.3.2 Ποσοτική PCR στον υποκινητή του lncHEAL έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης έναντι των CDX2 και HNF4α.

Αν και τα αποτελέσματα σε πρωτεϊνικό επίπεδο έδειξαν ότι το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης ήταν υποβέλτιστο προχωρήσαμε στον έλεγχο της πρόσδεσης του υποκινητή του lncRNA HEAL από τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α. Για αυτό το λόγω πραγματοποιήθηκε ποσοτική qPCR στα δείγματα DNA έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση τους, αφού σε περίπτωση άμεσης ρύθμισης αναμένεται εμπλουτισμός του σήματος στον υποκινητή του lncRNA HEAL καθώς ο μεταγραφικός παράγοντας θα έχει προσδεθεί σε ρυθμιστικό μοτίβο. Στο πείραμα αξιοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και ένας γνωστός υποκινητής στον οποίο παρατηρείται πρόσδεση του HNF4 (αντιστοιχεί στο γονίδιο ZNF341 και ονομάστηκε HNF4α TG1) (Διάγραμμα 4.2).

Σε μία ποσοτική PCR με δείγματα τα οποία προέρχονται από διαδικασία ChIP είναι σημαντικό να υπάρχουν διαδοχικά αραιωμένα δείγματα για απόλυτη ποσοτικοποίηση του σήματος μέσω κατασκευής πρότυπης καμπύλης. Τα δείγματα προέκυψαν από διαδοχικές αραιώσεις μη ανοσοκατακρημνισμένου DNA. Στα πειράματα έγινε χρήση τεσσάρων αραιώσεων: St1 (1/5), St2 (1/50), St3 (1/500) και St4 (1/5000). Παράλληλα το μη ανοσοκατακρημνισμένο DNA (Input DNA) πριν την προσθήκη αντισώματος, αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος.

Η διαδικασία κανονικοποίησης κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε σε δύο στάδια. Το πρώτο βήμα είναι η κανονικοποίηση ως προς το input για εξομάλυνση της αποτελεσματικότητας των διαφορετικών ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε δεύτερη κανονικοποίηση έναντι ενός αρνητικού γονιδιωματικού στόχου (Neg chrom 1) ώστε να υπολογισθεί η μεταβολή του σήματος που υποδήλωνε το πόσο πιο εμπλουτισμένο είναι το σήμα στην προς εξέταση αλληλουχία, σε σχέση με μη ειδικές αλληλουχίες του γονιδιώματος.



Διάγραμμα 4.2 : Διάγραμμα ενίσχυσης σήματος στον υποκινητή ενός γνωστού γονιδίου-στόχου του HNF4 (HNF4 TG1, μπλε μπάρα) και στον υποκινητή του Inc HEAL (πράσινη μπάρα) αντίστοιχα. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση του γονιδίου Neg.Chromosome 1 στον οποίο δεν παρατηρείται πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων.

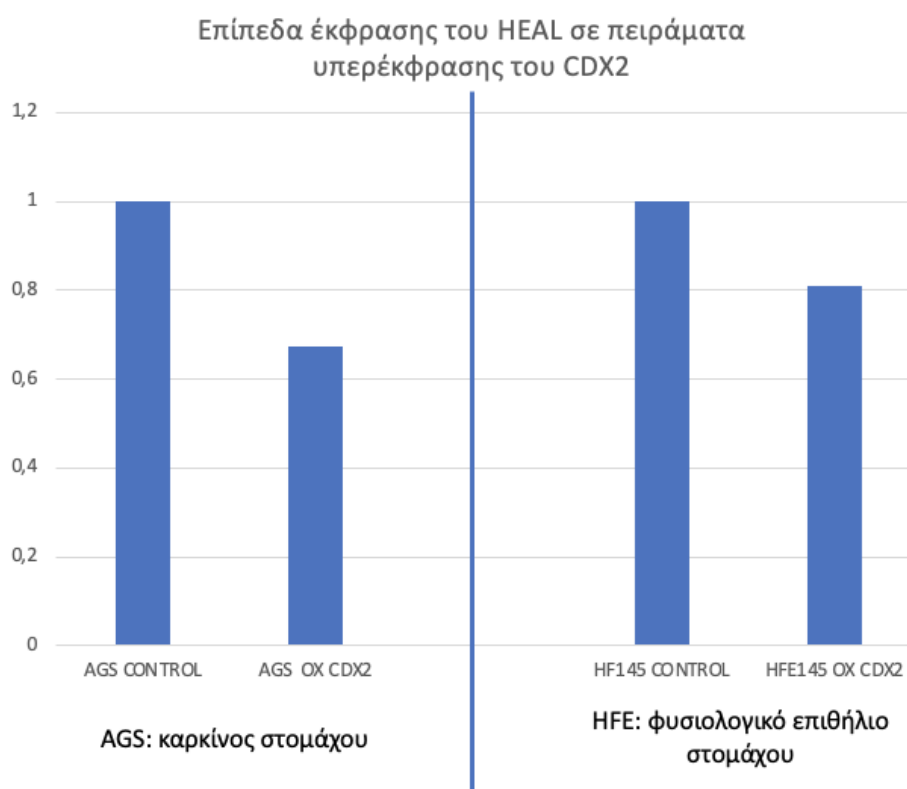
Σχετικά με τον θετικό μάρτυρα (Διάγραμμα 4.2, μπλε μπάρες) , από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ενίσχυση του σήματος κατά περίπου 2,5 φορές (fold enrichment) σε δείγμα του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α, γεγονός που μας δείχνει ότι υπάρχει ήπια πρόσδεση του μεταγραφικού στον θετικό μάρτυρα του πειράματος, ωστόσο θα πρέπει να διερευνηθεί ξανά, εφόσον διαλευκανθεί η ευαισθησία του αντισώματος για τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα και βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες ανοσοκατακρήμνισης. Σχετικά με την ρύθμιση του γονιδίου στόχου από τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2 δεν παρατηρούμε ιδιαίτερη ενίσχυση του σήματος του. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν προέλθει από δύο βιολογικές επαναλήψεις.

Ακολουθώντας για το Inc HEAL (Διάγραμμα 4.2, πράσινες μπάρες) παρατηρούμε αύξηση του σήματος , έναντι του θετικού μάρτυρα, για τον HNF4α, αφού σημειώνεται ενίσχυση κατά 6 φορές (fold enrichment) σε σχέση με το δείγμα που δεν έχει υποστεί τον εμπλουτισμό του σήματος με τη χρήση αντισώματος. Συνεπώς, αν λάβουμε υπόψιν, πως το συγκεκριμένο ChIP πραγματοποιήθηκε υπό μη βέλτιστες συνθήκες που επηρέασαν τον τρόπο πρόσδεσης του αντισώματος επάνω στα ρυθμιστικά στοιχεία τότε αναμένουμε ακόμα μεγαλύτερη ενίσχυση που μας προϊδεάζει για θετική ισχυρή ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α στο HEAL. Αντίστοιχα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 , δεν παρατηρήθηκε

ενίσχυση του σήματος άρα και όχι ρύθμιση από τον αντίστοιχο μεταγραφικό παράγοντα.

