



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΠΟΛΥΞΕΝΗ ΓΟΡΓΙΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

**"Μελέτη της ρύθμισης των μη κωδικοποιητικών μορίων
RNA στην καρκινογένεση"**

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δανιέλα Τσίκου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σωτήριος Βασιλειάδης, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είχα την ευκαιρία και την χαρά να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής υπό την επίβλεψη του Επικ. Καθ. Αντώνιου Γιακουντή.

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον κ. Γιακουντή για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο ερευνητικό project, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή του, την κατανόηση και υπομονή που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου. Ωστόσο, σημαντικός παράγοντας στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν τα μέλη αυτού του εργαστηρίου και δεν μπορώ παρά να ευχαριστήσω καθέναν και καθεμία τους μεμονωμένα.

Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Ελένη-Ροντιόλα Μπεγκόλλι για την εκπαίδευσή μου στο εργαστήριο, την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε σε κάθε βήμα της διπλωματικής μου εργασίας, την άριστη συνεργασία, την ψυχολογική υποστήριξη και κατανόηση και τον χρόνο που διέθετε για την επίλυση των αποριών μου, παρόλο που ξέρω ότι της ήταν εξαιρετικά πολύτιμος. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Μυρτώ Χατζηαγγέλου που ήταν δίπλα μου κάθε φορά που την χρειαζόμουν, ακόμη και αν δεν σχετιζόταν άμεσα με το project μου, για να με συμβουλέψει τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Αν και συνυπήρξαμε ελάχιστα μέσα στο εργαστήριο, η συνεργασία με την Ελένη Σταμπούλογλου και τον Απόστολο Καραγιάννη κατά την εργαστηριακή εκπαίδευσή μου και έπειτα στην έναρξη της διπλωματικής μου εργασίας ήταν καθοριστική και εξαιρετικά πολύτιμη για την επιτυχή έκβασή της. Ακόμη, η συνύπαρξη με τα μέλη του εργαστηρίου υπό την επίβλεψη του κ. Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου συντέλεσε στο ευχάριστο κλίμα του εργαστηρίου που βίωνα καθημερινά. Τέλος, το να ευχαριστήσω είναι λίγο για τους μεταπτυχιακούς φοιτητές που εκπονήσαμε ταυτόχρονα τις διπλωματικές μας εργασίες, Μαριλένα Μοσχοπούλου και Χρήστο Γιαννακά. Η συνεργασία, η αλληλοϋποστήριξη και η φιλία που αναπτύξαμε με αυτούς τους δύο ανθρώπους ήταν καταλυτικοί παράγοντες για την διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας και αποτέλεσαν έναν από τους λόγους που είμαι ευγνώμων για αυτήν την εμπειρία μου. Με όλους τους παραπάνω υπέροχους ανθρώπους οποιαδήποτε δυσκολία στην καθημερινότητα ήταν αφορμή γέλιου και χαράς.

Κλείνοντας, είμαι ευγνώμων για την οικογένειά μου, τους φίλους μου και τον σύντροφό μου για αυτούς τους ανθρώπους που είναι και που τους έχω στην ζωή μου. Η στήριξη και η αγάπη που μου δείχνουν καθημερινά μου έδωσαν και μου δίνουν δύναμη για κάθε βήμα της πορείας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος με υψηλό ποσοστό εμφάνισης, που αποτελεί μια σημαντική αιτία θανάτου από την νόσο παγκοσμίως. Ο ασυμπτωματικός χαρακτήρας του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου στα πρώιμα στάδια και η απουσία ειδικών και ευαίσθητων βιοδεικτών συμβάλλουν στην παρουσία προχωρημένου γαστρικού καρκίνου κατά τη στιγμή της διάγνωσης, ο οποίος χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση και ανταπόκριση στα θεραπευτικά σχήματα. Επομένως, καθίσταται επείγουσα η ανάγκη ανεύρεσης νέων αξιόπιστων βιοδεικτών και αποτελεσματικών θεραπειών για την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της νόσου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας CDX2 και HNF4α, οι οποίοι ενώ εμπλέκονται στην φυσιολογική ρύθμιση της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του εντέρου, η τυχόν έκτοπη έκφραση τους στον γαστρικό βλεννογόνο, σχετίζεται με ανάπτυξη γαστρικής εντερικής μεταπλασίας που οδηγεί σε γαστρικό καρκίνο. Ως εκ τούτου, λόγω της έκφρασης και απαραίτητης λειτουργίας των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς, καθίστανται ακατάλληλοι ως θεραπευτικοί στόχοι ή/και διαγνωστικοί δείκτες. Συνεπώς ερευνητικά το ενδιαφέρον στρέφεται σε καθοδικούς ρυθμιστικούς στόχους αυτών των πρωτεϊνών που εμφανίζουν καρκινοειδικότητα και ιστοειδικότητα, όπως τα lncRNA.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ρύθμισης των lncRNA-στόχων των ογκογονιδίων επιβίωσης γενεαλογίας CDX2 και HNF4α στον γαστρικό καρκίνο. Αρχικά κατασκευάστηκαν εργαλεία παροδικής σίγησης των παραγόντων CDX2 και HNF4α και από τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της καταστολής, βρέθηκε ότι το εργαλείο σίγησης του HNF4α προκαλεί αποτελεσματική καταστολή σε κύτταρα AGS. Το εργαλείο σίγησης του CDX2 οδήγησε σε αποτελεσματική καταστολή σε μεταγραφικό επίπεδο σε κύτταρα MKN45 και παραμένει να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα της σίγησης σε πρωτεϊνικό επίπεδο και να δοκιμαστεί σε κύτταρα AGS. Μέσω ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για τον CDX2 και τον HNF4α αποδείχθηκε ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες λειτουργούν ως μεταγραφικό σύμπλοκο για την ρύθμιση των καθοδικών lncRNA-στόχων τους σε καρκινικά γαστρικά κύτταρα. Με βάση τις ChIP-qPCR που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι οι υποκινητές των lncRNA HNF4α TG1 και GATA4/HNF4α TG3 (Target Genes-TG) βρίσκονται υπό την ρύθμιση του μεταγραφικού συμπλόκου CDX/HNF4α, ενώ οι υποκινητές των lncRNA G4/HNF4α TG4, cRENA1/2 και HNF4α TG3 ρυθμίζονται μεμονωμένα από τον HNF4α. Μελλοντικά απομένει να ελεγχθεί η έκφραση των παραπάνω στόχων υπό την σίγηση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών τους και να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης για τους CDX2 και HNF4α με σκοπό την ανεύρεση *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων στα οποία προσδένονται οι εν λόγω παράγοντες και τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση των lncRNA- στόχων που προάγουν ή αναστέλλουν τον γαστρικό καρκίνο.

Λέξεις – κλειδιά: γαστρικός καρκίνος, μεταγραφικοί παράγοντες, lineage survival, lncRNA, ChIP

ABSTRACT

Gastric cancer is a multifactorial disease with a high incidence rate that is considered to be a major cause of cancer deaths worldwide. The asymptomatic nature of the disease during early stages and the absence of specific and sensitive biomarkers contribute to the onset of advanced gastric cancer at the time of diagnosis, which is characterized by poor prognosis and weak response to treatment regimens. Therefore, there is an urgent need to develop new reliable biomarkers and effective treatments for early diagnosis and treatment of this neoplasia. The lineage survival transcription factors CDX2 and HNF4a, two master regulators of intestinal development and differentiation, are of particular interest since their ectopic expression in gastric mucosa leads to the development of intestinal metaplasia and subsequently to gastric cancer. However, due to their expression and critical function in various physiological tissues, they are inappropriate as therapeutic targets and/or diagnostic markers. Downstream regulatory targets of these proteins that exhibit carcinogenicity and tissue specificity, such as lncRNAs, are gaining interest.

This thesis aims to study the regulation of lncRNA by the lineage survival transcription factors CDX2 and HNF4a in gastric cancer. Initially, transient silencing tools for CDX2 and HNF4a were constructed and their repression efficacy was tested. It was found that the HNF4a silencing tool induces effective repression in AGS cells. The CDX2 silencing tool resulted in effective repression at the transcriptional level in MKN45 cells and its silencing efficacy remains to be investigated in AGS cells. Chromatin immunoprecipitation revealed that both transcription factors function as a transcriptional complex to regulate some of their downstream lncRNA targets in gastric cancer cells. More specifically, based on ChIP-qPCR results, it was found that the lncRNA promoters of HNF4a TG1 and GATA4/HNF4a TG3 (Target Genes-TG) are regulated by the CDX2/HNF4a transcriptional complex, whereas the lncRNA promoters of GATA4/HNF4a TG4, cRENA1/2 and HNF4a TG3 are regulated solely by HNF4a. Future experiments will test the expression of these targets through silencing of their regulatory proteins along with ChIP-seq of the immunoprecipitated chromatin for CDX2 and HNF4a in order to find *cis*-regulatory elements to which these factors bind and which are involved in the regulation of lncRNA targets that promote or inhibit gastric cancer.

Keywords: gastric cancer, transcription factors, lineage survival, lncRNA, ChIP

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1.	Γαστρικός Καρκίνος.....	1
1.1.1.	Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου	1
1.1.2.	Ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου.....	2
1.1.2.1.	Ιστοπαθολογική ταξινόμηση	2
1.1.2.2.	Μοριακή αιτιοπαθογένεια και ταξινόμηση της νόσου	3
1.1.3.	Προκλήσεις του γαστρικού καρκίνου	6
1.2.	Μεταγραφικοί παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας.....	6
1.2.1.	Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2	8
1.2.1.1.	Φυσιολογικός ρόλος του CDX2 στο γαστρεντερικό σύστημα	8
1.2.1.2.	Ο ρόλος του CDX2 στον γαστρικό καρκίνο	9
1.2.2.	Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a	10
1.2.2.1.	Φυσιολογικός ρόλος του HNF4a στο γαστρεντερικό σύστημα	11
1.2.2.2.	Ο ρόλος του HNF4a στον γαστρικό καρκίνο	12
1.3.	Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA	13
1.3.1.	Χαρακτηριστικά των lncRNA	13
1.3.2.	Λειτουργίες των lncRNA	14
1.3.3.	Ο ρόλος των lncRNA στον γαστρικό καρκίνο.....	15
1.3.4.	Τα lncRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες στον γαστρικό καρκίνο	16
1.4.	Σκοπός της εργασίας.....	18
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1.	Κυτταρικές σειρές	19
2.2.	Κλωνοποίηση ενθέματος (shRNA) σε πλασμιδιακό φορέα	19
2.3.	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	20
2.4.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (plasmid DNA, pDNA)	21
2.5.	Διαγνωστικές πέψεις	21
2.6.	Απομόνωση RNA.....	22
2.7.	Κατεργασία με DNase (DNase treatment)	22
2.8.	Σύνθεση cDNA (cDNA synthesis).....	23
2.9.	Ποσοτική PCR (qPCR)	24
2.10.	Απομόνωση πρωτεϊνών	25
2.11.	Western Blot.....	25
2.12.	Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)	27
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28

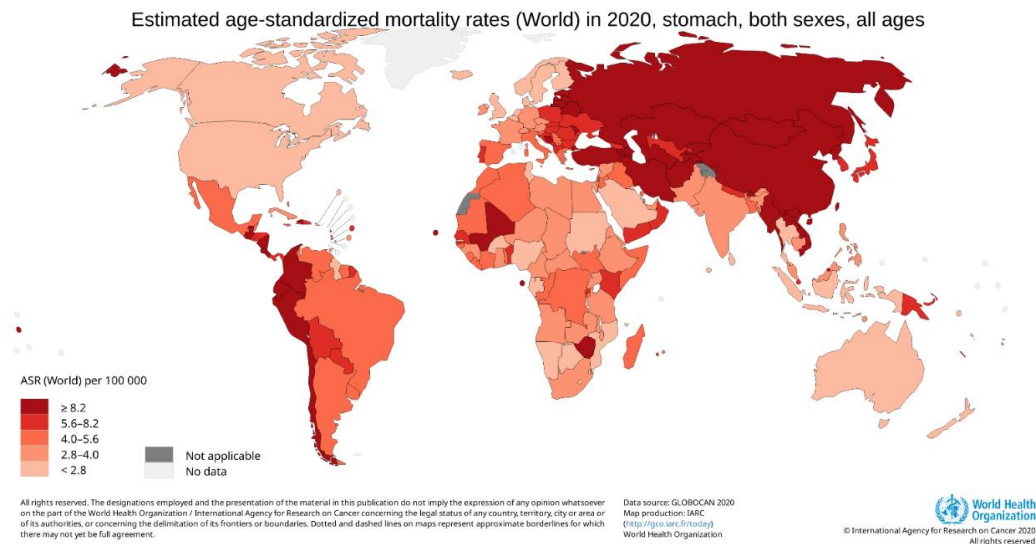
3.1.	Πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 σε γαστρικές κυτταρικές σειρές.....	28
3.2.	RNAi σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α.....	29
3.3.1.	Αποτελέσματα διαγνωστικών πύψεων για την ανίχνευση πλασμιδιακών φορέων με ένθεμα shRNA.....	29
3.3.2.	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α σε μεταγραφικό επίπεδο και μεταφραστικό επίπεδο	31
3.3.	Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.....	34
3.3.1.	Βελτιστοποίηση συνθηκών κατακερματισμού της χρωματίνης στις κυτταρικές σειρές MKN45 και KATOIII.....	34
3.3.2.	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας των πειραμάτων ChIP για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α.....	37
3.3.3.	Αποτελέσματα ChIP-qPCR για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α	37
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γαστρικός Καρκίνος

1.1.1.Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου

Ο γαστρικός καρκίνος (ΓΚ) είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, η οποία οφείλεται τόσο σε ποικίλους περιβαλλοντικούς όσο και σε γενετικούς παράγοντες του ασθενούς [1]. Αποτελεί τον πέμπτο πιο συχνό τύπο καρκίνου παγκοσμίως μετά από τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του προστάτη [2]. Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) [3], το έτος 2020 σημειώθηκαν 1.089.103 νέες περιπτώσεις ΓΚ, οι οποίες αντιστοιχούν στο 5,6% της παγκόσμιας συχνότητας όλων των τύπων καρκίνου. Όσον αφορά την θνησιμότητα, ο αριθμός των θανάτων που προκλήθηκαν από ΓΚ ανέρχεται στους 768.793, κατατάσσοντας τον ΓΚ ως την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο [2]. Μέχρι πρότινος, η διάγνωση του καρκίνου του στομάχου γινόταν κατά κύριο λόγο σε άτομα άνω των 50 ετών, με άτομα μεγαλύτερης ηλικίας να διατρέχουν και μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [4]. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί τα περιστατικά που διαγιγνώσκονται σε νεότερες γενιές σε διάφορες χώρες όπως η Σουηδία, το Ηνωμένο Βασίλειο και το Εκουαδόρ [5]. Ανεξαρτήτως ηλικίας, ο καρκίνος του στομάχου εμφανίζεται περίπου δύο φορές πιο συχνά στους άντρες από ότι στις γυναίκες σε όλον τον κόσμο [3, 6, 7], αν και σύμφωνα με νεότερα δεδομένα φαίνεται ότι τα αυξημένα περιστατικά ΓΚ, συγκεκριμένα του ΓΚ του άντρου, που παρατηρούνται σε νεαρούς ενήλικες σημειώνονται σε γυναίκες σε σχέση με τους άντρες [8]. Τα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας του καρκίνου του στομάχου παρουσιάζουν γεωγραφική διαφοροποίηση ανά την υφήλιο, ωστόσο το πρότυπο γεωγραφικής ποικιλότητας που εμφανίζουν είναι παρόμοιο. Συγκεκριμένα, υψηλά ποσοστά συναντώνται στην Α. Ασία, Α. και Κ. Ευρώπη και στην Ν. Αμερική, με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης να παρατηρείται σε Μογγολία και Ιαπωνία. Αντιθέτως, περιοχές που χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα ποσοστά είναι περιοχές της Αφρικής, η Β. Αμερική, η Β. Ευρώπη και η Αυστραλία (**Εικόνα 1**) [2, 3].



Εικόνα 1. Εκτιμώμενα ποσοστά θνησιμότητας του ΓΚ ανά τον κόσμο ανεξαρτήτως ηλικίας και φύλου. Με σκούρες και ανοιχτές αποχρώσεις απεικονίζονται περιοχές με υψηλή και χαμηλή θνησιμότητα αντίστοιχα. (ASR per 100.000: θνησιμότητα εκφρασμένη ως ηλικιακά τυποποιημένος ρυθμός ανά 100.000 άτομα ανά χρόνο) [3].

Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΓΚ, ο πιο σημαντικός είναι η λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό υγείας (WHO), με 1-2% των ατόμων που έχουν μολυνθεί από το βακτήριο να αναπτύσσουν ΓΚ παγκοσμίως [9]. Η καρκινογενετική δράση του *H. pylori* επάγεται κυρίως μέσω της τροποποίησης του γαστρικού βλεννογόνου από τη μολυσματική πρωτεΐνη CagA [10]. Ένας ακόμη μολυσματικός παράγοντας που συμβάλλει στην εκδήλωση ΓΚ είναι ο ιός Epstein-Barr (EBV) με περίπου 10% των ΓΚ παγκοσμίως να σχετίζονται με μόλυνση από τον ιό [11]. Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες αποτελούν η γεωγραφική τοποθεσία, το κάπνισμα και η διατροφή, ιδίως η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και πρόσληψη αλατιού [12]. Η συμβολή της γενετικής προδιάθεσης είναι επίσης σημαντική. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις ΓΚ είναι σποραδικές, περίπου το 10% των περιπτώσεων παρουσιάζουν οικογενή συνάθροιση και το 1-3% οφείλεται σε κληρονομικούς παράγοντες. Τα κληρονομικά σύνδρομα γαστρικού καρκίνου περιλαμβάνουν το αυτοσωμικό επικρατές κληρονομικό σύνδρομο διάχυτου γαστρικού καρκίνου (Hereditary Diffuse Gastric Cancer, HDGC), το οποίο οφείλεται σε μεταλλάξεις βλαστικής σειράς του γονιδίου *CDH1* που κωδικοποιεί την ε-καδχερίνη [13], το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και εγγύς πολύποδας του στομάχου και ο οικογενής εντερικός γαστρικός καρκίνος [14].

1.1.2. Ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου

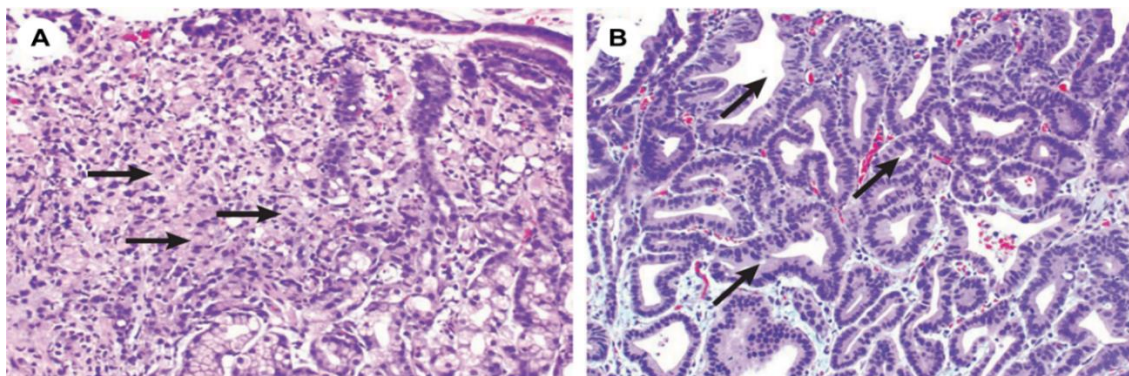
Οι περισσότεροι γαστρικοί καρκίνοι είναι γαστρικά αδενοκαρκινώματα, τα οποία αντιστοιχούν στο 95% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου και ξεκινούν από τους αδένες του βλεννογόνιου χιτώνα του στομάχου [15]. Λόγω της μεγάλης μοριακής και μορφολογικής ετερογένειας που τα χαρακτηρίζει, έχουν διαμορφωθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης, που κατηγοριοποιούν τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα σε επιμέρους υποτύπους σύμφωνα με την ανατομική θέση του όγκου (γαστρικό αδενοκαρκίνωμα της καρδιακής μοίρας του στομάχου και μη-καρδιακό γαστρικό αδενοκαρκίνωμα) και βάσει ιστοπαθολογικών ή μοριακών κριτηρίων [15, 16].

1.1.2.1. Ιστοπαθολογική ταξινόμηση

Το πιο διαδεδομένο και ευρέως εφαρμοσμένο σύστημα ιστοπαθολογικής διάκρισης είναι το σύστημα κατά Lauren, που προτάθηκε το 1965 [17, 18]. Σύμφωνα με αυτό το σύστημα, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διακρίνεται σε δύο υπότυπους, τον εντερικό και τον διάχυτο υπότυπο.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα του εντερικού υπότυπου είναι ο σχηματισμός σωληνοειδών δομών που μοιάζουν με αδένες από τα κακοήθη κύτταρα, προσδίδοντας στον γαστρικό επιθήλιο την εικόνα ενός εντερικού βλεννογόνου (**Εικόνα 2B**). Τα καρκινικά κύτταρα είναι συνεκτικά μεταξύ τους, σχηματίζοντας έναν συμπαγή όγκο, η ανάπτυξη του οποίου χαρακτηρίζεται από σαφή όρια εξάπλωσης [19]. Ο εντερικός τύπος έχει συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση, εμφανίζεται σε μεγάλους σε ηλικία άντρες [20] και είναι ο κυρίαρχος υπότυπος σε περιοχές υψηλού κινδύνου [21]. Η ανάπτυξή του είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιων και διαδοχικών, προκαρκινικών αλλοιώσεων που λαμβάνουν χώρα στον βλεννογόνο του στομάχου, γνωστό ως μονοπάτι του Correa [22]. Η πορεία των προκαρκινικών αλλοιώσεων ξεκινάει με το στάδιο της χρόνιας γαστρίτιδας, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή του γαστρικού βλεννογόνου που επάγεται από λοίμωξη από το *H. pylori* και ακολουθείται από ατροφική γαστρίτιδα με απώλεια των φυσιολογικών αδένων του βλεννογόνου. Στο επόμενο στάδιο (εντερική μεταπλασία) τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου αντικαθίστανται από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Τελικό στάδιο πριν την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος είναι η δυσπλασία ή ενδοθηλιακή νεοπλασία, κατά την οποία τα κύτταρα με εντερικό φαινότυπο παρουσιάζουν ανώμαλη ανάπτυξη, χωρίς όμως να διεισδύουν στον ιστό [23]. Η

εντερική μεταπλασία, ιδίως η ατελούς τύπου, αποτελεί σημαντικό παράγοντα υψηλού κινδύνου ανάπτυξης γαστρικού αδενοκαρκινώματος [24].



Εικόνα 2. Απεικόνιση ιστών γαστρικού αδενοκαρκινώματος ύστερα από χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. (Α) Διάχυτος υπότυπος. Τα βέλη δείχνουν κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου. (Β) Εντερικός υπότυπος. Τα βέλη δείχνουν αδενικούς σχηματισμούς [15].

Στον διάχυτο υπότυπο τα καρκινικά κύτταρα απαντώνται ως μονήρη ή σε μικρές ομάδες, διηθούν με διάχυτο τρόπο τον βλεννογόνο του στομάχου, χωρίς να σχηματίζουν έναν συμπαγή και καλά ορισμένο όγκο [19]. Τα κύτταρα μπορεί να εκδηλώνουν φαινότυπο δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (μορφολογία κατά την οποία ο πυρήνας εξωθείται στην περιφέρεια του κυττάρου λόγω της άφθονης κυτταροπλασματικής βλεννίνης) (Εικόνα 2Α), φαινότυπος ο οποίος σχετίζεται με κακή πρόγνωση [25] και αντίσταση σε θεραπεία [26]. Συγκριτικά με τον εντερικό υπότυπο, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διάχυτου υπότυπου έχει χειρότερη πρόγνωση [27] και υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα επανεμφάνισης της νόσου [20]. Όσον αφορά την επιδημιολογία του συγκεκριμένου υπότυπου, εμφανίζεται συνήθως σε νεαρές ηλικίες και τα ποσοστά εμφάνισης στα δύο φύλα είναι παρόμοια [28]. Σε αντίθεση με το εντερικό γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, η παθογενετική πορεία του διάχυτου υπότυπου παραμένει ως επί το πλείστον άγνωστη και υπομελετημένη. Φαίνεται, ωστόσο, να εξορμά απευθείας από χρόνια γαστρίτιδα [29] και θεωρείται ότι το γενετικό υπόβαθρο κατέχει σημαντικό ρόλο σε σχέση με περιβαλλοντικούς παράγοντες στην παθογένεσή του, αν και υπάρχουν αρκετές ενδείξεις της συσχέτισης του διάχυτου υπότυπου με την λοίμωξη από στελέχη *H. pylori* [30].

1.1.2.2. Μοριακή αιτιοπαθογένεια και ταξινόμηση της νόσου

Η ιστοπαθολογική ταξινόμηση του ΓΚ, με το σύστημα ταξινόμησης κατά Lauren να αποτελεί τον «χρυσό κανόνα», αν και επικρατεί στις εθνικές οδηγίες σχετικά με την διάγνωση και θεραπεία του ΓΚ [18], παρουσιάζει μικρή κλινική χρησιμότητα στο πλαίσιο της επιλογής κατάλληλης θεραπείας για τον ασθενή, καθώς δεν λαμβάνει υπόψη την μοριακή ετερογένεια της νόσου [31].

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην διερεύνηση της μοριακής βάσης του γαστρικού καρκίνου και έχουν ταυτοποιηθεί μοριακές βλάβες που σχετίζονται με την ανάπτυξή του [32]. Σε αυτές συγκαταλέγονται, μεταλλάξεις-οδηγοί σε ογκοεπαγωγικά (π.χ. *KRAS*, *CTNNB1*, *PI3KCA*) [33] ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. *SMAD4*, *APC*, *TP53*), δομικές ανακατατάξεις (οδηγούν σε αλλαγές του αριθμού αντιγράφων ή σε φαινόμενα σύντηξης γονιδίων), και μεταγραφικές μεταβολές, οι οποίες αφορούν mRNAs, εναλλακτικές ισομορφές γονιδίων και μη κωδικοποιητικά RNAs, συμπεριλαμβανομένων των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs (lncRNAs) [32]. Επιπρόσθετα, σημαντική κατηγορία μεταβολών στον ΓΚ αποτελούν οι μεταβολές στον αριθμό των σωματικών αντιγράφων (sCNAs) γονιδίων μέσω της ενίσχυσης ή της απαλοιφής τους. Συγκεκριμένα, μέσω αυτού του μηχανισμού ενισχύονται γονίδια του

μονοπατιού RT/RAS/MAPK (όπως τα γονίδια *HER2*, *EGFR*, *MET*, *FGFR2* και *RAS*) [34, 35], γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (*CCND1*, *CCNE1*, *CDK6*) [32] και μεταγραφικοί παράγοντες (*GATA4*, *GATA6*, *KLF5*) [36]. Οι τελευταίοι μεταγραφικοί παράγοντες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς εκφράζονται στα γαστρικά κύτταρα σε αναπτυσσόμενα και διαφοροποιημένα στάδια [37] και δρουν ως ογκογονίδια επιβίωσης γενεαλογίας, όπως αναλύεται παρακάτω (βλ. 2.1. Μεταγραφικοί παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας). Αντίθετα, στόχοι απαλοιφής του μηχανισμού sCNA αποτελούν ογκοκατασταλτικά γονίδια (*WWOX*, *RB1*, *PARK2*, *FHIT*, and *CDKN2A/B*) [35]. Ακόμη, σημαντικό ρόλο κατέχουν επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση καταλοίπων κυτοσίνης είτε σε υποκινητές μεμονωμένων γονιδίων (π.χ. ογκοκατασταλτικά γονίδια *CDH1*, *RUNX3*, *p16*, and *hMLH1*) [38] είτε σε CpG νησίδες σε όλο το εύρος του γονιδιώματος [39].

