



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Πτυχιακή Εργασία

---

**«Χαρακτηρισμός της έκφρασης ενός lncRNA και του mRNA στόχου του με παροδική σίγηση στον γαστρικό καρκίνο»**

**«Expression characterization of a lncRNA and its mRNA target via transient silencing in gastric cancer»**

---

Όνοματεπώνυμο: Σακκά Τριανταφυλλιά

Πατρώνυμο: Παναγιώτης

Επιβλέπων Καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Λάρισα, 2023

## Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής:

**Γιακουντής Αντώνιος**, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη:

**Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μπελούκας Απόστολος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

## Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Γιακουντή Αντώνιο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου και να συνδράμω στο ερευνητικό του έργο, καθώς επίσης και για τις συμβουλές που μου χάρισε καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους συνεπιβλέποντες καθηγητές, κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη και κύριο Μπελούκα Απόστολο για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις υποψήφιες διδάκτορες Μπεγγόλλι Ροντιόλα-Ελένη και Χατζηαγγέλου Μυρτώ, για την συμπαράσταση και την αμέριστη βοήθειά τους, τόσο σε εκπαιδευτικό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο, καθώς επίσης και τις συμφοιτήτριές μου Σπαχίου Κλαούντια-Χριστίνα, Μαρούλη Μαριάνθη και Grigoras Ioana, που όλες μαζί κατάφεραν να δημιουργήσουν ένα θερμό κλίμα ουσιαστικής συμπαράστασης και φιλίας, πέρα από το πλαίσιο μίας τυπικής, εκπαιδευτικού τύπου συνεργασίας. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένειά μου, και ιδιαίτερα στους γονείς μου, που ποτέ δεν σταμάτησαν να πιστεύουν σε εμένα και να με υποστηρίζουν σε κάθε μου βήμα.

## Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	<b>8</b>
1.1 Ο καρκίνος του στομάχου .....	8
1.1.1 Ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου .....	10
1.1.1.1 Ιστολογική ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου .....	10
1.1.1.2 Μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου .....	12
1.1.2 Διάγνωση και Θεραπεία γαστρικού καρκίνου .....	17
1.2 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (lncRNAs) .....	17
1.2.1 Ταξινόμηση lncRNAs ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό .....	18
1.2.2 Ταξινόμηση lncRNAs ανάλογα με τον τρόπο δράσης .....	20
1.2.3 lncRNAs και καρκίνος .....	23
1.2.4 Τα lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες .....	24
1.3 Γονίδια HOX και καρκίνος του στομάχου .....	25
<b>2. Σκοπός</b> .....	<b>27</b>
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	<b>28</b>
3.1 Υλικά .....	28
3.1.1 Αλληλουχίες .....	28
3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς .....	28
3.1.3 Κυτταρικές σειρές .....	30
3.1.4 Βακτηριακά στελέχη .....	31
3.2 Μέθοδοι .....	32
3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση .....	32
3.2.2 Υποκυτταρική κλασμάτωση .....	32
3.2.3 Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων .....	33

3.2.4 Αντίδραση λιγάσης .....	34
3.2.5 Μετασηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ .....	35
3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....	36
3.2.7 Διαγνωστική PCR και Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης .....	37
3.2.8 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών και κυτταρομετρία ροής .....	38
3.2.9 Απομόνωση RNA .....	39
3.2.10 Κατεργασία με DNάση .....	39
3.2.11 Σύνθεση cDNA .....	40
3.2.12 Ποσοτική PCR (qPCR) .....	41
<b>4. Αποτελέσματα .....</b>	<b>43</b>
4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση .....	43
4.1.1 Ανάλυση δεδομένων RNA-seq .....	43
4.1.2 Ανάλυση δεδομένων με την χρήση του εργαλείου GEPIA .....	47
4.2 Χαρακτηρισμός της έκφρασης REAKTn και TG1 σε κυτταρικές σειρές .....	49
4.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός REAKTn σε κύτταρα KATOIII και MKN45 .....	51
4.4 Μεταγραφική σταθερότητα REAKTn σε κύτταρα MKN45 .....	52
4.5 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης REAKTn και TG1 σε συνθήκες καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων KLF5, GATA4 και GATA6 .....	53
4.6 Κλωνοποίηση shRNA αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR .....	55
4.7 Έλεγχος ποσοστού διαμόλυνσης κυττάρων KATOIII και MKN45 .....	56
4.8 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης REAKTn και TG1 έπειτα από παροδική σίγηση του REAKTn σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου .....	59
4.8.1 Παροδική σίγηση REAKTn μέσω shRNA αλληλουχίας σε φορέα pSicoR .....	59
4.8.2 Παροδική σίγηση REAKTn μέσω shRNA αλληλουχίας σε φορέα pLL3.7 .....	60
<b>5. Συζήτηση .....</b>	<b>62</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>69</b>

## Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί έναν από τους πιο συχνούς και θνησιγόνους τύπους καρκίνου παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης νέων περιστατικών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το φύλο, η ηλικία και η γεωγραφική περιοχή. Δεδομένου ότι ο γαστρικός καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική και ετερογενής ασθένεια, έχουν γίνει ποικίλες προσπάθειες ταξινόμησης των υποτύπων του με βάση ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά, στοχεύοντας στην κατανόηση της παθογένεσης της νόσου. Η διάγνωση του καρκίνου του στομάχου πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο σε προχωρημένα στάδια, όπου η νόσος εκδηλώνεται ως μεταστατική και ως εκ τούτου οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες, γεγονός που επεξηγεί και τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Συνεπώς, τίθεται σε προτεραιότητα η ανακάλυψη νέων, μη επεμβατικών και εξειδικευμένων για τα αρχικά στάδια της νόσου διαγνωστικών και προγνωστικών μοριακών βιοδεικτών. Εξαιρετικό ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τις τελευταίες δεκαετίες τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNAs-lncRNAs), λόγω συγκεκριμένων χαρακτηριστικών τους που τα καθιστούν ιδανικούς βιοδείκτες, όπως η ιστο-ειδικότητά τους, η παρουσία τους σε βιολογικά υγρά και η διαφορική τους έκφραση σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού. Προς επίλυση του προβλήματος της καθυστερημένης διάγνωσης του καρκίνου του στομάχου, η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως στόχο τον χαρακτηρισμό ενός lncRNA που ονομάζεται REAKTn (lincRNA rEgulated by Kruppel gasTric n) και του γειτονικού, υποψήφιου γονιδίου στόχου του, REAKTn TG1 (REAKTn Target Gene 1), που ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων HOX. Η μελέτη των δύο γονιδίων περιλαμβάνει την βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA και τον καθορισμό του προφίλ έκφρασής τους σε διάφορες κυτταρικές σειρές, καθώς επίσης και σε συνθήκες καταστολής μεταγραφικών παραγόντων που προωθούν τον γαστρικό καρκίνο. Επιπλέον, για το lncRNA πραγματοποιείται χαρακτηρισμός του υποκυτταρικού εντοπισμού και της σταθερότητας των μεταγράφων του σε καρκινικά κύτταρα στομάχου. Τέλος, για την ανακάλυψη της σχέσης μεταξύ των δύο γονιδίων, πραγματοποιείται παροδική καταστολή της έκφρασης του lncRNA REAKTn μέσω συστήματος διαμόλυνσης κυττάρων με λεντιούς.

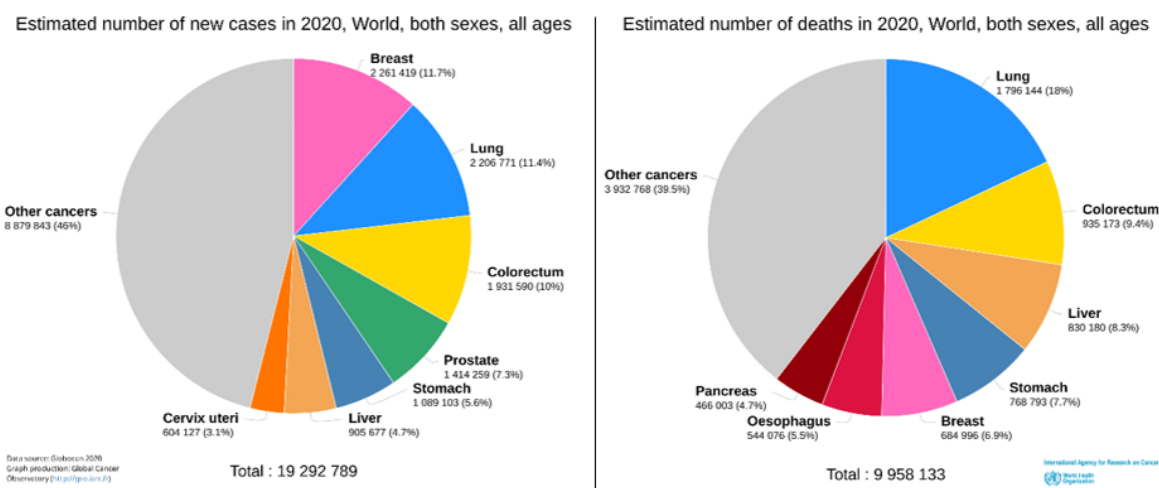
## Abstract

Stomach cancer is one of the most common and deadly types of cancer worldwide. Its incidence depends on several factors such as gender, age, and geographical area. Since gastric cancer is a multifactorial and heterogeneous disease, several attempts have been made to classify its subtypes based on histological and molecular features, aiming to understand the pathogenesis of the disease. Gastric cancer is mainly diagnosed at the final stages, when the disease is often metastatic and treatment options are limited, which also explains the high mortality rates. Therefore, the discovery of new, non-invasive, and specific for early stages, diagnostic and prognostic molecular biomarkers is a priority. Long non-coding RNAs (lncRNAs) have attracted considerable research interest in recent decades due to characteristics that make them ideal biomarkers, such as their tissue specificity, their presence in biological fluids and their differential expression in various types of cancer, including gastric cancer. To address the problem of delayed diagnosis of gastric cancer, this thesis aims to characterize a lncRNA called REAKTn (lincRNA rEgulated by Kruppel gasTric n) and its neighboring, potential target gene, REAKTn TG1 (REAKTn Target Gene 1), which belongs to the HOX gene family. The study of the two genes involves bioinformatic analysis of RNA sequencing data, and determination of their expression profiles in different cell lines, as well as in samples where transcription factors that promote gastric cancer were silenced. In addition, the lncRNA's subcellular localization and transcriptional stability is characterized in stomach cancer cells. Last but not least, in order to discover the relationship between the two genes, transient silencing of the lncRNA REAKTn is performed via a lentiviral cell transfection system.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ο καρκίνος του στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου παραμένει μία από τις κυριότερες προκλήσεις για την ανθρώπινη υγεία παγκοσμίως, παρ' όλη την μείωση που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες στην συχνότητα εμφάνισης και την θνησιμότητα της νόσου [1]. Σύμφωνα με παγκόσμια στατιστικά δεδομένα για το έτος 2020, ο γαστρικός καρκίνος κατέχει την πέμπτη θέση σε ότι αφορά την συχνότητα εμφάνισης νέων περιστατικών (5,6%), ακολουθώντας τους καρκίνους του μαστού (11,7%), του πνεύμονα (11,4%), του παχέος εντέρου (10%) και του προστάτη (7,3%) [2], ενώ είναι αξιοσημείωτο πως πάνω από ένα εκατομμύριο άτομα διαγνώστηκαν με την νόσο [1], (**Εικόνα 1**). Επιπλέον, ο καρκίνος του στομάχου ήταν υπεύθυνος για 768.793 θανάτους παγκοσμίως το 2020, κατακτώντας έτσι, την τέταρτη θέση σε θνησιμότητα [2, 3], (**Εικόνα 1**).

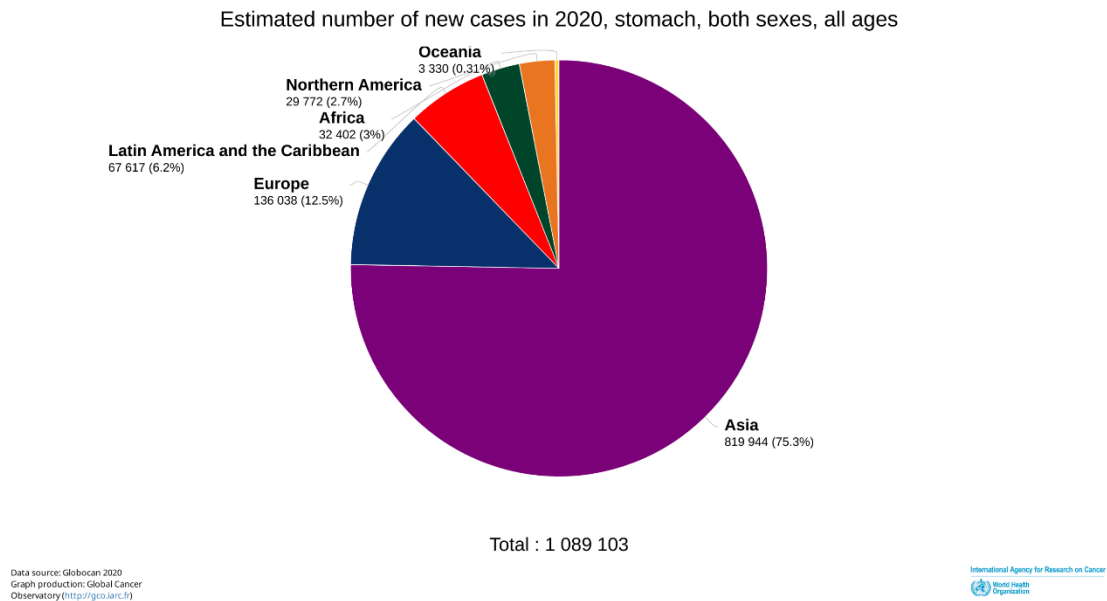


**Εικόνα 1:** Συχνότητα εμφάνισης νέων περιπτώσεων και θνησιμότητα ανά τύπο καρκίνου παγκοσμίως, για το 2020 και για τα δύο φύλα. Πηγή: GLOBOCAN 2020, IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 2023.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως η συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου είναι μεγαλύτερη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες και αυξάνεται με την ηλικία, καθώς στη πλειονότητα των περιπτώσεων (60%) η νόσος εμφανίζεται μετά τα 65 έτη [3, 4]. Ακόμη, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου διαφέρει ανά τον κόσμο. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με μελέτες του Διεθνούς Παρατηρητηρίου για την Έρευνα του Καρκίνου (GLOBOCAN), οι περισσότερες περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου το 2020 εντοπίστηκαν στην Ανατολική Ασία (22,4 στα 100000 άτομα) και έπειτα, στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη, την Νότια Αμερική, την Πολυνησία και την Δυτική Ασία [1].