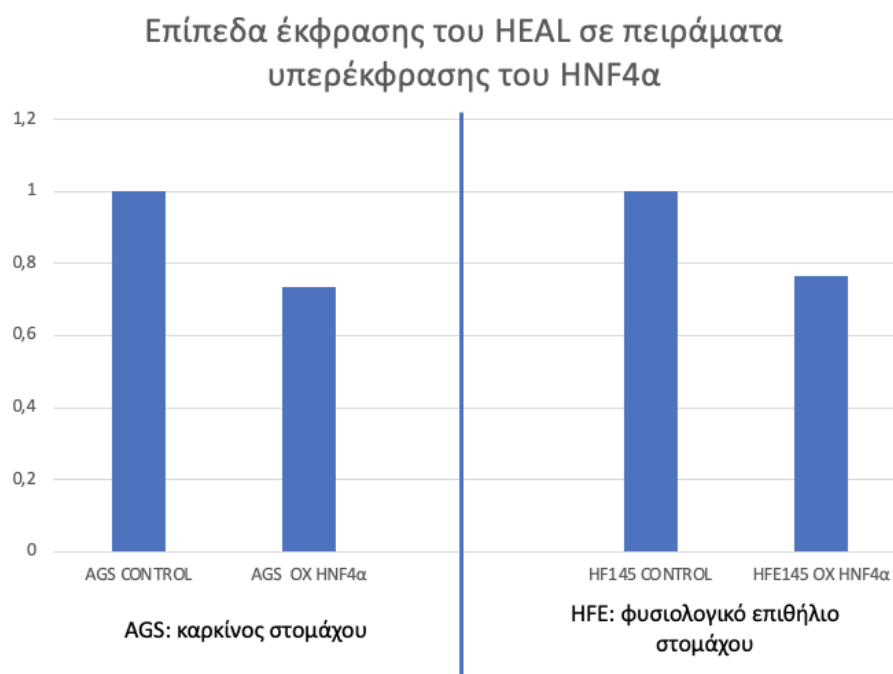
4.4 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του HEAL σε πείραμα υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α

Έπειτα από τα αποτελέσματα που φανερώνουν αλληλεπίδραση μεταξύ του lncHEAL υποκινητή και του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α, ακολούθησε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του lncRNA μεταγράφου σε πειράματα υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α , σε κυτταρική σειρά γαστρικού καρκίνου AGS καθώς και φυσιολογική μη καρκινική γαστρική σειρά (Διάγραμμα 4.3 και 4.4). Τα πειράματα υπερέκφρασης αυτά πραγματοποιήθηκαν στα ερευνητικά πλαίσια του εργαστηρίου με ποσοστά απ



Διάγραμμα 4.3: Διάγραμμα έκφρασης του HEAL σε πείραμα υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα (HFE) και κύτταρα από καρκίνο στομάχου (AGS)

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 , τόσο στην κυτταρική σειρά AGS όσο και στην HFE , παρατηρείται μη στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του HEAL (Διάγραμμα 4.3).



Διάγραμμα 4.4: Διάγραμμα έκφρασης του HEAL σε πείραμα υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα (HFE) και κύτταρα από καρκίνο στομάχου (AGS)

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τον έλεγχο της ρύθμισης του HEAL από τον μεταγραφικό παράγοντα HNF4α τόσο στην κυτταρική σειρά AGS όσο και στην HFE , επίσης παρατηρείται μη στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του HEAL (Διάγραμμα 4.4) όπως και προηγουμένως.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σχετικά με τον τρόπο επίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων στο lnc HEAL, έγινε στατιστική ανάλυση με t-test, ώστε να δούμε την σημαντικότητα των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση φανέρωσε ότι σε όλες τις περιπτώσεις υπερέκφρασης των δύο παραγόντων, η παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης του lncRNA HEAL είναι στατιστικώς σημαντική (Πίνακες 4.1 και 4.2).

CDX2 t-Test: Two-Sample (AGS and HFE145) Assuming Equal Variances

	CONTROL	CDX2
Mean	1	0,741252
Variance	0	0,009391
Observations	2	2
Pooled Variance	0,004696	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	3,775942	
P(T<=t) one-tail	0,031764	
t Critical one-tail	2,919986	
P(T<=t) two-tail	0,063527	
t Critical two-tail	4,302653	

Πίνακα 4.1: Στατιστική ανάλυση της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 στο Inc HEAL , στις κυτταρικές σειρές AGS και HFE.

HNF4 t-Test: Two-Sample (AGS and HFE145) Assuming Equal Variances

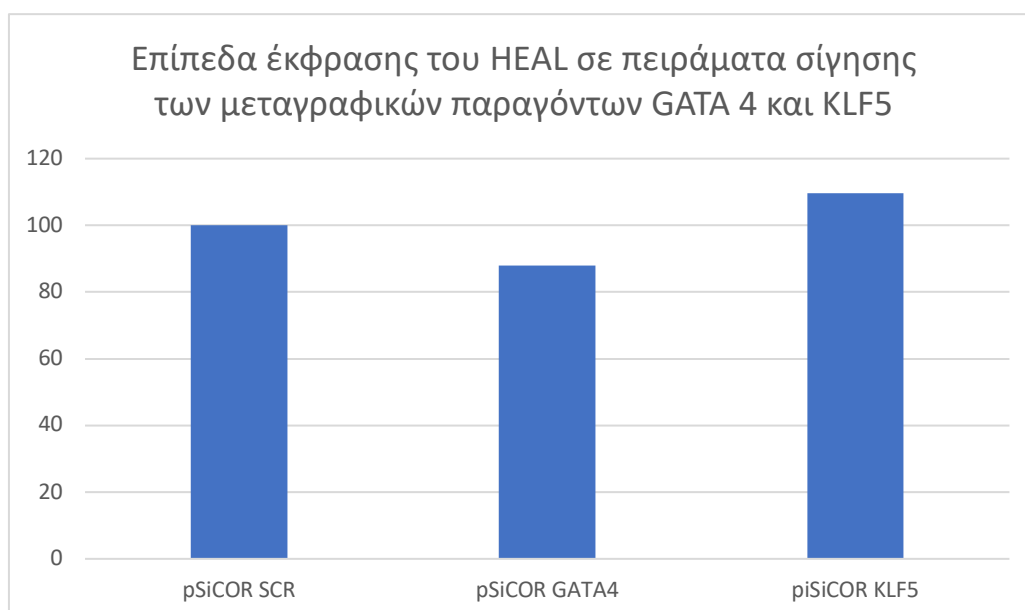
	CONTROL	HNF4
Mean	1	0,749826
Variance	0	0,000552
Observations	2	2
Pooled Variance	0,00027578	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	15,0646592	
P(T<=t) one-tail	0,00218873	
t Critical one-tail	2,91998558	
P(T<=t) two-tail	0,00437746	
t Critical two-tail	4,30265273	

Πίνακα 4.2: Στατιστική ανάλυση της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α στο Inc HEAL , στις κυτταρικές σειρές AGS και HFE.