Πρόσφατα, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες ταξινόμησης του ΓΚ χρησιμοποιώντας μοριακά κριτήρια [40], με το σύστημα ταξινόμησης της κοινοπραξίας The Cancer Genome Atlas (TCGA) να αποτελεί ορόσημο στον μοριακό χαρακτηρισμό του ΓΚ [34]. Σύμφωνα με αυτό το σύστημα, τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα διακρίνονται στους παρακάτω τέσσερις μοριακούς υπότυπους, βάσει της παρουσίας μόλυνσης από τον EBV, της έκτασης της μικροδορυφορικής αστάθειας και του βαθμού των μεταβολών στον σωματικό αριθμό αντιγράφων [34].

Όγκοι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (EBV+ όγκοι)

Σε αυτόν τον υπότυπο συγκαταλέγονται όγκοι που παρουσιάζουν μόλυνση από τον EBV. Οι περισσότεροι από αυτούς εντοπίζονται πιο συχνά στο σώμα του στομάχου (**Εικόνα 3**) και ο επιπολασμός των EBV+ όγκων διαφέρει μεταξύ των δύο φύλων, με τα μεγαλύτερα ποσοστά να παρατηρούνται στους άντρες [11]. Οι EBV+ όγκοι σχετίζονται με εκτεταμένα φαινόμενα υπερμεθυλίωσης στο DNA και εκδηλώνουν φαινότυπο μεθυλίωσης CpG νησίδων (CIMP) σε υποκινητές διάφορων γονιδίων που σχετίζονται με καρκίνο. Παραδείγματος χάριν, χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των όγκων είναι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών 2A (*CDKN2A*), το οποίο παρεμποδίζει την κυτταρικό κύκλο, με αποτέλεσμα την μεταγραφική σίγησή του [34, 41]. Έχει προταθεί ότι το επιγενετικό γνώρισμα της υπερμεθυλίωσης του EBV+ υπότυπου ενδεχομένως να επάγεται από την δράση της ιικής πρωτεΐνης LAMP2A (λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 2A). Το προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 από την LAMP2A μέσω φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 1 (DNMT1) και κατ' επέκταση την μεθυλίωση του DNA [42]. Ακόμη, συχνές είναι οι μη σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας A της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης PIK3CA. Όσον αφορά βλάβες όπως οι μεταβολές στον αριθμό των σωματικών αντιγράφων, παρατηρείται επαναλαμβανόμενη ενίσχυση της γονιδιωματικής περιοχής του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 9, που περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες JAK2 (Janus κινάση), PD-L1 (συνδέτης προγραμματισμένου θανάτου 1) και PD-L2 (συνδέτης προγραμματισμένου θανάτου 2) [34].

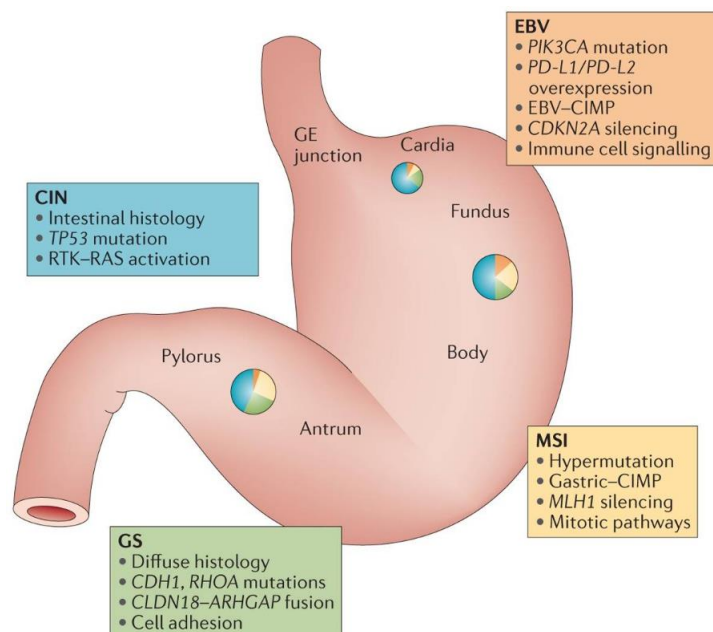
Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite unstable, MSI όγκοι)

Το φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας αφορά τις μεταβολές στο μέγεθος των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, που προκαλούνται από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA και τα οποία οφείλονται σε γενετικές ή/και επιγενετικές βλάβες σε γονίδια επιδιόρθωσης αναντιστοιχιών βάσεων [43, 44]. Η μικροδορυφορική αστάθεια σχετίζεται με το 22% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων, τα οποία διαγιγνώσκονται σε μεγάλη ηλικία (μέσος όρος 72 χρόνια), κυρίως σε γυναίκες και σε διάφορες ανατομικές

θέσεις του στομάχου (**Εικόνα 3**) [34]. Αν και οι EBV+ όγκοι διακρίνονται από τον υψηλότερο επιπολασμό του φαινότυπου CIMP, φαινόμενα υπερμεθυλίωσης παρατηρούνται και στους MSI όγκους, αλλά τα πρότυπα μεθυλίωσης διαφέρουν μεταξύ των δύο υπότυπων [34]. Οι MSI όγκοι σχετίζονται με την υπερμεθυλίωση του υποκινητή και επιγενετική σίγηση του γονιδίου επιδιόρθωσης αναντιστοιχιών *hMLH1*, κάτι που δεν ισχύει για τους EBV+ όγκους [45, 46]. Επίσης, βασικό γονιδιωματικό χαρακτηριστικό των όγκων είναι οι υψηλοί ρυθμοί μεταλλαξιγένεσης. Αρκετά γονίδια έχουν βρεθεί να έχουν επαναλαμβανόμενες σημειακές μεταλλάξεις, όπως τα γονίδια *TP53*, *KRAS*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *ERBB3*, *PTEN* και *HLA-B*, ή ενθέσεις/απαλοιφές, όπως τα γονίδια *ngRNF43*, *B2M*, *NF1* [34].

Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal instability, CIN όγκοι)

Ο όρος χρωμοσωμική αστάθεια αφορά τον υψηλό ρυθμό κέρδους ή απώλειας χρωμοσωμικών τμημάτων και σχετίζεται με φαινόμενα ανευπλοειδίας, απώλειας ετεροζυγωτίας και κέρδους αντιγράφων ογκογονιδίων [44]. Οι όγκοι με CIN αποτελούν το 50% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων και οι περισσότεροι εντοπίζονται στην γαστροοισοφαγική ένωση ή στην καρδιακή μοίρα του στομάχου (**Εικόνα 3**). Αυτός ο υπότυπος είναι εμπλουτισμένος σε γαστρικά αδενοκαρκινώματα με ιστολογικά χαρακτηριστικά εντερικού υπότυπου. Παραπάνω από τα 2/3 των όγκων με χρωμοσωμική αστάθεια έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* και χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Ακόμη, χαρακτηρίζονται από εστιασμένες ενισχύσεις γονιδίων που κωδικοποιούν υποδοχείς κίνησης τυροσίνης, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και γονίδια που κωδικοποιούν μόρια που προάγουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως κυκλίνες (*CCNE1*, *CCND1*) και κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (*CDK6*) [34].



Εικόνα 3. Κατανομή των όγκων των τεσσάρων μοριακών υπότυπων του συστήματος ταξινόμησης TCGA στις διάφορες ανατομικές θέσεις του στομάχου μαζί με τα κυριότερα χαρακτηριστικά κάθε υπότυπου [47].

Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (Genomically stable, GS όγκοι)

Το 20% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων αναλογεί στους γονιδιωματικά σταθερούς όγκους, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από απουσία εκτεταμένων μεταβολών στον αριθμό των σωματικών αντιγράφων. Τα περισσότερα γαστρικά αδενοκαρκινώματα διάχυτου υπότυπου ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και εντοπίζονται σε διάφορες ανατομικές θέσεις του στομάχου (**Εικόνα 3**) [34]. Διακριτικό γνώρισμα των GS όγκων είναι η απορρύθμιση των μονοπατιών σηματοδότησης στα οποία εμπλέκεται η πρωτεΐνη RHOA,

μέσω μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας στο γονίδιο *RHOA* ή μέσω της σύντηξης των γονιδίων *CLDN18* και *ARHGAP26* [34]. Η πρωτεΐνη *RHOA* είναι μια μικρή GTPάση της πρωτεϊνικής οικογένειας Rho (Ras homologous) και προάγει την καρκινογένεση συμμετέχοντας σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η πολικότητα, η συσταλτικότητα και κινητικότητα του κυττάρου [48]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *RHOA* εντοπίζονται στα τμήματα που κωδικοποιούν τις περιοχές αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με τους τελεστές της [34, 49], ενδεχομένως επηρεάζοντας τα καθοδικά βήματα των μονοπατιών που συμμετέχει η *RHOA*. Η σύντηξη των γονιδίων *CLDN18* (κωδικοποιεί το μόριο στενής σύνδεσης claudin 18) και *ARHGAP26* (κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPασών της *RHOA*) έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης που πιθανόν διατηρεί τις διαμεμβρανικές επικράτειες της claudin 18 και την επικράτεια GAP του *ARHGAP26* και ενδεχομένως επηρεάζει την ενεργότητα της *RHOA*. Ακόμη, 37% των GS όγκων χαρακτηρίζονται από σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1*. Ωστόσο, δεν βρέθηκαν παθογόνες βλαστικές μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο, οι οποίες ευθύνονται για το HDGC [34].

1.1.3. Προκλήσεις του γαστρικού καρκίνου

Ο ΓΚ παραμένει μια σημαντική αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως, παρόλο που η παγκόσμια επίπτωση της νόσου παρουσιάζει μείωση τα τελευταία χρόνια. Η υψηλή θνησιμότητα οφείλεται στην παρουσία προχωρημένου ΓΚ κατά την αρχική διάγνωση της νόσου, που έχει κακή πρόγνωση και μειωμένη απόκριση στις υπάρχουσες θεραπείες. Σε αυτό συμβάλει τόσο η έλλειψη κλινικών συμπτωμάτων κατά τα αρχικά στάδια της νόσου που θα επέτρεπαν την έγκαιρη ανίχνευσή της [50], όσο και η μη εφαρμογή προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου επεμβατικού τύπου σε χώρες χαμηλού κινδύνου λόγω κόστους [51]. Απεναντίας σε χώρες υψηλού κινδύνου, όπως η Ιαπωνία και η Ν. Κορέα, εφαρμόζονται τέτοια προγράμματα στον πληθυσμό, οδηγώντας σε έγκαιρη διάγνωση και βελτίωση των ποσοστών επιβίωσης των ασθενών [4]. Η μειωμένη αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών σχημάτων οφείλεται επίσης στην υψηλή ετερογένεια τόσο μεταξύ των όγκων όσο και μεταξύ διαφορετικών περιοχών ή σταδίων του ίδιου όγκου [16]. Αν και η πιο αξιόπιστη μέθοδος διάγνωσης και προσυμπτωματικού ελέγχου είναι η ενδοσκόπηση του ανώτερου πεπτικού με ταυτόχρονη λήψη ιστού (βιοψία) [51], πρόκειται για μια επεμβατικού τύπου μέθοδο, η οποία δεν παύει να ενέχει μικρό κίνδυνο αιμορραγίας και διάτρησης [52]. Ταυτόχρονα, οι υπάρχοντες βιοδείκτες που ανιχνεύονται στον ορό και εφαρμόζονται στην κλινική πράξη με σκοπό την διάγνωση και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών σχημάτων ή της υποτροπής της νόσου, χαρακτηρίζονται από χαμηλή ειδικότητα και ευαισθησία, επομένως καθίστανται αναξιόπιστοι [53].

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη νέων αξιόπιστων βιοδεικτών για την έγκαιρη και έγκυρη, μη επεμβατική διάγνωση της νόσου και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, οι οποίοι θα πρέπει να υπερεκφράζονται στους περισσότερους ασθενείς με ΓΚ και να εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στους όγκους [53].

1.2. Μεταγραφικοί παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από επαναλαμβανόμενες γενετικές παραλλαγές σε ογκοεπαγωγικά και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Παρά την συσσώρευση πολλαπλών γενετικών παραλλαγών, φαίνεται ότι οι όγκοι οφείλουν την εξέλιξη, επιβίωση και διατήρησή τους στην ύπαρξη μεμονωμένων μεταλλαγμένων ή υπερεκφραζόμενων ογκογονιδίων σε αυτούς, εγκαθιδρύοντας το μοντέλο της εξάρτησης από ογκογονίδια (oncogene addiction). Αν και το συγκεκριμένο μοντέλο έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορα προκλινικά και κλινικά παραδείγματα, δεν είναι πάντα επαρκές, καθώς υπάρχουν περιπτώσεις που η διατήρηση του καρκινικού

φαινότυπου δεν εξαρτάται μόνο από την συνεχή δράση ενός ογκογονιδίου, αλλά και από τις λειτουργίες του, τον κυτταρικό τύπο και από άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στην καρκινογένεση [54].

Στον αντίποδα του μοντέλου της εξάρτησης σε ογκογονίδια, βρίσκεται το μοντέλο της εξάρτησης των όγκων από την γενεαλογία (lineage addiction). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο τα καρκινικά κύτταρα των όγκων επιδεικνύουν εξάρτηση από την γενεαλογική γραμμή προέλευσής τους, καθώς τα μονοπάτια επιβίωσης της γενεαλογικής γραμμής και κυτταρικής διαφοροποίησης που προϋπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα προέλευσης του όγκου κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, διατηρούνται και απορρυθμίζονται στα καρκινικά κύτταρα λόγω γονιδιωματικών παραλλαγών [55]. Κατά την ανάπτυξη, τα παραπάνω μονοπάτια ελέγχονται από μια κατηγορία γονιδίων που παρουσιάζει εξίσου απορρυθμισμένη έκφραση σε καρκίνους της γενεαλογικής γραμμής προέλευσής τους και ονομάζονται ογκογονίδια επιβίωσης γενεαλογίας (lineage survival oncogenes) [56]. Τα ογκογονίδια επιβίωσης γενεαλογίας είναι συνήθως μεταγραφικοί παράγοντες, επηρεάζονται από τις σωματικές γενετικές αλλοιώσεις στους όγκους και είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την εξέλιξη τους [55].

Από τους μεταγραφικούς παράγοντες που λειτουργούν ως ογκογονίδια επιβίωσης γενεαλογίας, μια σημαντική κατηγορία είναι οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες (master transcription factors, MTFs) ή ρυθμιστές γενεαλογίας (lineage regulators), οι οποίοι κατέχουν βασικό ρόλο στην ρύθμιση των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης που καθορίζουν την κυτταρική ταυτότητα. Κάθε κυτταρικός τύπος σχετίζεται με υψηλή έκφραση συγκεκριμένων MTFs, οι οποίοι μπορούν και ελέγχουν την μεταγραφή των γονιδίων που τους κωδικοποιούν μέσω ενός αυτορρυθμιστικού βρόχου [57]. Οι MTFs αναγνωρίζουν και προσδένονται συνεργατικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA πάνω σε ειδικούς για τον κυτταρικό τύπο ενισχυτές, όπου προσελκύουν επιπλέον παράγοντες της μεταγραφής. Οι ενισχυτές που εντοπίζονται στον ίδιο χρωμοσωμικό βρόχο (insulated neighborhood), αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και συγκροτούν σύμπλοκα υπέρ-ενισχυτών, τα οποία με την σειρά τους ενεργοποιούν την μεταγραφή σε υποκινητές των γονιδίων-στόχων του ίδιου χρωμοσωμικού βρόχου, που σχετίζονται με την ταυτότητα του κυτταρικού τύπου [58]. Η διατήρηση της κυτταρικής κατάστασης είναι μια δυναμική διαδικασία, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από εξωκυτάρια σήματα του μικροπεριβάλλοντος των ιστών που λαμβάνονται και μεταφέρονται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών στα σύμπλοκα υπέρ-ενισχυτών-MTFs [59, 60].

Οι MTFs είναι μια από τις κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων που απορρυθμίζονται στον καρκίνο λόγω γενετικών μεταβολών. Φυσιολογικά αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες εκφράζονται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια πριν την κυτταρική διαφοροποίηση ή στα αρχικά στάδια μιας κυτταρικής γενεαλογίας, ωστόσο στον καρκίνο παρουσιάζουν έκτοπη έκφραση. Στους κυτταρικούς τύπους που εκφράζονται εκτοπικά, επηρεάζουν το βασικό μεταγραφικό δίκτυο και ενεργοποιούν γονίδια πρώιμων αναπτυξιακών προγραμμάτων, διαταράσσοντας έτσι την κυτταρική τους ταυτότητα [61]. Τέτοια παραδείγματα ογκογονιδίων επιβίωσης γενεαλογίας τα οποία βρίσκονται ενισχυμένα σε αδενοκαρκινώματα του γαστρεντερικού σωλήνα είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4, GATA6, KLF5 και CDX2 [62]. Μάλιστα, οι πρώτοι τρεις ενισχύονται στον ΓΚ [37, 63] και λειτουργούν ως σύμπλοκα, ρυθμίζοντας από κοινού καθοδικούς υποκινητές γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου [36]. Τέτοιο γονίδιο είναι το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a, ο οποίος σχετίζεται άμεσα με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών γαστρικών κυττάρων [36]. Εκτοπική έκφραση παρουσιάζουν και οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX1 και CDX2 στο στάδιο της εντερικής μεταπλασίας και στον γαστρικό καρκίνο, προάγοντας τον σχηματισμό της προκαρκινικής αλλοίωσης και την καρκινογένεση [64].

1.2.1.Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2

Το γονίδιο *CDX2* ανήκει στην οικογένεια των ομοιοτικών γονιδίων [65], τα οποία είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο της φυσιολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης και την διατήρηση των προτύπων διαφοροποίησης στους ενήλικες. Χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των ομοιοτικών γονιδίων είναι η παρουσία της εξαιρετικά συντηρημένης περιοχής «homeobox» στην αλληλουχία τους, η οποία κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA «homeodomain» μεγέθους 60 αμινοξέων [66]. Η ομάδα των ομοιοτικών γονιδίων περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, τις στενά συγγενικές υποομάδες *Hox* και *ParaHox*, οι οποίες είναι παράλογες μεταξύ τους [67, 68]. Τα γονίδια-μέλη της υποομάδας *ParaHox* εντοπίζονται κυρίως στην γενεαλογική γραμμή των σπονδυλωτών [68] και εκφράζονται στους αναπτυσσόμενους ιστούς ενδοδερμικής προέλευσης [67]. Σε αυτήν την ομάδα συγκαταλέγονται τα γονίδια *CDX* (caudal-related homeobox genes), τα οποία είναι ομόλογα του γονιδίου *caudal* της *Drosophila melanogaster* και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τα *CDX1* και *CDX2* [65, 69]. Τα τελευταία γονίδια εντοπίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού και του παχέος εντέρου, όπου αποτελούν κρίσιμους ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους [70]. Ο *CDX1* περιορίζεται κυρίως στα αδιαφοροποίητα κύτταρα των κρυπτών, ενώ ο *CDX2* εκφράζεται τόσο στις εντερικές κρύπτες όσο και στα διαφοροποιημένα κύτταρα των εντερικών λαχνών [71].

1.2.1.1. Φυσιολογικός ρόλος του CDX2 στο γαστρεντερικό σύστημα

Ο *CDX2* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του εντέρου, προάγοντας τη μορφογένεσή του, και στο ενήλικο έντερο, συμβάλλοντας στην φυσιολογική του λειτουργία [72]. Σε ομοζυγωτικά στελέχη ποντικών για την απενεργοποίηση του *CDX2* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (*Cdx2*^{-/-}) βρέθηκε ότι εμποδίζεται η ωρίμανση του τροφοβλάστη και άρα η εμφύτευση της βλαστοκύστης με αποτέλεσμα την πρόωρη παύση της κύησης. Σε ετεροζυγωτικά στελέχη δε (*Cdx2*^{+/-}), χαρακτηριστική ήταν η παρουσία πολύποδων στο μέσο έντερο του εμβρύου, που παρουσίαζαν ιστολογικά χαρακτηριστικά του επιθηλίου του στομάχου, καταδεικνύοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο που έχει ο *CDX2* στην εγκαθίδρυση του εντερικού προτύπου στα ενδοδερμικά κύτταρα κατά την ανάπτυξη [73, 74]. Η επαγωγή της έκφρασης του *CDX2* σε κύτταρα IEC-6 – μια αδιαφοροποίητη εντερική κυτταρική σειρά αρουραίου, η οποία δεν εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα *CDX2* – είχε ως αποτέλεσμα τα διαφοροποιημένα κύτταρα να εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία με εξειδικευμένα κύτταρα του εντέρου (όπως τα εντεροκύτταρα και τα κύτταρα goblet). Σε αυτά τα κύτταρα ανιχνεύθηκε, επίσης, έκφραση του γονιδίου της σουκράσης-ισομαλάσης, το οποίο αποτελεί ειδικό στόχο του *CDX2* στα εντερικά κύτταρα. Και σε αυτή την περίπτωση επισημαίνεται η κρίσιμη δράση του *CDX2* στην καθοδήγηση των πρώιμων διαδικασιών στη μορφογένεση του εντέρου, αλλά και στην διατήρηση του διαφοροποιημένου φαινοτύπου μέσω ρύθμισης της μεταγραφής εξειδικευμένων γονιδίων για τα εντερικά κύτταρα [75]. Ο τελευταίος ρόλος του *CDX2* αναδεικνύεται και σε διάφορες άλλες μελέτες, όπου φαίνεται ότι ο *CDX2* ρυθμίζει γονίδια πεπτικών ενζύμων, όπως η υδρολάση της λακτάσης-φλοριζίνης [76], η καρβονική ανυδράση [77] και η καλβινδίνη-D9k [78].

Ο *CDX2* δεσμεύει και ενεργοποιεί διαφορετικά γονίδια-στόχους στα εμβρυϊκά και στα ώριμα εντερικά κύτταρα, στοχεύοντας γονίδια που εμπλέκονται στην εντερική διαφοροποίηση και στη φυσιολογική εντερική λειτουργία αντίστοιχα. Η χρονικά οριοθετημένη ειδική πρόσδεση του *CDX2* σε διακριτούς στόχους, φαίνεται ότι ακολουθεί τις χρονικές μεταβολές στην ανοιχτή διαμόρφωση της χρωματίνης και άρα την προσβασιμότητα σε αυτήν. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι αυτές οι μεταβολές στη δομή της χρωματίνης δεν προκαλούνται από τον ίδιο τον *CDX2*, αλλά καθορίζονται από το περιβάλλον του κυττάρου. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν ότι, αφενός η έκφραση του *CDX2* στα κύτταρα του εντέρου είναι αναγκαία, αλλά όχι επαρκή συνθήκη για τον καθορισμό της μοίρας του εντερικών κυττάρων και αφετέρου ο *CDX2*

ανταποκρίνεται στο περιβάλλον του για την στόχευση των ειδικών γονιδίων που σχετίζονται με απαραίτητες λειτουργίες του εκάστοτε αναπτυξιακού σταδίου του κυττάρου. Ένας ακόμη μηχανισμός που θα μπορούσε να διέπει τη διακριτή ενεργοποίηση των διαφορετικών γονιδίων-στόχων στα εμβρυικά και ενήλικα κυτταρικά στάδια, είναι αλληλεπίδραση του CDX2 με διαφορετικά σύνολα μεταγραφικών παραγόντων στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα στα ώριμα κύτταρα του εντέρου ποντικών και ανθρώπων βρέθηκε ότι οι περιοχές πρόσδεσης του CDX2 είναι εμπλουτισμένες σε μοτίβα αναγνώρισης από τον HNF4α, υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες συνεργάζονται για την ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του διαφοροποιημένου εντέρου [79]. Σε αυτό το πλαίσιο έχει διαπιστωθεί ότι ο CDX2 συνεργάζεται με διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες για τη ρύθμιση διαφορετικών πτυχών της δομής και λειτουργίας του εντερικού επιθηλίου, συμμετέχοντας σε συνεργατικές αλληλεπιδράσεις με τον GATA4 για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις εντερικές κρύπτες και με τον HNF4α για την ρύθμιση γονιδίων στα διαφοροποιημένα κύτταρα των λαχνών, τα οποία είναι απαραίτητα για την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών [80]. Έχει προταθεί επίσης ένα μοντέλο δυναμικής αλληλεπίδρασης του CDX2 με τον GATA6 και στην συνέχεια με τον HNF4α σε διαφορετικές περιοχές ανοιχτής χρωματίνης, που φέρουν μοτίβα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων H3K4Me2 στις ιστόνες, στα διαιρούμενα και ώριμα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου αντίστοιχα [81]. Συμπερασματικά, σύμφωνα με τις παραπάνω ιδιότητες που παρουσιάζει ο CDX2, ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή στο έντερο για την εγκαθίδρυση της εντερικής διαφοροποίησης και την διατήρηση του φυσιολογικού εντερικού βλεννογόνου [81].

1.2.1.2. Ο ρόλος του CDX2 στον γαστρικό καρκίνο

Αν και φυσιολογικά η έκφραση του CDX2 περιορίζεται αποκλειστικά στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο, ο κύριος αυτός μεταγραφικός παράγοντας παρουσιάζει έκτοπη έκφραση στις προκαρκινικές αλλοιώσεις που λαμβάνουν χώρα στο γαστρικό βλεννογόνο και που επάγονται από *H. pylori*, λοίμωξη, κατά την καρκινογενετική πορεία του ΓΚ. Από τα στάδια των προκαρκινικών αλλοιώσεων, η εντερική μεταπλασία, θεωρείται ένα «μη αντιστρεπτό σημείο» για την ανάπτυξη του ΓΚ εντερικού υπότυπου, αυξάνοντας σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [82]. Οι Almeida et al. αναλύοντας την έκφραση του CDX2 σε γαστρικούς ιστούς με εντερική μεταπλασία, διαπίστωσαν ότι ο CDX2 εκφράζεται έκτοπα, υπογραμμίζοντας τον πιθανό του ρόλο στην εντερική διαφοροποίηση των γαστρικών κυττάρων [70]. Επιπλέον, σε δύο ανεξάρτητες έρευνες, όπου μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του CDX2 στον γαστρικό βλεννογόνο διαγονιδιακών ποντικών, διαπιστώθηκε ότι η επαγωγή της υπερέκφρασης του CDX2 είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των γαστρικών κυττάρων από εξειδικευμένα κύτταρα του εντέρου (κύτταρα goblet, εντεροκύτταρα, απορροφητικά κύτταρα), τον σχηματισμό ψευδοπυλωρικής μεταπλασίας και την αυξημένη έκφραση ιστό-ειδικών γονιδίων του εντέρου, αναδεικνύοντας τον CDX2 ως ανεξάρτητο παράγοντα έναρξης της διαδικασίας επαγωγής της εντερικής μεταπλασίας [83, 84]. Ο ρόλος της έκτοπης έκφρασης του CDX2 στην εντερική μεταπλασία εξακριβώθηκε, επίσης, στον φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο του ανθρώπου *in vitro*, όπου η υπερέκφραση του CDX2 προκάλεσε την εμφάνιση εντερικού φαινότυπου και την αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την εντερική ταυτότητα και την εντερική μεταπλασία [85].