Συνολικά, η Ασία είναι η ήπειρος που πλήττεται ως επί το πλείστον από τον καρκίνο του στομάχου, με το 75,3% των περιπτώσεων να εμφανίζονται εκεί (**Εικόνα 2**).



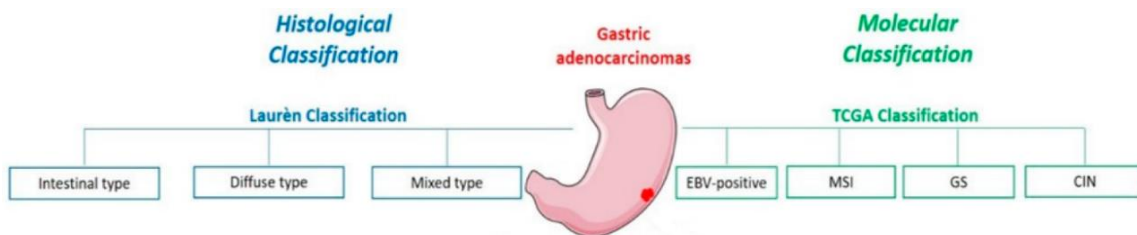
**Εικόνα 2:** Η κατανομή των περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Πηγή: GLOBOCAN 2020, IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 2023.

Ο καρκίνος του στομάχου είναι μία πολυπαραγοντική και ετερογενής ασθένεια, την ανάπτυξη της οποίας επηρεάζουν τόσο περιβαλλοντικοί όσο και γενετικοί παράγοντες [5]. Το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η διατροφή (λόγου χάρη η υψηλή κατανάλωση αλατιού) και η κατανάλωση αλκοόλ έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου [6]. Μολυσματικοί παράγοντες όπως το βακτήριο *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) και ο ιός Epstein-Barr (EBV), αποτελούν επίσης, σημαντικούς αρωγούς στην ανάπτυξη του καρκίνου του στομάχου. Συγκεκριμένα, το *H. pylori*, που έχει χαρακτηριστεί και ως πρώτης κατηγορίας καρκινογόνο από τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα στον Καρκίνο (IARC), παράγει πρωτεΐνες όπως οι CagA (Cytotoxin-associated gene A) και VacA (Vacuolating cytotoxin A), οι οποίες προωθούν την καρκινογένεση με διαφορετικούς μηχανισμούς [7-9]. Τέλος, αν και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο γαστρικός καρκίνος είναι σποραδικός, έχουν χαρακτηριστεί διάφορα γονίδια, κληρονομήσιμες μεταλλάξεις των οποίων θα μπορούσαν να προδιαθέσουν για την νόσο. Για παράδειγμα, γαμετική μετάλλαξη στο γονίδιο της Ε-καδερίνης (CDH1) οδηγεί στο σύνδρομο του κληρονομικού γαστρικού καρκίνου

διάχυτου τύπου (HDGC), το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού όγκου κατά 70% [10].

### 1.1.1 Ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο γαστρικός καρκίνος παρουσιάζει υψηλή ετερογένεια, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στους διαφορετικούς φαινοτύπους των ασθενών, στην καλύτερη ή χειρότερη πρόγνωση ανά περίπτωση, καθώς και στις ποικίλες αποκρίσεις στις υπάρχουσες θεραπείες. Η επιτακτική ανάγκη για την καλύτερη κατανόηση της παθογένεσης της νόσου και κατ'επέκταση για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή της, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων συστημάτων ταξινόμησης του καρκίνου του στομάχου [11]. Παρακάτω αναλύονται εκτενέστερα το σύστημα της ιστολογικής ταξινόμησης κατά Laurén και το σύστημα της μοριακής ταξινόμησης που προτάθηκε από το ερευνητικό δίκτυο «Άτλας του Καρκινικού Γονιδιώματος» (TCGA) το 2014 (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ιστολογική και μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου. Τροποποιημένο από: [12].

#### 1.1.1.1 Ιστολογική ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου

Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί τον κύριο τύπο κακοήθειας του στομάχου (~95%), με το υπόλοιπο 5% να περιλαμβάνει το λέμφωμα, το σάρκωμα, τον γαστρεντερικό στρωματικό όγκο και τους νευροενδοκρινείς όγκους [12, 13]. Η έντονη ποικιλότητα που χαρακτηρίζει τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα από μορφολογικής άποψης, είναι ο βασικός λόγος ύπαρξης τόσων πολλών και διαφορετικών συστημάτων ιστολογικής ταξινόμησης του καρκίνου του στομάχου [14]. Ωστόσο, το σύστημα ιστολογικής ταξινόμησης κατά Laurén, είναι αυτό που χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη και περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω.

### **Ταξινόμηση κατά Laurén:**

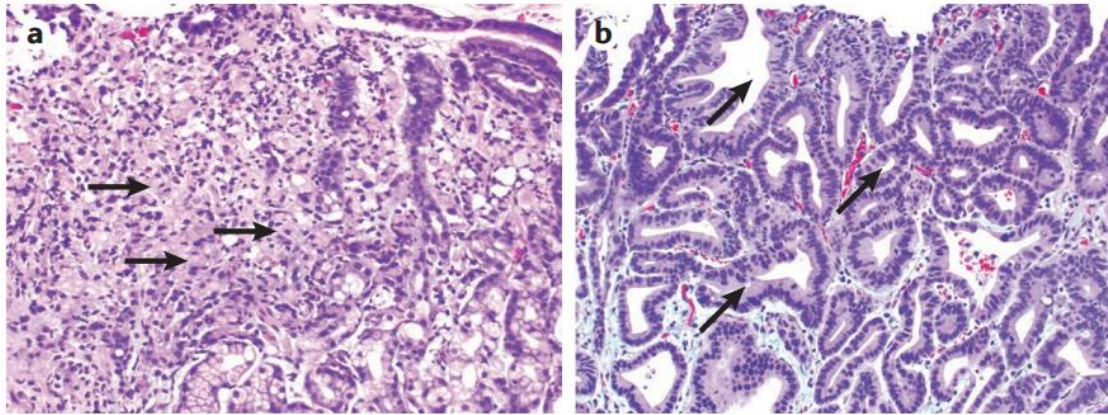
Η ταξινόμηση κατά Laurén διαχωρίζει τον γαστρικό καρκίνο, με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά, σε τρεις κατηγορίες: α) τον εντερικό τύπο (intestinal type), β) τον διάχυτο τύπο (diffuse type) και γ) τον μεικτό τύπο (mixed type), με κάθε μια από αυτές να διαθέτει διακριτά κλινικά, επιδημιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά [15, 16].

#### **α) Εντερικός τύπος:**

Ο γαστρικός καρκίνος εντερικού τύπου είναι ο πιο συχνός (54%), σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες και εμφανίζεται κυρίως σε άνδρες μεγάλης ηλικίας [17, 18]. Χαρακτηριστικό του εντερικού τύπου είναι ο σχηματισμός αδενώδων, σωληνοειδών δομών που δημιουργούνται από συνεκτικά μεταξύ τους καρκινικά κύτταρα [17], (**Εικόνα 4b**). Κύριος περιβαλλοντικός παράγοντας που ευθύνεται για την ανάπτυξη εντερικού τύπου γαστρικού αδενοκαρκινώματος είναι η μόλυνση από το βακτήριο *H. pylori*, το οποίο μπορεί να προκαλέσει χρόνια ατροφική γαστρίτιδα και εντερική μεταπλασία του γαστρικού επιθηλίου, οι οποίες αποτελούν καίριες προ-καρκινικές βλάβες [19]. Σε μοριακό επίπεδο, σημαντικό ρόλο στην εντερική μεταπλασία διαδραματίζει η *de novo* έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Caudal-related homeobox 1 και 2 (CDX1 και CDX2) στον στόμαχο, η οποία φυσιολογικά περιορίζεται αυστηρώς στο εντερικό επιθήλιο [20].

#### **β) Διάχυτος τύπος:**

Ο γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου έχει συχνότητα εμφάνισης 32% και έχει δειχθεί πως είναι περισσότερο συχνός σε νεαρές γυναίκες [21, 22]. Επίσης, χαρακτηρίζεται από φτωχά διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα με μειωμένη συνοχή μεταξύ τους και αυξημένη τάση για διήθηση, γεγονός που δικαιολογεί το ότι ο συγκεκριμένος τύπος γαστρικού καρκίνου έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς [23, 24]. Επιπροσθέτως, η χαρακτηριστική μορφολογία σφραγιστήρος δακτυλίου των καρκινικών κυττάρων (signet ring cancer cells) οδήγησε σε περαιτέρω διαχωρισμό δύο υποκατηγοριών του διάχυτου τύπου γαστρικού όγκου, ανάλογα με το αν παρατηρείται (Signet-Ring Cell Carcinoma (SRCC) ή όχι (non-SRCC) η συγκεκριμένη διαμόρφωση των κυττάρων [25], (**Εικόνα 4α**). Η αιτιολογία του διάχυτου τύπου καρκίνου του στομάχου περιλαμβάνει τόσο περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η μόλυνση από EBV και το κάπνισμα, όσο και γενετικούς παράγοντες, λόγω χάρη σωματικές και γαμετικές μεταλλάξεις στα γονίδια CDH1, TP53, RHOA, CTNN1A, και CMTM2 [26, 27].



**Εικόνα 4:** a) Χρώση τομών γαστρικού καρκινικού ιστού διάχυτου τύπου με αιματοξυλίνη-εωσίνη. Με τα βέλη επισημαίνονται τα κύτταρα με διαμόρφωση σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring cells). b) Χρώση τομών γαστρικού καρκινικού ιστού εντερικού τύπου με αιματοξυλίνη-εωσίνη. Με τα βέλη επισημαίνονται οι αδενώδεις δομές. [13]

#### 1.1.1.2 Μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου

Η ιστολογική ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου μπορεί να αποτελεί μία σημαντική βάση για τον αρχικό χαρακτηρισμό της νόσου, ωστόσο προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση για τον εκάστοτε ασθενή, είναι αναγκαία η γνώση και των μοριακών ιδιοτήτων του όγκου. Τις τελευταίες δεκαετίες, η πρόοδος των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς και άλλων γονιδιωματικών τεχνικών, αποτέλεσε ικρίωμα για την ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου σε μοριακό επίπεδο, λαμβάνοντας υπόψη γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις [28].

#### Μοριακή ταξινόμηση TCGA:

Το 2014 η ερευνητική ομάδα της κοινοπραξίας «Άτλας του Καρκινικού Γονιδιώματος» (TCGA) δημοσίευσε την πληρέστερη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστού πρωτογενούς γαστρικού αδενοκαρκινώματος από 295 ασθενείς στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί κάποια θεραπεία προηγουμένως. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια έξι μεθόδων: i) ανάλυση αριθμού σωματικών γονιδιακών αντιγράφων ii) αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος iii) χαρακτηρισμός του προτύπου μεθυλίωσης iv) αλληλούχηση κωδικοποιητικών (mRNA) και v) μικρών μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (miRNA) και vi) συστοιχίες πρωτεϊνών αντίστροφης φάσης (RPPA). Συνεπώς, σύμφωνα με την συγκεκριμένη έρευνα, ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις μοριακούς υποτύπους οι οποίοι περιλαμβάνουν: α) όγκους θετικούς για τον ιό Epstein-Barr (EBV<sup>+</sup>) β) όγκους με

μικροδορυφορική αστάθεια (MicroSatellite Instability-MSI) γ) γονιδιωματικά σταθερούς όγκους (Genomic Stability-GS) και δ) όγκους που χαρακτηρίζονται από χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal Instability-CIN) [29], (**Εικόνα 5**).