4.5 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του HEAL σε πείραμα σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και KLF5.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4α, συχνά εκτός από ετεροδιμερή σύμπλοκα που δημιουργούν, συχνά αλληλεπιδρούν και με τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και KLF5 σε γαστρικούς όγκους. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η απόκριση της έκφρασης του IncHEAL σε πείραμα σίγησης των GATA4 και KLF5 ν

μεταγραφικών παραγόντων. Η σίγηση πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της RNA παρεμβολής (RNAi) και της χρήσης συστήματος λεντιών, σε κυτταρική σειρά AGS από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. Από τα πειράματα σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων, επετεύχθει καταστολή κατά 75% της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και KLF5.



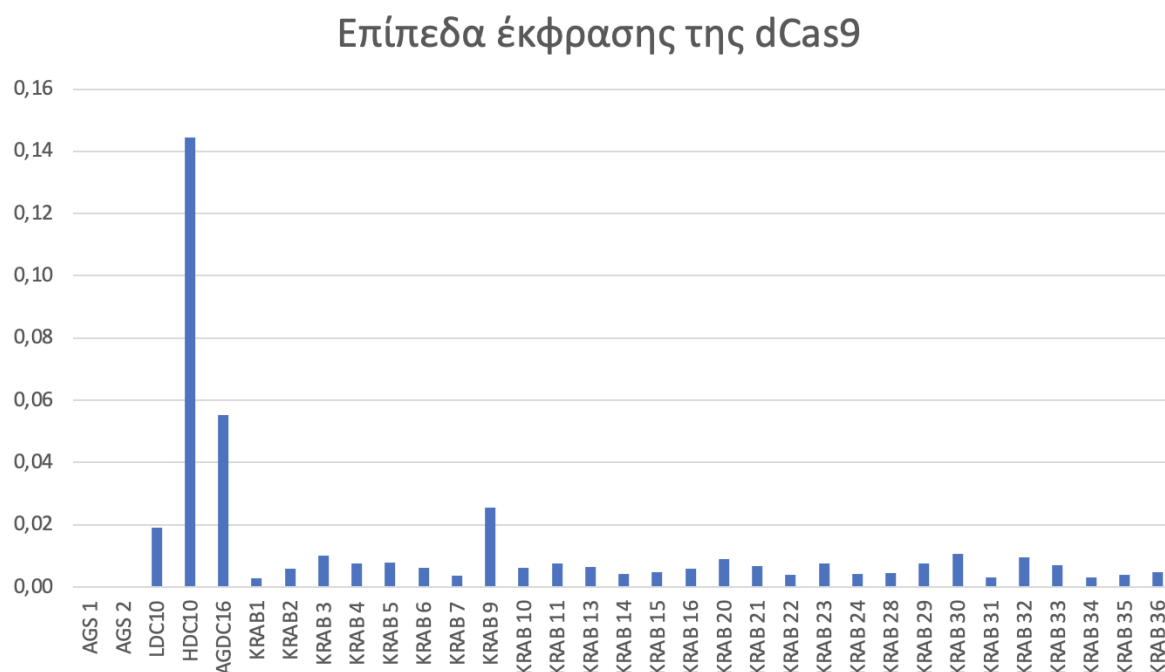
Διάγραμμα 4.5 : Διάγραμμα έκφρασης IncHEAL σε πείραμα σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και KLF5. Ως scr ορίζεται το control της αντίδρασης μας όπου δεν γίνεται σίγηση κανενός μεταγραφικού παράγοντα.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε πείραμα σίγησης των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων παρατηρήθηκε μη στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του HEAL για τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4, χωρίς ωστόσο να προϊδεάζει για σημαντική επίδραση στη ρύθμιση (Διάγραμμα 4.5). Αντίστοιχα υπό την επίδραση της σίγησης του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 δεν παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης (Διάγραμμα 4.5) .

4.6 Δημιουργία μοριακού εργαλείου για επιγενετική σίγηση γονιδίων με το σύστημα dCas9-KRAB-MeCP2

Για την δημιουργία ενός εργαλείου ενδογενούς σίγησης με την μέθοδο dCas9/KRAB/MeCP2, πραγματοποιήθηκε γενετική τροποποίηση γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS με τη χρήση λεντιών, με στόχο τον σταθερό μετασχηματισμό του γονιδιώματος τους. Μετά την γενετική τροποποίηση ακολούθησε διαλογή μεμονωμένων κυτταρικών κλώνων. Για να εξακριβωθεί ποιος από τους τροποποιημένους dCas9/KRAB/MeCP2 κλώνους έχει μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης dCas9, αρχικά ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του αντίστοιχου dCas9 μεταγράψου. Ύστερα από εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA έγινε ποσοτική PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου dCas9. Η κανονικοποίηση έγινε με την χρήση του ιδιοσυστάτου γονιδίου έκφρασης GAPDH.

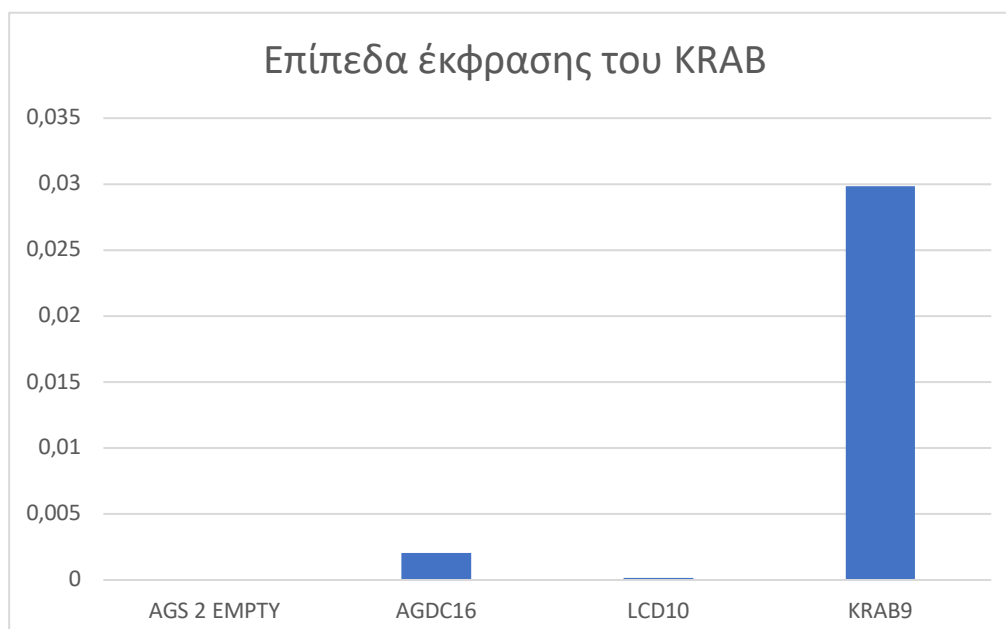
Συνολικά ελέγχθηκαν 28 κλώνοι που προέκυψαν από την γενετική τροποποίηση και έχουν αριθμηθεί ως KRAB 1 - KRAB36.