Σε μια πρόσφατη έρευνα, οι Hee-Jin Kim et al. βρήκαν ότι ο βαθμός μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου του CDX2 αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία σε μη καρκινικά γαστρικά κύτταρα, τα οποία είναι θετικά σε λοίμωξη από *H. pylori*, και επομένως η έκφραση του CDX2 καταστέλλεται. Ωστόσο, στην εντερική μεταπλασία, αλλά και στον ΓΚ, ο CDX2 υπερεκφράζεται λόγω της υπομεθυλίωσης που ανιχνεύθηκε στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του και κατ' επέκταση την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε αυτόν

[86]. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με μια άλλη μελέτη, στην οποία ανιχνεύθηκε υψηλή έκφραση του γονιδίου του CDX2 λόγω υπομεθυλίωσής του σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς [87]. Αντιθέτως, οι Park et al. ανίχνευσαν σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης του CDX2 κατά την πρόοδο της καρκινογενετικής πορείας από το στάδιο της γαστρικής δυσπλασίας, στον πρώιμο και προχωρημένο γαστρικό καρκίνο εντερικού υπότυπου [88]. Ακόμη, υποέκφραση του CDX2 παρατηρήθηκε σε όγκους ΓΚ εντερικού υπότυπου και θετικών για *H. pylori*, λόγω γενετικών αλλοιώσεων στο γονίδιό του, όπως σωματικές μεταλλάξεις στις περιοχές ενεργοποίησης και πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης και απώλεια αλληλομόρφου του γονιδίου [89].

Όσον αφορά την ρυθμιστική λειτουργία που επιτελεί ο CDX2 στον ΓΚ, ένα πλήθος μελετών αναδεικνύουν την ογκογόνο δράση του. Η απενεργοποίηση του CDX2 σε καρκινικά κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος της κυτταρικής σειράς MKN45 (CDX2^{-/-}) δεν επηρέασε την ογκογένεση σε σχέση με MKN45 κύτταρα αγρίου τύπου (CDX2^{+/+}), υποδεικνύοντας έναν μη ογκοκατασταλτικό ή μη απαραίτητο ρόλο στην εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου [90]. Ωστόσο, η έκφραση του CDX2 έχει συσχετιστεί με μετάσταση στους λεμφικούς αδένες [91], την εισβολή [92], την πολυφαρμακευτική αντίσταση, τον μειωμένο και αυξημένο ρυθμό απόπτωσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων αντίστοιχα (Multi-Drug Resistance, MDR) [93, 94] στον ΓΚ. Εντούτοις, υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι ο CDX2 έχει ογκοκατασταλτικό παρά ογκοεπαγωγικό ρυθμιστικό ρόλο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πειραμάτων τόσο υπερέκφρασης όσο και σίγησης του CDX2 σε γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές του ανθρώπου (MGC-803, NCI-N87, MKN45) *in vitro* και *in vivo*, ο CDX2 αναστέλλει την ανάπτυξη, εισβολή και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και περιορίζει την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) – ενός κρίσιμου φαινομένου στα αρχικά στάδια της μετάστασης [95-97]. Οι παραπάνω έρευνες δείχνουν ότι η έκφραση του CDX2 σχετίζεται με μια ευρεία γκάμα γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στον ΓΚ, αν και υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα σχετικά με την λειτουργία του. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο ακριβής ρυθμιστικός ρόλος του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα στον ΓΚ είναι πολύπλοκος και παραμένει ασαφής, επιδεχόμενος περαιτέρω διερεύνησης.

1.2.2. Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a

Οι μεταγραφικός παράγοντας HNF4a (hepatocyte nuclear factor 4a) ανήκει στην υπεροικογένεια των υποδοχών των στεροειδών ορμονών [98, 99]. Υπάρχουν 12 ισομορφές του HNF4a, που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα σε συνδυασμό με την εναλλακτική χρήση των υποκινητών του γονιδίου P1 και P2. Οι διάφορες ισομορφές παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης στην επικράτεια πρόσδεσης στο DNA με δομή «δακτυλίου ψευδαργύρου» (DNA Binding Domain, DBD) και στην επικράτεια σύνδεσης προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD), ενώ διαφέρουν μεταξύ τους στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τους άκρα [100]. Ο HNF4a επιτελεί την μεταγραφική του δράση συνδεδεμένος στις περιοχές αναγνώρισής του στο DNA των γονιδίων-στόχων του μέσω των DBD περιοχών του ως διμερές [98].

Η έκφραση των διαφορετικών ισομορφών παρουσιάζει ιστό-ειδικότητα και ποικίλει μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων. Συγκεκριμένα, οι P1- και P2-παραγόμενες ισομορφές εντοπίζονται αποκλειστικά στους νεφρούς και στον στόμαχο, αντίστοιχα, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, ενώ στο ήπαρ εντοπίζονται και οι δύο τύποι ισομορφών σε διαφορετικές αναλογίες στα αναπτυξιακά στάδια σε τρωκτικά [101]. Στον άνθρωπο, οι P1-παραγόμενες ισομορφές απαντώνται αποκλειστικά στο ήπαρ και στους νεφρούς, ενώ οι ισομορφές που προκύπτουν από τον P2 συναντώνται στην χοληδόχο κύστη, στο πάγκρεας και στο στομάχι. Το λεπτό και παχύ έντερο, καθώς και η επιδιδυμίδα χαρακτηρίζονται από την παρουσία και των δύο τύπων ισομορφών [102]. Μάλιστα, οι ισομορφές από τους υποκινητές P1 και P2 εκφράζονται σε

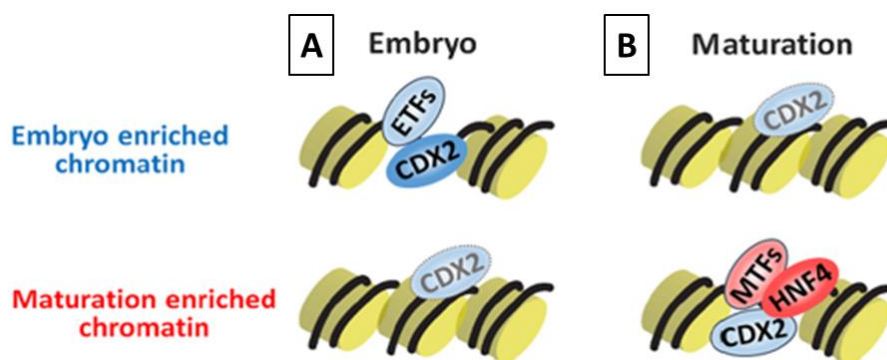
διαφορετικές περιοχές του παχέος εντέρου του ποντικού (διαμέρισμα διαφοροποίησης στις λάχνες και διαμέρισμα βλαστοκυττάρων στις κρύπτες αντίστοιχα), συμβάλλοντας στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του παχέος εντέρου [103]. Ακόμη, μονομερή της ίδιας ή διαφορετικής ισομορφής αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των LBD και σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή HNF4α, κάθε ένα από τα οποία ρυθμίζει διαφορετικό σύνολο γονιδίων [100] και διαφορετικές ισομορφές έχουν συσχετιστεί με διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς μεταγραφής και μεταγραφικούς παράγοντες [104], χαρακτηριστικά που εξηγούν το εύρος των λειτουργιών που επιτελεί ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας.

1.2.2.1. Φυσιολογικός ρόλος του HNF4α στο γαστρεντερικό σύστημα

Ο HNF4α ρυθμίζει πολλές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες των ανθρώπινων ιστών και οργάνων [105]. Πειράματα σίγησης του HNF4α σε ποντίκια ανέδειξαν τον κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο που διαδραματίζει στο σπλαχνικό ενδόδερμα κατά την εμβρυογένεση [106]. Κατά τα διάφορα στάδια της εμβρυογένεσης, η έκφραση του γονιδίου του HNF4α μετατοπίζεται από το αρχέγονο προς το σπλαχνικό ενδόδερμα και στην συνέχεια στα αναπτυσσόμενα ήπαρ, νεφρούς, πάγκρεας και έντερο [107].

Ο HNF4α είναι ενεργοποιητής πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν ποικίλα και απαραίτητα συστατικά των κυττάρων (π.χ. μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, παράγοντες που εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού, άλλους HNFs κ.α.) [108]. Στο ήπαρ έχει βρεθεί ότι ο HNF4α είναι απαραίτητος τόσο για την διαφοροποίηση κατά την εμβρυογένεση, όσο και την διατήρηση του διαφοροποιημένου φαινότυπου στα ενήλικα ηπατικά κύτταρα [109, 110], όπου εμπλέκεται στην ρύθμιση ιστό-ειδικών γονιδίων του μεταβολισμού, κρίσιμων για την φυσιολογική λειτουργία του οργάνου [111]. Ο HNF4α εκφράζεται διαφορικά στο νεφρικό επιθήλιο και μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ειδικών για τους νεφρούς [112]. Ρυθμίζει, επίσης, την ανάπτυξη του παχέος εντέρου στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού των κρυπτών, την ωρίμανση των κυττάρων του βλεννογόνου και την έκφραση των ειδικών γονιδίων για το παχύ έντερο που σχετίζονται με την φυσιολογική λειτουργία του [113].

Ο HNF4 είναι ένας κύριος μεταγραφικός παράγοντας που απαιτείται για την εγκαθίδρυση της κυτταρικής ταυτότητας και την τελική διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων στα όργανα ενδοδερμικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ήπατος και του εντέρου. Επιτελεί την παραπάνω λειτουργία του, συμμετέχοντας σε πολύπλοκα, μοναδικά για κάθε κυτταρική γενεαλογία μεταγραφικά ρυθμιστικά δίκτυα, στα οποία αποτελεί κεντρικό κόμβο και συνεργάζεται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας πάνω στα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων που σχετίζονται με την ταυτότητα και διατήρηση των κυττάρων, για την ρύθμιση της έκφρασής τους [114]. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ότι ο HNF4α προάγει την ωρίμανση του αναπτυσσόμενο εντέρου σε συνεργασία με τον CDX2. Ο CDX2 αρχικά λειτουργεί κατά την μορφογένεση του εντέρου. Μαζί με άλλους εμβρυϊκούς μεταγραφικούς παράγοντες προσδένεται πάνω σε περιοχές ανοιχτής χρωματίνης στα αρχικά εμβρυϊκά στάδια, ενώ, επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί πρόσδεση του CDX2 σε χαμηλότερα επίπεδα σε περιοχές που θα γίνουν προσβάσιμες σε μεταγενέστερα στάδια (**Εικόνα 4A**). Κατά τα στάδια ωρίμανσης του αναπτυσσόμενου εντέρου, ο CDX2 ενεργοποιεί την μεταγραφή του HNF4, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του. Οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες συνεργάζονται μεταξύ τους, καταλαμβάνοντας από κοινού ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος, και προάγουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στις περιοχές των γονιδίων που σχετίζονται με την ωρίμανση του εντέρου ενεργοποιώντας την μεταγραφή τους (**Εικόνα 4B**) [115].



Εικόνα 4. Γραφική αναπαράσταση του μοντέλου που προτάθηκε από τους Chen *et al.* σχετικά με τα ρυθμιστικά γεγονότα που καθοδηγούν την ωρίμανση του εντέρου στα τελικά εμβρυϊκά στάδια. ETFs, embryonic transcription factors (εμβρυϊκοί μεταγραφικοί παράγοντες), MTFs, Maturation transcription factors (μεταγραφικοί παράγοντες ωρίμανσης) [115].

1.2.2.2. Ο ρόλος του HNF4a στον γαστρικό καρκίνο

Ο HNF4a παρουσιάζει έκτοπη έκφραση σε διάφορους καρκίνους του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων των γαστρεντερικών καρκίνων, των καρκίνων του πνεύμονα και του ουρογεννητικού συστήματος και του νευροβλαστώματος, όπου εμπλέκεται στην ρύθμιση της διαφοροποίησης, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την διήθηση, τη μετανάστευση και την χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων. Τόσο το πρότυπο της έκτοπης έκφρασης του HNF4a, όσο και η λειτουργία που επιτελεί στους διάφορους όγκους, παρουσιάζουν καρκινοειδικότητα. Παραδείγματος χάριν, η υπερέκφραση του HNF4a σε καρκινώματα του ήπατος, του παχέος εντέρου και των νεφρών αποτελεί σημαντικό ογκοκατασταλτικό παράγοντα, καθώς καταστέλλει την EMT, την εξέλιξη της νόσου και την μετάσταση, ωστόσο, έχει ογκοεπαγωγικό ρόλο τον καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του παγκρέατος και το νευροβλάστωμα [105].

Έχει βρεθεί ότι η έκφραση του HNF4a απορρυθμίζεται στον ΓΚ. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκε έκτοπη υπερέκφρασή του σε κύτταρα γαστρικών όγκων από Καυκάσιους και Ασιάτες ασθενείς. Καθώς, βρέθηκε να ρυθμίζεται αρνητικά από το μονοπάτι σηματοδότησης AMPK μέσω της AMPKα και δεδομένου ότι το συγκεκριμένο μονοπάτι απορρυθμίζεται στον ΓΚ, ενδεχομένως αυτή η απορρύθμιση του μονοπατιού να συμβάλλει στην έκτοπη υπερέκφρασή του [116, 117]. Ακόμη, όπως προαναφέρθηκε (βλ. 2.1. Μεταγραφικοί παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας), το γονίδιο HNF4a αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του συμπλόκου GATA4/GATA6/KLF5 και υπερεκφράζεται στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα [36].

Όσον αφορά τον ρόλο του στον ΓΚ, αυτός φαίνεται να είναι ογκοεπαγωγικός, καθώς σύμφωνα με διάφορες μελέτες είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* [36, 116], προάγει την πολυφαρμακευτική αντίσταση (MDR) μέσω της ρύθμισης της απόπτωσης και της έκφρασης του γονιδίου B-κυτταρικού λεμφώματος 2 (Bcl-2), και σχετίζεται με την μετάσταση στους λεμφαδένες και με πιο προχωρημένα στάδια του όγκου [118]. Μάλιστα, η υψηλή έκφραση του HNF4a διατηρείται και σε μεταστάσεις των πρωτοπαθών γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων σε άλλους ιστούς (π.χ. μαστούς) [119]. Εκτός από τους παραπάνω ογκοεπαγωγικούς ρόλους, ο HNF4a εμπλέκεται και στον μεταβολισμό των καρκινικών γαστρικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, συμβάλει στην διατήρηση του ογκοεπαγωγικού μεταβολισμού στα καρκινικά κύτταρα του ΓΚ, μέσω της θετικής ρύθμισης του γονιδίου της αφυδρογονάσης του ισοκιτρικού 1 (*IDH1*) στους γαστρικούς όγκους, ενός γονιδίου που εμπλέκεται στον κύκλο του Krebs και είναι απαραίτητο για την επιβίωση των γαστρικών καρκινικών κυττάρων *in vivo* και *in vitro* [120]. Το πρότυπο έκφρασης των διάφορων ισομορφών του HNF4a που προκύπτουν από τους υποκινητές P1 και P2 απορρυθμίζεται στον καρκίνο του στομάχου, του ήπατος και του παχέος εντέρου

[102]. Παρόλο που, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στο στομάχι εντοπίζονται φυσιολογικά οι P2-παραγόμενες ισομορφές, στα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου κατά την εντερική μεταπλασία παρατηρείται έκτοπη παρουσία των P1-παραγόμενων ισομορφών HNF4α, οι οποίες εντοπίζονται φυσιολογικά στο έντερο. Επομένως, είναι πολύ πιθανόν ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας να εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση ή/και διατήρηση του εντερικού φαινότυπου του γαστρικού βλεννογόνου κατά την εντερική μεταπλασία [102, 121].

Καθώς οι μεταγραφικοί παράγοντες CDX2 και HNF4α απορρυθμίζονται στον ΓΚ, θα μπορούσαν να αποτελέσουν νέους διαγνωστικούς βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους για τον καρκίνο του στομάχου [116, 119, 122]. Υπάρχουν, όμως, εμπόδια στην αξιοποίηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων επιβίωσης γενεαλογίας για αυτούς τους σκοπούς. Αφενός, ως μεταγραφικοί παράγοντες θεωρούνται «μη στοχεύσιμοι» από μικρά μόρια αναστολές και ρυθμιστές, ως αποτέλεσμα της έλλειψης ενζυμικής δραστηριότητας και καταλυτικών θέσεων [123]. Αφετέρου, ως ρυθμιστές γενεαλογίας εμφανίζονται απορρυθμισμένοι στα καρκινικά γαστρικά κύτταρα, διατηρώντας την παρουσία τους στα κύτταρα όπου εκφράζονται κανονικά και επιτελούν την λειτουργία τους. Επομένως, η στόχευση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων επιβίωσης γενεαλογίας θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένες τοξικές παρενέργειες [55]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, χρειάζεται να ταυτοποιηθούν γονίδια και μονοπάτια που να ρυθμίζονται από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας και που να χαρακτηρίζονται από ιστοειδικότητα και καρκινοειδικότητα, ώστε να αποτελέσουν νέους καρκινικούς βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους στον ΓΚ. Τέτοια μόρια θα μπορούσαν να αποτελέσουν τα lncRNA.

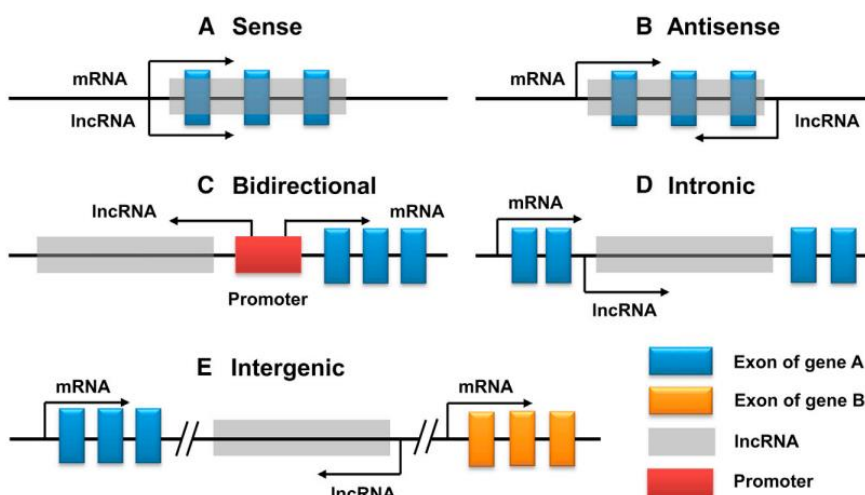
1.3. Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA

Η ραγδαία πρόοδος που σημειώθηκε στις τεχνολογίες αλληλούχησης του μεταγραφώματος και του γονιδιώματος και η εφαρμογή αυτών, οδήγησε στην διαπίστωση ότι τουλάχιστον το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται. Μάλιστα, ένα μεγάλο μέρος του μεταγραφώματος αφορά τα ρυθμιστικά μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (long non-coding RNA, lncRNA) [124], τα οποία συνιστούν μια ετερογενή ομάδα από μόρια RNA με μήκος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια, τα οποία δεν κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες και εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες [125].

1.3.1. Χαρακτηριστικά των lncRNA

Η βιογένεση των lncRNA παρουσιάζει κάποια κοινά χαρακτηριστικά με αυτή των mRNA, καθώς συνήθως μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (RNA pol II), οι γονιδιωματικές περιοχές μεταγραφής τους χαρακτηρίζονται από παρόμοιες επιγενετικές τροποποιήσεις με αυτές των RNA pol II μεταγραφόμενων mRNA (H3K4me3 στην θέση έναρξης της μεταγραφής και H3K36me3 σε όλο το μήκος του γονιδίου μεταγραφής τους), περιλαμβάνουν 5' καλύπτρα και 3' πολύ(A)-ουρά και υπόκεινται σε μάτισμα των εξονίων τους [126]. Ωστόσο, σε σχέση με τα mRNA μπορεί να υπόκεινται σε ασυνήθιστες διαδικασίες επεξεργασίας των άκρων τους, διαθέτουν λιγότερα εξόνια και αδύναμα «κρυπτικά» σήματα μάτισματος και πολυαδενυλίωσης [127]. Αναλόγως την γονιδιωματική περιοχή από την οποία προέρχονται, τα lncRNA διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες. Τα νοηματικά (sense) (**Εικόνα 5A**) ή αντινοηματικά (antisense) lncRNA (**Εικόνα 5B**) μεταγράφονται από την νοηματική ή αντινοηματική αλυσίδα πρωτεϊνικών γονιδίων, αντίστοιχα, και μπορεί να επικαλύπτονται με μέρος της αλληλουχίας του πρωτεϊνικού γονιδίου ή να την καλύπτουν ολόκληρη. Τα αμφίδρομα lncRNA (bidirectional lncRNA) μεταγράφονται από τον υποκινητή ενός πρωτεϊνικού γονιδίου προς την αντίθετη κατεύθυνση (**Εικόνα 5C**). Τα ιντρονικά lncRNA (intronic lncRNA) (**Εικόνα 5D**) μεταγράφονται από το εσωτερικό μακρών ιντρονίων σε πρωτεϊνικά γονίδια, ενώ τα

διαγονιδιακά lncRNA (intergenic lncRNA, lincRNA) (Εικόνα 5E) μεταγράφονται από διαγονιδιακές περιοχές μεταξύ των πρωτεϊνικών γονιδίων [128].



Εικόνα 5. Ταξινόμηση των lncRNA με βάση την γονιδιωματική περιοχή βιογένεσής τους [128].

Σε αντίθεση με τα μεταγράφα των πρωτεϊνικών γονιδίων, τα lncRNA χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης, αποκτούν πολύπλοκες δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές μέσω των οποίων επιτελούν τις ρυθμιστικές τους λειτουργίες και ενώ χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό συντήρησης ως προς την αλληλουχία τους μεταξύ των εξελικτικών τάξεων, συχνά εμφανίζουν συντήρηση ως προς την δομή τους [129, 130]. Ακόμη, χαρακτηριστικά γνωρίσματα της έκφρασης των lncRNA είναι η υψηλή ειδικότητα των προτύπων έκφρασής τους ως προς τον κυτταρικό τύπο, τον ιστό και τα αναπτυξιακά στάδια, ο κατά μέσο όρο μικρότερος χρόνος ημιζωής συγκριτικά με τα mRNA και η υποκυτταρική εξειδίκευση [131].

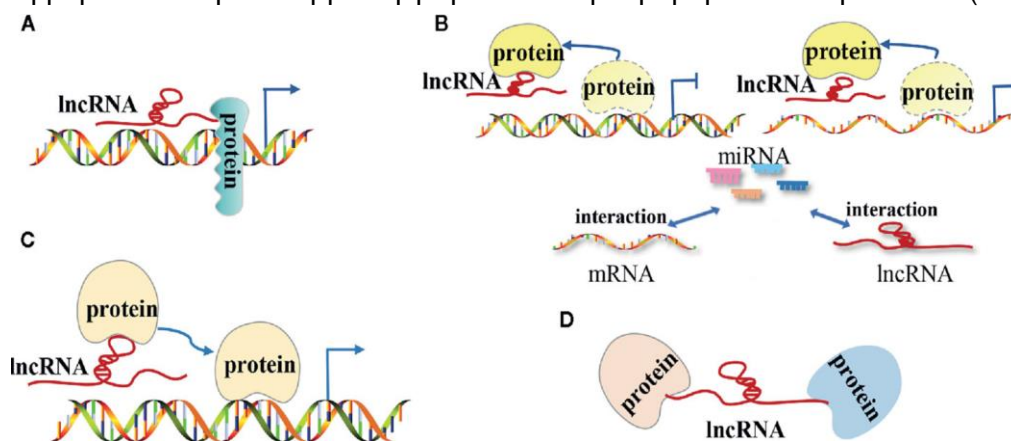
1.3.2. Λειτουργίες των lncRNA

Τα lncRNA συμμετέχουν στην μεταγραφική και μετά-μεταγραφική ρύθμιση, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στην ρύθμιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, καθορίζοντας σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη των κυττάρων [129]. Ακόμη, αυξανόμενα στοιχεία, όπως η εμπλοκή των lncRNA στην ρύθμιση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων και ογκογονιδίων και στην ρύθμιση της ανάπτυξης του σκελετού, των οφθαλμών και της EMT, υπογραμμίζουν τον σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο που διαδραματίζουν στις διαδικασίες της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης [132].

Οι λειτουργίες που επιτελούν τα lncRNA επηρεάζονται από πολλά χαρακτηριστικά τους, συμπεριλαμβανομένων της αλληλουχίας, των επιπέδων έκφρασης, της υποκυτταρικής θέσης, της δομής και της αλληλεπίδρασής τους με άλλα μόρια, όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες [133]. Αναλόγως την υποκυτταρική τους θέση τα lncRNA διακρίνονται σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά. Τα πυρηνικά lncRNA εμπλέκονται σε διαδικασίες μεταγραφικής και επιγενετικής ρύθμισης συγκεκριμένων γονιδίων, επεξεργασίας των μεταγράφων, καθώς και στην οργάνωση των πυρηνικών περιοχών. Αντιθέτως, τα lncRNA στο κυτταρόπλασμα λειτουργούν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης κυρίως σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο, επηρεάζοντας την σταθερότητα ή την αποικοδόμηση των mRNAs και επάγοντας ή αναστέλλοντας την μετάφρασή τους σε πρωτεΐνες. Επίσης, λειτουργούν ως μοριακά δολώματα των miRNA (miRNA sponges), ρυθμίζοντας την ανασταλτική τους δράση ως προς τα mRNA [134]. Επιπλέον, τα lncRNAs επιτελούν τις ρυθμιστικές τους δράσεις είτε σε γειτονικά γονίδια ως προς το σημείο

μεταγραφής τους στον πυρήνα – δρώντας *in cis* – είτε σε απομακρυσμένα γονίδια στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα – δρώντας *in trans* [135].

Οι ρυθμιστικές δράσεις των lncRNA σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο πραγματοποιούνται μέσα από τέσσερις βασικούς τρόπους δράσης, ως σηματοδοτικά μόρια, ως μόρια-δολώματα, ως μόρια οδηγού και ως ικκρίωματα [136]. Ως σηματοδοτικά μόρια, τα lncRNA μεταγράφονται ειδικά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και επηρεάζουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, ρυθμίζοντας την μεταγραφή καθοδικών γονιδίων του μονοπατιού είτε από μόνα τους είτε σε συνεργασία με πρωτεΐνες, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες (**Εικόνα 6A**). Λειτουργούν, επίσης, ως μοριακά δολώματα δεσμεύοντας πρωτεϊνικά μόρια, όπως μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες αναδίπλωσης της χρωματίνης ή miRNA, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τους τελεστές τους και αναστέλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ρυθμιστική τους δράση (**Εικόνα 6B**). Ως μόρια οδηγού, καθοδηγούν διάφορα μόρια στις θέσεις δράσης τους, ώστε να επιτελέσουν την λειτουργία τους, για παράδειγμα αλληλεπίδραση και *trans* μεταφορά μεταγραφικών παραγόντων στις ρυθμιστικές περιοχές δράσης τους (**Εικόνα 6C**). Τέλος, μπορούν να λειτουργήσουν ως ικκρίωματα, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση μορίων και την συναρμολόγηση ποικίλων μακρομοριακών συμπλόκων (**Εικόνα 6D**).



Εικόνα 6. Κατηγορίες των μηχανισμών δράσης των lncRNA. (A) lncRNA ως σηματοδοτικά μόρια. (B) lncRNA ως μόρια-δολώματα. (C) lncRNA ως μόρια-οδηγοί. (D) lncRNA ως μόρια-ικκρίωματα [136].

1.3.3. Ο ρόλος των lncRNA στον γαστρικό καρκίνο

Η πολυεπίπεδη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα lncRNA μέσω μιας πληθώρας κυτταρικών διαδικασιών, τα καθιστά σημαντικούς παράγοντες στην διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου. Η έκφρασή τους, όμως, απορρυθμίζεται σε ποικίλες ασθένειες του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η παρεκκλίνουσα έκφραση των lncRNA σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία της καρκινογένεσης, όπου μπορεί να έχει τόσο ογκοκατασταλτικό όσο και ογκοεπαγωγικό ρόλο [137].