#### **α) Όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (EBV<sup>+</sup>):**

Σύμφωνα με τα πορίσματα της μελέτης του δικτύου TCGA, οι γαστρικοί όγκοι που είναι θετικοί για μόλυνση από τον ιό Epstein-Barr (EBV) συνιστούσαν το 9% των περιπτώσεων, ήταν παρόντες κυρίως στον θόλο και στο σώμα του στομάχου (62%) και συναντήθηκαν συχνότερα σε άνδρες ασθενείς (81%) [29]. Ο EBV ή αλλιώς ο ανθρώπινος ερπητοϊός 4 μολύνει, συνήθως ασυμπτωματικά, πάνω από το 90% του πληθυσμού και έχει συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων κακοηθειών, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και ο καρκίνος του στομάχου [30, 31]. Συγκεκριμένα, η είσοδος του ιού στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της άμεσης κυτταρικής επαφής με μολυσμένα από EBV Β λεμφοκύτταρα [32]. Το βασικό στοιχείο διαχωρισμού του EBV-θετικού υποτύπου γαστρικού καρκίνου από τους υπόλοιπους είναι η εκτεταμένη υπερμεθυλίωση του DNA σε νησίδες CpG (CpG Islands Methylator Phenotype-CIMP), μία επιγενετική τροποποίηση που μπορεί να οδηγήσει στην μείωση της έκφρασης σημαντικών ογκοκαταστολέων και κατ' επέκταση σε διατάραξη θεμελιωδών λειτουργιών του κυττάρου [33]. Επί παραδείγματι, σε όλους τους EBV<sup>+</sup> όγκους που αναλύθηκαν από το TCGA παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου CDKN2A, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p16<sup>INK4</sup> και συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [29, 34]. Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο πως το 80% των EBV<sup>+</sup> όγκων έφερε μη συνώνυμες μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο PIK3CA, που κωδικοποιεί την κινάση 3 της 3,4 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, η οποία μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt αποτελεί βασικό ρυθμιστή της κυτταρικής αύξησης, της απόπτωσης και του μεταβολισμού [29, 35]. Ακόμη, από την πολυομική ανάλυση της έρευνας του TCGA αποκαλύφθηκε πως στο γονιδίωμα των θετικών για EBV όγκων υπάρχει επαναλαμβανόμενη ενίσχυση του γενετικού τόπου 9p24.1, στον οποίο εδρεύουν τα γονίδια Janus Kinase 2 (JAK2), Programmed Death Ligands 1 και 2 (PD-L1 και PD-L2) [29]. Το γονίδιο JAK2 κωδικοποιεί μία κινάση τυροσίνης με ρόλο ενδοκυτταρικού τελεστή, συμμετέχει σε μονοπάτια σηματοδότησης για την απόκριση σε κυτοκίνες και θα

μπορούσε να αποτελέσει έναν νέο θεραπευτικό στόχο [36]. Σε ότι αφορά τα γονίδια PD-L1 και PD-L2, συνιστούν διαμεμβρανικούς ανοσοκατασταλτικούς προσδέτες, οι οποίοι όταν συνδεθούν στον αντίστοιχο υποδοχέα τους (PD-1) στα T λεμφοκύτταρα, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους και τα οδηγούν σε ανέργεια, δίνοντας την δυνατότητα στα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα [37].

### **β) Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI):**

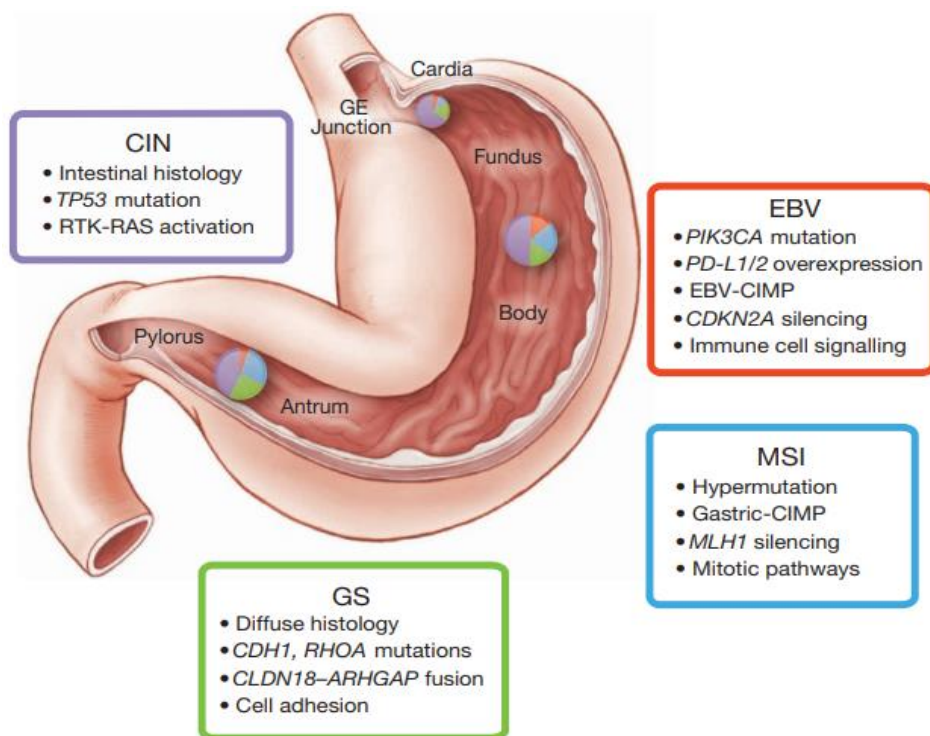
Η ταξινόμηση της κοινοπραξίας TCGA κατέδειξε πως το 22% των καρκινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν παρουσίαζαν μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και αφορούσαν κυρίως γυναίκες με μέση ηλικία διάγνωσης τα 72 έτη [29]. Επιπρόσθετα, ο υπότυπος γαστρικού καρκίνου με αστάθεια μικροδορυφόρων εμφανίζεται συχνότερα (75%) στο άντρο του στομάχου και συσχετίζεται με τον εντερικό υπότυπο (60%) της ιστολογικής ταξινόμησης κατά Laurén, εξηγώντας και την καλύτερη πρόγνωση που παρατηρείται στους ασθενείς [38]. Ως μικροσωληνίσκοι αναφέρονται οι μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους 1-6 νουκλεοτιδίων, που βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα και είναι αρκετά επιρρεπείς σε μεταλλάξεις [39]. Η κύρια αιτία της μικροδορυφορικής αστάθειας είναι η ελαττωματική δράση του μονοπατιού επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων (Mismatch Repair pathway-MMR), γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει ενθέσεις ή ελλείμματα νουκλεοτιδίων στην περιοχή των μικροδορυφόρων κατά την αντιγραφή του DNA [40]. Μείωση ή πλήρης απώλεια της έκφρασης πρωτεϊνών που απαρτίζουν το σύστημα MMR εξαιτίας μεταλλάξεων ή επιγενετικής σίγησης μπορούν να οδηγήσουν σε ελλειμματική επιδιόρθωση του γονιδιώματος και στη λεγόμενη αστάθεια [41]. Συγκεκριμένα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων γαστρικού όγκου με αστάθεια μικροδορυφόρων διαπιστώνεται υπερμεθυλίωση του υποκινητή και κατά συνέπεια, σίγηση του γονιδίου MLH1 (Human MutL homolog 1) [42]. Γενικότερα, ο συγκεκριμένος υπότυπος καρκίνου του στομάχου χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων σε γονίδια που διαδραματίζουν μείζονες ρόλους σε κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός (KRAS) και η αλληλεπίδραση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης με την επιδιόρθωση του DNA (TP53) [43].

### **γ) Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (GS):**

Οι δύο εναπομείναντες κατηγορίες όγκων διαχωρίστηκαν σε δύο επιπλέον υποτύπους ανάλογα με το ποσό των αλλαγών που εμφανίζουν ως προς τον αριθμό των σωματικών αντιγράφων γονιδίων (Somatic Copy Number Alterations-SCNAs) και ανάλογα με τον βαθμό της ανευπλοειδίας [29, 44]. Ο μοριακός υπότυπος γαστρικού καρκίνου με γονιδιωματική σταθερότητα ανιχνεύθηκε στο 20% των ασθενών που ελέγχθηκαν στην έρευνα του TCGA, εμφάνισε υψηλή συσχέτιση με τον διάχυτο ιστολογικό τύπο της ταξινόμησης κατά Laurén και ως μέση ηλικία διάγνωσης γι' αυτόν τον υπότυπο υπολογίστηκαν τα 59 έτη [29]. Σε μοριακό επίπεδο, το TCGA κατέδειξε πως το 37% των περιπτώσεων έφεραν σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο CDH1, που κωδικοποιεί την E-καδερίνη, πρωτεΐνη-κλειδί για την διατήρηση της κυτταρικής προσκόλλησης και της πολικότητας του κυττάρου. Η διατάραξη της λειτουργίας της E-καδερίνης διευκολύνει την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), μηχανισμός που διέπει τις διαδικασίες της κυτταρικής μετανάστευσης, της διήθησης και τελικά, της μετάστασης [29, 44, 45]. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο RHOA, που κωδικοποιεί μία μικρού μοριακού βάρους GTPάση που εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την προσκόλληση και την κινητικότητα του κυττάρου μέσω του κυτταροσκελετού, παρατηρήθηκαν σχεδόν αποκλειστικά στον συγκεκριμένο υπότυπο γαστρικού καρκίνου [29, 46]. Τέλος, χαρακτηριστική για τους γονιδιωματικά σταθερούς όγκους ήταν η σύντηξη των γονιδίων CLDN18-ARHGAP26. Το γονίδιο CLDN18 κωδικοποιεί την κλαυδίνη 18, που αποτελεί ένα από τα συστατικά των στενοσυνδέσμων που σχηματίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα για να διατηρήσουν την συνοχή μεταξύ τους, ενώ το γονίδιο ARHGAP26 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ενεργοποίησης των Rho GTPασών με ρόλο στην κινητικότητα του κυττάρου [47]. Μάλιστα, η συγκεκριμένη γονιδιακή αναδιάταξη αποτελεί συχνή μετάλλαξη-οδηγό για τον συγκεκριμένο τύπο γαστρικού καρκίνου και πραγματοποιούνται προσπάθειες θεραπευτικής στόχευσης του υβριδικού προϊόντος της [48].

#### δ) Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN):

Το 50% των όγκων που ελέγχθηκαν στην μελέτη του δικτύου TCGA παρουσίαζαν χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal Instability-CIN), κατά την οποία εκτενείς γενετικοί τόποι χρωμοσωμάτων ή ακόμη και ολόκληρα χρωμοσώματα είτε ενισχύονται είτε απαλείφονται από το γονιδίωμα, οδηγώντας συχνά σε ανευπλοειδία [29, 49]. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος μοριακός υποτύπος συσχετίζεται κυρίως με το εντερικού τύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και φέρει υψηλή συχνότητα εμφάνισης στην γαστροοισοφαγική συμβολή και στην καρδιά του στομάχου [29]. Η συχνότερη μετάλλαξη για τον τύπο γαστρικού καρκίνου με χρωμοσωμική αστάθεια είναι στο γονίδιο TP53 (71% των ασθενών), που κωδικοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η οποία κατέχει κρίσιμο ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, δρώντας ως διαμεσολαβητής μεταξύ κυτταρικού κύκλου, επιδιόρθωσης του DNA και απόπτωσης [50, 51]. Παράλληλα, χαρακτηριστική για τον υποτύπο αυτό είναι η ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (RTKs), όπως οι EGFR, ERBB2, ERBB3 και FGFR2, καθώς επίσης και γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων που προωθούν την καρκινογένεση, βασικότεροι εκ των οποίων είναι οι c-Myc, GATA4 και GATA6 [52].



Εικόνα 5: Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των τεσσάρων μοριακών υποτύπων γαστρικού καρκίνου με βάση την ταξινόμηση TCGA [29].



### **1.1.2 Διάγνωση και θεραπεία γαστρικού καρκίνου**

Είναι γνωστό πως το στάδιο της νόσου καθορίζει την θεραπευτική στρατηγική που θα ακολουθηθεί, καθώς και την αποτελεσματικότητά της. Συγκεκριμένα, διάγνωση πρωτογενούς γαστρικού καρκίνου συνήθως συνεπάγεται χειρουργική αφαίρεση του όγκου και ποσοστά επιβίωσης του ασθενούς πάνω από 90% [53]. Αντίθετα και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, όταν ο γαστρικός όγκος ανιχνευθεί σε προχωρημένο στάδιο, επιλέγονται συστηματικές θεραπείες όπως η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία και η μοριακή στοχευμένη θεραπεία [54].

Τα βασικότερα συμπτώματα του καρκίνου του στομάχου είναι η δυσπεψία, η ανορεξία, ο πρώιμος κορεσμός, η απώλεια βάρους και ο πόνος στην κοιλιακή περιοχή. Εντούτοις, επειδή οι ασθενείς με γαστρικό καρκίνο αρχικών σταδίων είναι συνήθως ασυμπτωματικοί, η διάγνωση πραγματοποιείται όταν η νόσος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο και είναι ανίατη [55, 56]. Ο πιο διαδεδομένος, επεμβατικού τύπου, τρόπος διάγνωσης είναι η ενδοσκόπηση με παράλληλη ακριβή εξέταση του γαστρικού βλενογόννου και λήψη βιοψιών από τις παρατηρούμενες βλάβες [57]. Οι βιοψίες που λαμβάνονται χρησιμοποιούνται τόσο για τον χαρακτηρισμό του όγκου σε ιστολογικό επίπεδο, όσο και για την κλινική σταδιοποίηση της νόσου, η οποία θα καθορίσει το είδος της θεραπείας που θα επιλεγεί [56]. Παράλληλα, χώρες με υψηλή συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου όπως η Ιαπωνία και η Κορέα, έχουν θεσπίσει εδώ και δεκαετίες κρατικά προγράμματα ελέγχου ρουτίνας για την συγκεκριμένη νόσο, με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση και την αύξηση της πιθανότητας επιβίωσης των ασθενών [58]. Ωστόσο, αυτά τα προγράμματα στηρίζονται σε κοστοβόρες και επεμβατικού τύπου διαγνωστικές μεθόδους που επιβαρύνουν το κρατικό ασφαλιστικό σύστημα και συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η εύρεση νέων, μη επεμβατικών και εξειδικευμένων για τον γαστρικό καρκίνο μοριακών βιοδεικτών, στοχεύοντας στην διάγνωση της νόσου στα πρώιμα στάδια και άρα, στην επιλογή αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων [13, 59].