Διάγραμμα 4.6: Διάγραμμα έκφρασης της dCas9 στους απομονωμένους κλώνους έπειτα από επιτυχή διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS με τον πλασμιδιακό φορέα CRISPR-KRAB-MeCP2

Τα δείγματα AGS 1 και AGS 2 αποτέλεσαν αρνητικούς μάρτυρες καθώς σε αυτά δεν έχει γίνει γενετική τροποποίηση και επομένως δεν ήταν αναμενόμενο να παρατηρηθεί έκφραση της dCas9. Τα δείγματα LDC10, HDC10 και AGDC16 αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες ως προς την παρουσία της dCas9 καθώς είναι θυγατρικές κυτταρικές dCas9 σειρές που είχαν ήδη τροποποιηθεί με την κασέτα CRISPR-a που εκφράζει το γονίδιο dCas9 αλλά ως χίμαιρα με μεταγραφικούς ενεργοποιητές και όχι καταστολείς. Παρατηρήθηκε διαφορά των επιπέδων έκφρασης της dCas9 ανάμεσα στους θετικούς μάρτυρες. Από το σύνολο των 28 κλώνων ο κλώνος με το νούμερο 9 φαινόταν από τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου να χαρακτηρίζεται ως θετικός με ικανοποιητικά ποσοστά έκφρασης έναντι των υπολοίπων.

Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων KRAB και MeCP2 που έχουν συντηχθεί με την πρωτεΐνη dCas9 και αντιστοιχούν στις επικράτειες με ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης που επάγουν την σίγηση στο σύστημα. Για αυτό το λόγο έγινε ποσοτική PCR με κατάλληλα ζεύγη εκκινητών.



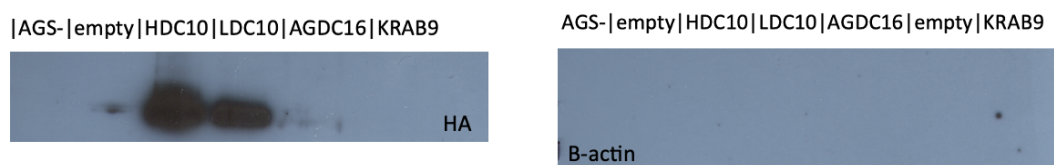
Διάγραμμα 4.7: Διάγραμμα έκφρασης της KRAB στον απομονωμένο κλώνο KRAB9, έπειτα από επιτυχή διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS με τον πλασμιδιακό φορέα CRISPR-KRAB-MeCP2



Διάγραμμα 4.8: Διάγραμμα έκφρασης της MeCP2, KRAB στον απομονωμένο κλώνο KRAB9, έπειτα από επιτυχή διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS με τον πλασμιδιακό φορέα CRISPR-KRAB-MeCP2

Από τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR επιβεβαιώθηκε ότι ο κλώνος 9 εκφράζει και τα δύο γονίδια KRAB και MecP2. Παράλληλα, στους θετικούς dCas9 μάρτυρες (AGDC16 και LDC10), δεν ανιχνεύτηκε έκφραση των δύο επικρατειών καταστολής, γεγονός που ήταν αναμενόμενο, καθώς στις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές η πρωτεΐνη dCas9 είχε συντηχθεί με μεταγραφικούς ενεργοποιητές και όχι με τους καταστολείς KRAB/MecP2. Συνεπώς τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ειδική ένθεση και έκφραση της dCas9-KRAB-MeCP2 χίμαιρας στον κλώνο 9.

Το επόμενο βήμα αποτελεί η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης της dCas9 για αυτό το λόγο και προχωρήσαμε σε ανοσοσύτρωση κατά Western (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5: Εικόνα αποτελέσματος Western Blot, για την πρωτεΐνη dCas και την ιδιοσυστατα εκφραζόμενη πρωτεΐνη β-ακτίνη.

Από τα αποτελέσματα της Western Blot, παρατηρήθηκε πως ενώ υπήρχε έκφραση της πρωτεΐνης dCas9 στα δείγματα HDC10, LDC10 και AGDC16, δεν ανιχνεύτηκε σήμα στον κλώνο KRAB9. Ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε σήμα σε κανένα δείγμα ούτε και στην β-ακτίνη, γεγονός που υποδηλώνει κακό χειρισμό κατά την ανοσοσύτρωση. Εκτός αυτού, από την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων φάνηκε ότι το δείγμα AGDC16 είχε συγκέντρωση 36,721mg/ml ενώ το δείγμα του KRAB9 16,161mg/ml. Με βάση τα παραπάνω, μια πιθανή αιτία για την απουσία σήματος στο δείγμα KRAB9 είναι το αραιό δείγμα, συνδυαστικά και με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκαν σε επίπεδο RNA. Μελλοντικά θα επαναληφθεί η ίδια Western blot αλλά αυτή τη φορά με πιο πυκνό δείγμα.

5.Συζήτηση-Συμπεράσματα

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μία από τις πιο επικίνδυνες μορφές κακοήθειας με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Η δυσκολία διάγνωσης λόγω της απουσίας συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια της νόσου, αλλά και της ετερογένειας που παρουσιάζει συμβάλλουν καθοριστικά στην δυσμενή πρόγνωση της. Οι υφιστάμενες μέθοδοι διάγνωσης έχουν ως αποτέλεσμα ανίχνευση σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας, παράλληλα με εμφάνιση λεμφικών διηθήσεων ή/και μεταστάσεων καθιστώντας αδύνατη την αντιμετώπιση της νόσου και ως εκ τούτου προτείνεται παρηγορητική θεραπεία. Συνεπώς κρίνεται αναγκαία η δημιουργία νέων μη επεμβατικών τρόπων έγκαιρης διάγνωσης που θα δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης στα αρχικά στάδια (Pasechnikov, 2014).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2/HNF4 αποτελούν ιδανικά εργαλεία ως προς την ταυτοποίηση της νόσου, ωστόσο η συμβολή τους σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια και φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες εμποδίζει τη δυνατότητα αξιοποίησης τους ως πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες λόγω ύπαρξης πολλών, μη επιθυμητών παρενεργειών σε φυσιολογικούς ιστούς. Για αυτό, καθοδικοί τους στόχοι που περιλαμβάνουν τα lncRNA κρίνονται ως καλύτεροι διαγνωστικοί βιοδείκτες. Το μεγάλο τους πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί να εντοπίζονται στα σωματικά υγρά, καθιστώντας τα ως μοριακά εργαλεία για μη επεμβατικού τύπου διάγνωση, ενώ η αυξημένη ιστοειδικότητα και καρκινοειδικότητα της έκφρασης τους, παρέχει ευαισθησία στη διαδικασία της ταυτοποίησης της νόσου (Wu et al., 2014)