Τα πρότυπα έκφρασης ολόένα και περισσότερων lncRNA βρίσκονται να μεταβάλλονται εκτενώς κατά την παθογενετική πορεία του ΓΚ, με τα περισσότερα από αυτά να εμφανίζουν ογκοεπαγωγική δράση, ενώ ελάχιστα δρουν ογκοκατασταλτικά [128]. Ειδικότερα, τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA έχουν συσχετιστεί με διάφορους κλινικοπαθολογικούς παραγόντες ΓΚ, όπως είναι η λεμφική μετάσταση, η διαφοροποίηση του όγκου, το μεταστατικό δυναμικό, το βάθος διήθησης και προχωρημένα στάδια της νόσου [138]. Τα απορρυθμισμένα lncRNA συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου, δρώντας ως μεταγραφικοί και μετά-μεταγραφικοί ρυθμιστές ορισμένων καθοδικών γονιδίων σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια (όπως τα μονοπάτια σηματοδότησης AKT, mTOR, STAT3 και το μονοπάτι που επάγεται από την υποξία), τα οποία

σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την εισβολή, την μετανάστευση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, τα lncRNA εμπλέκονται στην παθογένεια του ΓΚ, μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με τα miRNAs [139]. Λειτουργώντας ως μοριακά δολώματα για miRNA-ρυθμιστές γονιδίων που σχετίζονται με την αντίσταση στα φάρμακα, καθώς και μέσω της ρύθμισης ογκοεπαγωγικών μονοπατιών σηματοδότησης, της αναστολής της απόπτωσης, της διαμόρφωσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και την προαγωγή της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάβαση, τα lncRNA συμβάλλουν στον φαινότυπο της αντίστασης στα φάρμακα στον ΓΚ [140].

1.3.4. Τα lncRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες στον γαστρικό καρκίνο

Σύμφωνα με ολοένα και περισσότερες μελέτες, τα lncRNA επιδεικνύουν πολλά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν καλούς υποψήφιους καρκινικούς βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση της απόκρισης σε φαρμακευτικά θεραπευτικά σχήματα στον ΓΚ [138].

Τα lncRNA αποτελούν ιδανικούς βιοδείκτες για την διάγνωση του ΓΚ, καθώς είναι δυνατή η σχετικά εύκολη και μη επεμβατική ανίχνευσή τους σε βιολογικά υγρά, όπως τον ορό ή πλάσμα του αίματος, στο εσωτερικό φορτίο των εξωσωμάτων και στον γαστρικό χυμό, όπου είναι πλήρως λειτουργικά χωρίς να μεταφράζονται σε πρωτεΐνες εν αντιθέσει με τα mRNA. Επιπλέον ιδιότητες των lncRNA που τα καθιστούν κατάλληλους πιθανούς βιοδείκτες είναι η υψηλή σταθερότητα και ιστό-ειδικότητα που τα χαρακτηρίζουν [138, 141]. Τα επίπεδα έκφρασης των κυκλοφορούντων lncRNA στο πλάσμα και των lncRNA στα καρκινικά γαστρικά κύτταρα των πρωτοπαθών όγκων είναι παρόμοια. Επομένως, τα κυκλοφορούντα lncRNA του πλάσματος δύνανται να αντανakλούν τα χαρακτηριστικά των όγκων προέλευσής τους και άρα θα μπορούσαν να εφαρμοστούν ως διαγνωστικοί βιοδείκτες στην κλινική πράξη [142]. Επιπλέον, έχουν βρεθεί διάφορα lncRNA στο πλάσμα που έχουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ ασθενών με ΓΚ και υγιών ατόμων. Για παράδειγμα, τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA H19 ήταν σημαντικά υψηλότερα στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου συγκριτικά με τα υγιή δείγματα ελέγχου. Από την ανάλυση της διαγνωστικής αξίας του συγκεκριμένου lncRNA, βρέθηκε ότι το προφίλ έκφρασης του H19 στο πλάσμα μπορεί να διακρίνει τους πάσχοντες από τους υγιείς με ευαισθησία 85,5% και ειδικότητα 80,1%, υποδηλώνοντας ότι αποτελεί έναν αρκετά υποσχόμενο διαγνωστικό βιοδείκτη στον ΓΚ [143]. Όσον αφορά τα lncRNA που εμπεριέχονται στο φορτίο των εξωσωμάτων, αυτά έχουν αναγνωριστεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για τη διάγνωση του ΓΚ λόγω της ενδοκυτταρικής τους προέλευσης και των υψηλών ποσοτήτων τους στο πλάσμα [144]. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων lncRNA στο εσωτερικό εξωσωμάτων παρουσιάζουν υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ ασθενών με καρκίνο του στομάχου και υγιών ατόμων ή ατόμων με προκαρκινικών γαστρικών αλλοιώσεων και έχουν συσχετιστεί με το μέγεθος, το στάδιο και την εισβολή του όγκου προέλευσής τους [145, 146].

Εκτός από την διάγνωση, τα κυκλοφορούντα lncRNA θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες, καθώς έχουν συσχετιστεί με παράγοντες που συνδέονται με την πρόγνωση των ασθενών με ΓΚ, όπως το μέγεθος του όγκου, του στάδιο της νόσου, η λεμφική μετάσταση, οι απομακρυσμένες μεταστάσεις και το βάθος εισβολής [142]. Ακόμη, δεδομένου του κρίσιμου ρόλου τους στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει θεραπευτικούς στόχους, με σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, λόγω της υψηλής ιστό-ειδικότητας των lncRNA και της ρύθμισης συγκεκριμένων πτυχών των δικτύων των κυττάρων, η στόχευσή τους ενδεχομένως να σχετίζεται με λιγότερες, τοξικές παρενέργειες. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασής τους, η έλλειψη κωδικοποιητικού δυναμικού και γρήγορη απενεργοποίησή τους, είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά που θα βοηθούσαν να επιτευχθεί άμεσα η φαρμακευτική δράση σε χαμηλότερες δόσεις [133]. Ορισμένα

απορρυθμισμένα lncRNA έχουν συσχετιστεί με την φαρμακευτική αντίσταση που παρουσιάζουν οι ασθενείς με καρκίνο του στομάχου. Επομένως, η θεραπευτική στόχευση των lncRNA θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της ευαισθησίας και βελτίωση της αποτελεσματικότητας των φαρμακευτικών αγωγών [142]. Ακόμη, η ανίχνευση του προφίλ έκφρασης των απορρυθμισμένων lncRNA που σχετίζονται με την αντίσταση σε θεραπεία σε ασθενείς με ΓΚ, θα μπορούσε να καθοδηγήσει την επιλογή κατάλληλης θεραπείας και τον εξατομικευμένο σχεδιασμό θεραπευτικού πλάνου [138]. Ωστόσο, κρίνεται αναγκαία η διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης των lncRNA τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε παθολογικό επίπεδο, καθώς η φαρμακευτική στόχευση αυτών των μορίων θα μπορούσε να οδηγήσει σε άγνωστες φυσιολογικές και παθολογικές αντιδράσεις, δεδομένου των πολύπλοκων και ποικίλων ρυθμιστικών δράσεων που διαδραματίζουν [128].

1.4. Σκοπός της εργασίας

Με αφετηρία την ανάγκη ανάπτυξης νέων αξιόπιστων βιοδεικτών στον ΓΚ, η συμβολή των μεταγραφικών παραγόντων επιβίωσης γενεαλογίας CDX2 και HNF4α στην ανάπτυξη της εντερικής μεταπλασίας που οδηγεί στον ΓΚ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση της νόσου αλλά και την αξιοποίηση τους ως νέους θεραπευτικούς στόχους στην κλινική πράξη. Εντούτοις, η φυσιολογική έκφραση και λειτουργία των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων σε άλλους ιστούς αποτελεί τροχοπέδη στην αξιοποίησή τους ως διαγνωστικά και θεραπευτικά μοριακά εργαλεία. Συνεπώς, η μελέτη καρκινοειδικών και ιστοειδικών lncRNA που ρυθμίζονται από τους ίδιους μεταγραφικούς παράγοντες με καρκινοειδικό τρόπο θα μπορούσε να αναδείξει αυτή την κατηγορία μορίων ως διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες και υποσχόμενους νέους θεραπευτικούς στόχους στον καρκίνο του στομάχου. Με γνώμονα τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ρύθμισης των lncRNA από τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α στον γαστρικό καρκίνο. Αρχικά κατασκευάστηκαν εργαλεία παροδικής σίγησης των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων σε μεταγραφικό επίπεδο, τα οποία στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων-στόχων σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, αφού πρώτα επιβεβαιώθηκε η έκφρασή τους σε αυτά. Στην συνέχεια, μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των εργαλείων σίγησης σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο, ώστε να εξακριβωθεί εάν αποτελούν αποτελεσματικά συστήματα για την μελέτη της ρύθμισης των πιθανών lncRNA-στόχων από τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες κατά την απορρύθμισή τους μελλοντικά. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τους CDX2 και HNF4α και qPCR στην ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη, με σκοπό την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων με συγκεκριμένες γονιδιωματικές αλληλουχίες, που έχουν ταυτοποιηθεί ως υποψήφιοι στόχοι μέσω βιοπληροφορικών αναλύσεων, και την ανάδειξή αυτών ως καθοδικούς ρυθμιστικούς στόχους των μεταγραφικών παραγόντων ενδιαφέροντος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

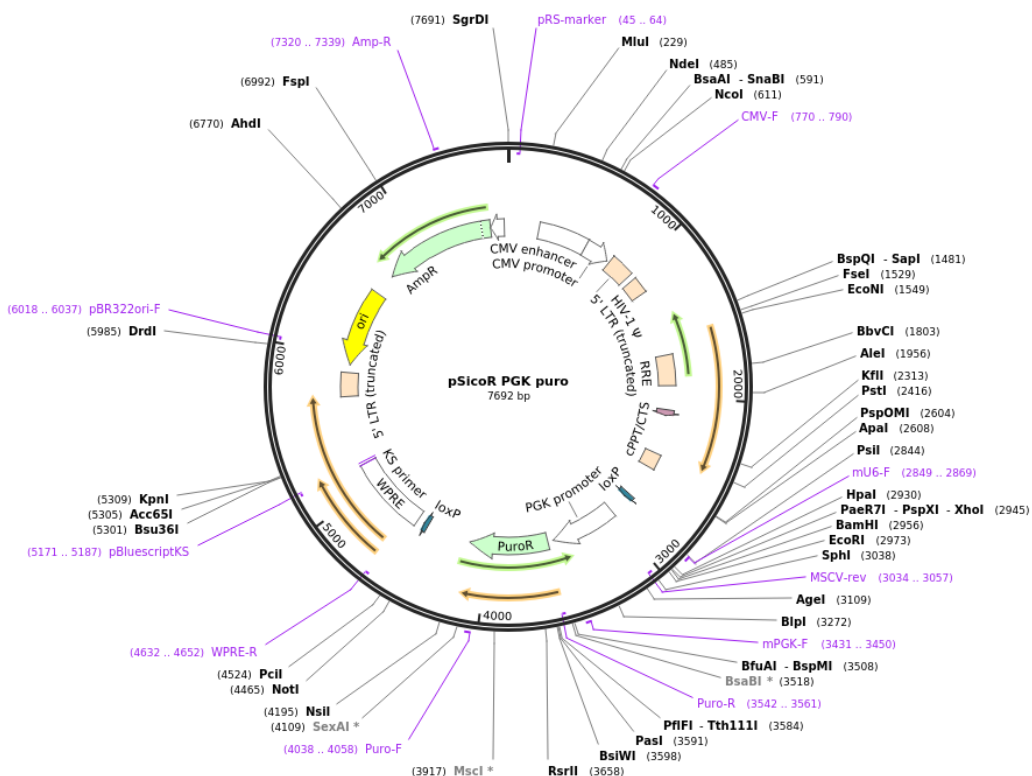
2.1. Κυτταρικές σειρές

Στις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές που αναγράφονται παρακάτω.

- **HFE145:** ανθρώπινη κυτταρική σειρά φυσιολογικών κυττάρων του γαστρικού επιθηλίου.
- **AGS:** ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά από γαστρικό επιθήλιο ασθενούς με γαστρικό αδеноκαρκίνωμα.
- **KATOIII:** ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά γαστρικού αδеноκαρκινώματος προερχόμενη από μετάσταση στην πλευρική συλλογή.
- **MKN45:** ανθρώπινη καρκινική κυτταρική φτωχά διαφοροποιημένου γαστρικού αδеноκαρκίνωμα ασθενούς προερχόμενη από μετάσταση στο ήπαρ.
- **NUGC4:** ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά γαστρικού αδеноκαρκινώματος προερχόμενη από μετάσταση σε παραγαστρικούς λεμφαδένες.

2.2. Κλωνοποίηση ενθέματος (shRNA) σε πλασμιδιακό φορέα

Για την RNAi σίγηση των μεταγράφων των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα σχεδιασμένα shRNAs από προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου. Συγκεκριμένα, αρχικά είχαν σχεδιαστεί κατάλληλες siRNA αλληλουχίες για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a, οι οποίες στην συνέχεια μετατράπηκαν σε shRNA αλληλουχίες με κατάλληλα άκρα για την ενσωμάτωσή τους σε πλασμιδιακό φορέα. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των ενθεμάτων είναι ο ρSicoR PGK puro (Addgene) (από εδώ και στο εξής αναφέρεται στο κείμενο ως ρSicoR) (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα ρSicoR PGK puro (Addgene) (ανάκτηση από: <https://www.addgene.org/12084/>).

Υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων shRNAs

Πριν την ενσωμάτωση των shRNAs στους φορείς pSicoR, πραγματοποιήθηκε μια προετοιμασία των ολιγονουκλεοτιδίων shRNA με σκοπό τον σχηματισμό δίκλωνων μορίων. Συγκεκριμένα, αναμείχθηκαν 2 μl νοηματικά και 2 μl αντινοηματικά ολιγονουκλεοτίδια shRNA, μαζί με 96 μl annealing buffer (100mM KoAc, 30mM HEPES, 2mM MgOAc) για κάθε μεταγραφικό παράγοντα και τα μίγματα θερμάνθηκαν για 5' στους 95°C. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να μειωθεί η θερμοκρασία στους 30°C, ώστε μέσω της σταδιακής και ελεγχόμενης ψύξης τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια να μετατραπούν σε δίκλωνο ενθεματικό DNA.

Αντίδραση λιγάσης

Για την διασύνδεση του φορέα pSicoR με τα shRNAs για τους CDX2 και HNF4a, χρησιμοποιήθηκαν γραμμικοποιημένοι πλασμιδιακοί φορείς pSicoR που είχαν προκύψει από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XhoI/BamHI. Τα shRNAs των μεταγραφικών παραγόντων διέθεταν, επίσης, κατάλληλα συμπληρωματικά κολλώδη άκρα για τις θέσεις περιορισμού XhoI και BamHI. Οι αντιδράσεις διασύνδεσης πραγματοποιήθηκαν στους 16°C για 16 ώρες. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε μια αντίδραση λιγάσης του φορέα pSicoR, όπου στην θέση του ενθέματος προστέθηκε ενέσιμο ύδωρ (water for injection, WFI) (self-ligation). Η σύσταση των αντιδράσεων αναγράφεται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Σύσταση της αντίδρασης λιγάσης πλασμιδιακού φορέα με ένθεμα shRNA.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Ένθεμα	4
Πλασμιδιακός φορέας (50 ng/μl)	1
T4 DNA ligase buffer 10x (NEB)	1
T4 DNA ligase buffer (Minotech)	0,5
WFI	3,5
Τελικός όγκος	10

2.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Για τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά βακτήρια *E. coli* XL1blue. Αναμείχθηκαν 50 μl βακτηριακά κύτταρα XL1blue και 5 μl προϊόν διασύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα με το shRNA στις αντιδράσεις μετασχηματισμού για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες και το self-ligation. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν για 20' στον πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ των βακτηρίων για 50'' στους 42°C, με σκοπό την πρόσληψη των πλασμιδίων από τα βακτήρια και άμεση επώαση για 2'' στον πάγο με σκοπό την μείωση του στρες των βακτηρίων. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 945 μl υγρού θρεπτικού μέσου LB (CONDA-ronadisa) χωρίς αμπικιλίνη (AMP) και ο συνολικός όγκος μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα βακτήρια επωάστηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (160 rpm) για 50', προκειμένου τα βακτήρια να ολοκληρώσουν δύο πλήρεις κύκλους αντιγραφής και να προλάβουν να εκφράσουν το πλασμιδιακό γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Με το πέρας της επώασης, επιστρώθηκαν 350 μl από κάθε υγρή καλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB άγαρ με AMP 100μg/ml, τα οποία επωάστηκαν 37°C ολονύκτια. Έπειτα, επιλέχθηκαν μοναδιαίες αποικίες βακτηρίων, οι οποίες μεταφέρθηκαν μεμονωμένα σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρουσία 3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με AMP 100μg/ml και επωάστηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (160 rpm) ολονύκτια.

2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (plasmid DNA, pDNA)

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. Coli* XL1blue χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση pDNA με σκοπό την ανίχνευση θετικών κλώνων. Η απομόνωση pDNA σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το προσαρμοσμένο πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης («homemade»), ενώ για την απομόνωση pDNA από θετικούς κλώνους *E. coli* XL1blue σε μετέπειτα στάδιο χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο «Isolation of high-copy plasmid DNA from E.coli» του kit «NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA» (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Κατά την απομόνωση pDNA σύμφωνα με το προσαρμοσμένο πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης, αρχικά έγινε συλλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων με φυγοκέντρηση της υγρής καλλιέργειας στις 11.000rpm στους 4°C για 2' και απόρριψη του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με διαδοχική προσθήκη 100μl διαλύματος λύσης I (50mM Tris, 10mM EDTA, 100μg/ml RNaseA, ddH₂O), 200 μl φρέσκου διαλύματος λύσης II (1% SDS, 0,2M NaOH, ddH₂O), επώαση για 5' σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 150μl διαλύματος λύσης III (3M KOAc, glacial acetate/acetic acid, ddH₂O) και επώαση για 5' στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000rpm στους 4°C για 15' και ακολούθησε απομόνωση του pDNA από το συλλεγμένο υπερκείμενο με κλασικό πρωτόκολλο κατακρήμνισης αιθανόλης. Το απομονωμένο pDNA κάθε δείγματος επαναδιαλύθηκε σε 100 μl WFI.

2.5. Διαγνωστικές πέψεις

Για την ταυτοποίηση των πλασμιδιακών φορέων στους οποίους έχουν κλωνοποιηθεί με επιτυχία τα shRNAs των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/XbaI, τα οποία αναγνωρίζουν και κόβουν τον φορέα σε μοναδικές θέσεις εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης. Η σύσταση της αντίδρασης κάθε δείγματος περιγράφεται στον **Πίνακα 2**. Στις διαγνωστικές πέψεις συμπεριλήφθηκαν ένα αρνητικό και ένα θετικό δείγμα ελέγχου. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε καθαρό pDNA άκοππου πλασμιδίου pSicoR, ενώ ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε καθαρό pDNA πλασμιδιακού φορέα pSicoR που φέρει διαφορετικό ένθεμα shRNA και η επιτυχία της ένθεσης είχε επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση κατά Sanger. Τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες. Στην συνέχεια, τα προϊόντα των διαγνωστικών πέψεων αναμείχθηκαν με 10 μl χρωστική φορτώματος 6x και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ως μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 1kb plus DNA Ladder 100 ng/μl (NEB).

Πίνακας 2. Σύσταση της αντίδρασης διαγνωστικής πέψης με σκοπό την ανίχνευση θετικών κλώνων.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Απομονωμένο pDNA	5 μl
EQ buffer 10x (Enzyquest)	5 μl
BamHI (Enzyquest)	1 μl
XbaI (Enzyquest)	1 μl
WFI	38 μl
Τελικός όγκος 50 μl	

Τα δείγματα απομονωμένου pDNA που βρέθηκαν να είναι θετικά στην ενσωμάτωση των επιθυμητών shRNA έναντι των μεταγραφικών παραγόντων-στόχων χρησιμοποιήθηκαν για εκ νέου μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E. coli* XL1blue, μόνο που αυτήν τη φορά μετασχηματίστηκαν 10 μl κυττάρων με 1 μl θετικών πλασμιδίων και στην συνέχεια προστέθηκαν 989 μl υγρό θρεπτικό μέσο LB, ενώ επιστρώθηκαν 200 μl υγρής καλλιέργειας σε τρυβλία με LB άγαρ με AMP 100 μg/ml. Στην συνέχεια,

τοποθετήθηκαν μοναδιαίες αποικίες από κάθε τρυβλίο σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 4 ml υγρό θρεπτικό μέσο LB με AMP 100 µg/ml, όπου επωάστηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (160 rpm) ολονύκτια. Η υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση καθαρού pDNA θετικών κλώνων με το kit «NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA» (Macherey-Nagel) προς αξιοποίηση στις επόμενες πειραματικές διαδικασίες.

Οι πλασμιδιακοί φορείς που ταυτοποιήθηκαν ως θετικοί χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα διαμόλυνσης γαστρικών καρκινικών κυττάρων με λεντιούς με σκοπό την έκφραση των shRNAs και την RNAi σίγηση των μεταγράφων-στόχων. Συγκεκριμένα, οι φορείς pSicoR που έφεραν τα shRNAs έναντι του CDX2 και HNF4α ενσωματώθηκαν σε λεντιούς και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων AGS με τους λεντιούς που παράχθηκαν, με αποτέλεσμα την μεταγραφική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων-στόχων. Η αποτελεσματικότητα του πειράματος σίγησης κάθε μεταγραφικού παράγοντα ελέγχθηκε τόσο σε μεταγραφικό (απομόνωση RNA και ποσοτική PCR) όσο και πρωτεϊνικό επίπεδο (απομόνωση πρωτεϊνών και Western Blot).

2.6. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA (RNA extraction) από τα κύτταρα AGS στα οποία έγινε σίγηση των CDX2 και HNF4α, τα δείγματα κυττάρων ομογενοποιήθηκαν σε 1 ml τριζόλης. Στην συνέχεια, ακολούθησε έντονη ανάδευση με 200 µl χλωροφόρμιο και φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm και στους 4°C για 5'. Το υπερκείμενο που δημιουργήθηκε μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf, όπου προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης και 1 µl γλυκογόνο. Ακολούθησε ήπια ανακίνηση, επώαση στον πάγο για 10' και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm και στους 4°C για 15'. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, προστέθηκαν 500 µl παγωμένης EtOH 70% στο ίζημα που δημιουργήθηκε και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm και στους 4°C για 10'. Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα δείγματα αφέθηκαν με ανοιχτό το καπάκι προκειμένου να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε WFI. Στην συνέχεια τα δείγματα ολικού RNA μετρήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 UV, προκειμένου να εκτιμηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητά τους, και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.7. Κατεργασία με DNase (DNase treatment)

Προτού προχωρήσουν τα δείγματα στην διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA), πραγματοποιήθηκε επεξεργασία τους με την χρήση DNase I (ThermoFisher scientific), με σκοπό την αποικοδόμηση των πιθανών υπολειμμάτων γονιδιωματικού DNA. Οι ενζυμικές αντιδράσεις επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα, η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3**. Στις αντιδράσεις προστέθηκε επίσης RNase out, ώστε να παρεμποδιστεί η δράση των πιθανών ενζύμων που υδρολύουν το RNA.

Αμέσως μετά ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της παραπάνω ενζυμικής αντίδρασης με την μέθοδο φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της αντίδρασης και τον πλήρη καθαρισμό του RNA. Συγκεκριμένα, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 40 µl οξικού νατρίου 3M pH=5,6, 360 µl WFI και 400 µl φαινόλη/χλωροφόρμιο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm και στους 4°C για 5', μετά από έντονη ανάδευση. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα tubes τύπου erpendorf, όπου προστέθηκαν 1 ml παγωμένης EtOH 100% και 1 µl γλυκογόνο και τα δείγματα επωάστηκαν για 1 ώρα στους -80°C, με σκοπό την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων με κατακρήμνιση της αιθανόλης. Με το τέλος της επώασης, τα δείγματα

φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm και στους 4°C για 30', απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl παγωμένης EtOH 70% στο ίζημα που δημιουργήθηκε. Από αυτό το βήμα και έπειτα, επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην §2.6.Απομόνωση RNA.

Πίνακας 3. Σύσταση της ενζυμικής αντίδρασης DNase I.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Δείγμα RNA	25 μl
DNase I Buffer 10x (Thermoscientific for DNase I)	3 μl
DNase I, RNase-free (ThermoFisher scientific)	1 μl
RNase out	0,5 μl
WFI	0,5 μl
Τελικός όγκος	30 μl

2.8. Σύνθεση cDNA (cDNA synthesis)

Προκειμένου να ελεγχθούν τα μεταγραφικά επίπεδα των υπό μελέτη μεταγράφων με την μέθοδο της ποσοτικής PCR, χρειάστηκε να προηγηθεί σύνθεση cDNA από το ολικό καθαρό RNA των δειγμάτων που απομονώθηκε. Η σύνθεση cDNA πραγματοποιείται με την ενζυμική αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, η οποία καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLV, Invitrogen). Επειδή για την ιδανική λειτουργία του ενζύμου απαιτούνται 1 μg καθαρού RNA σε τελικό όγκο 10 μl, προηγήθηκε προετοιμασία των καθαρών δειγμάτων RNA βάσει των τιμών των συγκεντρώσεών τους, ώστε να επιτευχθεί η απαραίτητη ποσότητα και όγκος υποστρώματος της αντίδρασης. Ακόμη, προηγήθηκε επώαση των 10 μl του καθαρού RNA με 2 μl από το μίγμα των εκκινητών της M-MLV και των dNTPs (Πίνακας 4) σε heatblock στους 65°C για 5', με σκοπό την αποδιάταξη των πιθανών δευτεροταγών δομών του RNA και την υβριδοποίηση των εκκινητών με τα μόρια RNA. Εν συνεχεία, τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν με 8 μl του μίγματος των αντιδράσεων της σύνθεσης cDNA (η σύσταση παρουσιάζεται στον Πίνακα 5) σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστέθηκαν 380 μl WFI στα δείγματα cDNA και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Πίνακας 4. Σύσταση του μίγματος εκκινητών και dNTPs.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Εκκινητές random hexamers (100μM, Takara)	1 μl
dNTPs (10μM dNTP Mix, Invitrogen)	1 μl
Τελικός όγκος	2 μl

Πίνακας 5. Σύσταση της ενζυμικής αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής.

Αντιδραστήρια	Όγκος
5x Buffer (Invitrogen)	4 μl
DTT 100 Mμ (Invitrogen)	2 μl
RNase out	0,5 μl
WFI	0,5 μl
M-MLV (Invitrogen)	1 μl
Τελικός όγκος	8 μl

2.9. Ποσοτική PCR (qPCR)

Η μέθοδος της ποσοτικής PCR ή qPCR χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ποσότητας DNA που υπήρχε σε αρχικά δείγματα DNA (cDNA ή χρωματίνη). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το μίγμα της SYBRgreen 2x (ThermoFisher), η οποία έχει την ικανότητα εκπομπής ισχυρού σήματος φθορισμού, όταν δεσμεύεται στα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Το μηχάνημα της qPCR μετράει τα επίπεδα του εκπεμπόμενου φθορισμού, ο οποίος επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του DNA που υπάρχει στο αρχικό δείγμα. Η σύσταση των αντιδράσεων qPCR που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας παρουσιάζεται στον **Πίνακα 6**. Τόσο η διαδικασία σχεδιασμού της αντίδρασης (ορισμός του plate, σχεδιασμός πρωτοκόλλου) όσο και η ανάλυση των αποτελεσμάτων υλοποιήθηκαν με το πρόγραμμα CFX Manager (BIO-RAD) και οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν με το μηχάνημα qPCR της BIO-RAD.

Πίνακας 6. Σύσταση της αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήρια	Όγκος
DNA	4 μ l
SYBRgreen Buffer Mix (2X) (ThermoFisher)	10 μ l
Primer F/R	2 μ l
WFI	4 μ l
Τελικός όγκος 20 μ l	

Στα εξεταζόμενα δείγματα cDNA στο πλαίσιο των πειραμάτων σίγησης των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων, εκτός από την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων στόχων, ανιχνεύθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης του ιδιοσυστατού γονιδίου *GAPDH*, το οποίο παρουσιάζει σταθερή έκφραση ανεξαρτήτως του ιστού, του αναπτυξιακού σταδίου και των πειραματικών συνθηκών, με σκοπό την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων ως προς αυτό το γονίδιο αναφοράς και την εξομάλυνση πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων που αφορούν την αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων, την ποιότητα του RNA ή του cDNA. Επίσης, τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου-στόχου σε ένα εξεταζόμενο δείγμα προσδιορίστηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασής του ίδιου γονιδίου στο αρνητικό δείγμα ελέγχου που συμπεριλήφθηκε στην αντίδραση.