### **1.2 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (lncRNAs)**

Σημαντικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες χάρη στην πρόοδο των τεχνικών αλληλούχησης έχουν αποδείξει πως παρόλο που η πλειοψηφία

του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται (~76%), μόνο το 1,2% των παραγόμενων RNA παρουσιάζουν κωδικοποιητικό δυναμικό [60]. Εκτός από τα κλασικά λειτουργικά («housekeeping») RNAs, όπως τα μεταφορικά (tRNAs), τα ριβοσωμικά (rRNAs), τα μικρά πυρηνικά (snRNAs) και τα μικρά RNAs του πυρηνίσκου (snoRNAs), υπάρχουν και τα ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα που διακρίνονται ανάλογα με το μέγεθός τους σε μικρά και μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs [61]. Τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs έχουν μήκος μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια και τα βασικότερα αυτών είναι τα μικρά-παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), τα micro-RNAs (miRNAs) και τα αλληλεπιδρώντα με PIWI RNAs (piRNAs). Αντίστοιχα, μετάγραφα με μήκος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων αποτελούν τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNAs-lncRNAs), τα οποία παλαιότερα θεωρούνταν «μεταγραφικός θόρυβος», αλλά σήμερα έχει δειχθεί η συμμετοχή τους σε πληθώρα κυτταρικών και μοριακών διεργασιών όπως η απόπτωση, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και οι επιγενετικές τροποποιήσεις [62, 63].

Τα lncRNAs διαθέτουν αρκετές ομοιότητες με τα κωδικοποιητικά μετάγραφα (mRNAs), καθώς και αυτά μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, φέρουν 5' καλύπτρα και 3' πολύ-αδενυλιωμένη ουρά και υπόκεινται σε μάτισμα. Ωστόσο, τα lncRNAs τείνουν να είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα mRNAs και να έχουν λιγότερα εξώνια (συνήθως δύο). Παράλληλα, τα lncRNAs εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα mRNAs και η πρωτοταγής τους αλληλουχία δεν είναι συντηρημένη μεταξύ των ειδών, με εξαίρεση τους υποκινητές τους που δέχονται υψηλή εξελικτική πίεση [64, 65]. Επιπλέον, η δευτεροταγής δομή των lncRNAs είναι κρίσιμη για την λειτουργία τους, οδηγώντας στον επιμέρους διαχωρισμό τους σε γραμμικά και κυκλικά lncRNAs με διακριτές δράσεις [66]. Πολλά lncRNAs, παρουσιάζουν επίσης, ιστοειδική ή ακόμα και κυτταροειδική έκφραση, τονίζοντας τις εξειδικευμένες φυσιολογικές κυτταρικές δράσεις τους, οι οποίες εάν διαταραχθούν συσχετίζονται με παθολογίες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [67, 68].

### **1.2.1 Ταξινόμηση lncRNAs ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό**

Η μοριακή δράση ενός lncRNA καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον εντοπισμό του μέσα στο κύτταρο [69]. Έρευνες έχουν αποδείξει πως τα lncRNAs μπορούν να βρίσκονται είτε στον πυρήνα, είτε στο κυτταρόπλασμα, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις

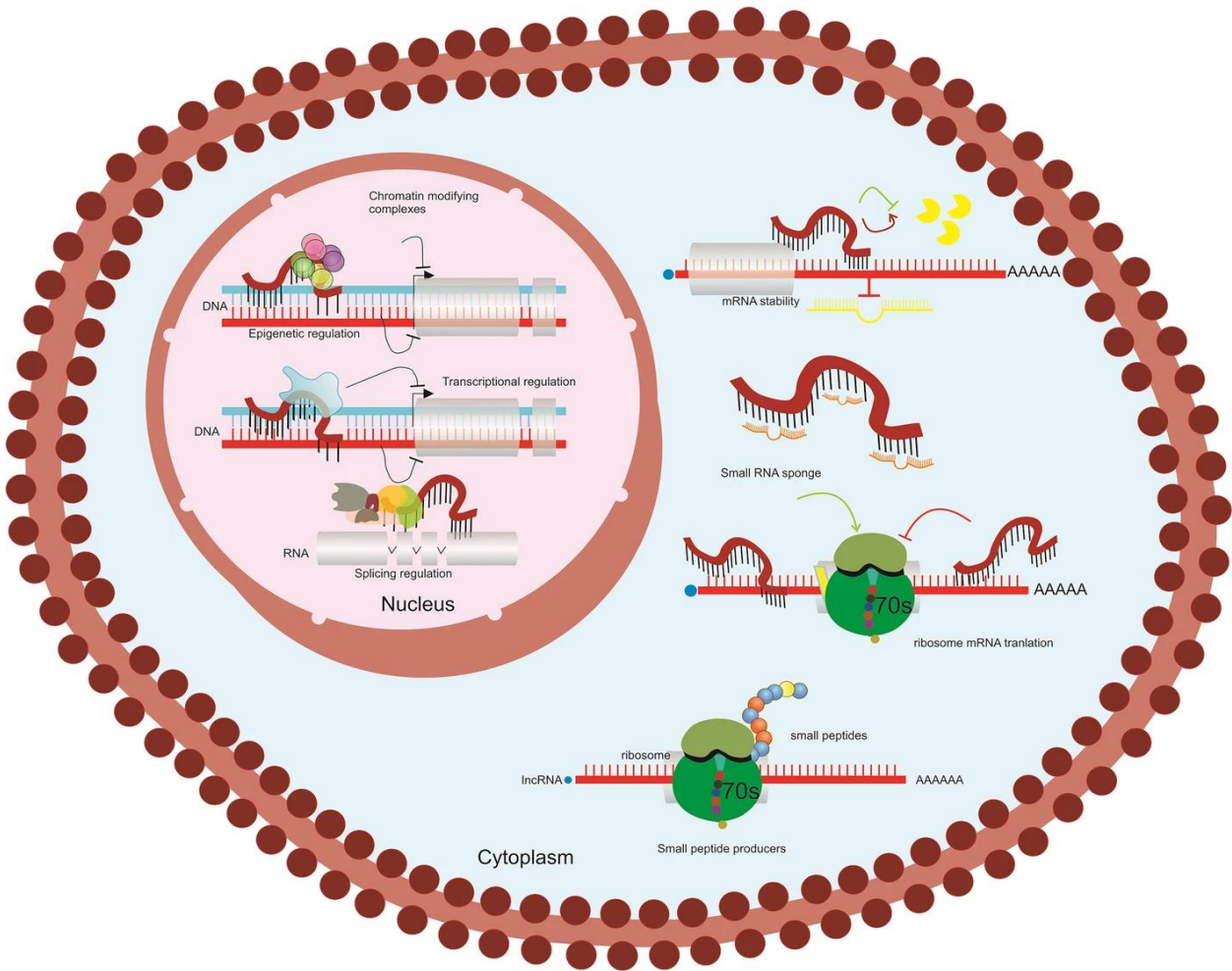
έχουν βρεθεί lncRNAs που εντοπίζονται και στα δύο αυτά υποκυτταρικά διαμερίσματα [70], (**Εικόνα 6**). Για παράδειγμα, το lncRNA PYCARD-AS1 δρα τόσο στον πυρήνα σε επιγενετικό επίπεδο, όσο και στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζοντας την μετάφραση, με σκοπό την σίγηση του προ-αποπτωτικού γονιδίου PYCARD σε καρκινικά κύτταρα μαστού [71].

#### **Πυρηνικά lncRNAs:**

Τα πυρηνικά lncRNAs συνιστούν συνήθως ρυθμιστές της μεταγραφής συμμετέχοντας στην επιγενετική ρύθμιση και στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [72]. Επιπρόσθετα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και άλλοι μηχανισμοί δράσης των lncRNAs με πυρηνικό εντοπισμό, όπως η άμεση εμπλοκή τους στο εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων-στόχων και στην αρχιτεκτονική του πυρήνα [73, 74]. Επί παραδείγματι, το lncRNA NEAT1 αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό των δυναμικών πυρηνικών δομών paraspeckles, οι οποίες σχηματίζονται σε απόκριση στο στρες και επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση λόγω της συγκράτησης μεταγράφων και πρωτεϊνών στον πυρήνα [75].

#### **Κυτταροπλασματικά lncRNAs:**

Αντιθέτως, τα κυτταροπλασματικά lncRNAs διαδραματίζουν καίριους ρόλους σε μετα-μεταγραφικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση της μετάφρασης και ο έλεγχος της σταθερότητας των mRNAs [76]. Επιπλέον, lncRNAs με κυτταροπλασματικό εντοπισμό συχνά δρουν ως σπόγγοι miRNAs, αποτρέποντας την κατασταλτική δράση αυτών στα mRNA-στόχους τους, ενώ τελευταία έχουν βρεθεί και κάποια lncRNAs που κωδικοποιούν μικρά, λειτουργικά πεπτίδια [77, 78]. Τέλος, έχουν ταυτοποιηθεί lncRNAs που συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης επιδρώντας στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, όπως το lincRNA-p21 που αναστέλλει την ουβικιτίνωση του παράγοντα HIF-1α από τον ογκοκαταστολέα VHL, ενισχύοντας την σηματοδότηση που επάγεται από την υποξία στον καρκίνο [79].



Εικόνα 6: Παραδείγματα δράσεων των lncRNAs σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα [80].

### 1.2.2 Ταξινόμηση lncRNAs ανάλογα με τον τρόπο δράσης

Τα lncRNAs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες ομάδες ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους στο κύτταρο: α) τα *cis*-δραστικά lncRNAs που ρυθμίζουν την έκφραση γειτονικών τους γονιδίων επηρεάζοντας την διαμόρφωση της χρωματίνης ή την στρατολόγηση του μεταγραφικού συμπλόκου και β) τα *trans*-δραστικά lncRNAs που εγκαταλείπουν τον γενετικό τόπο από τον οποίο παράγονται, εκτελούν ποικίλους κυτταρικούς ρόλους και ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων [81, 82].

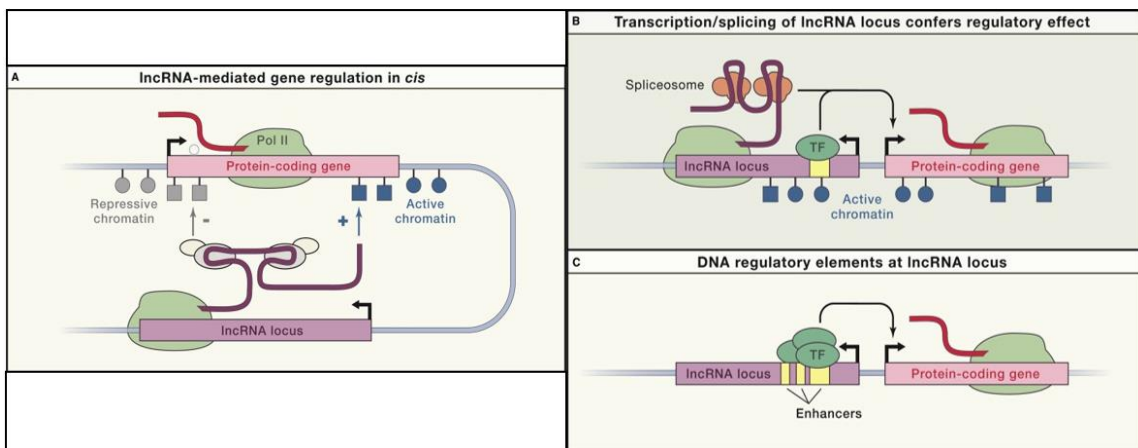
Ξεκινώντας με τα *cis*-δραστικά lncRNAs, έχουν αναφερθεί τουλάχιστον τρεις πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα συγκεκριμένα lncRNAs ρυθμίζουν σε τοπικό επίπεδο την γονιδιακή έκφραση (**Εικόνα 7**):

**A)** Το ίδιο το lncRNA αλληλεπιδρά με ρυθμιστικούς παράγοντες, συνήθως σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση

ή αποσιώπηση των γονιδίων-στόχων. Συγκεκριμένα, το lncRNA μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην δημιουργία ή στην διατήρηση των βρόχων της χρωματίνης, φέρνοντας σε κοντινή απόσταση το γονίδιο-στόχο με έναν ενισχυτή και μεσολαβώντας, έτσι, στην αύξηση της έκφρασης του στόχου. Παράλληλα, lncRNAs οδηγούν σε ενίσχυση ή μείωση της γονιδιακής έκφρασης, λόγω στρατολόγησης συμπλόκων επιγενετικής τροποποίησης των ιστονών, τα οποία καθιστούν την χρωματίνη των ρυθμιστικών στοιχείων των γειτονικών γονιδίων περισσότερο ή λιγότερο προσβάσιμη [82-84], (**Εικόνα 7A**).

**B)** Σε άλλες περιπτώσεις, η ρύθμιση της έκφρασης ενός γειτονικού γονιδίου δεν εξαρτάται από αυτή καθαυτή την αλληλουχία του lncRNA, αλλά από τις διαδικασίες της μεταγραφής ή/και του μάτισματός του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το lncRNA Blustr, του οποίου η μεταγραφή και το μάτισμα συμβάλλουν στην ρύθμιση της έκφρασης του γειτονικού του γονιδίου Sfmbt2, πιθανώς αυξάνοντας τοπικά την συγκέντρωση των συστατικών της μεταγραφικής μονάδας στον υποκινητή του Sfmbt2. [82, 85], (**Εικόνα 7B**).

**Γ)** Το γονίδιο ή ο υποκινητής ενός lncRNA μπορεί να περιέχει *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA (συνήθως ενισχυτές), οι οποίες να ευθύνονται για την επαγωγή της έκφρασης γειτονικών γονιδίων, χωρίς να απαιτείται μεταγραφή του lncRNA [86], (**Εικόνα 7C**).