Η πειραματική επιβεβαίωση της άμεσης ρύθμισης ενός lncRNA από το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α στο γαστρικό καρκίνο αποτέλεσε και τον σκοπό της πτυχιακής εργασίας. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων του lncRNA HEAL, το οποίο προέκυψε από προηγούμενες πειραματικές και βιοπληροφορικές αναλύσεις του εργαστηρίου από δεδομένα RNA sequencing και CHIP sequencing και βρεθηκε ως πιθανός στόχος του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α, στην κυτταρική σειρά AGS που προέρχεται από καρκίνο του στομάχου και προχωρήσαμε σε μελέτη της πρόσδεσης τους ανοδικά από την θέση έναρξης της μεταγραφής του lncRNA HEAL. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα του πειράματος στον υποκινητή του συγκεκριμένου lncRNA φαίνεται να προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α, καθώς παρουσίασε μία ενίσχυση του σήματος του κατά 6 φορές στο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης και δευτερευόντως ο παράγοντας CDX2 με 2 φορές ενίσχυση στην ίδια θέση.

Επόμενο βήμα αποτέλεσε ο έλεγχος των επιπέδων του lncRNA HEAL σε πειράματα σίγησης και υπερέκφρασης των αντίστοιχων μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να διαπιστωθεί ο τρόπος της απορρύθμισης του σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Η σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α, πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της RNA παρεμβολής (RNAi) και της χρήσης συστήματος λεντιϊών, σε κυτταρική σειρά AGS για την μελέτη των διαφορετικά εκφρασμένων lncRNAs από την

καταστολή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων και ιδιαίτερα του lncHEAL. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση κατάλληλων αλληλουχιών shRNAs για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM και εισαγωγή τους στα κύτταρα AGS μέσω διαμόλυνσης με λεντιϊούς. Ωστόσο, μετά την ποσοτικοποίηση για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της σίγησης φάνηκε ότι επετεύχθει ήπια καταστολή για τον παράγοντα HNF4α και καθόλου καταστολή για τον CDX2. Συνεπώς κρίνεται αναγκαία η χρήση άλλων πλασμιδιακών φορέων ή επανασχεδιασμός νέων αλληλουχιών shRNA ειδικά για τον παράγοντα CDX2.

Παράλληλα η ανάλυση για την ρύθμιση του lncHEAL από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και KLF5 (που ενίοτε αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο CDX2/HNF4α και φαίνεται να επάγουν την μεταγραφή του HNF4α και του CDX2) σε πειράματα σίγησης, έδειξε μη στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης υπό τον έλεγχο του GATA4 χωρίς ωστόσο να αποτελεί σημαντική ένδειξη συμμετοχής στην ρύθμιση του lncHEAL (Chia et al., 2014 , San Roman et al., 2015). Τα παραπάνω δεδομένα αποτέλεσαν διερευνητικά βήματα για την χρήση του lncHEAL ως διαγνωστικού βιοδείκτη που σχετίζεται με την έκτοπή έκφραση των CDX2 και HNF4α στον καρκίνο του στομάχου.

Παράλληλα δημιουργήθηκε ένα μοριακό εργαλείο σίγησης με τη χρήση του συστήματος dCas9-KRAB-MeCP2, το οποίο ξεπερνά τα προβλήματα κλωνοποίησης μέσω των shRNA και δίνει ένα εύκολο και αποτελεσματικό εργαλείο σίγησης με τη χρήση λεντιϊών. Από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος, συμπεραίνουμε την επιτυχή έκφραση των γονιδίων dCas9, KRAB και MeCP2. Σε επόμενο στάδιο το σύστημα αυτό θα πρέπει να ελεγχθεί ως προς την αποτελεσματικότητα του μελετώντας τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA αλλά και γονιδίων στόχων των αντίστοιχων μεταγραφικών παραγόντων. Μελλοντικά θα πρέπει να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα σίγησης του με τον κατάλληλο σχεδιασμό των αντίστοιχων sgRNA έναντι των μεταγραφικών παραγόντων ώστε να διερευνηθεί και η απορρύθμιση των lncRNA στόχων τους.

6.Βιβλιογραφία

- Almeida, R., Silva, E., Santos-Silva, F., Silberg, D. G., Wang, J., De Bolós, C., & David, L. (2002, October 9). Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *The Journal of Pathology*, 199(1), 36–40. <https://doi.org/10.1002/path.1246>
- Ansari, S., Gantuya, B., Tuan, V., & Yamaoka, Y. (2018, August 16). Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2424. <https://doi.org/10.3390/ijms19082424>
- Assumpção, P. P., Barra, W. F., Ishak, G., Coelho, L. G. V., Coimbra, F. J. F., Freitas, H. C., Dias-Neto, E., Camargo, M. C., & Szklo, M. (2020, July 13). The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma. *BMC Gastroenterology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01354-4>
- Bai, Y. Q., Yamamoto, H., Akiyama, Y., Tanaka, H., Takizawa, T., Koike, M., Kenji Yagi, O., Saitoh, K., Takeshita, K., Iwai, T., & Yuasa, Y. (2002, February). Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. *Cancer Letters*, 176(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00753-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00753-4)
- Balakrishnan, M., George, R., Sharma, A., & Graham, D. Y. (2017, July 20). Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. *Current Gastroenterology Reports*, 19(8). <https://doi.org/10.1007/s11894-017-0575-8>
- Baretti, M., & Le, D. T. (2018b, September). DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 189, 45–62. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.04.004>
- Bolotin, E., Liao, H., Ta, T. C., Yang, C., Hwang-Verslues, W., Evans, J. R., Jiang, T., & Sladek, F. M. (2009, October 5). Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4α target genes using protein binding microarrays. *Hepatology*, 51(2), 642–653. <https://doi.org/10.1002/hep.23357>
- Bonhomme, C. (2003, October 1). The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut*, 52(10), 1465–1471. <https://doi.org/10.1136/gut.52.10.1465>
- Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H., & Theise, N. D. (2010, October 26), The International Agency for Research on Cancer, *WHO Classification of Tumours of the Digestive System [OP] (Medicine)* (4th ed.). World Health Organization.
- Boyd, M., Bressendorff, S., Møller, J., Olsen, J., & Troelsen, J. T. (2009, September 17). Mapping of HNF4α target genes in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-230x-9-68>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018, September 12). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Buffart, T. E., Louw, M., van Grieken, N. C., Tijssen, M., Carvalho, B., Ylstra, B., Grabsch, H., Mulder, C. J., van de Velde, C. J., van der Merwe, S. W., & Meijer, G. A. (2011, January 13). Gastric cancers of Western European and African patients show different patterns of genomic instability. *BMC Medical Genomics*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-7>
- Chawengsaksophak, K. (2019, November 14). Cdx2 Animal Models Reveal Developmental Origins of Cancers. *Genes*, 10(11), 928. <https://doi.org/10.3390/genes10110928>
- Chia, N. Y., Deng, N., Das, K., Huang, D., Hu, L., Zhu, Y., Lim, K. H., Lee, M. H., Wu, J., Sam, X. X., Tan, G. S., Wan, W. K., Yu, W., Gan, A., Tan, A. L. K., Tay, S. T., Soo, K. C., Wong, W. K., Dominguez, L. T. M., . . . Tan, P. (2014, July 22). Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes *KLF5*, *GATA4* and *GATA6* cooperatively promotes gastric cancer development. *Gut*, 64(5), 707–719. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306596>
- Cho, J., Ahn, S., Son, D., Kim, N. K., Lee, K., Kim, S., Lee, J., Park, S. H., Park, J. O., Kang, W. K., An, J. Y., Choi, M. G., Lee, J., Sohn, T. S., Bae, J. M., Kim, S., & Kim, K. (2019, November).