Στις qPCR που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του πειράματος της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP-qPCR), χρησιμοποιήθηκαν 4 πρότυπα δείγματα DNA γνωστής συγκέντρωσης σε υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις, τα οποία αξιοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς και την ποσοτικοποίηση της αρχικής ποσότητας DNA των δειγμάτων. Ακόμη, σε αυτές τις qPCR ακολουθήθηκε μια διαφορετική διαδικασία κανονικοποίησης, η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης ως προς τα αποτελέσματα του δείγματος "Input DNA", στο οποίο δεν έγινε ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης, με σκοπό να εξομαλυνθούν πιθανές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων λόγω της αποτελεσματικότητας των εκκινητών για τις εξεταζόμενες γονιδιωματικές περιοχές. Στο δεύτερο στάδιο, η διαδικασία κανονικοποίησης ήταν αντίστοιχη αυτής που έγινε στις qPCR του πειράματος σίγησης, με την διαφορά ότι αντί της χρήσης ενός ιδιοσυστατού γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν γονιδιωματικές περιοχές, οι οποίες είναι γνωστό ότι δεν προσδένονται οι υπό μελέτη μεταγραφικοί παράγοντες. Με αυτήν την κανονικοποίηση ουσιαστικά υπολογίστηκε το εύρος αλλαγής (fold enrichment), δηλαδή πόσες φορές περισσότερος εμπλουτισμός υπήρχε της εκάστοτε γονιδιωματικής αλληλουχίας ενδιαφέροντος σε σχέση με τις υπόλοιπες γονιδιωματικές περιοχές στα δείγματα ανοσοκατακρήμνισης.

2.10. Απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση πρωτεϊνών από ολόκληρα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση 1-1,5 ml ευκαρυωτικής καλλιέργειας στις 3.000 rpm στους 4°C για 5', επακόλουθη απόρριψη του υπερκειμένου και ομογενοποίηση του κυτταρικού ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας ραδιοανοσοκαθίζησης (Radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA buffer) (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% Sodium Deoxycholate (NaDOC), 150 mM NaCl, 10% glycerol). Το συγκεκριμένο διάλυμα επιτυγχάνει την λύση των κυττάρων με αποτέλεσμα απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα συνδράμει στην προστασία των πρωτεϊνών από αποικοδόμηση. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων με το φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 UV και αραιώση των δειγμάτων με επιπλέον ποσότητα RIPA όπου χρειαζόταν και ήταν εφικτό, ούτως ώστε όλα τα δείγματα να είχαν παρόμοια συγκέντρωση πρωτεΐνης. Τέλος, προστέθηκε ίσος όγκος 2x SDS loading buffer με τον όγκο του RIPA στο οποίο ήταν διαλυμένο το πρωτεϊνικό δείγμα και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση σε Western Blot.

2.11. Western Blot

Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western ή Western Blot χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ή/και την ημιποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος σε δείγματα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που παράχθηκαν στο πλαίσιο των πειραματικών διαδικασιών της διπλωματικής εργασίας.

Στο πρώτο στάδιο της μεθόδου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων σε αποδιατακτικές συνθήκες σύμφωνα με το μοριακό βάρος (MB) τους με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE. Αρχικά συναρμολογήθηκε το σύστημα κάθετης ηλεκτροφόρησης και έγινε παρασκευή των πηκτών διαχωρισμού (separating ή resolving gel) (**Πίνακας 7**) και επιστίβαξης (stacking gel) με μείγμα ακρυλαμίδης 40% (BIO-RAD) (**Πίνακας 8**). Η παρασκευή της πηκτής επιστίβαξης έπεται του πολυμερισμού της πηκτής διαχωρισμού στο σύστημα κάθετης ηλεκτροφόρησης, όπου τοποθετείται πάνω στην ήδη πολυμερισμένη πηκτή διαχωρισμού.

Πίνακας 7. Σύσταση της πηκτής διαχωρισμού 10%.

Αντιδραστήρια	Όγκος
dH ₂ O	4,8 ml
40% Acrylamide Bis Solution (BIO-RAD)	2,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS (ammonium persulphate)	0,1 ml
TEMED	0,004 ml
Τελικός όγκος 10 ml	

Το σύστημα κάθετης ηλεκτροφόρησης με τις πολυμερισμένες πηκτές τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος Running Buffer, η σύσταση του οποίου είναι 900ml dH₂O, 100ml Running Buffer (-SDS) 10x (30 gr Tris base, 144gr glycine, 1L ddH₂O) και 10ml SDS 10%. Τα πρωτεϊνικά δείγματα, αφού πρώτα υπέστησαν θερμική επεξεργασία στους 95°C για 5' (ή για 10' για δείγματα που χρησιμοποιούνταν πρώτη φορά), φορτώθηκαν στην πηκτή επιστίβαξης και ηλεκτροφορήθηκαν αρχικά στα 75 V και στην συνέχεια, αφού τα δείγματα εισήλθαν στην πηκτή διαχωρισμού, στα 110 V. Μαζί με τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν 5 μl του μάρτυρα μοριακού βάρους Prestained protein Ladder (Invitrogen).

Πίνακας 8. Σύσταση της πηκτής επιστίβαξης 5%.

Αντιδραστήρια	Όγκος
dH ₂ O	2,96 ml
40% Acrylamide Bis Solution (BIO-RAD)	0,48 ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,5 ml
10% SDS	0,04 ml
10% APS (ammonium persulphate)	0,04 ml
TEMED	0,004 ml
Τελικός όγκος 4 ml	

Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, ακολούθησε η ηλεκτρομεταφορά τους από την πηκτική πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Κατά την συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς, η πηκτική τοποθετήθηκε με σωστό προσανατολισμό και με τέτοιο τρόπο, ώστε να βρίσκεται σε άμεση επαφή με την μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και ανάμεσα σε διηθητικά χαρτιά και να επιτραπεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική στην μεμβράνη μέσω τριχοειδών φαινομένων. Η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς συνδέθηκε σε συσκευή ηλεκτροφοδοσίας και η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 110 V στους 4°C για 90' παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος Transfer Buffer με σύσταση 700ml dH₂O, 100ml Running Buffer (-SDS) 10x, 200ml MeOH.

Στο επόμενο βήμα της μεθόδου πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των πρωτεϊνών-στόχων με την χρήση ειδικών αντισωμάτων και εμφάνισή τους σε φιλμ. Η μεμβράνη επώαστηκε με 10ml διαλύματος 5% w/v αποβουτυρωμένου γάλατος σκόνης σε TBST-T 1X (9ml dH₂O, 1ml TBS 10x, 0,1ml 10% Tween-20) υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος στην μεμβράνη, το οποίο προστέθηκε μετά την αφαίρεση του γάλατος. Η μεμβράνη επώαστηκε ολονύκτια με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν 4 διαδοχικές πλύσεις του πρωτογενούς αντισώματος με 2,5 ml TBST-T 1X (5'/πλύση) και επώαση της μεμβράνης με 5ml δευτερογενούς αντισώματος στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση για 1 ώρα. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι συζευγμένα με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP). Επαναλήφθηκε η διαδικασία των πλύσεων για απομάκρυνση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος από την μεμβράνη και ξεκίνησε η προετοιμασία της μεμβράνης για την εμφάνιση των πρωτεϊνών σε φιλμ. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη επώαστηκε με μίγμα των 2 αντιδραστηρίων (σε αναλογία 1:1) του υποστρώματος χημειοφωταύγειας ECL για 5', τοποθετήθηκε σε κασετίνα εμφάνισης, όπου πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση σε φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο, μέσω της διαδοχικής εμβάπτισης του φιλμ στα διαλύματα εμφάνισης και μονιμοποίησης και σε νερό. Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**.

Πίνακας 9. Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Πρωτογενή αντισώματα
anti-CDX2 (Santa Cruz, Mouse monoclonal IgG), 1:1000
anti-HNF4α (Santa Cruz, Mouse monoclonal IgG), 1:1000
anti-beta-actin (Cell signaling, Mouse monoclonal), 1:1000
Δευτερογενή αντισώματα
anti-mouse HRP conjugated (Santa Cruz), 1:10000

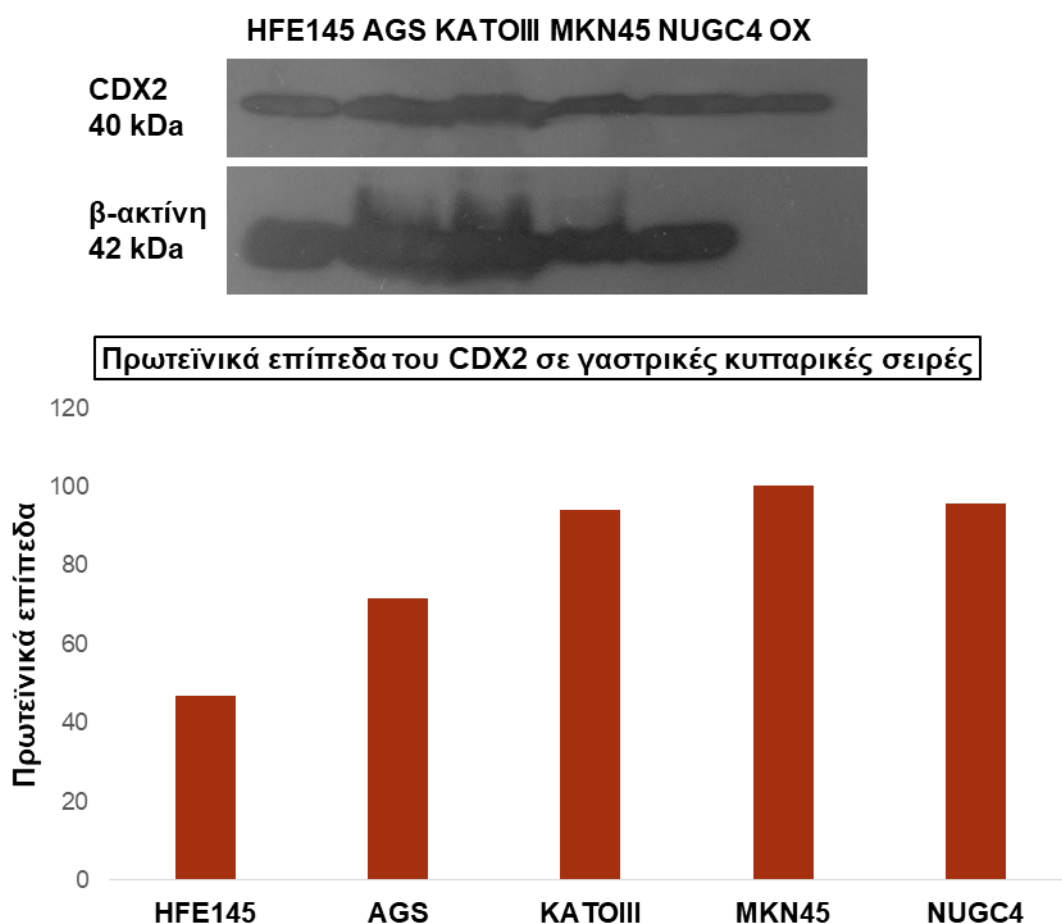
2.12. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Η δοκιμασία της ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης είναι μια τεχνική η οποία επιτρέπει την απομόνωση και τον προσδιορισμό των γονιδιωματικών θέσεων πρόσδεσης των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων στην χρωματίνη σε ζωντανά κύτταρα (*in vivo*), δίνοντας έτσι την δυνατότητα διερεύνησης της ρυθμιστικής λειτουργίας τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επιλεκτικής κατακρήμισης των μεταγραφικών παραγόντων στόχων μαζί με τις γονιδιωματικές περιοχές πρόσδεσής τους με την χρήση ειδικών αντισωμάτων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ChIP για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α, όπως περιγράφηκε προηγουμένως [147].

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 σε γαστρικές κυτταρικές σειρές

Ένας από τους βασικούς στόχους της διπλωματικής εργασίας ήταν η κατασκευή εργαλείων παροδικής σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α σε μεταγραφικό επίπεδο σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ένα τέτοιο πείραμα σε κυτταρικές σειρές, πρέπει πρώτα να διερευνηθεί εάν οι εν λόγω μεταγραφικοί παράγοντες εκφράζονται σε αυτές. Στο πλαίσιο προηγούμενων διπλωματικών εργασιών του εργαστηρίου είχε επιβεβαιωθεί η έκφραση του HNF4α σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο, ωστόσο η έκφραση του CDX2 είχε εξακριβωθεί μόνο σε επίπεδο mRNA. Για την διερεύνηση της έκφρασης του CDX2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε γαστρικές κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκαν Western Blot στις οποίες ελέγχθηκε η παρουσία του CDX2 σε δείγματα ολικής πρωτεΐνης από τις γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές AGS, MKN45, NUGC4 και KATOIII, καθώς και από φυσιολογικά γαστρικά κύτταρα HFE145 και κύτταρα HFE145 με υπερέκφραση του CDX2 (από προηγούμενη διπλωματική εργασία), τα οποία λειτούργησαν ως αρνητικός και θετικός μάρτυρας του πειράματος αντίστοιχα.



Εικόνα 8. Διερεύνηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε γαστρικές κυτταρικές σειρές. Στο πάνω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται οι ζώνες του CDX2 και της ιδιοσύστατης πρωτεΐνης β-ακτίνη που ανιχνεύθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στο κάτω μέρος απεικονίζονται τα κανονικοποιημένα σχετικά επίπεδα του CDX2 που ανιχνεύθηκαν στις διάφορες

γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (HFE145) σε μορφή ραβδογράμματος. ΟΧ: Overexpression, δείγμα υπερέκφρασης του CDX2 στην γαστρική κυτταρική σειρά HFE145.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (**Εικόνα 8**) ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 εντοπίζεται σε όλες τις εξεταζόμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Με βάση τα σχετικά επίπεδα της πρωτεΐνης που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ImageJ και τα οποία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ιδιοσυστατής πρωτεΐνης β-ακτίνης που ανιχνεύθηκε στα ίδια δείγματα, φαίνεται ότι ο CDX2 ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα σε όλες τις κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου σε σχέση με τα φυσιολογικά γαστρικά κύτταρα (HFE145), με τα υψηλότερα επίπεδα να απαντώνται στις καρκινικές κυτταρικές σειρές MKN45, NUGC4 και KATOIII, ενώ τα αμέσως υψηλότερα επίπεδα του CDX2 να παρατηρούνται για την γαστρική καρκινική σειρά AGS. Για το δείγμα υπερέκφρασης του CDX2 στην κυτταρική σειρά HFE145 δεν προσδιορίστηκαν τα σχετικά επίπεδα της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε, καθώς η ποσότητα του δείγματος δεν επαρκούσε για την ανίχνευση της β-ακτίνης και άρα δεν ήταν εφικτή η κανονικοποίηση των επιπέδων. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και λαμβάνοντας υπόψιν αφενός την υψηλή έκφραση των CDX2 και HNF4a σε μεταγραφικό επίπεδο στα κύτταρα AGS και αφετέρου την ευρεία χρήση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς στην έρευνα για τον ΓΚ (βλ. 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ), επιλέχθηκε η γαστρική καρκινική σειρά AGS τόσο για τα πειράματα της σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a όσο και τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για την πρωτεΐνη και των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων.

3.2. RNAi σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a

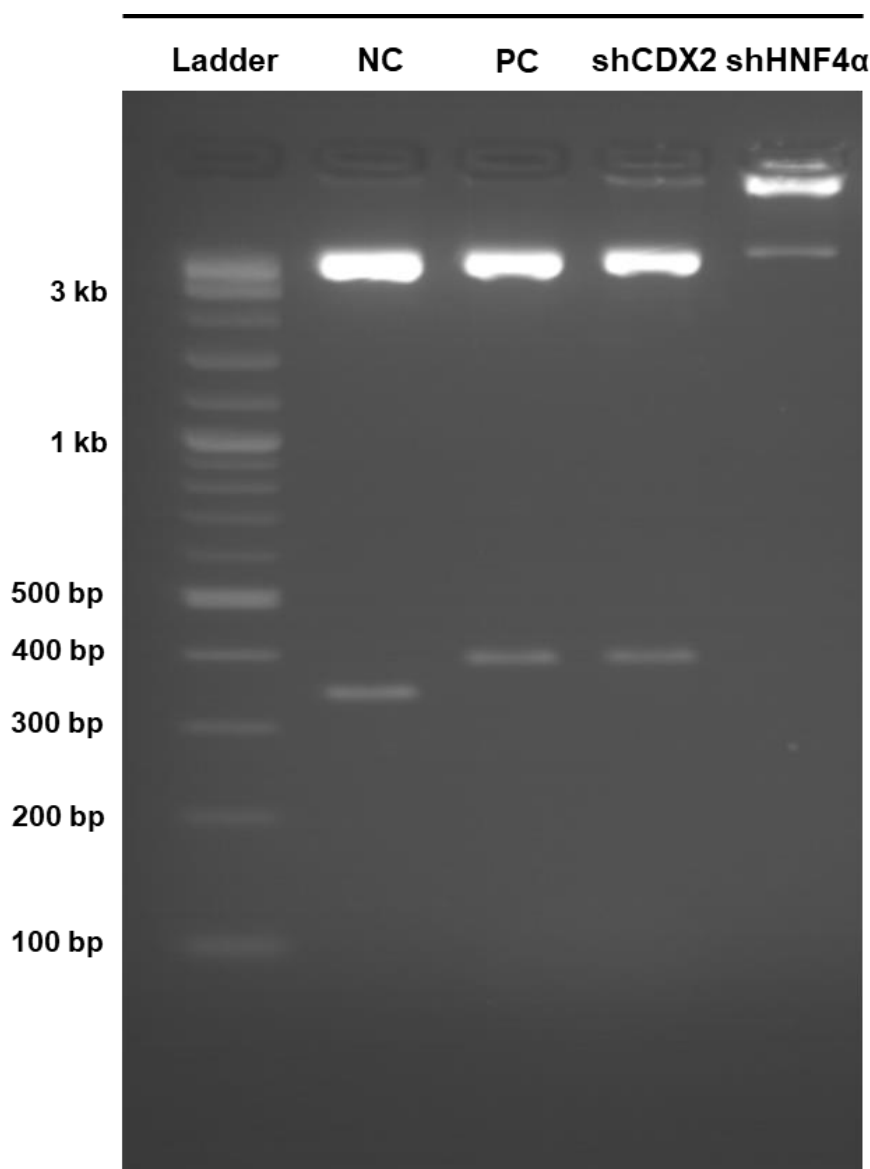
Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση κατάλληλα σχεδιασμένων shRNAs στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR για την καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a και ακολούθησαν πειράματα RNAi σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων σε κύτταρα AGS, μέσω της εισαγωγής των κλωνοποιημένων φορέων στα κύτταρα με λεντιιούς. Απώτερος σκοπός ήταν η κατασκευή αποτελεσματικών εργαλείων παροδικής σίγησης, τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν μελλοντικά για την διερεύνηση και αποσαφήνιση του ρόλου των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων ως ανοδικοί ρυθμιστές των πιθανών lncRNA στόχων τους.

3.3.1. Αποτελέσματα διαγνωστικών πέψεων για την ανίχνευση πλασμιδιακών φορέων με ένθεμα shRNA

Από τις διαγνωστικές πέψεις που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση των φορέων pSicoR στους οποίους έχουν κλωνοποιηθεί επιτυχώς τα shRNAs για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/XbaI, τα αναμενόμενα προϊόντα ενός θετικού κλώνου είναι ένα τμήμα DNA μεγέθους 7.348 bp και ένα μικρότερο τμήμα 392 bp. Η διαφοροποίηση ενός θετικού από έναν αρνητικό κλώνο προκύπτει από το μικρότερο κομμάτι DNA, που στην περίπτωση ενός αρνητικού κλώνου είναι 344 bp.

Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής πέψης σε πηκτή αγαρόζης 2% (**Εικόνα 9**) συμπεραίνεται ότι ο φορέας στον οποίο κλωνοποιήθηκε το shRNA για τον CDX2 (shCDX2) στην 4^η διαδρομή είναι θετικός, καθώς η μικρότερη ζώνη εμφανίζεται περίπου στις 390 bp, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του θετικού δείγματος ελέγχου (3^η διαδρομή – πλασμιδιακός φορέας pSicoR με ένθεμα shRNA) και σε αντίθεση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (2^η διαδρομή – πλασμιδιακός φορέας pSicoR) που η μικρότερη ζώνη αντιστοιχεί σε τμήμα DNA μεγέθους ~340 bp. Όσον αφορά τον φορέα στον οποίο

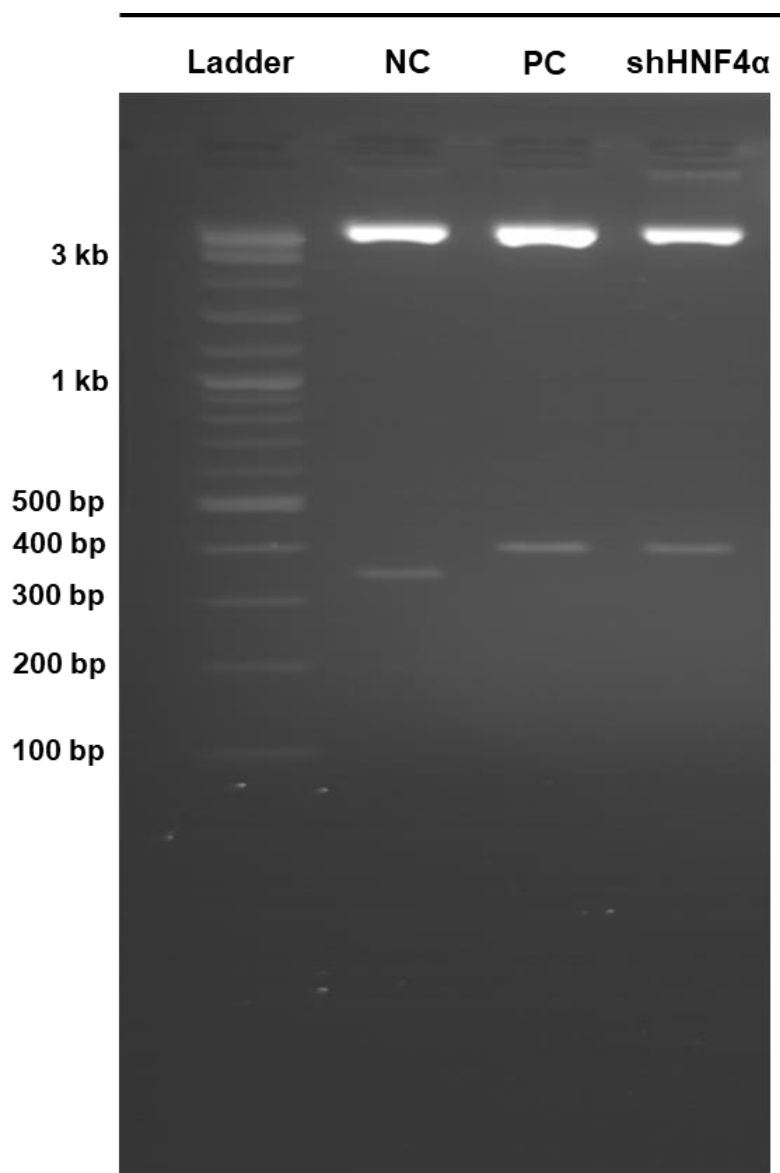
κλωνοποιήθηκε shRNA για τον HNF4α (shHNF4α) στην 5^η διαδρομή, τα αποτελέσματα είναι ασαφή καθώς δεν υπάρχει η καθοριστική ζώνη μικρότερου μεγέθους. Εμφανίζεται η αναμενόμενη ζώνη μεγέθους τμήματος DNA περίπου στις 7.000 bp, ωστόσο η ένταση της ζώνης είναι ασθενέστερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Αυτό σε συνδυασμό με την παρουσία σήματος στο πάνω μέρος της πηκτής, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε ατελής πέψη του πλασμιδίου ενδεχομένως λόγω χαμηλής καθαρότητας του δείγματος. Για αυτόν τον λόγο έγινε νέα διαγνωστική πέψη φορέα pSicoR στον οποίο κλωνοποιήθηκε το shHNF4α από διαφορετικό βακτηριακό κλώνο.



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων διαγνωστικής πέψης του φορέα pSicoR με σκοπό την ανίχνευση θετικών φορέων για τα shCDX2 και shHNF4α σε πηκτή αгарόζης 2%. Ladder: μάρτυρας μοριακών βαρών 1 kb plus ladder (NEB). NC: αρνητικό δείγμα ελέγχου. PC: θετικό δείγμα ελέγχου.

Βάσει της ηλεκτροφόρησης της νέας διαγνωστικής πέψης που πραγματοποιήθηκε (**Εικόνα 10**) γίνεται αντιληπτό αφενός ότι η διαγνωστική πέψη ήταν επιτυχής, όπως φαίνεται από την παρουσία δύο ζωνών που αντιστοιχούν σε τμήματα DNA με τα αναμενόμενα μεγέθη (4^η διαδρομή), και αφετέρου ότι ο πλασμιδιακός φορέας φέρει την ένθεση του shRNA για τον HNF4α, δεδομένου ότι η χαμηλότερη ζώνη στην πηκτή ευθυγραμμίζεται με την ζώνη του θετικού δείγματος ελέγχου στις ~390 bp. Συμπερασματικά,

από τα αποτελέσματα και των δύο ηλεκτροφορήσεων προκύπτει ότι η ένθεση των shRNA για τον CDX2 και HNF4α ήταν επιτυχής.