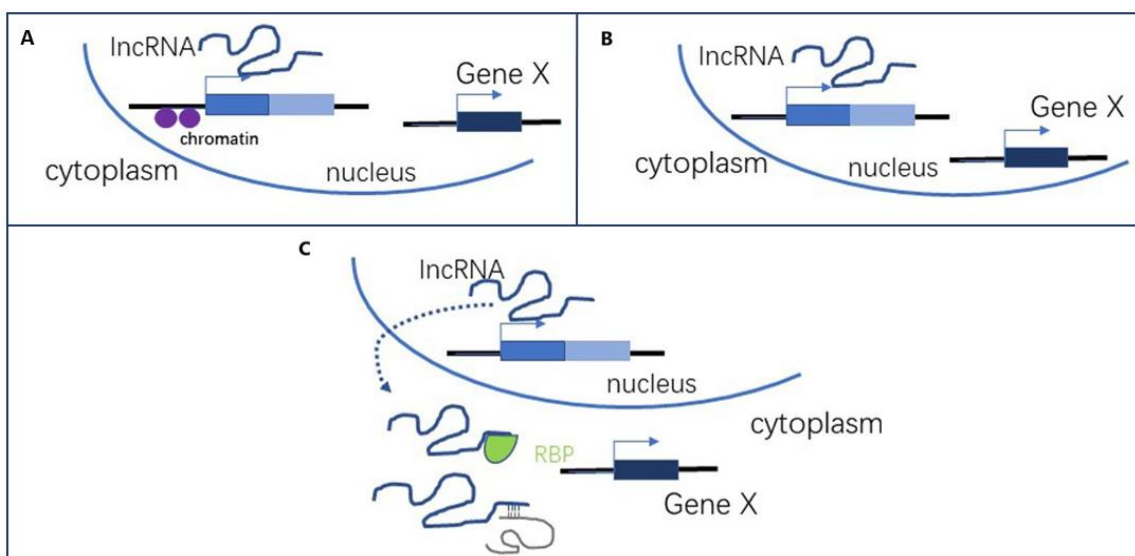
**Εικόνα 7:** Οι τρεις πιθανοί τρόποι δράσης των *cis*-δραστικών lncRNAs. TF: Μεταγραφικός Παράγοντας, Pol II: RNA πολυμεράση II. Τροποποιημένο από: [82]

Σε ότι αφορά τα *trans*-δραστικά lncRNAs, έχουν καταδειχθεί ποικίλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν, με κυριότερους τους παρακάτω (**Εικόνα 8**):

**A)** Το lncRNA ελέγχει την δομή της χρωματίνης και την έκφραση γενετικών τόπων που βρίσκονται απομακρυσμένοι από το σημείο της μεταγραφής του, αλληλεπιδρώντας με επιγενετικούς τροποποιητές, μεταγραφικούς παράγοντες ή ακόμη και με την RNA πολυμεράση [87], (**Εικόνα 8A**).

**B)** Κάποια lncRNAs συμμετέχουν στην αλλαγή της πυρηνικής αρχιτεκτονικής, με σκοπό να επηρεάσουν την μεταγραφή ή το μάτισμα γονιδίων-στόχων, όπως το lncRNA MALAT1, που στρατολογείται στις πυρηνικές δομές speckles, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων με συστατικά του μηχανισμού ματίσματος [82, 88], (**Εικόνα 8B**).

**Γ)** Τα lncRNAs μπορούν να προσδεθούν άμεσα σε πρωτεΐνες (μέσω ριβονουκλεοπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων) ή σε άλλα μόρια RNA (συνήθως miRNAs) και να αναστείλουν την δράση τους ή να επηρεάσουν την διαθεσιμότητά τους στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, για να υποστηριχθεί αυτή η λειτουργία, θα πρέπει το lncRNA να έχει επαρκή επίπεδα έκφρασης ώστε να μπορεί να αλληλεπιδράσει στοιχειομετρικά με την πρωτεΐνη ή το RNA-στόχο. Παραδείγματος χάριν, το lncRNA NORAD, παράγοντας 500-1000 αντίγραφα ανά κύτταρο, δεσμεύει τις πρωτεΐνες PUMILIO, οι οποίες κανονικά καταστέλλουν την μετάφραση των mRNA που στοχεύουν και απουσία του NORAD οδηγούν σε γονιδιωματική αστάθεια, λόγω υπερβολικής σίγησης γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, καθώς και στη μίτωση [82, 89], (**Εικόνα 8C**).



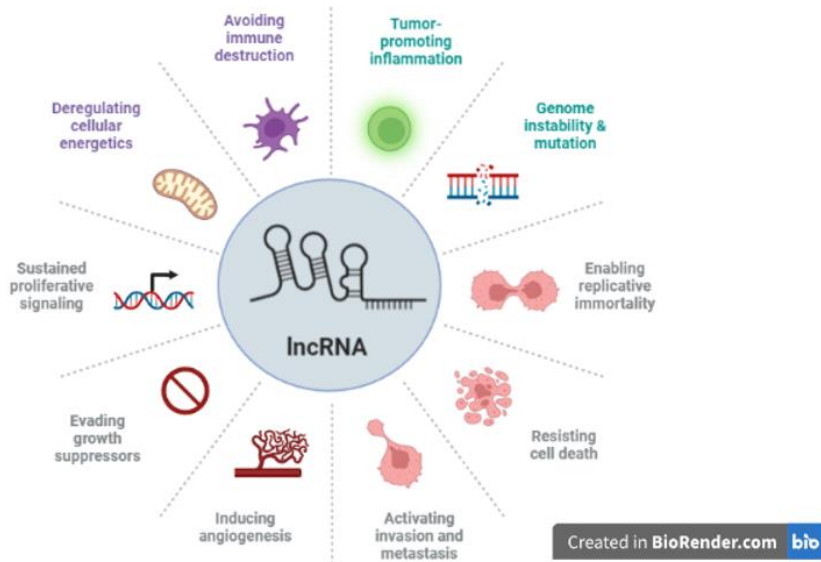
**Εικόνα 8:** Οι τρεις πιθανοί τρόποι δράσης των *trans*-δραστικών lncRNAs. *RBP*: RNA-Binding Protein. Τροποποιημένο από: [90]

### 1.2.3 lncRNAs και καρκίνος

Μελέτες αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος σε καρκινικά δείγματα έχουν επισημάνει πως οι περισσότερες μεταλλάξεις, όπως οι σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs) και οι αλλαγές ως προς τον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων (CNVs), εντοπίζονται σε μη κωδικοποιητικές περιοχές, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και τα lncRNAs [91]. Τις τελευταίες δεκαετίες, ολοένα και περισσότερα lncRNAs αποδεικνύεται πως συσχετίζονται με την καρκινογένεση, διαδραματίζοντας μείζονες ρόλους σε καθένα από τα ορόσημά της, όπως ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αναστολή της απόπτωσης, η αγγειογένεση, η διήθηση και η μετάσταση [92], (**Εικόνα 9**). Τα lncRNAs συνιστούν σημαντικούς ρυθμιστές ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών και μπορούν να έχουν είτε ογκοεπαγωγικό είτε ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα [93].

Συγκεκριμένα, για τον γαστρικό καρκίνο έχουν ανακαλυφθεί οκτώ ολίγα lncRNAs που εμπλέκονται σε απαραίτητες για την εξέλιξη της ασθένειας κυτταρικές διεργασίες και των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στη νόσο. Για παράδειγμα, το lncRNA ANRIL επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προκαλώντας επιγενετική σίγηση των γειτονικών του ογκοκαταστολέων CDKN2A/B, λόγω αλληλεπίδρασης με συστατικά των συμπλόκων PRC1 και PRC2, ενώ συχνά η υπερέκφρασή του σε ασθενείς γαστρικού καρκίνου σχετίζεται με αυξημένη αντίσταση στην χημειοθεραπεία [94, 95]. Επιπλέον, το lncRNA H19 συχνά υπερεκφράζεται στον γαστρικό καρκίνο, προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μαζί με το miR-675 που κωδικοποιείται από το πρώτο εξόνό του και έχει συσχετισθεί με κακή πρόγνωση για τους ασθενείς [96]. Ακόμη, το μετάγραφο H19 δρα επικουρικά στην μετατροπή των γαστρικών καρκινικών κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (EMT) και στην μετάσταση, λόγω ενίσχυσης της σηματοδότησης Wnt, καθώς βοηθά στην μεταφορά της β-κατενίνης στον πυρήνα [97]. Αντίθετα, ένα lncRNA με ογκοκατασταλτική δράση είναι το GAS5, που αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και επάγει την απόπτωση, καθώς μειώνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 και της κυκλίνης D1, ενώ ενισχύει την δράση του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 [98]. Γι' αυτό, η έκφραση του GAS5 είναι συνήθως μειωμένη σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο και έχει συσχετισθεί με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κακή πρόγνωση [99]. Επιπρόσθετα, το

lncRNA MEG3 αποτελεί ογκοκαταστολέα και ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση γαστρικών καρκινικών κυττάρων, δεσμεύοντας miRNAs όπως το miR-21 και συμμετέχοντας στην σηματοδότηση του p53, δικαιολογώντας έτσι, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασής του που παρατηρούνται [100].



Εικόνα 9: Τα lncRNAs συμμετέχουν σε όλα τα ορόσημα της καρκινογένεσης.

#### 1.2.4 Τα lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες

Όπως έχει ήδη καταστεί φανερό, η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου στα πρώιμα στάδιά του αποτελεί επείγουσα ανάγκη, ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των θεραπειών και να μειωθεί το ποσοστό θνησιμότητας της νόσου [101]. Καθώς τα lncRNAs διαθέτουν έναν διόλου ευκαταφρόνητο ρόλο στην έναρξη και στην εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού, η έρευνα για την χρήση τους ως προγνωστικούς και διαγνωστικούς δείκτες προοδεύει συνεχώς [102]. Ορισμένα χαρακτηριστικά που μετατρέπουν τα lncRNAs σε ιδανικούς βιοδείκτες είναι τα εξής: i) η περισσότερο ιστοειδική και άρα, καρκινοειδική έκφραση που παρουσιάζουν σε σχέση με τα κωδικοποιητικά γονίδια (mRNAs) ii) η υψηλή συσχέτισή τους με συγκεκριμένα και κρίσιμα στάδια της καρκινογένεσης και iii) η παρουσία τους σε σωματικά υγρά όπως το πλάσμα του αίματος, τα ούρα και το γαστρικό υγρό, όπου κυκλοφορούν εντός εξωσωμάτων ή αποπτωτικών κυστιδίων που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα [103, 104]. Ειδικότερα, τα πλεονεκτήματα που διαθέτουν τα κυκλοφορούντα σε βιολογικά υγρά lncRNAs ως πιθανοί βιοδείκτες είναι η μη επεμβατική ανίχνευσή τους



με μεθόδους όπως η ποσοτική PCR (qPCR) ή η αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS), καθώς επίσης και η υψηλής ευαισθησίας διάκριση των ασθενών από τα υγιή άτομα και η εξειδίκευση για τον καρκινικό τύπο [105, 106]. Ωστόσο, για να μπορούν τα lncRNAs να εφαρμοστούν επίσημα στην κλινική πράξη ως προγνωστικοί ή διαγνωστικοί δείκτες, απαιτείται τυποποίηση της προετοιμασίας του δείγματος και της διαδικασίας απομόνωσης των lncRNAs, όπως επίσης και εύρεση των κατάλληλων lncRNA-μαρτύρων στα υπό εξέταση δείγματα, ώστε να λαμβάνονται τα, κατά το δυνατό, πιο ακριβή αποτελέσματα [104].

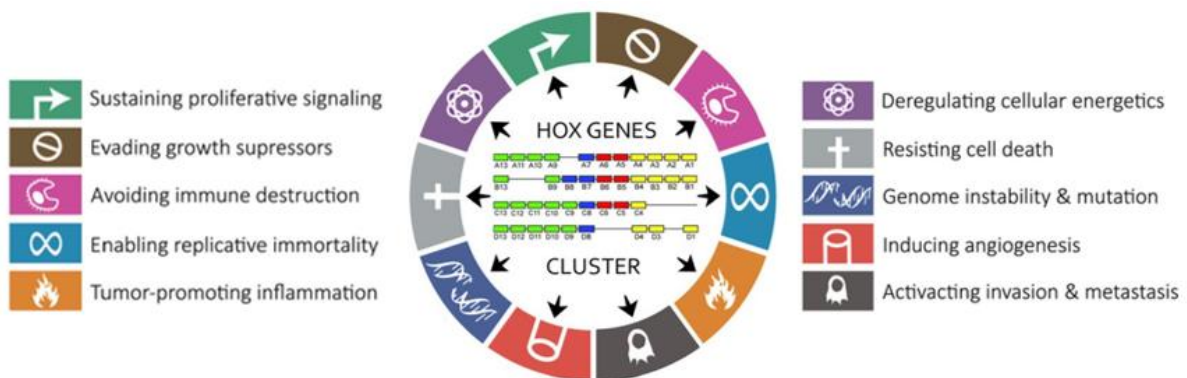
### 1.3 Γονίδια HOX και καρκίνος του στομάχου

Η οικογένεια των HOX (Homeobox) γονιδίων περιλαμβάνει μεταγραφικούς παράγοντες με κείμερο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη, η έκφραση των οποίων συχνά μεταβάλλεται σε ποικίλες ανθρώπινες αναπτυξιακές ασθένειες, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγεται και ο καρκίνος [107]. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 39 HOX γονίδια, τα οποία κατανέμονται σε τέσσερα διαφορετικά χρωμοσώματα, όπου σχηματίζουν τις γονιδιακές συστοιχίες HOXA, HOXB, HOXC και HOXD [108]. Συνήθως στο δεύτερο εξόνιο των γονιδίων αυτών, εντοπίζεται η υψηλά συντηρημένη επικράτεια homeobox που κωδικοποιεί για ένα μοτίβο «έλικα-στροφή-έλικα» (helix-turn-helix) 60 αμινοξέων, το οποίο εξυπηρετεί την πρόσδεση του παραγόμενου μεταγραφικού παράγοντα στο DNA [109].