- Bridging genomics and phenomics of gastric carcinoma. *International Journal of Cancer*, 145(9), 2407–2417. <https://doi.org/10.1002/ijc.32228>
- Chong, J. M., Sakuma, K., Sudo, M., Osawa, T., Ohara, E., Uozaki, H., Shibahara, J., Kuroiwa, K., Tominaga, S. I., Hippo, Y., Aburatani, H., Funata, N., & Fukayama, M. (2002, July). Interleukin-1 β Expression in Human Gastric Carcinoma with Epstein-Barr Virus Infection. *Journal of Virology*, 76(13), 6825–6831. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6825-6831.2002>
 - Corso, G., Figueiredo, J., La Vecchia, C., Veronesi, P., Pravettoni, G., Macis, D., Karam, R., Lo Gullo, R., Provenzano, E., Toesca, A., Mazzocco, K., Carneiro, F., Seruca, R., Melo, S., Schmitt, F., Roviello, F., De Scalzi, A. M., Intra, M., Feroce, I., . . . Galimberti, V. (2018, June 21). Hereditary lobular breast cancer with an emphasis on E-cadherin genetic defect. *Journal of Medical Genetics*, 55(7), 431–441. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105337>
 - Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., & Ryffel, G. U. (1996, March). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 925–931. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.3.925>
 - Duncan, S. A., Manova, K., Chen, W. S., Hoodless, P., Weinstein, D. C., Bachvarova, R. F., & Darnell, J. E. (1994, August 2). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7598–7602. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7598>
 - Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J. P. M., Grenrum, W., Beijersbergen, R. L., & Bernards, R. (2016, April 25). CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nature Biotechnology*, 34(6), 631–633. <https://doi.org/10.1038/nbt.3536>
 - Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021b, April 22). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
 - Ferlita A, Battaglia R, Andronico F, Caruso S, Cianci A, Purrello M, Pietro CD.(2018,July) Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms19072120.
 - Ferlita, A., et al., *Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(7).
 - Fukayama, M., Abe, H., Kunita, A., Shinozaki-Ushiku, A., Matsusaka, K., Ushiku, T., & Kaneda, A. (2019, December 13). Thirty years of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Virchows Archiv*, 476(3), 353–365. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02724-4>
 - Gao, Y., Wang, J. W., Ren, J. Y., Guo, M., Guo, C. W., Ning, S. W., & Yu, S. (2020, June 28). Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application. *World Journal of Gastroenterology*, 26(24), 3401–3412. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i24.3401>
 - Garraway, L. A., & Sellers, W. R. (2006, August 1). Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(8), 593–602. <https://doi.org/10.1038/nrc1947>
 - Grabsch, H. I., Askham, J. M., Morrison, E. E., Pomjanski, N., Lickvers, K., Parsons, W. J., Boecking, A., Gabbert, H. E., & Mueller, W. (2003, November 27). Expression of BUB1 protein in gastric cancer correlates with the histological subtype, but not with DNA ploidy or microsatellite instability. *The Journal of Pathology*, 202(2), 208–214. <https://doi.org/10.1002/path.1499>
 - Guo, R. J., Funakoshi, S., Lee, H. H., Kong, J., & Lynch, J. P. (2009, September 4). The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits β -catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the β -catenin–TCF protein complex. *Carcinogenesis*, 31(2), 159–166. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp213>
 - Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., van de Vijver, M. J., Sukumar, S., & Chang, H. Y. (2010, April). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071–1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>
 - Ha Kim, G., Am Song, G., Youn Park, D., Han Lee, S., Hyun Lee, D., Oh Kim, T., Jae Jo, H., Heo, J., Hwan Kang, D., & Cho, M. (2006, January). CDX2 expression is increased in gastric cancers