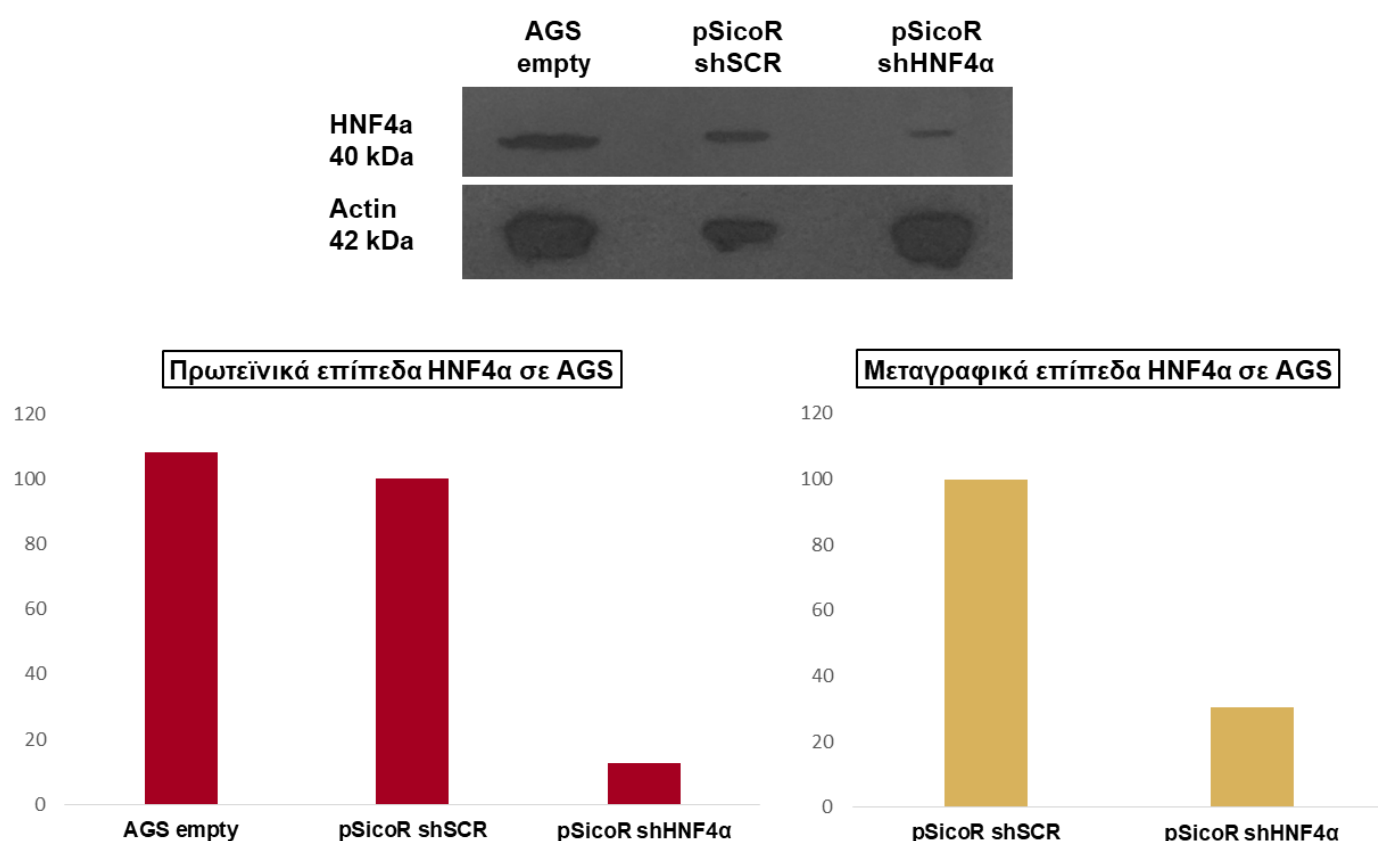


Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της νέας διαγνωστικής πέψης του φορέα pSicoR με σκοπό την ανίχνευση θετικών φορέων για το shHNF4α σε πηκτή αγαρόζης 2%. Ladder: μάρτυρας μοριακών βαρών 1 kb plus ladder (NEB). NC: αρνητικό δείγμα ελέγχου. PC: θετικό δείγμα ελέγχου.

3.3.2. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α σε μεταγραφικό επίπεδο και μεταφραστικό επίπεδο

Η αποτελεσματικότητα της σίγησης κάθε μεταγραφικού παράγοντα ενδιαφέροντος (CDX2 και HNF4α) μεμονωμένα σε κύτταρα AGS ελέγχθηκε σε πρωτεϊνικό (απομόνωση πρωτεϊνών και Western Blot) και μεταγραφικό (απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και qPCR) επίπεδο όπως περιγράφηκε προηγουμένως (βλ. 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ). Αρνητικό δείγμα ελέγχου στα πειράματα σίγησης των δύο μεταγραφικών παραγόντων αποτέλεσαν κύτταρα AGS, τα οποία διαμολύνθηκαν με λεντιούς που έφεραν κλωνοποιημένο πλασμιδιακό φορέα pSicoR με ένθεμα κατάλληλα σχεδιασμένου shRNA (shSCR) για σίγηση της αλληλουχίας RNA scramble (SCR), η οποία δεν κωδικοποιείται από το ανθρώπινο γονιδίωμα.

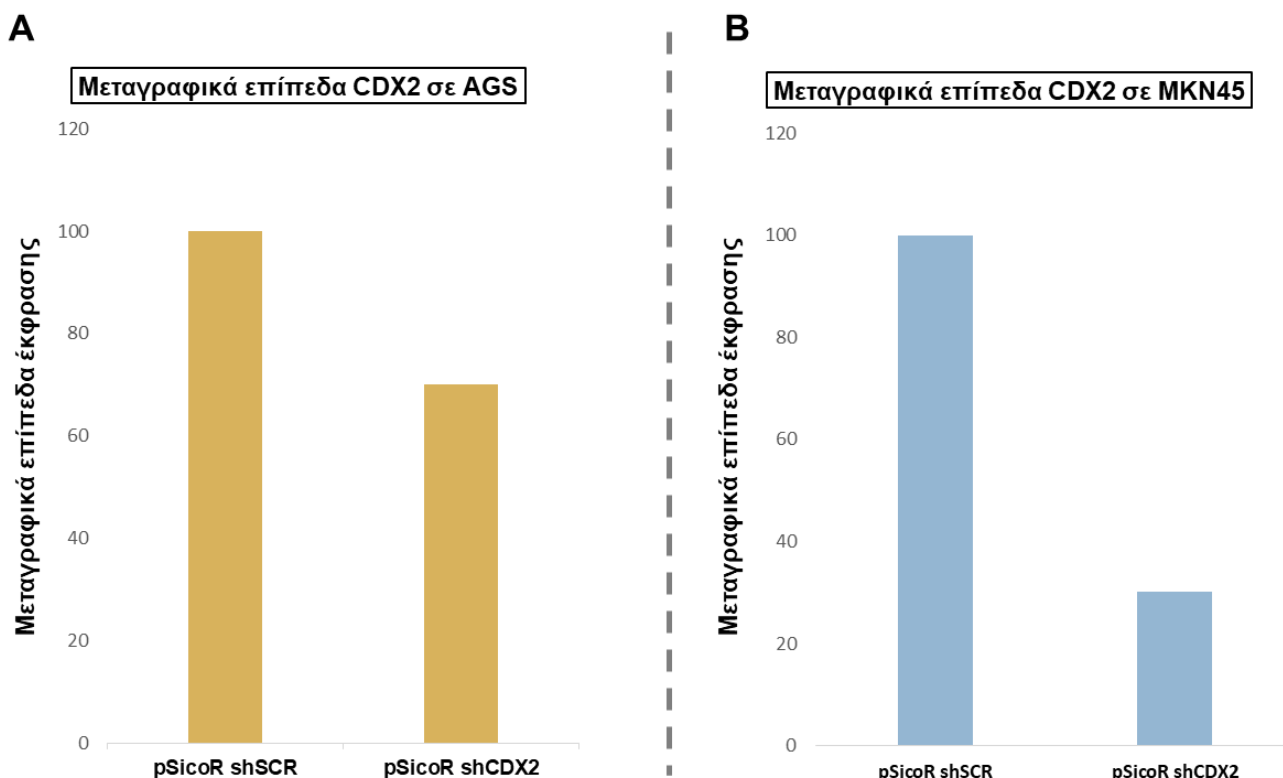
Στις Western Blot που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση του HNF4α και της β-ακτίνης στο δείγμα ολικής πρωτεΐνης που απομονώθηκε από τα κύτταρα AGS σίγησης του HNF4α (pSicoR shHNF4α), εκτός από την ολική πρωτεΐνη του αρνητικού δείγματος ελέγχου που αναφέρθηκε παραπάνω (pSicoR shSCR), χρησιμοποιήθηκε και δείγμα ολικής πρωτεΐνης από κύτταρα AGS που δεν διαμολύνθηκαν με λεντιοίους ως δεύτερος αρνητικός μάρτυρας. Τα σχετικά επίπεδα του HNF4α στα παραπάνω δείγματα που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ImageJ, κανονικοποιήθηκαν ως προς την β-ακτίνη και εκφράστηκαν ως προς το αρνητικό δείγμα ελέγχου (pSicoR shSCR) (**Εικόνα 11**). Φαίνεται ότι τα επίπεδα του HNF4α στην σίγησή του είναι σημαντικά χαμηλότερα συγκριτικά με τα δύο αρνητικά δείγματα ελέγχου, τα οποία χαρακτηρίζονται από παραπλήσια επίπεδα της πρωτεΐνης υποδεικνύοντας ότι η αποσιώπηση του γονιδίου στόχου ήταν ειδική και οποιαδήποτε επίδραση στη καταστολή του γονιδίου μπορεί να αποδοθεί στην ειδική αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου. Η σίγηση που επιτεύχθηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα pSicoR shSCR είναι περίπου 87%. Η σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α επιβεβαιώθηκε και σε μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το γράφημα των μεταγραφικών επιπέδων του HNF4α στα εξεταζόμενα δείγματα (**Εικόνα 11**), τα επίπεδα mRNA του μεταγραφικού παράγοντα είναι περίπου 70% χαμηλότερα στο δείγμα της σίγησής του (pSicoR shHNF4α) σε σχέση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (pSicoR shSCR).



Εικόνα 11. Αποτελέσματα της σίγησης του HNF4α σε κύτταρα AGS. Στο πάνω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται οι western blot για την ανίχνευση του HNF4α και της β-ακτίνης σε πρωτεϊνικά δείγματα από κύτταρα AGS που έγινε σίγηση του HNF4α (pSicoR shHNF4α) και από τα δύο αρνητικά δείγματα ελέγχου AGS empty (κύτταρα AGS που δεν διαμολύνθηκαν) και pSicoR shSCR (κύτταρα AGS που διαμολύνθηκαν με φορέα pSicoR με ένθεμα shSCR). Στο κάτω αριστερά ραβδόγραμμα απεικονίζονται τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα του HNF4α στα προηγούμενα δείγματα, τα οποία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης. Στο κάτω δεξιά ραβδόγραμμα παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα μεταγραφικά

επίπεδα του *HNF4a* στην σίγησή του (*pSicoR shHNF4a*) και στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (*pSicoR shSCR*) ως προς τα μεταγραφικά επίπεδα του ιδιοσυστατού γονιδίου *GAPDH*.

Όσον αφορά τον μεταγραφικό παράγοντα *CDX2*, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR στα δείγματα cDNA από τα κύτταρα AGS σίγησής του (*pSicoR shCDX2*) και από το αρνητικό δείγμα ελέγχου (*pSicoR shSCR*) (**Εικόνα 12A**), καταδεικνύεται ότι επιτεύχθηκε καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα στο δείγμα της σίγησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, αλλά ο βαθμός της καταστολής ήταν περιορισμένος (~30%). Καθώς το εργαλείο σίγησης του *CDX2* που κατασκευάστηκε δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα καταστολής σε επίπεδο mRNA (τουλάχιστον 70% καταστολή), διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα της καταστολής του *CDX2* μέσω διαφορετικού shRNA σε κύτταρα MKN45, η οποία είχε διεξαχθεί στο πλαίσιο των ερευνητικών δραστηριοτήτων του εργαστηρίου με σκοπό την ανάπτυξη εργαλείων σίγησης πρωτεϊνών στόχων στον γαστρικό καρκίνο. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης διενεργήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο με qPCR και η ανάλυση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 12B**. Σύμφωνα με τα μεταγραφικά επίπεδα του *CDX2* στο δείγμα της σίγησής του (*pSicoR shCDX2*) συγκριτικά με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (*pSicoR shSCR*) φαίνεται ότι επιτεύχθηκε καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα σε επίπεδο 70%. Συνεπώς, προκύπτει ότι η σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα *CDX2* με το δεύτερο shRNA ήταν αποτελεσματική σε μεταγραφικό επίπεδο στα κύτταρα MKN45, ενώ στην περίπτωση του *HNF4a* η σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα ήταν αποτελεσματική τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο.



Εικόνα 12. Αποτελέσματα της σίγησης του *CDX2*. **A)** Μεταγραφικά επίπεδα του *CDX2* μετά από την σίγησή του σε κύτταρα AGS. Τα επίπεδα του *CDX2* mRNA στα δείγματα της σίγησής του (*pSicoR shCDX2*) και στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (*pSicoR shSCR*) κανονικοποιήθηκαν ως προς τα μεταγραφικά επίπεδα του ιδιοσυστατού γονιδίου *GAPDH*. **B)** Μεταγραφικά επίπεδα του *CDX2* μετά από την σίγησή του σε κύτταρα MKN45. Τα επίπεδα του *CDX2* mRNA στα δείγματα της σίγησής του (*pSicoR shCDX2*) και στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (*pSicoR shSCR*) κανονικοποιήθηκαν ως προς τα μεταγραφικά επίπεδα του ιδιοσυστατού γονιδίου *GAPDH*.

3.3. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης

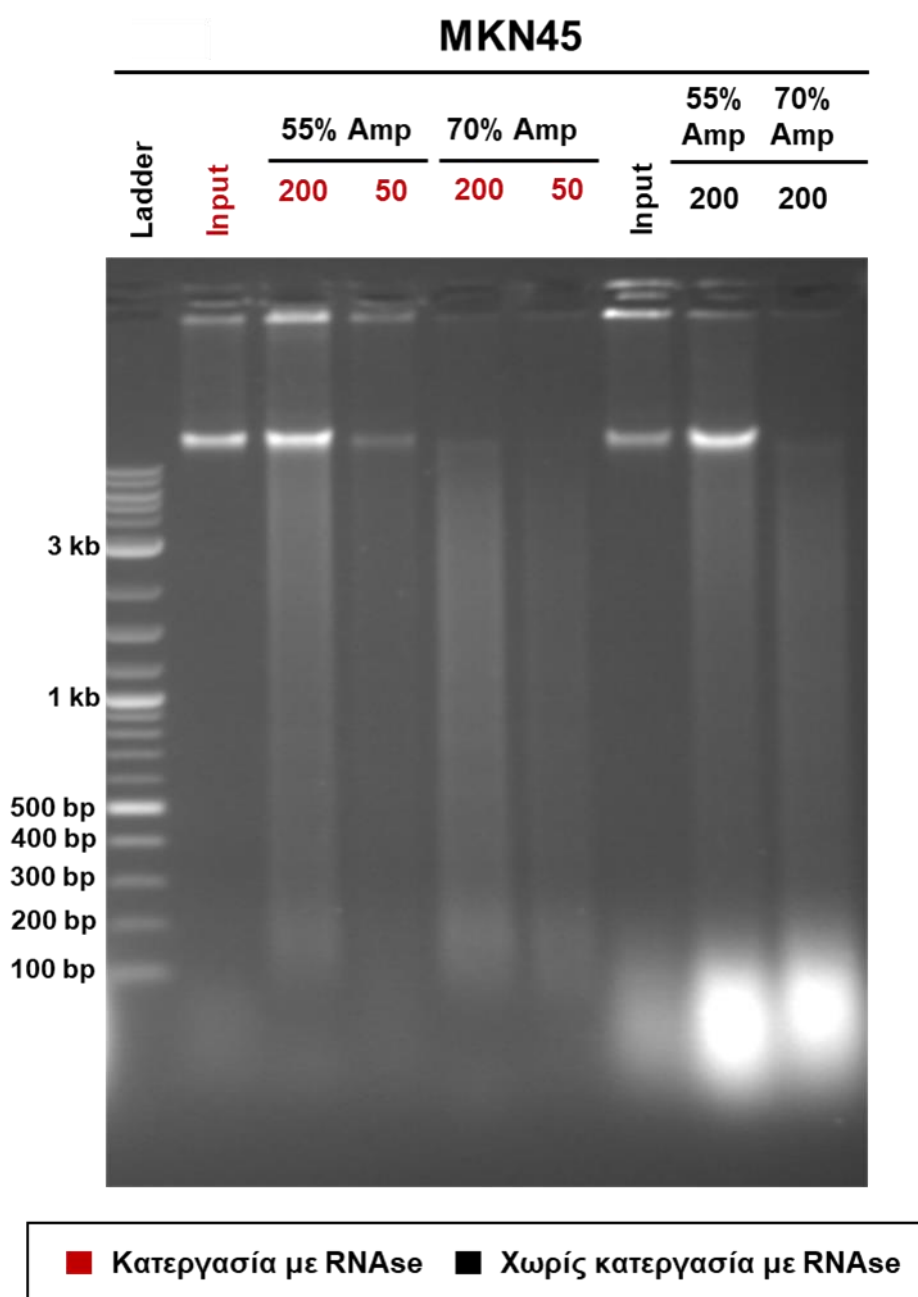
Στο πλαίσιο των ερευνητικών δραστηριοτήτων του εργαστηρίου έχουν ταυτοποιηθεί μέσω βιοπληροφορικών αναλύσεων συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές ως εν δυνάμει lncRNA στόχοι (Target Genes-TG) των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 ή/και HNF4α. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί οι υποκινητές των lncRNA γονιδίων HNF4α TG1 και HNF4α TG3, στους οποίους προσδένεται ο HNF4α, οι υποκινητές των lncRNA γονιδίων GATA4/HNF4α TG3 και GATA4/HNF4α TG4, στους οποίους προσδένονται τόσο ο HNF4α όσο και ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4, καθώς και οι υποκινητές των lncRNA γονιδίων cRENA 1&2 (CDX2 REgulated lncRNA 1&2), στους υποκινητές των οποίων προσδένεται ο HNF4α και ρυθμίζονται από το μεταγραφικό σύμπλοκο των CDX2 και HNF4α. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτές τις περιοχές του γονιδιώματος *in vivo*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α σε κύτταρα AGS και ακολούθησαν ChIP-qPCR στα δείγματα της ανοσοκατακρημισμένης χρωματίνης, ούτως ώστε να εξακριβωθεί ο βαθμός που οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με τις συγκεκριμένες γονιδιωματικές αλληλουχίες-στόχους. Επιπροσθέτως, παρόλο που τα πειράματα στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας διεξήχθησαν στην κυτταρική σειρά AGS, παράλληλα πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών κατακερματισμού της χρωματίνης με υπερήχους για τις γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές MKN45 και KATOIII για αξιοποίησή τους σε μελλοντικά πειράματα ChIP.

3.3.1. Βελτιστοποίηση συνθηκών κατακερματισμού της χρωματίνης στις κυτταρικές σειρές MKN45 και KATOIII

Αν και το ChIP είναι ένα πολύ ευέλικτο εργαλείο μελέτης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το DNA, η διαδικασία απαιτεί τη βελτιστοποίηση των συνθηκών των επιμέρους βημάτων. Ένα από τα πιο κρίσιμα βήματα της διαδικασίας ChIP που καθορίζει την επιτυχία του πειράματος είναι ο κατακερματισμός της χρωματίνης, συνεπώς οι συνθήκες του συγκεκριμένου βήματος πρέπει να βελτιστοποιούνται προσεκτικά για κάθε κυτταρική σειρά.

Στο πείραμα βελτιστοποίησης των συνθηκών κατακερματισμού της χρωματίνης με υπερήχους για τις κυτταρικές σειρές MKN45 και KATOIII, ο κατακερματισμός της χρωματίνης έγινε με το μηχάνημα QSONICA Q800R3 Sonicator και για τις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχθηκαν οι ίδιες συνθήκες. Από 2.000 μl συνολικής ποσότητας χρωματίνης (χρωματίνη αραιωμένη σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος κατακερματισμού) έγινε κατακερματισμός 800 μl χρωματίνης σε συνθήκες έντασης υπερήχων (Amplitude) 55% με παλμό 15" on και 15" off και 800 μl σε συνθήκες έντασης υπερήχων 70% με παλμό 15" on και 45" off. Ο συνολικός χρόνος κατακερματισμού ήταν 30'. Τα εναπομείναντα 200 μl χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου μη κατακερματισμένης χρωματίνης (unsonicated input). Συνολικά, σε 50, 200 και 200 μl κατακερματισμένης χρωματίνης από κάθε συνθήκη έγινε αντιστροφή της μονιμοποίησης της χρωματίνης (decrosslink). Εκτός από τις διαφορετικές συνθήκες κατακερματισμού, διερευνήθηκε και η επίδραση που έχει η επεξεργασία των δειγμάτων με RNase για την απομάκρυνση του RNA στην αποτελεσματικότητα της κατάτμησης της χρωματίνης. Για αυτόν τον λόγο, 100 μl Input και τα δείγματα με 50 και 200 μl κατακερματισμένης χρωματίνης από τις δύο συνθήκες υπέστησαν επεξεργασία με RNase. Αφού έγινε καθαρισμός της χρωματίνης με φαινόλη-χλωροφόρμιο, έγινε έλεγχος της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού υπό διαφορετικές συνθήκες κατακερματισμού και επεξεργασίας με RNase για τις δύο κυτταρικές σειρές σε πηκτή αгарόζης 1%.

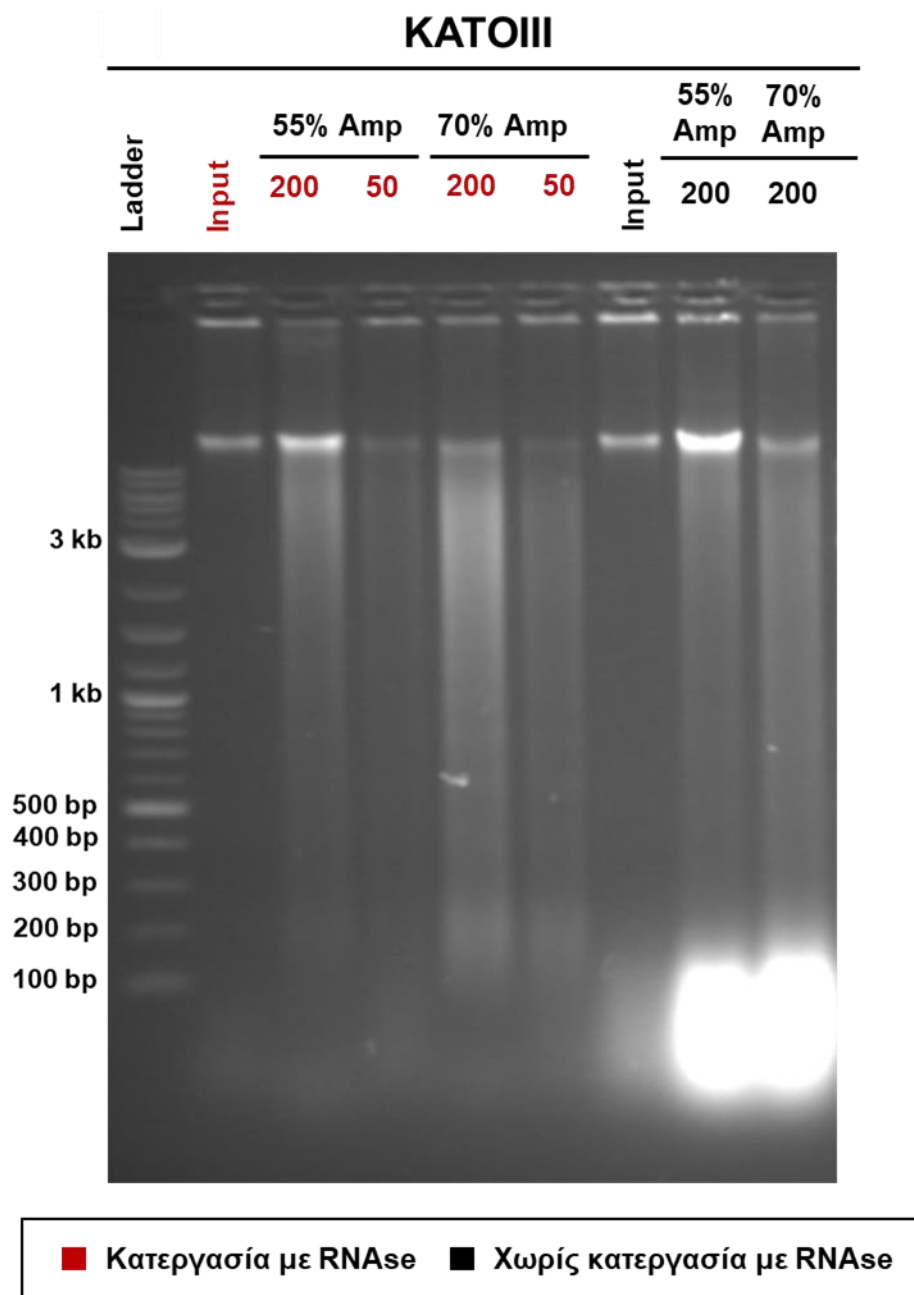
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα για την κυτταρική σειρά ΜΚΝ45 (**Εικόνα 13**) φαίνεται ότι σε όλες τις συνθήκες κατακερματισμού η χρωματίνη έχει κατακερματιστεί και απαρτίζεται από ένα θραυματοποιημένο εύρος μοριακών μεγεθών (smear) σε σχέση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (Input), όπου παρατηρείται μια ζώνη που αντιπροσωπεύει μεγάλα μεγέθη χρωματίνης. Αν και ζώνη ίδιου μεγέθους παρατηρείται σε όλα τα αναλυόμενα δείγματα, όσο αυξάνεται η ένταση υπερήχων (70% Amp) τόσο μειώνεται η παρουσία μεγάλων μεγεθών χρωματίνης και αυξάνονται τα θραύσματα της χρωματίνης. Μάλιστα, τα περισσότερα εντοπίζονται κάτω από τις 300 bp, που είναι κατάλληλο μέγεθος κατακερματισμένης χρωματίνης για το βήμα της κατακρήμνισης. Ακόμη, για κάθε συνθήκη έντασης υπερήχων, φαίνεται ότι η χρωματίνη είναι πιο πυκνή στα αναλυόμενα δείγματα ποσότητας 200 μl χρωματίνης. Τέλος, όσον αφορά την επίδραση με RNase, φαίνεται ότι η κατεργασία της χρωματίνης με RNase οδηγεί στον πλήρη καθαρισμό της από τα υπολειπόμενα RNA.



Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση κατακερματισμένης χρωματίνης από κύτταρα ΜΚΝ45 σε πηκτή αγαρόζης 1%. Οι συνθήκες έντασης των υπερήχων κατακερματισμού που εξετάστηκαν ήταν 55% (on 15", off 15") και 70% Amp (on 15", off 45"). Και από τις δύο συνθήκες αναλύθηκαν 200 μl και 50 μl που υπέστησαν

κατεργασία με RNase και 200 µl που δεν υπέστησαν κατεργασία με RNase. Αναλύθηκαν επίσης 200 µl μη κατακερματισμένης χρωματίνης (Input), εκ των οποίων τα 100 µl υπέστησαν κατεργασία με RNase. Συνολικός χρόνος κατακερματισμού 30'. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 1 kb plus ladder (NEB). Amp: Amplitude.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα για την κυτταρική σειρά KATOIII (Εικόνα 14), αυτά παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο με τα αποτελέσματα για τα MKN45 κύτταρα. Επομένως, από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι οι βέλτιστες συνθήκες κατακερματισμού της χρωματίνης για τα κύτταρα MKN45 και KATOIII είναι 30' χρόνος κατακερματισμού αραιωμένης χρωματίνης σε 2 ml, 70% έντασης υπερήχων (15" on, 45" off) και κατεργασία με RNase έπειτα από αντιστροφή της μονιμοποίησης της χρωματίνης.

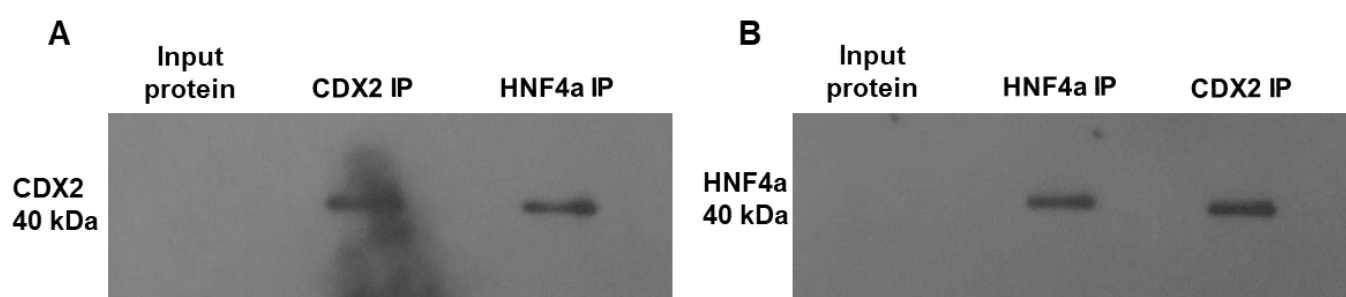


Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση κατακερματισμένης χρωματίνης από κύτταρα KATOIII σε πηκτή αγαρόζης 1%. Οι συνθήκες έντασης των υπερήχων κατακερματισμού που εξετάστηκαν ήταν 55% (on 15", off 15") και 70% Amp (on 15", off 45"). Και από τις δύο συνθήκες αναλύθηκαν 200 µl και 50 µl που υπέστησαν κατεργασία με RNase και 200 µl που δεν υπέστησαν κατεργασία με RNase. Αναλύθηκαν επίσης 200 µl μη

κατακερματισμένης χρωματίνης (Input), εκ των οποίων τα 100 µl υπέστησαν κατεργασία με RNase. Συνολικός χρόνος κατακερματισμού 30'. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 1 kb plus ladder (NEB). Amp: Amplitude.