Έχει αποδειχθεί πως τα HOX γονίδια συσχετίζονται με διάφορες κρίσιμες διαδικασίες της καρκινογένεσης όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, ο μεταβολισμός, η αγγειογένεση, η διήθηση και η μετάσταση, στις οποίες άλλοτε δρουν ογκοεπαγωγικά και άλλοτε ογκοκατασταλτικά [107, 110], (**Εικόνα 10**). Έτσι, συχνά η έκφραση των HOX γονιδίων εμφανίζει παραλλαγές σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού [111]. Για παράδειγμα, το γονίδιο HOXA1 συχνά υπερεκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου και προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διήθηση και τη μετάσταση, ενώ συμβάλλει και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, πιθανώς ενισχύοντας την έκφραση της κυκλίνης D1 [112]. Ένα ακόμη HOX γονίδιο που αυξορρυθμίζεται σε γαστρικούς όγκους είναι το HOXB8, το οποίο φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην μετάπτωση των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT) και στην μετάσταση, λόγω αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό

παράγοντα ZEB2 [113]. Επιπρόσθετα, το HOXC10 γονίδιο παρουσιάζει ιδιαίτερη αύξηση στην έκφρασή του σε φτωχά διαφοροποιημένους γαστρικούς όγκους και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της κυτταρικής μετανάστευσης, καθώς προσδένεται στον υποκινητή p65, ενισχύει την έκφραση του NF-κB και οδηγεί στην υπερέκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως οι IL-6, TNF-α και TGF-β, γεγονός που υποδεικνύει πως το HOXC10 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν νέο θεραπευτικό στόχο [114]. Τέλος, αυξημένη έκφραση του HOXD9 γονιδίου σε καρκίνο του στομάχου επάγει την ανάπτυξη του όγκου και την μετάσταση, λόγω άμεσης πρόσδεσής του στον υποκινητή της πρωτεΐνης RUFY3 και επακόλουθης μεταγραφικής ενεργοποίησής της [115].

Παράλληλα, έχει γίνει γνωστό πως στις μεσογονιδιακές περιοχές των HOX συστοιχιών εντοπίζονται αλληλουχίες μη κωδικοποιητικών RNA (miRNAs και lncRNAs), που είναι υψηλά συντηρημένες και κατέχουν βασικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης των HOX γονιδίων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος [116]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ογκοεπαγωγικό lncRNA HOTAIR (HOX Transcript Antisense RNA), το οποίο συμμετέχει σε διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διήθηση και η μετάσταση και έχει προγνωστική αξία στον γαστρικό καρκίνο [117]. Συγκεκριμένα, το HOTAIR αποτελεί ένα *trans*-δραστικό lncRNA, καθώς παρόλο που εντοπίζεται εντός της HOXC συστοιχίας, ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων HOXD [118]. Ο μηχανισμός δράσης του έγκειται στην καταστολή της έκφρασης ογκοκαταστολέων της HOXD συστοιχίας, είτε μέσω στρατολόγησης των συμπλόκων PRC2 και LSD1/CoREST/REST που αλλάζουν την δομή της χρωματίνης λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων, είτε μέσω δέσμευσης διαφόρων miRNAs, για τα οποία το HOTAIR δρα ως σπόγγος [119].



Εικόνα 10: Τα HOX γονίδια συμμετέχουν στα ορόσημα της καρκινογένεσης. Τροποποιημένο από: [107]

## 2. Σκοπός

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί καιρία απειλή για την υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, γεγονός που είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές και κατ' επέκταση χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των ασθενών. Συνεπώς, η ανακάλυψη νέων, μη επεμβατικών και εξειδικευμένων για τα αρχικά στάδια της νόσου, διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών, καθίσταται απολύτως αναγκαία. Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον ως βιοδείκτες παρουσιάζουν τα lncRNAs, μία σχετικώς ανεξερεύνητη ομάδα μορίων που χαρακτηρίζονται από εξειδικευμένη έκφραση σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ή ιστούς και από σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους ανάμεσα σε φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα.

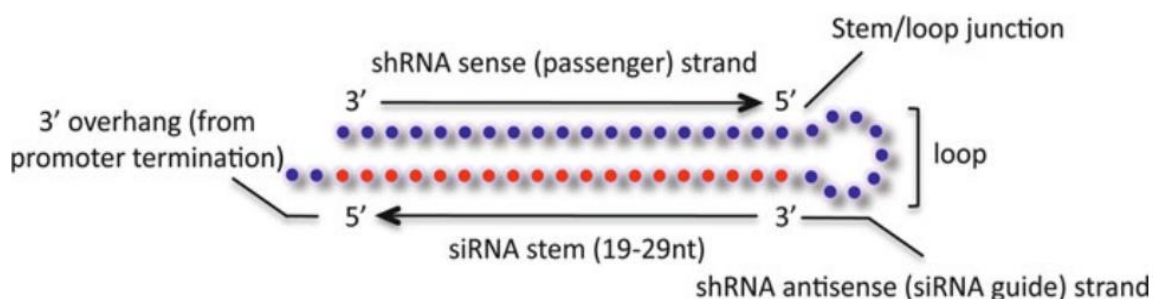
Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός ενός, μέχρι στιγμής, μη μελετημένου lncRNA που ονομάστηκε REAKTn (lincRNA rEgulAted by Kruppel gasTric n) καθώς και του υποψήφιου γονιδίου στόχου του REAKTn TG1 (REAKTn Target Gene 1) που ανήκει στην γονιδιακή οικογένεια HOX. Για την μελέτη των προαναφερθέντων γονιδίων πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA (RNA-seq) από βιοψίες ασθενών γαστρικού καρκίνου και από παρακαρκινικά δείγματα. Επιπροσθέτως, έγινε χαρακτηρισμός των επιπέδων έκφρασης του lncRNA και του πιθανού mRNA στόχου σε ποικίλες κυτταρικές σειρές. Εμβαθύνοντας την μελέτη του ίδιου του lncRNA αρχικά ελέγχθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η σταθερότητα των μεταγράφων του σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου. Ακόμη, έγινε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των δύο γονιδίων (lncRNA/mRNA στόχος) σε δείγματα στα οποία είχαν προηγουμένως σιγηθεί ογκογόνοι μεταγραφικοί παράγοντες, με σκοπό την ανάκτηση πληροφοριών για την ρύθμιση της δράσης του lncRNA. Τέλος, πραγματοποιήθηκε πείραμα παροδικής σίγησης του REAKTn μέσω δύο διαφορετικών shRNA, με την βοήθεια λεντιών που διαμολύνουν τα καρκινικά κύτταρα, έτσι ώστε να μελετηθεί η σχέση αυτού του lncRNA με το υποψήφιο mRNA στόχο του.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Υλικά

##### 3.1.1 Αλληλουχίες

Για τον χαρακτηρισμό της έκφρασης του lncRNA (REAKTn) και του υποψήφιου γονιδίου στόχου του (TG1), έγινε προσπάθεια αποσιώπησης του REAKTn με την χρήση της τεχνολογίας RNAi (παρεμβολή RNA). Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε μία αλληλουχία για τη δημιουργία ενός short hairpin RNA (shRNA) που να στοχεύει εξειδικευμένα το lncRNA REAKTn. Η συγκεκριμένη αλληλουχία σχεδιάστηκε μέσω του εργαλείου siDESIGN Center της εταιρείας Horizon και περιλαμβάνει μία αλληλουχία 19 νουκλεοτιδίων όμοια με το μετάγραφο στόχο (sense), μία αλληλουχία 19 νουκλεοτιδίων συμπληρωματική ως προς το μετάγραφο στόχο (antisense) και μία αλληλουχία λούπας που συνδέει τις προηγούμενες (**Εικόνα 11**). Επιπλέον, στον σχεδιασμό περιλαμβάνεται και η προσθήκη των κατάλληλων νουκλεοτιδίων στα άκρα, με σκοπό την επιτυχημένη κλωνοποίηση της shRNA αλληλουχίας σε πλασμιδιακό φορέα.



**Εικόνα 11:** Σχηματική αναπαράσταση ενός short hairpin RNA (shRNA) [120].

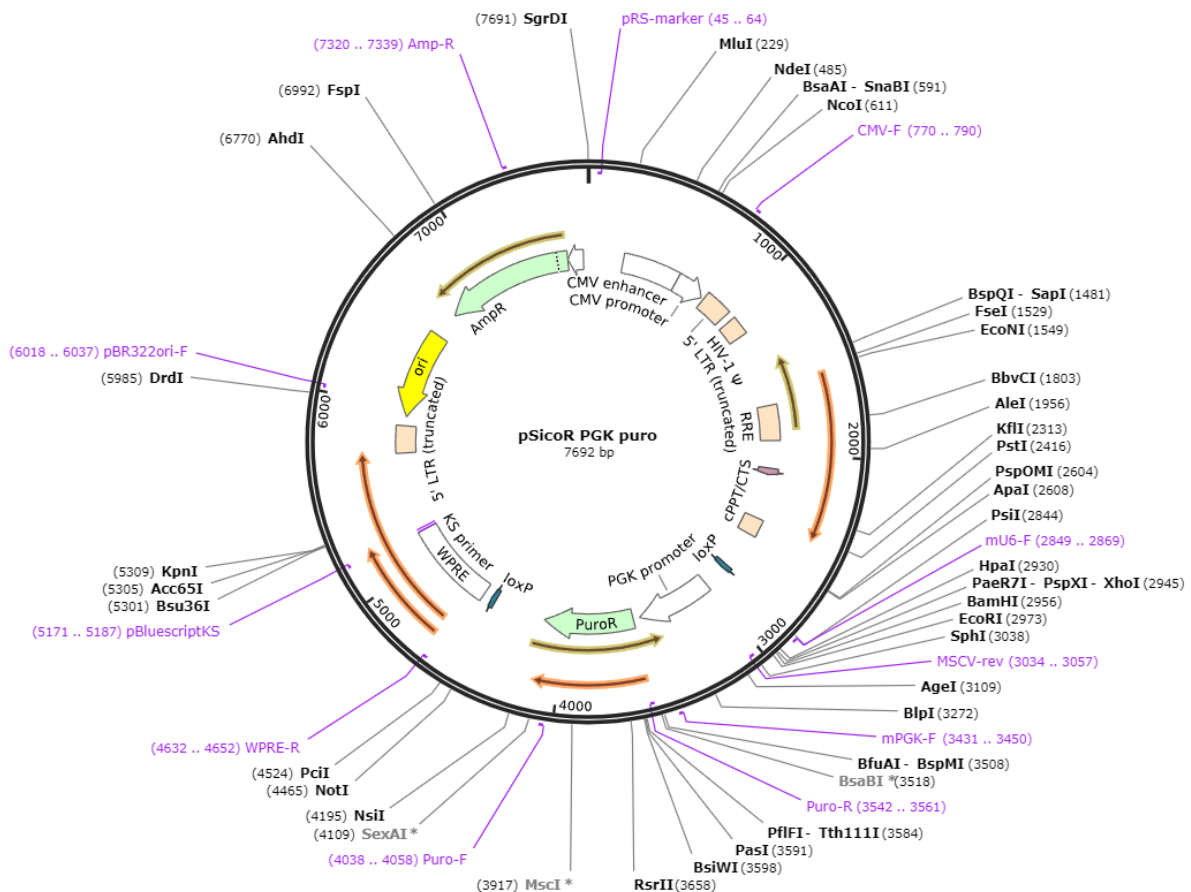
##### 3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

###### pSicoR PGK puro:

Για την κλωνοποίηση της shRNA αλληλουχίας που στοχεύει το lncRNA REAKTn, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pSicoR PGK puro (Addgene plasmid # 12084, **Εικόνα 12**), μήκους 7692 νουκλεοτιδίων. Ο συγκεκριμένος φορέας χρησιμοποιείται για την έκφραση shRNAs με σκοπό την παροδική σίγηση γονιδίων σε κύτταρα θηλαστικών, στα οποία εισάγεται ύστερα από διαμόλυνση με λεντιούς. Η αλληλουχία του φορέα περιλαμβάνει και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, που βοηθά στην

επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που έχουν λάβει το πλασμίδιο. Επίσης, το 5' σημείο κλωνοποίησης του φορέα έχει κοπεί με το περιοριστικό ένζυμο HpaI που αφήνει τυφλά άκρα, ενώ το 3' σημείο κλωνοποίησης έχει κοπεί με το περιοριστικό ένζυμο XhoI που δημιουργεί κολλώδη άκρα.