- with less invasiveness and intestinal mucin phenotype. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(8), 880–886. <https://doi.org/10.1080/00365520500497140>
- Harbers, L., Agostini, F., Nicos, M., Poddighe, D., Bienko, M., & Crosetto, N. (2021, July 28). Somatic Copy Number Alterations in Human Cancers: An Analysis of Publicly Available Data From The Cancer Genome Atlas. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.700568>
 - Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C., & Rivard, N. (2001, June). Intestinal Epithelial Cell Differentiation Involves Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase That Regulates the Homeobox Transcription Factor CDX2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21885–21894. <https://doi.org/10.1074/jbc.m100236200>
 - Huarte, M., & Rinn, J. L. (2010, August 20). Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Human Molecular Genetics*, 19(R2), R152–R161. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq353>
 - Hung, T., Wang, Y., Lin, M. F., Koegel, A. K., Kotake, Y., Grant, G. D., Horlings, H. M., Shah, N., Umbricht, C., Wang, P., Wang, Y., Kong, B., Langerød, A., Børresen-Dale, A. L., Kim, S. K., van de Vijver, M., Sukumar, S., Whitfield, M. L., Kellis, M., . . . Chang, H. Y. (2011, June 5). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature Genetics*, 43(7), 621–629. <https://doi.org/10.1038/ng.848>
 - Ilic, M., & Ilic, I. (2022). Epidemiology of stomach cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 28(12), 9694. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i12.1187>
 - Iwakiri D, Eizuru Y, Tokunaga M, Takada K.(2003,November). Autocrine growth of Epstein-Barr virus-positive gastric carcinoma cells mediated by an Epstein-Barr virus-encoded small RNA. *Cancer Res.*;63(21).
 - Iyer, P., Moslim, M., Farma, J. M., & Denlinger, C. S. (2020, October). Diffuse gastric cancer: histologic, molecular, and genetic basis of disease. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 5, 52–52. <https://doi.org/10.21037/tgh.2020.01.02>
 - Kim, J. W., Lee, H. S., Nam, K. H., Ahn, S., Kim, J. W., Ahn, S. H., Park, D. J., Kim, H. H., & Lee, K. W. (2017, June 28). *PIK3CA* mutations are associated with increased tumor aggressiveness and Akt activation in gastric cancer. *Oncotarget*, 8(53), 90948–90958. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18770>
 - Lee, J. H., Kim, S. H., Han, S. H., An, J. S., Lee, E. S., & Kim, Y. S. (2009, March). Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: A meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(3), 354–365. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05775.x>
 - Lee, J., & Kim, K. M. (2017, June 30). Biomarkers for gastric cancer: molecular classification revisited. *Precision and Future Medicine*, 1(2), 59–68. <https://doi.org/10.23838/pfm.2017.00079>
 - Lee, T., Tanaka, H., Ohira, M., Okita, Y., Yoshii, M., Sakurai, K., Toyokawa, T., Kubo, N., Muguruma, K., Tanaka, S., Ohsawa, M., & Hirakawa, K. (2014). Clinical Impact of the Extent of Lymph Node Micrometastasis in Undifferentiated-Type Early Gastric Cancer. *Oncology*, 86(4), 244–252. <https://doi.org/10.1159/000358803>
 - Li, Y., Eshak, E. S., Shirai, K., Liu, K., Dong, J., Iso, H., & Tamakoshi, A. (2021b, January 5). Alcohol Consumption and Risk of Gastric Cancer: The Japan Collaborative Cohort Study. *Journal of Epidemiology*, 31(1), 30–36. <https://doi.org/10.2188/jea.je20190304>
 - Ling, Y., Watanabe, Y., Nagahashi, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Wakai, T., & Okuda, S. (2020). Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3301–3308. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.021>
 - Liu, J., Li, H., Sun, L., Yuan, Y., & Xing, C. (2020, June 8). Profiles of PD-1, PD-L1, PD-L2 in Gastric Cancer and Their Relation with Mutation, Immune Infiltration, and Survival. *BioMed Research International*, 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/2496582>
 - MA, J., SHEN, H., KAPESA, L., & ZENG, S. (2016, March 16). Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncology Letters*, 11(5), 2959–2964. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4337>
 - Machairiotis, N., Zarogoulidis, P., Stylianaki, Tsimogiannis, Kougioumtzi, & Katsikogiannis. (2013, March). Gastrointestinal stromal tumor mesenchymal neoplasms: the offspring that

- choose the wrong path. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 127.
<https://doi.org/10.2147/jmdh.s43703>
- Mallo, G. V., Soubeyran, P., Lissitzky, J. C., André, F., Farnarier, C., Marvaldi, J., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (1998, May). Expression of the Cdx1 and Cdx2 Homeotic Genes Leads to Reduced Malignancy in Colon Cancer-derived Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 14030–14036. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.14030>
 - Martin, S. A., Hewish, M., Lord, C. J., & Ashworth, A. (2009). Genomic instability and the selection of treatments for cancer. *The Journal of Pathology*, n/a-n/a.
<https://doi.org/10.1002/path.2631>
 - Matsuda, M., Sentani, K., Noguchi, T., Hinoi, T., Okajima, M., Matsusaki, K., Sakamoto, N., Anami, K., Naito, Y., Oue, N., & Yasui, W. (2010, August 17). Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: Claudin-18 is associated with poor prognosis. *Pathology International*, 60(10), 673–680. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02587.x>
 - Morgan, E., Arnold, M., Camargo, M. C., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Meheus, F., Verhoeven, R. H., Vignat, J., Laversanne, M., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2022, May). The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *EClinicalMedicine*, 47, 101404.
<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101404>
 - Nam, S., Kim, J. H., & Lee, D. H. (2019, May 15). RHOA in Gastric Cancer: Functional Roles and Therapeutic Potential. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00438>
 - Necula, L., Matei, L., Dragu, D., Neagu, A. I., Mambet, C., Nedeianu, S., Bleotu, C., Diaconu, C. C., & Chivu-Economescu, M. (2019, May 7). Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World Journal of Gastroenterology*, 25(17), 2029–2044.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i17.2029>
 - Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I., & Young, R. A. (2004, February 27). Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. *Science*, 303(5662), 1378–1381. <https://doi.org/10.1126/science.1089769>
 - Pardini, B., Sabo, A. A., Birolo, G., & Calin, G. A. (2019, August 14). Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. *Cancers*, 11(8), 1170. <https://doi.org/10.3390/cancers11081170>
 - Pasechnikov, V. (2014b). Gastric cancer: Prevention, screening and early diagnosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(38), 13842. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13842>
 - Petrovich, I., & Ford, J. M. (2016b, October). Genetic predisposition to gastric cancer. *Seminars in Oncology*, 43(5), 554–559.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.08.006>
 - Prensner JR, Chinnaiyan AM. (2011, October), The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* (5):391-407. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0209.
 - Rajavelu, A., Lungu, C., Emperle, M., Dukatz, M., Bröhm, A., Broche, J., Hanelt, I., Parsa, E., Schiffrers, S., Karnik, R., Meissner, A., Carell, T., Rathert, P., Jurkowska, R. Z., & Jeltsch, A. (2018, August 8). Chromatin-dependent allosteric regulation of DNMT3A activity by MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 46(17), 9044–9056. <https://doi.org/10.1093/nar/gky715>
 - Ratti, M., Lampis, A., Hahne, J. C., Passalacqua, R., & Valeri, N. (2018, September 1). Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(22), 4151–4162.
<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2906-9>
 - Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterology Review*, 14(1), 26–38. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>
 - Ricci, R., & Colasante, G. (2021). CRISPR/dCas9 as a Therapeutic Approach for Neurodevelopmental Disorders: Innovations and Limitations Compared to Traditional Strategies. *Developmental Neuroscience*, 43(3–4), 253–261.
<https://doi.org/10.1159/000515845>
 - Richa, Sharma, N., & Sageena, G. (2022, April 1). Dietary factors associated with gastric cancer - a review. *Translational Medicine Communications*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s41231-022-00111-x>