3.3.2. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας των πειραμάτων ChIP για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α

Πριν την ανάλυση της κατακρημνισμένης χρωματίνης με ChIP-qPCR, πραγματοποιήθηκε Western Blot σε δείγματα πρωτεΐνης από την ανοσοκατακρήμνιση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α μαζί με την χρωματίνη που καταλαμβάνουν, προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία και ο εμπλουτισμός των μεταγραφικών παραγόντων στα δείγματα ανοσοκατακρήμνισης. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του πειράματος ChIP, καθώς τα παραπάνω συνεπάγονται τον επιλεκτικό εμπλουτισμό των γονιδιωματικών περιοχών-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό δείγμα που προήλθε από τη χρωματίνη που δεν ανοσοκατακρημνίστηκε (Input protein).



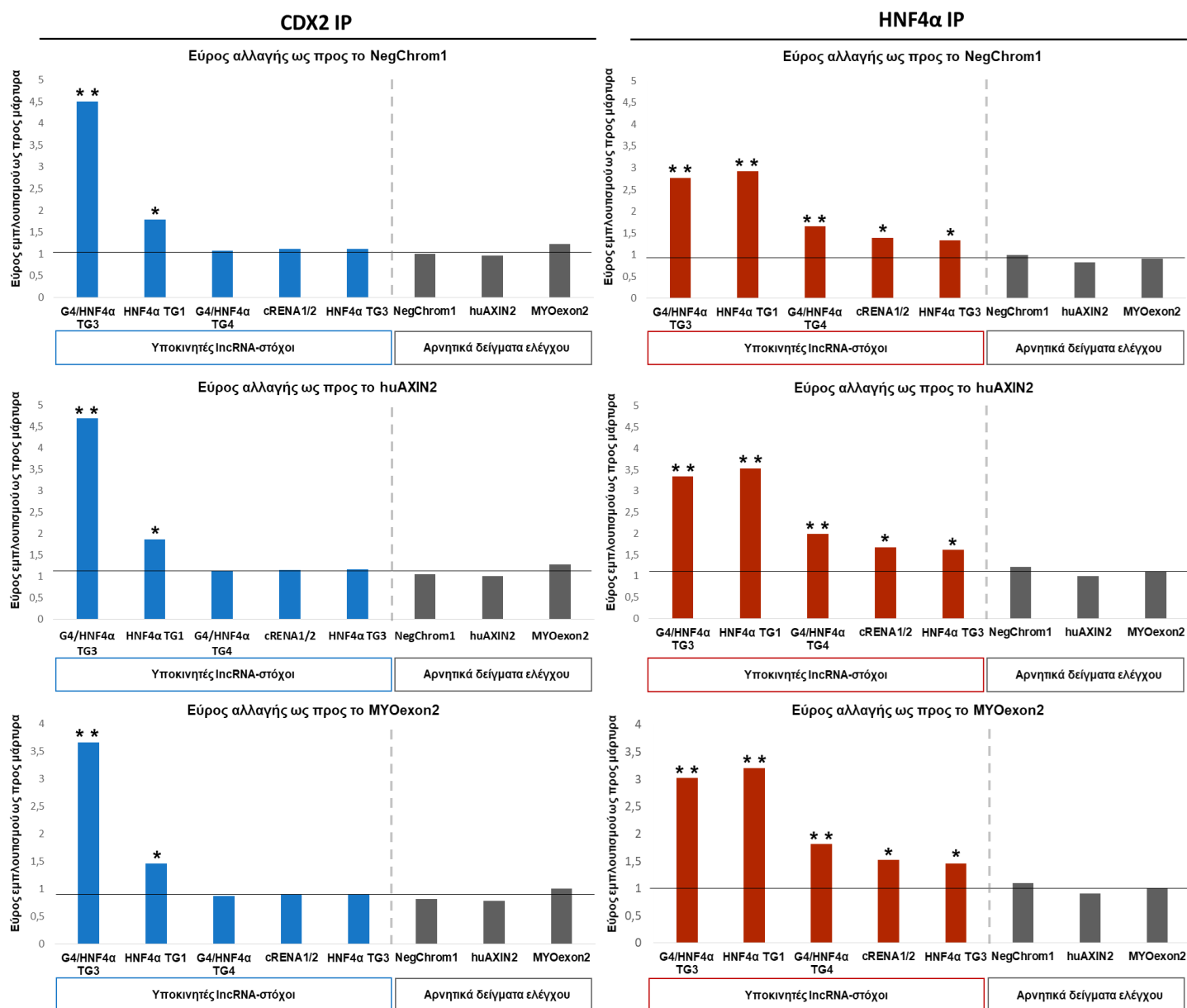
Εικόνα 15. Έλεγχος της επιτυχίας του πειράματος ChIP για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α με τη μέθοδο Western Blot. **A)** Western Blot για την ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 και **B)** Western Blot για την ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α σε πρωτεϊνικά δείγματα AGS έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση των μεταγραφικών CDX2 και HNF4α και στο αρνητικό δείγμα ελέγχου input protein. CDX2 IP: CDX2 Immunoprecipitation, HNF4α IP: HNF4α Immunoprecipitation.

Σύμφωνα με την Western Blot για την ανίχνευση του CDX2 (**Εικόνα 15A**), ο μεταγραφικός παράγοντας ανιχνεύτηκε στο δείγμα ανοσοκατακρήμνισης (CDX2 IP) και μάλιστα παρατηρείται εμπλουτισμός του μεταγραφικού παράγοντα ενδιαφέροντος, όπως συμπεραίνεται από την απουσία ζώνης στο αρνητικό δείγμα ελέγχου Input protein. Το ίδιο πρότυπο αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε και στην Western Blot για την ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α (**Εικόνα 15B**) στο δείγμα ανοσοκατακρήμνισης του HNF4α (HNF4α IP) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ακόμη, ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία ζώνης κατά την ανίχνευση του ενός μεταγραφικού παράγοντα στο δείγμα ανοσοκατακρήμνισης για τον άλλο μεταγραφικό παράγοντα (**Εικόνα 15A, 15B**). Η ανίχνευση ενός δεύτερου μεταγραφικού παράγοντα στην χρωματίνη που ανοσοκατακρημνίστηκε με τον πρώτο μεταγραφικό παράγοντα, υποδηλώνει την αλληλεπίδρασή και των δύο στην χρωματίνη. Συμπερασματικά, λοιπόν, προκύπτει ότι τα πειράματα ChIP για τους δύο υπό μελέτη μεταγραφικούς παράγοντες ήταν επιτυχή ενώ παρατηρείται και αλληλεπίδρασή τους πάνω στην χρωματίνη.

3.3.3. Αποτελέσματα ChIP-qPCR για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α

Όπως προαναφέρθηκε, σκοπός των δοκιμασιών ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τους

μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α ήταν η διερεύνηση της *in vivo* αλληλεπίδρασης των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων με τους υποκινητές HNF4α TG1, HNF4α TG3, GATA4/HNF4α TG3, GATA4/HNF4α TG4 και cRENA 1&2, οι οποίοι έχουν ταυτοποιηθεί ως υποψήφιοι lncRNA στόχοι μέσω βιοπληροφορικών αναλύσεων. Ως αρνητικοί μάρτυρες για την διερεύνηση της ειδικότητας της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στις περιοχές στόχους χρησιμοποιήθηκαν οι γονιδιωματικές περιοχές NegChrom1 (τμήμα μεσογονιδιακής περιοχής του γονιδιώματος), huAXIN2 (αλληλουχία εξονίου) και MYOexon2 (αλληλουχία εξονίου), στις οποίες δεν προσδένονται οι εν λόγω μεταγραφικοί παράγοντες όπως έχει διαπιστωθεί από δεδομένα αλληλούχησης CHIP (ChIP-seq) του εργαστηρίου.



Εικόνα 16. Αποτελέσματα των ChIP-qPCR για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 (αριστερά) και HNF4α (δεξιά). Στα παραπάνω γραφήματα απεικονίζεται το εύρος αλλαγής του σήματος στις γονιδιωματικές περιοχές-στόχους (cRENA 1/2, HNF4α TG1 και TG3, G4/HNF4α TG3-TG4) σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες NegChrom1, huAXIN2 και MYOexon2 (παρουσιάζονται δεξιά της διακεκομμένης γραμμής) στην ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη για τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα. Η παράλληλη γραμμή ως προς τον χ'χ άξονα αντικατοπτρίζει τον μέσο όρο του σήματος των τριών αρνητικών δειγμάτων ελέγχου. Η παρουσία αστερίσκων πάνω από τις μπάρες υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα του εύρους αλλαγής του σήματος στις γονιδιωματικές περιοχές-στόχους έναντι

του μέσου όρου του σήματος των τριών αρνητικών δειγμάτων ελέγχου με βάση το αποτέλεσμα των στατιστικών ελέγχων *t-test*. Με έναν αστερίσκο επισημαίνεται τιμή *P-value* μικρότερη από 0,05 και με δύο αστερίσκους επισημαίνεται τιμή *P-value* μικρότερη από 0,01.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων των ChIP-qPCR που πραγματοποιήθηκαν για τους μεταγραφικούς CDX2 και HNF4α παρουσιάζονται στην **Εικόνα 16**. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν ο εμπλουτισμός κάθε γονιδιωματικής περιοχής-στόχου (συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου) διαφέρει με στατιστικά σημαντικό τρόπο από τον μέσο όρο των τριών αρνητικών δειγμάτων ελέγχου, πραγματοποιήθηκαν *t-test* έλεγχοι και για τα δύο πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Από τις κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων ως προς κάθε αρνητικό μάρτυρα μεμονωμένα, φαίνεται καταρχάς ότι οι γονιδιωματικές περιοχές που επιλέχθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες είναι κατάλληλοι, καθώς δεν παρατηρείται εμπλουτισμός των συγκεκριμένων περιοχών στα δείγματα ανοσοκατακρήμνισης τόσο του CDX2 όσο και του HNF4α, όπως αποδεικνύεται από τον μεταξύ τους λόγο που είναι κοντά στην μονάδα παρουσιάζοντας μόνο μικρές αποκλίσεις, οι οποίες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Όσον αφορά την ανοσοκατακρήμνιση για τον CDX2, υπάρχει ανίχνευση της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στον υποκινητή των lncRNA γονιδίων GATA4/HNF4α TG3 και HNF4α TG1, καθώς ο εμπλουτισμός των συγκεκριμένων γονιδιωματικών αλληλουχιών είναι σημαντικά υψηλότερος (~ 4 και 2 φορές αντίστοιχα) σε σχέση με τον μέσο όρο των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου αντίστοιχα. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι το σήμα στους υπόλοιπους στόχους είναι παραπλήσιο με αυτό των αρνητικών μαρτύρων, με τους οποίους δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, υποδηλώνοντας ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας δεν αλληλεπιδράει με τις συγκεκριμένες περιοχές στην χρωματίνη στα συγκεκριμένα κύτταρα του πειράματος. Σχετικά με την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης για τον HNF4α παρατηρείται ότι ο βαθμός εμπλουτισμού είναι περίπου τρεις φορές υψηλότερος στις γονιδιωματικές περιοχές στόχους GATA4/HNF4α TG3 και HNF4α TG1, ενώ χαμηλότερη αλλά ανιχνεύσιμη αλληλεπίδραση (~1,5 – 2 φορές) παρατηρείται στην χρωματίνη των υποκινητών των lncRNA G4/HNF4α TG4, cRENA1/2 και HNF4α TG3 συγκριτικά με τον μέσο όρο των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου, υποδηλώνοντας την αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α στις συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές. Μάλιστα, οι συγκεκριμένες διαφορές στον βαθμό εμπλουτισμού μεταξύ όλων των περιοχών των υποκινητών των lncRNA γονιδίων και των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου είναι στατιστικά σημαντικές. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνεται η σημαντική αλληλεπίδραση των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων με την χρωματίνη των υποκινητών των lncRNA-στόχων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πλαίσιο της ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας ανάδειξης των ρυθμιζόμενων από ογκογονίδια επιβίωσης γενεαλογίας lncRNA ως νέους αξιόπιστους βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της νόσου σε αρχικά στάδια, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ρύθμισης των πιθανών lncRNA-στόχων των ογκογονιδίων επιβίωσης γενεαλογίας CDX2 και HNF4a στον γαστρικό καρκίνο. Όπως προαναφέρθηκε (βλ. 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ), οι μεταγραφικοί παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας CDX2 και HNF4a διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο ιδίως στα αρχικά στάδια της νόσου, όπου η έκτοπη έκφρασή τους στα γαστρικά κύτταρα σχετίζεται με την ανάπτυξη της προκαρκινικής αλλοίωσης της εντερικής μεταπλασίας. Στην επαγόμενη από *H. pylori* εντερική μεταπλασία, η έκτοπη έκφραση του CDX2 στον γαστρικό βλεννογόνο επάγεται από την δράση παραγόντων τοξικότητας του βακτηρίου και στην συνέχεια μπορεί να διατηρηθεί μέσω της αυτορρύθμισης του ίδιου του γονιδίου του [82, 148]. Στην περίπτωση της εντερικής μεταπλασίας που επάγεται από την παλινδρόμηση των χολικών οξέων, η έκτοπη έκφραση του CDX2 επάγεται μέσω της ενεργοποίησης του HNF4a. Συγκεκριμένα, παρουσία χολικών οξέων ενεργοποιείται το μονοπάτι ERK1/2 με αποτέλεσμα την επαγωγή του HNF4a, ο οποίος στην συνέχεια ρυθμίζει άμεσα την έκφραση του CDX2 με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του [149]. Και στις δύο περιπτώσεις αποτέλεσμα της έκτοπης έκφρασης του CDX2 είναι η ενεργοποίηση της έκφρασης ειδικών δεικτών της εντερικής μεταπλασίας, τα οποία αφορούν κωδικοποιητικά μετάγραφα [82, 150]. Παρά τον αναγνωρισμένο ρόλο των συγκεκριμένων παραγόντων στην παθογένεια της νόσου, λόγω της φυσιολογικής λειτουργίας και παρουσίας τους σε άλλους ιστούς ως μεταγραφικοί παράγοντες επιβίωσης γενεαλογίας, καθίστανται ακατάλληλοι θεραπευτικοί στόχοι και διαγνωστικοί δείκτες. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η ανίχνευση καθοδικών ρυθμιστικών στόχων lncRNA, καθώς οι ιδιότητες αυτών των μορίων τα καθιστούν ιδανικούς βιοδείκτες.

Μέχρι στιγμής στον ΓΚ οι μεταγραφικοί στόχοι των CDX2 και HNF4a αφορούν κωδικοποιητικά μετάγραφα και στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι ο P1-HNF4a ενεργοποιεί σημαντικά τον υποκινητή του lncRNA HNF4a-AS1 σε ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα (HEK293), ενώ η καταστολή του HNF4a σε κύτταρα HepaRG οδήγησε στην σίγηση του HNF4a-AS1. Μάλιστα, το HNF4a-AS1 και οι P1-HNF4a ισομορφές παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης μεταξύ των διάφορων ιστών του ανθρώπου. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη στοιχεία άμεσης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στον υποκινητή HNF4a-AS1 [151-153]. Το συγκεκριμένο lncRNA παρουσιάζει χαμηλή έκφραση σε ιστούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε σχέση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών, όπου εκφράζεται υψηλά, υποδηλώνοντας έναν εν δυνάμει ογκοκατασταλτικό ρόλο [154], που συνάδει και με την λειτουργία του HNF4a στο φυσιολογικό ήπαρ και αφορά την διατήρηση της διαφοροποιημένης κατάστασης των ηπατοκυττάρων (βλ. 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ). Τα παραπάνω ευρήματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο πλαίσιο του ΓΚ, καθώς είναι γνωστό ότι στην εντερική μεταπλασία παρατηρείται έκτοπη έκφραση των P1-παραγόμενων ισομορφών του HNF4a με αποτέλεσμα την προαγωγή της νόσου. Επομένως, η περαιτέρω διερεύνηση της άμεσης ρύθμισης του HNF4a-AS1 από το HNF4a μελλοντικά θα θέσει τη βάση για την εύρεση του πρώτου lncRNA που είναι ρυθμιζόμενο από την HNF4a πρωτεΐνη με ογκοεπαγωγική δράση στον ΓΚ έναντι του ογκοκατασταλτικού του ρόλου στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αντίστοιχοι lncRNA-στόχοι έχουν ταυτοποιηθεί για το ογκογονίδιο επιβίωσης γενεαλογίας KLF5 στον γαστρικό καρκίνο. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο KLF5 δρα ως θετικός ρυθμιστής του lncRNA DANCR στον ΓΚ, ενεργοποιώντας την μεταγραφή στην περιοχή του υποκινητή του lncRNA με αποτέλεσμα την υψηλή έκφρασή του. Το DANCR καταστέλλει το miR-194, ενός αναστολέα της έκφρασης της πρωτεΐνης AKT2, λειτουργώντας ως μοριακό δόλωμα, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της AKT2 που σχετίζεται με την αύξηση του πολλαπλασιασμού και την μείωση της αυτοφαγίας και απόπτωσης των καρκινικών

κυττάρων. Επομένως, μέσω της ενεργοποίησης του DANCR ο KLF5 εμπλέκεται στην ρύθμιση της ανάπτυξης του όγκου και το συγκεκριμένο lncRNA μπορεί να αποτελέσει πιθανό θεραπευτικό στόχο στον ΓΚ [155]. Ένα ακόμη lncRNA ρυθμιστικός στόχος του KLF5 είναι το lncRNA NEAT1. Ο KLF5 αλληλεπιδρά με την περιοχή του υποκινητή του NEAT1, ενεργοποιώντας την μεταγραφή του στον ΓΚ. Το συγκεκριμένο lncRNA εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα και εμπλέκεται στην προώθηση της καρκινογένεσης του ΓΚ, αποτελώντας έναν υποψήφιο διαγνωστικό βιοδείκτη και θεραπευτικό στόχο για την νόσο [156].

Για αυτόν τον σκοπό, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αρχικά κατασκευάστηκαν εργαλεία σίγησης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a, τα οποία θα μπορέσουν να αξιοποιηθούν μελλοντικά για την διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο ρυθμίζουν καθοδικά lncRNA-στόχους τους. Για την διεξαγωγή τέτοιων πειραμάτων είναι αναγκαία σε πρώτη φάση η μελέτη του προτύπου έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων σε διαφορετικές γαστρικές κυτταρικές σειρές. Ο έλεγχος της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο έδειξε ότι ο CDX2 εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στις καρκινικές γαστρικές κυτταρικές σειρές συγκριτικά με τα φυσιολογικά γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα HFE145. Το συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία, καθώς έχει βρεθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 εκφράζεται υψηλότερα τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε ιστούς ΓΚ και σε γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς του στομάχου και την κυτταρική σειρά φυσιολογικού γαστρικού βλεννογόνου [157]. Μεταξύ των κυτταρικών σειρών του καρκίνου του στομάχου τα επίπεδα της πρωτεΐνης CDX2 στην κυτταρική σειρά AGS είναι χαμηλότερα από τις υπόλοιπες καρκινικές κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 8**). Σε μεταγραφικό επίπεδο, ωστόσο, τόσο ο CDX2 όσο και ο HNF4a παρουσιάζουν υψηλή έκφραση στην γαστρική καρκινική κυτταρική σειρά AGS σύμφωνα με τις αναλύσεις από προηγούμενες διπλωματικές του εργαστηρίου. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αυτή η κυτταρική σειρά αποτελεί το πιο κοινό και ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο στην έρευνα για τον γαστρικό καρκίνο λόγω ευκολίας γενετικής τροποποίησης αλλά και του ρυθμού ανάπτυξης αυτών των κυττάρων [158], τα επακόλουθα πειράματα σίγησης και ανοσοκατακρήμνισης των μεταγραφικών παραγόντων πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα AGS.

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση των shRNAs, που σχεδιάστηκαν με σκοπό την ειδική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a, στους πλασμιδιακούς φορείς pSicoR, ακολούθησε μεταγραφική σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων στα κύτταρα AGS μέσω της εισαγωγής των φορέων με το σύστημα των λεντιών. Η μέτρηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του HNF4a mRNA έδειξε ότι το εργαλείο RNAi σίγησης που κατασκευάστηκε παρήγαγε αποτελεσματικό επίπεδο παρεμβολής και τα επίπεδα του HNF4a mRNA μειώθηκαν κατά 70%. Βέλτιστη καταστολή σημειώθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όπου ανιχνεύθηκε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης κατά 87%. Παρατηρείται ότι η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του HNF4a κατά την σίγησή του είναι υψηλότερη από την μείωση των HNF4a μεταγράφων που ανιχνεύθηκε στην αντίστοιχη περίπτωση σε μεταγραφικό επίπεδο. Κατά την RNAi σίγηση ενός mRNA στόχου, οι αλλαγές που προκύπτουν στα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης στόχου είναι αποτέλεσμα τόσο της σίγησης όσο και άλλων παραγόντων που δρουν σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο [159]. Η υψηλότερη μείωση που παρατηρείται σε πρωτεϊνικό επίπεδο θα μπορούσε να εξηγηθεί από την πιθανή μεταφραστική αναστολή στα ριβοσώματα λόγω του siRNA, επιπρόσθετα της αποικοδόμησης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Επομένως, τα υπολειπόμενα πρωτεϊνικά μόρια του HNF4a που συντέθηκαν από mRNA μόρια που διέφυγαν της RNA παρεμβολής, πιθανότατα έχουν υποστεί επιπρόσθετη μεταφραστική αναστολή επηρεάζοντας τα τελικά συνολικά επίπεδά της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Στην περίπτωση του CDX2 η καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα σε επίπεδο mRNA δεν ήταν αποτελεσματική, καθώς επιτεύχθηκε μείωση των επιπέδων του CDX2 mRNA κατά περίπου 30%. Στους πιθανούς λόγους αποτυχίας ενός πειράματος RNAi σίγησης ενός mRNA στόχου σε ζωντανά κύτταρα μέσω της εισαγωγής του εργαλείου καταστολής με το σύστημα των λεντιών εντάσσεται η πιθανότητα να μην ήταν επιτυχής η διαμόλυνση των κυττάρων λόγω χαμηλής αραίωσης του ιού και το shRNA να μην εκφράστηκε βέλτιστα ή να μην είχε βέλτιστη δράση λόγω ακατάλληλου σχεδιασμού. Σε κάθε περίπτωση χρειάζεται να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών του πειράματος για την σίγηση του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα και να επαναληφθεί σε βέλτιστες συνθήκες. Καθώς η αποτυχία της σίγησης μπορεί να οφειλόταν στην μη βέλτιστη δράση του shRNA που χρησιμοποιήθηκε στην διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα της σίγησης του CDX2 μέσω διαφορετικού shRNA που είχε πραγματοποιηθεί σε κύτταρα MKN45 παλιότερα στο εργαστήριο. Σε αυτή την περίπτωση ανιχνεύθηκε καταστολή του CDX2. Συγκεκριμένα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του CDX2 mRNA μειώθηκαν κατά 70%, όπως και στην περίπτωση της σίγησης του HNF4α, υποδεικνύοντας ότι συγκεκριμένο shRNA έχει βέλτιστη κατασταλτική δράση τουλάχιστον σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα MKN45. Χρειάζεται βέβαια να επιβεβαιωθεί και η αποτελεσματικότητα της καταστολής σε πρωτεϊνικό επίπεδο καθώς και να δοκιμαστεί και σε κύτταρα AGS.

Επιπροσθέτως, έγινε προσπάθεια εξακρίβωσης του κατά πόσο συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί ως υποψήφιοι στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4α μέσω προηγούμενων βιοπληροφορικών αναλύσεων του εργαστηρίου, αποτελούν άμεσους καθοδικούς στόχους των μεταγραφικών παραγόντων επιβίωσης γενεαλογίας στα κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος AGS μέσω ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες. Από τις Western Blot που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της επιτυχίας των πειραμάτων ChIP φάνηκε ότι ήταν επιτυχής, καθώς παρατηρήθηκε εμπλουτισμός των μεταγραφικών παραγόντων στα δείγματα της ανοσοκατακρήμισής τους. Επίσης, κατά την ανίχνευση του CDX2 και HNF4α στα δείγματα HNF4α IP και CDX2 IP αντίστοιχα παρατηρήθηκε παρουσία ζώνης που υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στην χρωματίνη (**Εικόνα 15**). Η ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης ακολουθούμενη από ανάλυση Western Blot με την χρήση αντισώματος έναντι μιας δεύτερης πρωτεΐνης μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων [160]. Η παραπάνω αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία έχει βρεθεί ότι ο CDX2 και HNF4α προσδένονται μαζί σε ένα ρυθμιστικό στοιχείο συνολικού μήκους 12 νουκλεοτιδίων, το οποίο περιλαμβάνει μοτίβα αναγνώρισης και των δύο παραγόντων και βρίσκεται συντηρημένο στους υποκινητές των γονιδίων UGT1A8-1A10 (UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφεράσες) σε γαστρεντερικούς ιστούς, με αποτέλεσμα την συνεργιστική ενεργοποίηση της μεταγραφής των συγκεκριμένων γονιδίων. Μάλιστα, βρέθηκε ότι η παρουσία και των δύο μεταγραφικών παραγόντων ταυτόχρονα είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί συνέργεια, όπως φάνηκε με πειράματα μεταλλάξεων στα μοτίβα πρόσδεσης των παραγόντων. Ακόμη στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η στρατολόγηση του HNF4α στον ρυθμιστικό στοιχείο του υποκινητή του UGT1A8 απαιτεί την παρουσία του CDX2 [161]. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και με μια άλλη μελέτη που έδειξε ότι ο CDX2 συμβάλει στην διατήρηση της ενεργούς διαμόρφωσης της χρωματίνης με σήμανση H3K4me2 στις περισσότερες περιοχές πρόσδεσής του σε ενισχυτές, γεγονός που είναι απαραίτητο για την πρόσδεση και του HNF4α [162]. Η αλληλεπίδραση των δύο μεταγραφικών παραγόντων πάνω στο DNA, όπως διαπιστώθηκε από την ανίχνευση του ενός μεταγραφικού παράγοντα μετά την ανοσοκατακρήμιση με ειδικό αντίσωμα για τον άλλον μεταγραφικό παράγοντα λόγω της ανοσοκατακρήμισης του συμπλόκου τους, υποδεικνύει την δράση των CDX2 και HNF4α ως μεταγραφικό σύμπλοκο σε καρκινικά γαστρικά

κύτταρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4α διαπιστώθηκε η σημαντική αλληλεπίδραση του HNF4α με τους υποκινητές των lncRNA GATA4/HNF4α TG3, HNF4α TG1, G4/HNF4α TG4, cRENA1/2 και HNF4α TG3 και του CDX2 με τους υποκινητές των lncRNA GATA4/HNF4α TG3 και HNF4α TG1. Τα παραπάνω δεδομένα για τον HNF4α επιβεβαιώνουν τις βιοπληροφορικές παρατηρήσεις, υποστηρίζοντας την υπόθεση της άμεσης ρύθμισης των lncRNA από τον συγκεκριμένο παράγοντα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο σημαντικός εμπλουτισμός των στόχων lncRNA HNF4α TG1 και GATA4/HNF4α TG3 τόσο στην ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη για τον CDX2 όσο και για τον HNF4α, καθώς αυτό υποδεικνύει ότι αυτές οι περιοχές βρίσκονται υπό την ρύθμιση του μεταγραφικού συμπλόκου CDX2/HNF4α. Ειδικότερα στην περίπτωση του στόχου GATA4/HNF4α TG3, σύμφωνα με τα βιοπληροφορικά δεδομένα στην συγκεκριμένη περιοχή προσδένεται εκτός από τον HNF4α και ο GATA4, ο οποίος φαίνεται να έχει ογκοεπαγωγικό ρόλο στον καρκίνο του στομάχου, καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στην εντερική μεταπλασία και περίπου 30% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων χαρακτηρίζονται από γονιδιακή ενίσχυση του γονιδίου του [37, 163]. Επομένως, με την περαιτέρω διερεύνηση της πρόσδεσης του συγκεκριμένου παράγοντα στον υποκινητή του συγκεκριμένου lncRNA μέσω ενός μελλοντικού πειράματος ChIP για τον GATA4, θα είναι εφικτό να ελεγχθεί στην συνέχεια εάν το συγκεκριμένο lncRNA βρίσκεται υπό την ρύθμιση ενός μεταγραφικού ρυθμιστικού δικτύου από τους συγκεκριμένους παράγοντες στον ΓΚ, όπως έχει προταθεί για τον τρόπο δράσης των ογκογονιδίων επιβίωσης γενεαλογίας [164]. Για τους υπόλοιπους υποκινητές των lncRNA στους οποίους δεν βρέθηκε να προσδένεται ο CDX2, φαίνεται ότι δεν ρυθμίζονται από το μεταγραφικό σύμπλοκο CDX/HNF4α, αλλά μεμονωμένα από τον HNF4α.