Created with SnapGene®



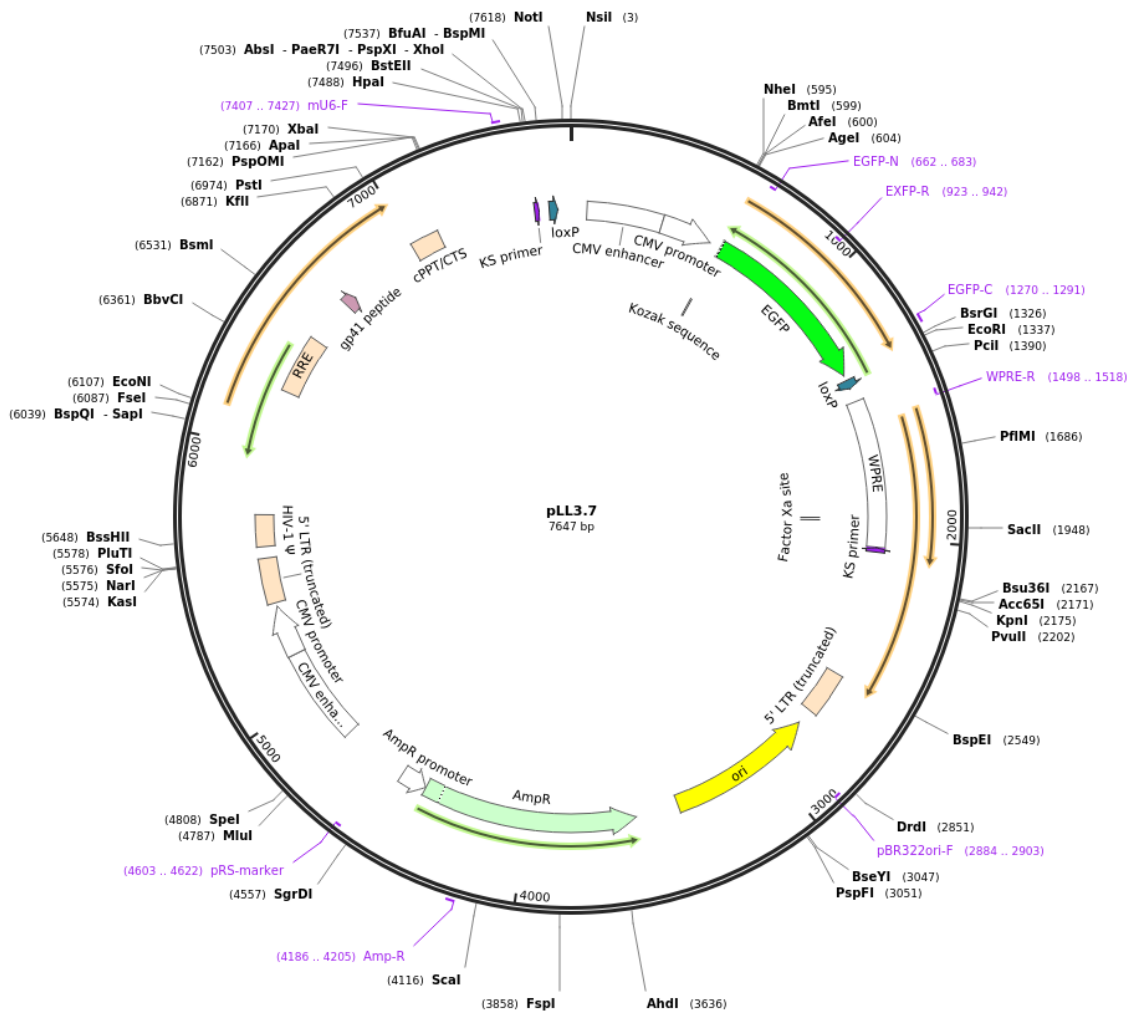
Εικόνα 12: Ο χάρτης του πλασμδιακού φορέα pSicoR PGK puro (Addgene plasmid # 12084).

### pLL3.7:

Παράλληλα, μία διαφορετική shRNA αλληλουχία που στοχεύει το γονίδιο REAKTn είχε προηγουμένως κλωνοποιηθεί και στον πλασμδιακό φορέα pLL3.7 (Addgene plasmid # 11795, **Εικόνα 13**), μήκους 7647 νουκλεοτιδίων. Και αυτός ο φορέας χρησιμοποιείται για την, διαμεσολαβούμενη από shRNAs, παροδική καταστολή της γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών μέσω συστήματος λεντιών. Στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του πλασμιδίου περιλαμβάνεται ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για την επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων, καθώς επίσης και ένα γονίδιο πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) που εξυπηρετεί την οπτικοποίηση και

ποσοτικοποίηση του ποσοστού των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί επιτυχώς από τους λεντιούς. Τα σημεία της κλωνοποίησης είναι ίδια με αυτά του pSicoR φορέα, δηλαδή το 5' σημείο κλωνοποίησης έχει κοπέι με το περιοριστικό ένζυμο HpaI, ενώ το 3' σημείο κλωνοποίησης έχει κοπέι με το περιοριστικό ένζυμο XhoI.

Created with SnapGene®



Εικόνα 13: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLL3.7 (Addgene plasmid # 11795).

### 3.1.3 Κυτταρικές σειρές

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1**):

**Πίνακας 1:** Τα κύρια χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν. Πηγές: *Cellosaurus - a knowledge resource on cell lines* (<https://www.cellosaurus.org/index.html>), ATCC product catalogue (<https://www.atcc.org/>).

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή
-----------------	-----------

<b>HFE-145</b>	Αθανατοποιημένα κύτταρα ανθρώπινου φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου [121]
<b>AGS</b> (RRID: CVCL_0139)	Κύτταρα με επιθηλιακή μορφολογία που απομονώθηκαν από ασθενή με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα
<b>NUGC4</b> (RRID: CVCL_3082)	Γαστρικά καρκινικά κύτταρα με μορφολογία σφραγιστήρος δακτυλίου που απομονώθηκαν από μετάσταση σε παραγαστρικούς λεμφαδένες
<b>KATOIII</b> (RRID: CVCL_0371)	Σφαιρικής μορφολογίας κύτταρα που απομονώθηκαν από υπεζωκοτική συλλογή ασθενούς με μεταστατικού τύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα
<b>MKN45</b> (RRID: CVCL_0434)	Κύτταρα στομάχου που απομονώθηκαν από ηπατική μετάσταση ασθενούς με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα
<b>Ls174</b> (RRID: CVCL_YJ85)	Κύτταρα με επιθηλιακή μορφολογία που απομονώθηκαν από ασθενή με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου
<b>HepG2</b> (RRID: CVCL_0027)	Επιθηλιακής μορφολογίας κύτταρα που προέρχονται από ασθενή με καρκίνο του ήπατος
<b>MCF7</b> (RRID: CVCL_0031)	Κύτταρα που απομονώθηκαν από υπεζωκοτική συλλογή ασθενούς με μεταστατικού τύπου καρκίνο του μαστού
<b>SK-BR-3</b> (RRID: CVCL_0033)	Κύτταρα που απομονώθηκαν από υπεζωκοτική συλλογή ασθενούς με μεταστατικού τύπου καρκίνο του μαστού
<b>HeLa</b> (RRID: CVCL_0030)	Επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενή με HPV-σχετιζόμενο αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας
<b>NCIH520</b> (RRID: CVCL_1566)	Κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα
<b>HEK-293</b> (RRID: CVCL_0045)	Φυσιολογικά εμβρυικά κύτταρα νεφρού με επιθηλιακή μορφολογία

### 3.1.4 Βακτηριακά στελέχη

Η επιλογή και ο πολλαπλασιασμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων, δηλαδή των πλασμιδίων που έχουν λάβει το ένθεμα (shRNA αλληλουχία), πραγματοποιήθηκαν στο βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1 Blue. Το

βακτηριακό αυτό στέλεχος διαθέτει μεταξύ άλλων μετάλλαξη στο γονίδιο *endA*, που κωδικοποιεί για μία ενδονουκλεάση και μετάλλαξη στο γονίδιο *recA* που κωδικοποιεί για μία ρεκομπινάση. Η μετάλλαξη *endA* εξυπηρετεί στην βελτίωση της ποιότητας του πλασμιδιακού DNA που θα απομονωθεί από τα βακτήρια, ενώ η μετάλλαξη *recA* αυξάνει τη σταθερότητα του ενθέματος. Τα βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε διάλυμα που περιέχει γλυκερόλη.

## **3.2 Μέθοδοι**

### **3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση**

Για τον γενικότερο χαρακτηρισμό του προφίλ έκφρασης του lncRNA REAKTn και του υποψήφιου γονιδίου στόχου του, TG1, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA (RNA-seq) από ποικίλα δείγματα. Αρχικά, αναλύθηκαν δεδομένα προερχόμενα από 1019 διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές που αντιστοιχούν σε 26 όργανα του ανθρώπινου οργανισμού. Ύστερα, αναλύθηκαν δεδομένα από βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο και από φυσιολογικό παρακαρκινικό ιστό. Τα δεδομένα αντλήθηκαν από την κοινοπραξία «Άτλας του Καρκινικού Γονιδιώματος» (TCGA) και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού Microsoft Excel. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο GEPIA για την ανάλυση δεδομένων έκφρασης των γονιδίων REAKTn και REAKTn TG1 σε φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα, καθώς και για την ανάλυση της επιβίωσης ασθενών με γαστρικό καρκίνο. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε Student's t-test με κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας την τιμή  $p\text{-value} \leq 0,05$ .

### **3.2.2 Υποκυτταρική κλασμάτωση**

Για τον προσδιορισμό της κατανομής των μεταγράφων του lncRNA REAKTn εντός του κυττάρου, πραγματοποιήθηκε υποκυτταρική κλασμάτωση δειγμάτων από τις κυτταρικές σειρές MKN45 και KATOIII. Σκοπός του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου ήταν η λήψη τριών υποκυτταρικών κλασμάτων, όπου το S2 αντιστοιχεί στο κυτταρόπλασμα, το S3 στο πυρηνόπλασμα και το P3 στην χρωματίνη.

Αρχικά, από πιάτα καλλιέργειας κυττάρων διαμέτρου 10 cm (10 cm plates) αφαιρείται το θρεπτικό ανάπτυξης και προστίθενται 5 mL PBS ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) για πλύση. Ο ορός PBS



αφαιρείται και το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται με ειδικές κινήσεις ώστε τα κύτταρα να αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξής τους. Τα 5 mL κάθε πιάτου που περιέχουν PBS και τα αποκολλημένα κύτταρα μεταφέρονται σε Falcon 15 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4 °C και στα 1500 rpm. Έπειτα, γίνεται αφαίρεση του υπερκειμένου και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 mL Buffer A (Hepes 25 mM/pH = 7,9, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 10 mM, 0,1% NP40). Το περιεχόμενο του Falcon μεταφέρεται στον ομογενοποιητή, ώστε να γίνει ήπια λύση των κυττάρων χωρίς την διατάραξη της πυρηνικής μεμβράνης. Ύστερα, το 1 mL που περιέχει τα ομογενοποιημένα κύτταρα και Buffer A χωρίζεται σε δύο (για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις) δοκιμαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL με 500 μL το καθένα, τα οποία ονομάζονται P3, διότι σε αυτά θα καταλήξει το χρωματινικό κλάσμα P3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληναρίων για 5 λεπτά, στους 4 °C και στα 3000 rpm, μετά από την οποία το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα δοκιμαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL, τα οποία ονομάζονται S2 καθώς περιέχουν πλέον το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Στη συνέχεια, τα σωληνάρια P3 περιέχουν το ίζημα, το οποίο επαναδιαλύεται σε 500 μL Buffer NLB800 και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά υπό ανάδευση στους 4 °C. Αμέσως μετά, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές, το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL, τα οποία ονομάζονται S3 καθώς πλέον περιέχουν το κλάσμα του πυρηνοπλάσματος, ενώ το ίζημα αποτελεί το κλάσμα P3. Σε όλα τα σωληνάρια προστίθενται 900 μL αντιδραστηρίου TRI (Trizol, MRC) και αποθηκεύονται στους -20 °C. Τελικά, από αυτά τα δείγματα απομονώνεται RNA και συντίθεται cDNA, ώστε να ελεγχθούν μέσω ποσοτικής PCR (qPCR) τα επίπεδα έκφρασης του REAKTn σε κάθε υποκυτταρικό κλάσμα.

### **3.2.3 Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων**

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας κλωνοποίησης του shRNA είναι η δημιουργία ενός δίκλωνου μορίου DNA, το οποίο προκύπτει από την ανάμειξη του νοηματικού ολιγονουκλεοτιδίου (sense oligo (100 μM)), του αντινοηματικού ολιγονουκλεοτιδίου (antisense oligo (100 μM)) και του διαλύματος υβριδοποίησης (Annealing Buffer: KOAc 100 mM, Hepes-KOH 30 mM/pH 7,4, MgAc 2 mM) στις ποσότητες που αναγράφονται στον **Πίνακα 2** και επώαση στους 95 °C για 5 λεπτά.

**Πίνακας 2:** Η σύσταση της αντίδρασης υβριδοποίησης των ολιγονουκλεοτιδίων.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
Sense oligo (100 μM)	2
Antisense oligo (100 μM)	2
Annealing Buffer	96
<b>V<sub>τελικό</sub></b>	<b>100</b>

### 3.2.4 Αντίδραση λιγάσης

Το επόμενο βήμα είναι η αντίδραση λιγάσης που στοχεύει στην ενσωμάτωση του ενθέματος (υβριδοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια shRNA) στον πλασμιδιακό φορέα (pSicoR). Ως αρνητικός μάρτυρας (self-ligation control) της αντίδρασης χρησιμοποιείται δείγμα στο οποίο αντί για το ένθεμα, προστίθεται ίση ποσότητα ddH<sub>2</sub>O (Water For Injection-WFI). Η αντίδραση διαρκεί 16 ώρες και τα δείγματα βρίσκονται στους 16 °C. Οι αναλυτικές ποσότητες των συστατικών της αντίδρασης φαίνονται στον **Πίνακα 3**.