- Rodriquez, M. G., Roviello, G., D'Angelo, A., Lavacchi, D., Roviello, F., & Polom, K. (2020, May 11). MSI and EBV Positive Gastric Cancer's Subgroups and Their Link with Novel Immunotherapy. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1427. <https://doi.org/10.3390/jcm9051427>
- Sakuma, K., Chong, J. M., Sudo, M., Ushiku, T., Inoue, Y., Shibahara, J., Uozaki, H., Nagai, H., & Fukayama, M. (2004). High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *International Journal of Cancer*, 112(2), 273–278. <https://doi.org/10.1002/ijc.20420>
- San Roman, A. K., Aronson, B. E., Krasinski, S. D., Shivdasani, R. A., & Verzi, M. P. (2015, January). Transcription Factors GATA4 and HNF4A Control Distinct Aspects of Intestinal Homeostasis in Conjunction with Transcription Factor CDX2. *Journal of Biological Chemistry*, 290(3), 1850–1860. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.620211>
- Sivachandran, N., Dawson, C. W., Young, L. S., Liu, F. F., Middeldorp, J., & Frappier, L. (2012, January). Contributions of the Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein to Gastric Carcinoma. *Journal of Virology*, 86(1), 60–68. <https://doi.org/10.1128/jvi.05623-11>
- Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., & Darnell, J. E. (1990, December 1). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes & Development*, 4(12b), 2353–2365. <https://doi.org/10.1101/gad.4.12b.2353>
- Spizzo, R., Almeida, M. I., Colombatti, A., & Calin, G. A. (2012, January 23). Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene*, 31(43), 4577–4587. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.621>
- Sun, X., Yang, Q., Rogers, C. J., Du, M., & Zhu, M. J. (2017, February 24). AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death & Differentiation*, 24(5), 819–831. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.14>
- Tan, H., Zhang, S., Zhang, J., Zhu, L., Chen, Y., Yang, H., Chen, Y., An, Y., & Liu, B. (2020). Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications. *Theranostics*, 10(19), 8880–8902. <https://doi.org/10.7150/thno.47548>
- Thakore, P. I., D'Ippolito, A. M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N. K., Kabadi, A. M., Reddy, T. E., Crawford, G. E., & Gersbach, C. A. (2015, October 26). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nature Methods*, 12(12), 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3630>
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Freier, S. M., Bennett, C. F., Sharma, A., Bubulya, P. A., Blencowe, B. J., Prasanth, S. G., & Prasanth, K. V. (2010, September). The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Molecular Cell*, 39(6), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.011>
- Tsagakis, I., Douka, K., Birds, I., & Aspden, J. L. (2020, March 16). Long non-coding RNAs in development and disease: conservation to mechanisms. *The Journal of Pathology*, 250(5), 480–495. <https://doi.org/10.1002/path.5405>
- Tsai, C. K., Yeh, T. S., Wu, R. C., Lai, Y. C., Chiang, M. H., Lu, K. Y., Hung, C. Y., Ho, H. Y., Cheng, M. L., & Lin, G. (2018, September 7). Metabolomic alterations and chromosomal instability status in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 24(33), 3760–3769. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i33.3760>
- van der Post, R. S., & Carneiro, F. (2017b, December). Emerging Concepts in Gastric Neoplasia. *Surgical Pathology Clinics*, 10(4), 931–945. <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.07.011>
- van der Post, R. S., Vogelaar, I. P., Carneiro, F., Guilford, P., Huntsman, D., Hoogerbrugge, N., Caldas, C., Chelcun Schreiber, K. E., Hardwick, R. H., Ausems, M. G. E. M., Bardram, L., Benusiglio, P. R., Bisseling, T. M., Blair, V., Bleiker, E., Boussioutas, A., Cats, A., Coit, D., DeGregorio, L., . . . Fitzgerald, R. C. (2015, May 15). Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *Journal of Medical Genetics*, 52(6), 361–374. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103094>
- van der Woude, C. J. (2003, September 1). Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. *Journal of Clinical Pathology*, 56(9), 699–702. <https://doi.org/10.1136/jcp.56.9.699>

- Verzi, M. P., Shin, H., San Roman, A. K., Liu, X. S., & Shivdasani, R. A. (2013, January 15). Intestinal Master Transcription Factor CDX2 Controls Chromatin Access for Partner Transcription Factor Binding. *Molecular and Cellular Biology*, 33(2), 281–292. <https://doi.org/10.1128/mcb.01185-12>
- Verzi, M., Shin, H., He, H., Sulahian, R., Meyer, C., Montgomery, R., Fleet, J., Brown, M., Liu, X., & Shivdasani, R. (2014, December). Differentiation-Specific Histone Modifications Reveal Dynamic Chromatin Interactions and Partners for the Intestinal Transcription Factor CDX2. *Developmental Cell*, 31(6), 801. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.006>
- Vlăduț, C., Ciocirlan, M., Costache, R., Jinga, M., Balaban, V., Costache, D., & Diculescu, M. (2020, July 23). Is mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma an infectious disease? Role of *Helicobacter pylori* and eradication antibiotic therapy (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9031>
- Waddell, T., Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013, October). Gastric cancer: ESMO–ESSO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24, vi57–vi63. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt344>
- Waldum, H., & Fossmark, R. (2018b, December 18). Types of Gastric Carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4109. <https://doi.org/10.3390/ijms19124109>
- Wang, Q., Liu, G., & Hu, C. (2019). Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology Research*, 12(6), 275–282. <https://doi.org/10.14740/gr1187>
- Wang, Y., He, L., Du, Y., Zhu, P., Huang, G., Luo, J., Yan, X., Ye, B., Li, C., Xia, P., Zhang, G., Tian, Y., Chen, R., & Fan, Z. (2015, April). The Long Noncoding RNA lncTCF7 Promotes Self-Renewal of Human Liver Cancer Stem Cells through Activation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell*, 16(4), 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.03.003>
- Wierzbicki, A. T., Haag, J. R., & Pikaard, C. S. (2008, November). Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell*, 135(4), 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.035>
- Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010, October). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 713–739. <https://doi.org/10.1128/cmr.00011-10>
- Wu, C. C., Hsu, T. W., Yeh, C. C., & Huang, H. B. (2020). The role of transcription factor caudal-related homeobox transcription factor 2 in colorectal cancer. *Tzu Chi Medical Journal*, 32(4), 305. https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_49_20
- Wu, H. H., Lin, W. C., & Tsai, K. W. (2014). Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: miRNAs as emerging novel cancer markers. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 16. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.16>
- Wu, R., Su, Y., Wu, H., Dai, Y., Zhao, M., & Lu, Q. (2016, February 17). Characters, functions and clinical perspectives of long non-coding RNAs. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(3), 1013–1033. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1179-y>
- Yamamoto, H., & Imai, K. (2015, February 22). Microsatellite instability: an update. *Archives of Toxicology*, 89(6), 899–921. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1474-0>
- Yang, Z., Wang, W., Lu, J., Pan, G., Pan, Z., Chen, Q., Liu, W., & Zhao, Y. (2018b). Gastric Neuroendocrine Tumors (G-Nets): Incidence, Prognosis and Recent Trend Toward Improved Survival. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(1), 389–396. <https://doi.org/10.1159/000486915>
- Yau, T. O. (2014b). Epigenetic dysregulation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Disease and treatments. *World Journal of Gastroenterology*, 20(21), 6448. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6448>
- Yuza, K., Nagahashi, M., Watanabe, S., Takabe, K., & Wakai, T. (2017, December 1). Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget*, 8(67), 112103–112115. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22783>
- Zhang, W. (2014, September 16). TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics. *Chinese Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10117>