Τέλος, καθώς ένα πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης απαιτεί την βελτιστοποίηση των συνθηκών των επιμέρους βημάτων για κάθε κυτταρική σειρά που αναλύεται προκειμένου να είναι επιτυχές [165], παράλληλα με τα υπόλοιπα πειράματα που διεξήχθησαν στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας διενεργήθηκε και βελτιστοποίηση των συνθηκών του βήματος του κατακερματισμού της χρωματίνης με υπερήχους για τις κυτταρικές σειρές MKN45 και KATOIII προς αξιοποίησή τους σε μελλοντικά πειράματα ChIP. Από τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού σε συνολικό χρόνο 30' μεταξύ δύο συνθηκών έντασης υπερήχων και της επίδρασης της RNase κατεργασίας στο αποτέλεσμα του κατακερματισμού και στις δύο κυτταρικές σειρές, διαπιστώθηκε ότι βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονται υπό συνθήκες κατακερματισμού με ένταση υπερήχων 70% (παλμός 15" on, 45" off) και με κατεργασία της κατακερματισμένης χρωματίνης με RNase. Όντως, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, προτείνεται να γίνεται επίδραση των θραυσμάτων χρωματίνης με RNase μετά το στάδιο της κατακρήμνισης σε ένα πείραμα ChIP, καθώς μόρια RNA που μπορεί να έχουν παραμείνει στο διάλυμα ενδέχεται να αυξάνουν το σήμα υπόβαθρου, αποτελώντας σημαντική αιτία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων [166]. Η πλειονότητα των θραυσμάτων έχει μήκος έως 300 bp, το οποίο είναι επιθυμητό για τον ακριβέστερο εντοπισμό της περιοχής πρόσδεσης ενός μεταγραφικού παράγοντα στο DNA [167], καθώς είναι γνωστό ότι θραύσματα εντός αυτού του εύρους μεγέθους ισοδυναμούν με θραύσματα με ένα ή δύο νουκλεοσώματα και ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες τείνουν να προσδένονται στο DNA ανάμεσα σε δύο πυρήνες νουκλεοσωμάτων [168].

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας τα υπό μελέτη lncRNA αναδεικνύονται ως καθοδικοί στόχοι των ογκογονιδίων επιβίωσης γενεαλογίας HNF4α ή/και CDX2. Στους μελλοντικούς στόχους περιλαμβάνεται ο έλεγχος της έκφρασης των G4/HNF4α TG4,

cRENA1/2 και HNF4α TG3 υπό την σίγηση του HNF4α και των lncRNA GATA4/HNF4α TG3 και HNF4α TG1 υπό την σίγηση και του HNF4α και του CDX2, με το εργαλείο σίγησης που κατασκευάστηκε για τον HNF4α και αναπτύσσοντας ένα πιο αποτελεσματικό εργαλείο σίγησης του CDX2, ώστε να διερευνηθεί ο τρόπος ρύθμισής τους από τους συγκεκριμένους παράγοντες. Επιπρόσθετα, στους μελλοντικούς στόχους εντάσσεται η αλληλούχηση της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης για τους CDX2 και HNF4α με σκοπό την ανεύρεση *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων στα οποία προσδένονται οι εν λόγω παράγοντες και τα οποία εμπλέκονται στην ρύθμιση γονιδίων lncRNA. Στην συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει ο έλεγχος της έκφρασης των πιθανών ρυθμιστικών στόχων lncRNA που θα ταυτοποιηθούν μέσω της παραπάνω διαδικασίας στην περίπτωση της καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Yusefi, A.R., et al., *Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(3): p. 591-603.
2. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
3. Ferlay, J., et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020; Available from: <https://gco.iarc.fr/today>.
4. Eusebi, L.H., et al., *Gastric cancer prevention strategies: A global perspective*. J Gastroenterol Hepatol, 2020. **35**(9): p. 1495-1502.
5. Wong, M.C.S., et al., *Global Incidence and Mortality of Gastric Cancer, 1980-2018*. JAMA Netw Open, 2021. **4**(7): p. e2118457.
6. Edgren, G., et al., *Enigmatic sex disparities in cancer incidence*. Eur J Epidemiol, 2012. **27**(3): p. 187-96.
7. Luo, G., et al., *Global patterns and trends in stomach cancer incidence: Age, period and birth cohort analysis*. Int J Cancer, 2017. **141**(7): p. 1333-1344.
8. Anderson, W.F., et al., *The Changing Face of Noncardia Gastric Cancer Incidence Among US Non-Hispanic Whites*. J Natl Cancer Inst, 2018. **110**(6): p. 608-615.
9. Peleteiro, B., et al., *Prevalence of Helicobacter pylori infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(8): p. 1698-709.
10. Higashi, H., et al., *SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein*. Science, 2002. **295**(5555): p. 683-6.
11. Murphy, G., et al., *Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 824-33.
12. Shah, D. and D. Bentrem, *Environmental and genetic risk factors for gastric cancer*. J Surg Oncol, 2022. **125**(7): p. 1096-1103.
13. Huntsman, D.G., et al., *Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations*. N Engl J Med, 2001. **344**(25): p. 1904-9.
14. Oliveira, C., et al., *Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management*. Lancet Oncol, 2015. **16**(2): p. e60-70.
15. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17036.
16. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications*. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
17. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
18. Berlth, F., et al., *Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(19): p. 5679-84.
19. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
20. Chen, Y.C., et al., *Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer*. Pathol Oncol Res, 2016. **22**(1): p. 197-202.
21. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.
22. Correa, P., et al., *A model for gastric cancer epidemiology*. Lancet, 1975. **2**(7924): p. 58-60.
23. Correa, P. and M.B. Piazuelo, *The gastric precancerous cascade*. J Dig Dis, 2012. **13**(1): p. 2-9.
24. Li, D., et al., *Risks and Predictors of Gastric Adenocarcinoma in Patients with Gastric Intestinal Metaplasia and Dysplasia: A Population-Based Study*. Am J Gastroenterol, 2016. **111**(8): p. 1104-13.
25. Piessen, G., et al., *Is pretreatment endoscopic biopsy a good predictor of signet ring cell histology in gastric carcinoma?* World J Surg, 2012. **36**(2): p. 346-54.
26. Charalampakis, N., et al., *The Proportion of Signet Ring Cell Component in Patients with Localized Gastric Adenocarcinoma Correlates with the Degree of Response to Pre-Operative Chemoradiation*. Oncology, 2016. **90**(5): p. 239-47.
27. Petrelli, F., et al., *Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis*. J Gastrointest Oncol, 2017. **8**(1): p. 148-163.
28. Waldum, H.L. and R. Fossmark, *Types of Gastric Carcinomas*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(12).

29. Kinoshita, H., Y. Hayakawa, and K. Koike, *Metaplasia in the Stomach-Precursor of Gastric Cancer?* Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
30. Ansari, S., et al., *Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).
31. Sanjeevaiah, A., et al., *Gastric Cancer: Recent Molecular Classification Advances, Racial Disparity, and Management Implications.* J Oncol Pract, 2018. **14**(4): p. 217-224.
32. Tan, P. and K.G. Yeoh, *Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma.* Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1153-1162 e3.
33. Grabsch, H.I. and P. Tan, *Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms.* Dig Surg, 2013. **30**(2): p. 150-8.
34. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma.* Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
35. Deng, N., et al., *A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets.* Gut, 2012. **61**(5): p. 673-84.
36. Chia, N.Y., et al., *Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development.* Gut, 2015. **64**(5): p. 707-19.
37. Haveri, H., et al., *Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa.* BMC Gastroenterol, 2008. **8**: p. 9.
38. Nakamura, J., et al., *Methylation-mediated gene silencing as biomarkers of gastric cancer: a review.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(34): p. 11991-2006.
39. Zouridis, H., et al., *Methylation subtypes and large-scale epigenetic alterations in gastric cancer.* Sci Transl Med, 2012. **4**(156): p. 156ra140.
40. Wang, Q., G. Liu, and C. Hu, *Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma.* Gastroenterology Res, 2019. **12**(6): p. 275-282.
41. Zhao, R., et al., *Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer.* EBioMedicine, 2016. **8**: p. 30-39.
42. Kaneda, A., et al., *Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis.* Cancer Res, 2012. **72**(14): p. 3445-50.
43. Shokal, U. and P.C. Sharma, *Implication of microsatellite instability in human gastric cancers.* Indian J Med Res, 2012. **135**(5): p. 599-613.
44. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology.* Neoplasia, 2017. **19**(5): p. 412-420.
45. Geddert, H., et al., *EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1.* Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(3): p. 209-14.
46. Toyota, M., et al., *Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype.* Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5438-42.
47. Lordick, F. and Y.Y. Janjigian, *Clinical impact of tumour biology in the management of gastroesophageal cancer.* Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(6): p. 348-60.
48. Nam, S., J.H. Kim, and D.H. Lee, *RHOA in Gastric Cancer: Functional Roles and Therapeutic Potential.* Front Genet, 2019. **10**: p. 438.
49. Thumkeo, D., S. Watanabe, and S. Narumiya, *Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals.* Eur J Cell Biol, 2013. **92**(10-11): p. 303-15.
50. Nacula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis.* World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
51. Karimi, P., et al., *Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(5): p. 700-13.
52. Hamashima, C., et al., *The Japanese guidelines for gastric cancer screening.* Jpn J Clin Oncol, 2008. **38**(4): p. 259-67.
53. Matsuoka, T. and M. Yashiro, *Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective.* World J Gastroenterol, 2018. **24**(26): p. 2818-2832.
54. Weinstein, I.B., *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer.* Science, 2002. **297**(5578): p. 63-4.
55. Garraway, L.A. and W.R. Sellers, *Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(8): p. 593-602.

56. Garraway, L.A. and W.R. Sellers, *From integrated genomics to tumor lineage dependency*. *Cancer Res*, 2006. **66**(5): p. 2506-8.
57. Bradner, J.E., D. Hnisz, and R.A. Young, *Transcriptional Addiction in Cancer*. *Cell*, 2017. **168**(4): p. 629-643.
58. Miyazaki, K. and M. Miyazaki, *The Interplay Between Chromatin Architecture and Lineage-Specific Transcription Factors and the Regulation of Rag Gene Expression*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 659761.
59. Trompouki, E., et al., *Lineage regulators direct BMP and Wnt pathways to cell-specific programs during differentiation and regeneration*. *Cell*, 2011. **147**(3): p. 577-89.
60. Mullen, A.C., et al., *Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling*. *Cell*, 2011. **147**(3): p. 565-76.
61. Sanda, T., et al., *Core transcriptional regulatory circuit controlled by the TAL1 complex in human T cell acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(2): p. 209-21.
62. Liu, Y., et al., *Comparative Molecular Analysis of Gastrointestinal Adenocarcinomas*. *Cancer Cell*, 2018. **33**(4): p. 721-735 e8.
63. Chen, W., et al., *KLF5 Is Activated by Gene Amplification in Gastric Cancer and Is Essential for Gastric Cell Proliferation*. *Cells*, 2021. **10**(5).
64. Bai, Y.Q., et al., *Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach*. *Cancer Lett*, 2002. **176**(1): p. 47-55.
65. James, R., T. Erler, and J. Kazenwadel, *Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(21): p. 15229-37.
66. Gehring, W.J. and Y. Hiromi, *Homeotic genes and the homeobox*. *Annu Rev Genet*, 1986. **20**: p. 147-73.
67. Brooke, N.M., J. Garcia-Fernandez, and P.W. Holland, *The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster*. *Nature*, 1998. **392**(6679): p. 920-2.
68. Garcia-Fernandez, J., *The genesis and evolution of homeobox gene clusters*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(12): p. 881-92.
69. Duprey, P., et al., *A mouse gene homologous to the Drosophila gene caudal is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine*. *Genes Dev*, 1988. **2**(12A): p. 1647-54.
70. Almeida, R., et al., *Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas*. *J Pathol*, 2003. **199**(1): p. 36-40.
71. Freund, J.N., et al., *The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine*. *Biochem Cell Biol*, 1998. **76**(6): p. 957-69.
72. Beck, F., *The role of Cdx genes in the mammalian gut*. *Gut*, 2004. **53**(10): p. 1394-6.
73. Chawengsaksophak, K., et al., *Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice*. *Nature*, 1997. **386**(6620): p. 84-7.
74. Tamai, Y., et al., *Colonic hamartoma development by anomalous duplication in Cdx2 knockout mice*. *Cancer Res*, 1999. **59**(12): p. 2965-70.
75. Suh, E. and P.G. Traber, *An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(2): p. 619-25.
76. Troelsen, J.T., et al., *Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein Cdx-2*. *Biochem J*, 1997. **322 (Pt 3)**(Pt 3): p. 833-8.
77. Drummond, F., et al., *The caudal-type homeobox protein Cdx-2 binds to the colon promoter of the carbonic anhydrase 1 gene*. *Eur J Biochem*, 1996. **236**(2): p. 670-81.
78. Lambert, M., et al., *cis-Acting elements and transcription factors involved in the intestinal specific expression of the rat calbindin-D9K gene: binding of the intestine-specific transcription factor Cdx-2 to the TATA box*. *Eur J Biochem*, 1996. **236**(3): p. 778-88.
79. Kumar, N., et al., *The lineage-specific transcription factor CDX2 navigates dynamic chromatin to control distinct stages of intestine development*. *Development*, 2019. **146**(5).
80. San Roman, A.K., et al., *Transcription factors GATA4 and HNF4A control distinct aspects of intestinal homeostasis in conjunction with transcription factor CDX2*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(3): p. 1850-60.
81. Verzi, M.P., et al., *Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2*. *Dev Cell*, 2010. **19**(5): p. 713-26.

82. Chen, H.Y., et al., *Caudal type homeoboxes as a driving force in Helicobacter pylori infection-induced gastric intestinal metaplasia*. Gut Microbes, 2020. **12**(1): p. 1-12.
83. Mutoh, H., et al., *Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(2): p. 470-9.
84. Silberg, D.G., et al., *Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(3): p. 689-96.
85. Koide, T., et al., *CDX2-induced intestinal metaplasia in human gastric organoids derived from induced pluripotent stem cells*. iScience, 2022. **25**(5): p. 104314.
86. Kim, H.J., et al., *Methylation of the CDX2 promoter in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa increases with age and its rapid demethylation in gastric tumors is associated with upregulated gene expression*. Carcinogenesis, 2020. **41**(10): p. 1341-1352.
87. Samadani, A.A., et al., *Epigenetic changes of CDX2 in gastric adenocarcinoma*. J Cell Commun Signal, 2016. **10**(4): p. 267-272.
88. Park, D.Y., et al., *CDX2 expression in the intestinal-type gastric epithelial neoplasia: frequency and significance*. Mod Pathol, 2010. **23**(1): p. 54-61.
89. Song, J.H., et al., *Genetic alterations of the Cdx2 gene in gastric cancer*. APMIS, 2008. **116**(1): p. 74-80.
90. Dang, L.H., et al., *CDX2 does not suppress tumorigenicity in the human gastric cancer cell line MKN45*. Oncogene, 2006. **25**(14): p. 2048-59.
91. Samadani, A.A., et al., *CDX1/2 and KLF5 Expression and Epigenetic Modulation of Sonic Hedgehog Signaling in Gastric Adenocarcinoma*. Pathol Oncol Res, 2019. **25**(3): p. 1215-1222.
92. Song, X., et al., *H. pylori-encoded CagA disrupts tight junctions and induces invasiveness of AGS gastric carcinoma cells via Cdx2-dependent targeting of Claudin-2*. Cell Immunol, 2013. **286**(1-2): p. 22-30.
93. Yan, L.H., et al., *Reversal of multidrug resistance in gastric cancer cells by CDX2 downregulation*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(26): p. 4155-65.
94. Yan, L.H., et al., *Overexpression of CDX2 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(1): p. 321-32.
95. Liu, Y.Q., et al., *CDX2 inhibits invasion and migration of gastric cancer cells by phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10/Akt signaling pathway*. Chin Med J (Engl), 2015. **128**(8): p. 1065-71.
96. Xie, Y., et al., *Overexpression of Cdx2 inhibits progression of gastric cancer in vitro*. Int J Oncol, 2010. **36**(2): p. 509-16.
97. Zhang, J.F., et al., *Nuclear transcription factor CDX2 inhibits gastric cancer-cell growth and reverses epithelial-to-mesenchymal transition in vitro and in vivo*. Mol Med Rep, 2015. **12**(4): p. 5231-8.
98. Sladek, F.M., et al., *Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily*. Genes Dev, 1990. **4**(12B): p. 2353-65.
99. Chartier, F.L., et al., *Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver*. Gene, 1994. **147**(2): p. 269-72.
100. Ko, H.L., Z. Zhuo, and E.C. Ren, *HNF4alpha Combinatorial Isoform Heterodimers Activate Distinct Gene Targets that Differ from Their Corresponding Homodimers*. Cell Rep, 2019. **26**(10): p. 2549-2557 e3.
101. Dean, S., et al., *Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents*. Gene Expr, 2010. **14**(6): p. 337-44.
102. Tanaka, T., et al., *Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer*. J Pathol, 2006. **208**(5): p. 662-72.
103. Chellappa, K., et al., *Opposing roles of nuclear receptor HNF4alpha isoforms in colitis and colitis-associated colon cancer*. Elife, 2016. **5**.
104. Lambert, E., et al., *Human Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha Encodes Isoforms with Distinct Transcriptional Functions*. Mol Cell Proteomics, 2020. **19**(5): p. 808-827.
105. Lv, D.D., L.Y. Zhou, and H. Tang, *Hepatocyte nuclear factor 4alpha and cancer-related cell signaling pathways: a promising insight into cancer treatment*. Exp Mol Med, 2021. **53**(1): p. 8-18.
106. Chen, W.S., et al., *Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos*. Genes Dev, 1994. **8**(20): p. 2466-77.

107. Taraviras, S., et al., *Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis*. Mech Dev, 1994. **48**(2): p. 67-79.
108. Lazarevich, N.L., et al., *Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression*. Exp Oncol, 2010. **32**(3): p. 167-71.
109. Li, J., G. Ning, and S.A. Duncan, *Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 464-74.
110. Parviz, F., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 292-6.
111. Lu, H., *Crosstalk of HNF4alpha with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids*. Acta Pharm Sin B, 2016. **6**(5): p. 393-408.
112. Lucas, B., et al., *HNF4alpha reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma*. Oncogene, 2005. **24**(42): p. 6418-31.
113. Garrison, W.D., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1207-20.
114. Dubois, V., et al., *Control of Cell Identity by the Nuclear Receptor HNF4 in Organ Pathophysiology*. Cells, 2020. **9**(10).
115. Chen, L., et al., *HNF4 factors control chromatin accessibility and are redundantly required for maturation of the fetal intestine*. Development, 2019. **146**(19).
116. Chang, H.R., et al., *HNF4alpha is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer*. Gut, 2016. **65**(1): p. 19-32.
117. Kim, Y.H., et al., *AMPKalpha modulation in cancer progression: multilayer integrative analysis of the whole transcriptome in Asian gastric cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2512-21.
118. Ma, Y., X. Wei, and Z. Wu, *HNF-4alpha promotes multidrug resistance of gastric cancer cells through the modulation of cell apoptosis*. Oncol Lett, 2017. **14**(6): p. 6477-6484.
119. van der Post, R.S., et al., *HNF4A immunohistochemistry facilitates distinction between primary and metastatic breast and gastric carcinoma*. Virchows Arch, 2014. **464**(6): p. 673-9.
120. Xu, C., et al., *HNF4alpha pathway mapping identifies wild-type IDH1 as a targetable metabolic node in gastric cancer*. Gut, 2020. **69**(2): p. 231-242.
121. Kojima, K., et al., *The expression of hepatocyte nuclear factor-4alpha, a developmental regulator of visceral endoderm, correlates with the intestinal phenotype of gastric adenocarcinomas*. Pathology, 2006. **38**(6): p. 548-54.
122. Chai, D., et al., *CDX2 and Reg IV expression and correlation in gastric cancer*. BMC Gastroenterol, 2021. **21**(1): p. 92.
123. Xie, K., K. Tan, and M.J. Naylor, *Transcription Factors as Novel Therapeutic Targets and Drivers of Prostate Cancer Progression*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 854151.
124. Morris, K.V. and J.S. Mattick, *The rise of regulatory RNA*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(6): p. 423-37.
125. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(12): p. 861-74.
126. Prensner, J.R. and A.M. Chinnaiyan, *The emergence of lncRNAs in cancer biology*. Cancer Discov, 2011. **1**(5): p. 391-407.
127. Wu, H., L. Yang, and L.L. Chen, *The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation*. Trends Genet, 2017. **33**(8): p. 540-552.
128. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
129. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
130. Graf, J. and M. Kretz, *From structure to function: Route to understanding lncRNA mechanism*. Bioessays, 2020. **42**(12): p. e2000027.
131. Gloss, B.S. and M.E. Dinger, *The specificity of long noncoding RNA expression*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 16-22.
132. Mattick, J.S., R.J. Taft, and G.J. Faulkner, *A global view of genomic information--moving beyond the gene and the master regulator*. Trends Genet, 2010. **26**(1): p. 21-8.
133. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 96-118.
134. Zhang, K., et al., *The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus*. Gene, 2014. **547**(1): p. 1-9.
135. Chen, L.L., *Linking Long Noncoding RNA Localization and Function*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(9): p. 761-772.

136. Gao, N., et al., *Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 598817.
137. Reis, E.M. and S. Verjovski-Almeida, *Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics*. Front Genet, 2012. **3**: p. 32.
138. Ghafouri-Fard, S. and M. Taheri, *Long non-coding RNA signature in gastric cancer*. Exp Mol Pathol, 2020. **113**: p. 104365.
139. Zong, W., et al., *Long non-coding RNA-mediated regulation of signaling pathways in gastric cancer*. Clin Chem Lab Med, 2018. **56**(11): p. 1828-1837.
140. Liu, Y., et al., *Long Non-Coding RNA in Gastric Cancer: Mechanisms and Clinical Implications for Drug Resistance*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 841411.
141. Gao, Y., et al., *Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(24): p. 3401-3412.
142. Yuan, L., et al., *Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 96.
143. Zhou, X., et al., *Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11516.
144. Wang, J., et al., *Plasma exosomes as novel biomarker for the early diagnosis of gastric cancer*. Cancer Biomark, 2018. **21**(4): p. 805-812.
145. Cai, C., et al., *Serum Exosomal Long Noncoding RNA pcsk2-2:1 As A Potential Novel Diagnostic Biomarker For Gastric Cancer*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 10035-10041.
146. Lin, L.Y., et al., *Tumor-originated exosomal lncUEGC1 as a circulating biomarker for early-stage gastric cancer*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 84.
147. Giakountis, A., et al., *A Positive Regulatory Loop between a Wnt-Regulated Non-coding RNA and ASCL2 Controls Intestinal Stem Cell Fate*. Cell Rep, 2016. **15**(12): p. 2588-96.
148. Barros, R., et al., *CDX2 autoregulation in human intestinal metaplasia of the stomach: impact on the stability of the phenotype*. Gut, 2011. **60**(3): p. 290-8.
149. Ni, Z., et al., *TGR5-HNF4alpha axis contributes to bile acid-induced gastric intestinal metaplasia markers expression*. Cell Death Discov, 2020. **6**: p. 56.
150. He, Q., et al., *Roles and action mechanisms of bile acid-induced gastric intestinal metaplasia: a review*. Cell Death Discov, 2022. **8**(1): p. 158.
151. Chen, L., et al., *The Roles of Long Noncoding RNAs HNF1alpha-AS1 and HNF4alpha-AS1 in Drug Metabolism and Human Diseases*. Noncoding RNA, 2020. **6**(2).
152. Chen, L., et al., *A Transcriptional Regulatory Network Containing Nuclear Receptors and Long Noncoding RNAs Controls Basal and Drug-Induced Expression of Cytochrome P450s in HepaRG Cells*. Mol Pharmacol, 2018. **94**(1): p. 749-759.
153. Guo, S. and H. Lu, *Novel mechanisms of regulation of the expression and transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4alpha*. J Cell Biochem, 2019. **120**(1): p. 519-532.
154. Song, M., et al., *Large-scale analyses identify a cluster of novel long noncoding RNAs as potential competitive endogenous RNAs in progression of hepatocellular carcinoma*. Aging (Albany NY), 2019. **11**(22): p. 10422-10453.
155. Cheng, Z., et al., *KLF5 activates lncRNA DANCR and inhibits cancer cell autophagy accelerating gastric cancer progression*. NPJ Genom Med, 2021. **6**(1): p. 75.
156. Ma, P., et al., *KLF5-Modulated lncRNA NEAT1 Contributes to Tumorigenesis by Acting as a Scaffold for BRG1 to Silence GADD45A in Gastric Cancer*. Mol Ther Nucleic Acids, 2020. **22**: p. 382-395.
157. Wang, Q., et al., *Tumor-derived exosomes orchestrate the microRNA-128-3p/ELF4/CDX2 axis to facilitate the growth and metastasis of gastric cancer via delivery of LINC01091*. Cell Biol Toxicol, 2023. **39**(2): p. 519-536.
158. Lu, S., et al., *Expression of alpha-fetoprotein in gastric cancer AGS cells contributes to invasion and metastasis by influencing anoikis sensitivity*. Oncol Rep, 2016. **35**(5): p. 2984-90.
159. de Sousa Abreu, R., et al., *Global signatures of protein and mRNA expression levels*. Mol Biosyst, 2009. **5**(12): p. 1512-26.
160. Wells, J. and P.J. Farnham, *Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation*. Methods, 2002. **26**(1): p. 48-56.
161. Mubarakah, N., et al., *Cooperative Regulation of Intestinal UDP-Glucuronosyltransferases 1A8, -1A9, and 1A10 by CDX2 and HNF4alpha Is Mediated by a Novel Composite Regulatory Element*. Mol Pharmacol, 2018. **93**(5): p. 541-552.

162. Verzi, M.P., et al., *Intestinal master transcription factor CDX2 controls chromatin access for partner transcription factor binding*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(2): p. 281-92.
163. Sulahian, R., et al., *An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer*. Oncogene, 2014. **33**(49): p. 5637-48.
164. Chen, Y., et al., *Core transcriptional regulatory circuitries in cancer*. Oncogene, 2020. **39**(43): p. 6633-6646.
165. Wooden, J. and P. Ciborowski, *Chromatin immunoprecipitation for human monocyte derived macrophages*. Methods, 2014. **70**(2-3): p. 89-96.
166. Waldminghaus, T. and K. Skarstad, *ChIP on Chip: surprising results are often artifacts*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 414.
167. Kus-Liskiewicz, M., *ChIP - Does it work correctly? The optimization steps of chromatin immunoprecipitation*. Acta Biol Hung, 2016. **67**(4): p. 373-378.
168. Kidder, B.L., G. Hu, and K. Zhao, *ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data*. Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 918-22.