**Πίνακας 3:** Η σύσταση της αντίδρασης λιγάσης shRNA - pSicoR.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
Ένθεμα (pSicoRunmod_sh1REAKTn_annealed oligos)	4
Πλασμιδιακός φορέας (pSicoR_HpaI, XhoI 50 ng/μl)	1
TA DNA ligase buffer (10x), New England Biolabs (NEB)	1
TA DNA ligase (400 U/μL), EnzyQuest	0,5
ddH <sub>2</sub> O	3,5
<b>V<sub>τελικό</sub></b>	<b>10</b>

### 3.2.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ

Έπειτα από την αντίδραση λιγάσης, πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* του στελέχους XL1 Blue μέσω της διαδικασίας του θερμικού σοκ (heat shock), ώστε η κατασκευή DNA (DNA construct) του πλασμιδιακού φορέα pSicoR που φέρει το ένθεμα να εισαχθεί στα βακτηριακά κύτταρα και να παραχθεί σε πολλά αντίγραφα. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται τόσο για το δείγμα με ένθεμα, όσο και για τον αρνητικό μάρτυρα (self-ligation). Αρχικά, γίνεται ανάμειξη των κυττάρων XL1 Blue με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης στις ποσότητες που αναγράφονται στον **Πίνακα 4** και τα δείγματα παραμένουν στον πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42 °C για ακριβώς 50 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά μεταφέρονται ξανά στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολούθως, σε κάθε δείγμα προστίθενται 945 μL θρεπτικού υγρής καλλιέργειας LB Free (χωρίς αμπικιλίνη), και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 50 λεπτά υπό ανάδευση στα 160 rpm. Ύστερα, 350 μL υγρής καλλιέργειας επιστρώνονται σε τρυβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό LB agar με αμπικιλίνη (100 μg/ml) και επωάζονται στους 37 °C για περίπου 18-20 ώρες (overnight).

Μετά το πέρας των 18-20 ωρών, επιλέγονται μεμονωμένες αποικίες από τα τρυβλία για την δημιουργία υγρών καλλιεργειών (1 αποικία σε 2 mL θρεπτικό LB με αμπικιλίνη 100 μg/ml). Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται στους 37 °C για περίπου 18-20 ώρες (overnight) υπό ανάδευση στα 210 rpm.

**Πίνακας 4:** Η σύσταση της αντίδρασης μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
Βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i> XL1 Blue	50
Προϊόν αντίδρασης λιγάσης (pSicoRunmod_sh1REAKTn)	5
<b>V<sub>τελικό</sub></b>	<b>55</b>

### 3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Έπειτα, από τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες κάθε κλώνου κυττάρων (1 αποικία = 1 κλώνος) απομονώνεται πλασμιδιακό DNA, ώστε να ελεγχθεί η επιτυχής ενσωμάτωση του ενθέματος στο πλασμίδιο. Αρχικά, η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται με πρωτόκολλο κοινών αντιδραστηρίων (homemade). Συγκεκριμένα, η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές, μετά από την οποία το υπερκείμενο απορρίπτεται. Έπειτα, στο ίζημα που έχει απομείνει στο σωληνάριο προστίθενται 100 µL Διαλύματος I (4 °C) (**Πίνακας 5**) μαζί με RNάση A (100 µg/mL) και το δείγμα αναδεύεται με τη βοήθεια vortex. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 µL Διαλύματος II (25 °C) (**Πίνακας 5**), το δείγμα αναδεύεται ήπια 5 φορές και επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων. Με το πέρας των 5 λεπτών, προστίθενται 150 µL Διαλύματος III (4 °C) (**Πίνακας 5**), ακολουθεί και πάλι ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές, ύστερα από την οποία το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 mL. Στο νέο σωληνάριο προστίθενται 1000 µL αιθανόλης 100% και ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους -80 °C για τουλάχιστον 20 λεπτά. Αμέσως μετά, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές και απόρριψη του υπερκειμένου. Ύστερα, προστίθενται 600 µL αιθανόλης 70% και γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές, μετά από την οποία το ίζημα στεγνώνεται απολύτως και επαναδιαλύεται σε ddH<sub>2</sub>O.

Αφού διαπιστωθεί η ύπαρξη θετικού, ως προς την ενσωμάτωση του ενθέματος, κλώνου, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια αυτού και απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin Plasmid mini for plasmid DNA της εταιρίας Macherey-Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

**Πίνακας 5:** Η σύσταση των Διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση.

**Διάλυμα**

**Σύσταση Διαλύματος**

<b>Διάλυμα I</b> (4 °C ) [3 M ΚΟΑc, pH 6,0]	50mM Tris, 10mM EDTA, ddH <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο
<b>Διάλυμα II</b> (RT)	1% SDS, 0,2M NaOH, ddH <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο
<b>Διάλυμα III</b> (4 °C ) [3 M ΚΟΑc, pH 6,0]	Για 100 mL: 60ml 5M οξικό κάλιο, 11,5 mL άνυδρο οξικό οξύ, 28,5ml ddH <sub>2</sub> O

### 3.2.7 Διαγνωστική PCR και Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ένθεσης της αλληλουχίας του shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR, πραγματοποιείται διαγνωστική PCR στην οποία χρησιμοποιούνται εκκινητές (primers) που υβριδίζουν σε περιοχή του πλασμιδίου εκτός του ενθέματος. Η σύσταση της αντίδρασης PCR φαίνεται στον **Πίνακα 6**, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης αναγράφονται στον **Πίνακα 7**.

**Πίνακας 6:** Η σύσταση της αντίδρασης διαγνωστικής PCR.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
Πλασμιδιακό DNA (template)	1
dNTPs (10 mM)	0,5
Forward primer (10 μM)	1
Reverse primer (10 μM)	1
Taq buffer A (10X), Kapa Biosystems	5
Taq DNA polymerase (5 U/μL), Kapa Biosystems	0,15
ddH <sub>2</sub> O	41,35
<b>V<sub>τελικό</sub></b>	<b>50</b>

**Πίνακας 7:** Συνθήκες αντίδρασης διαγνωστικής PCR.

Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασία	Χρόνος
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95 °C	2 min
<b>Αποδιάταξη</b>	95 °C	20 sec

<b>Υβριδοποίηση εκκινητών</b>	60 °C	10 sec
<b>Επιμήκυνση</b>	72 °C	15 sec
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C	2 min
<b>Κύκλοι</b>	<b>25</b>	

Μετά την διαγνωστική PCR στα δείγματα προστίθενται 10 µL 6x Loading Dye. Στη συνέχεια, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 2%, με σκοπό τον καλύτερο δυνατό διαχωρισμό των ζωνών του DNA, καθώς το θετικό για ένθεμα προϊόν είναι μόλις 60 βάσεις μεγαλύτερο από το αρνητικό. Για την διαγνωστική PCR και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας το self-ligation control καθώς και δείγμα άδειου φορέα pSicoR (empty vector). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου που περιείχαν κλωνοποιημένα, σε φορέα pSicoR, shRNA που στοχεύουν διαφορετικά γονίδια.

### **3.2.8 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών και κυτταρομετρία ροής**

Η DNA κατασκευή (DNA construct) που δημιουργήθηκε με την κλωνοποίηση της shRNA αλληλουχίας που στοχεύει το lncRNA REAKTn στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR, χρησιμοποιείται για την διαμόλυνση κυττάρων των γαστρικών καρκινικών σειρών MKN45 και KATOIII με τη βοήθεια του συστήματος λεντιών. Η κυτταρική σειρά HEK-293 χρησιμοποιείται για την παραγωγή των λεντιών και για τον σκοπό αυτό μετασχηματίζεται με τρία πλασμίδια: i) την DNA κατασκευή του φορέα pSicoR που φέρει την shRNA αλληλουχία για το REAKTn, το πλασμίδιο PAX2 που εκφράζει τις πρωτεΐνες πακεταρίσματος του λεντιού και 3) το πλασμίδιο PMD2G που εκφράζει τις πρωτεΐνες για την συναρμολόγηση του ιικού φακέλου. Η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιείται με την βοήθεια λιποφιλικού παράγοντα, ο οποίος συμβάλλει στο πακετάρισμα των τριών πλασμιδίων σε λιποσφαιρίδια, τα οποία στη συνέχεια συντήκονται με την λιπιδική μεμβράνη των κυττάρων, επιτυγχάνοντας την διαμόλυνσή τους. Τα γαστρικά καρκινικά κύτταρα συλλέχθηκαν τρεις ημέρες μετά τη διαμόλυνση με τους ιούς και χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων

αλλά και για ανάλυση ταξινόμησης των κυττάρων με βάση των φθορισμό τους (FACS-Fluorescence-Activated Cell Sorting).

### 3.2.9 Απομόνωση RNA

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων σε δείγματα κυττάρων, απαιτείται ως πρώτο βήμα η απομόνωση του συνολικού RNA. Αρχικά, σε καθένα από τα τρυβλία ανάπτυξης κυττάρων (6-well) προστίθεται 1 mL αντιδραστηρίου TRI (Trizol, MRC), ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα το περιεχόμενο του κάθε well μεταφέρεται σε δοκιμαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL, τα οποία αποθηκεύονται στους -80 °C, μέχρι την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης RNA. Η απομόνωση RNA ξεκινά με την προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου και πολύ καλή ανάδευση των δειγμάτων σε vortex. Ύστερα, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές, με το πέρας της οποίας συλλέγεται σε νέο σωληνάριο η υδατική φάση κάθε δείγματος που περιέχει το RNA. Έπειτα, σε κάθε δείγμα προστίθενται 1 μL γλυκογόνου και 500 μL ισοπροπανόλης και γίνεται ήπια ανακίνηση και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο. Αμέσως μετά, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια, προστίθενται 500 μL αιθανόλης 70% (4 °C), ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές και τελικά, το ίζημα στεγνώνεται τελείως με την βοήθεια πιπέτας και επαναδιαλύεται σε RNase-free ddH<sub>2</sub>O με θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο μετράται η συγκέντρωση του RNA στο φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000.

### 3.2.10 Κατεργασία με DNάση

Μετά την διαδικασία απομόνωσης RNA που περιγράφηκε παραπάνω, στα δείγματα περιέχεται τόσο RNA όσο και υπολείμματα DNA που δεν απομακρύνθηκαν επιτυχώς (Total Nucleic Acid samples). Για τον σκοπό αυτό, απαιτείται η κατεργασία των δειγμάτων με DNάση και ακολούθως ο τελικός καθαρισμός αυτών, ώστε να περιλαμβάνουν μόνο RNA. Για την αντίδραση της DNάσης, η ποσότητα του RNA δεν πρέπει να ξεπερνά τα 8000 ng, οπότε γι' αυτό γίνονται οι απαραίτητοι υπολογισμοί των ποσοτήτων δείγματος και ddH<sub>2</sub>O. Τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα στους 37 °C και η αναλυτική σύσταση της αντίδρασης αναγράφεται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8: Η σύσταση της αντίδρασης κατεργασίας με DNάση.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
Δείγμα Total Nucleic Acid + ddH <sub>2</sub> O (αν χρειάζεται)	25
DNase Buffer 10X, Thermo	3
DNase (1U/ μL), Thermo	1
RNAase out (40 U/ μL), Invitrogen	0,5
ddH <sub>2</sub> O	0,5
<b>V<sub>τελικό</sub></b>	<b>30</b>

Ακολουθεί ο καθαρισμός των δειγμάτων, ο οποίος ξεκινά με προσθήκη 40 μL οξικού νατρίου 3M/pH 5.2, 330 μL ddH<sub>2</sub>O και 400 μL διαλύματος Φαινόλης/Χλωροφορμίου/Ισομυλικής αλκοόλης (25:24:1) και καλή ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές και έπειτα, η υδατική φάση κάθε δείγματος μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL. Εν συνεχεία, προστίθενται 1 μL γλυκογόνου και 1000 μL αιθανόλης 100% (4 °C) και γίνεται ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στους -80 °C για τουλάχιστον 1 ώρα. Ύστερα από το στάδιο της καταβύθισης, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές, στο τέλος της οποίας το υπερκείμενο απορρίπτεται. Αμέσως μετά, προστίθενται 500 μL αιθανόλης 70% (4 °C), τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά, στους 4 °C και στις μέγιστες στροφές και το ίζημα στεγνώνεται πλήρως και επαναδιαλύεται σε RNase-free ddH<sub>2</sub>O με θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά. Η τελική συγκέντρωση καθαρού RNA μετράται με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου Quawell Q3000.

### 3.2.11 Σύνθεση cDNA

Το επόμενο στάδιο είναι η σύνθεση cDNA από τα δείγματα RNA. Γί αυτό το βήμα απαιτούνται 1000 ng RNA σε τελικό όγκο 10 μL, το οποίο επιτυγχάνεται με κατάλληλους υπολογισμούς. Οπότε, σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL προστίθενται οι απαραίτητες ποσότητες δείγματος RNA και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 10 μL, καθώς



επίσης 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM) και 1  $\mu\text{L}$  Random Hexamers (100 mM, Takara) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στους 65 °C, ώστε οι εκκινητές για την σύνθεση του cDNA (Random Hexamers) να υβριδίσουν πάνω στο υπόστρωμα του RNA. Ύστερα, στα δείγματα προστίθενται και τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης που αναγράφονται στον **Πίνακα 9** και ακολουθεί δίωρη επώαση στους 37 °C.

**Πίνακας 9:** Η συνολική σύσταση της αντίδρασης σύνθεσης cDNA.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος ( $\mu\text{L}$ )
Δείγμα RNA + ddH <sub>2</sub> O (αν χρειάζεται)	10
dNTPs (10 mM)	1
Random Hexamers (100 mM), Takara	1
<b>Επώαση για 5 λεπτά στους 65 °C</b>	
First Strand Buffer 5X, Invitrogen	4
DTT 0,1 M (500 U/ $\mu\text{L}$ ), Invitrogen	2
MMLV (200 U/ $\mu\text{L}$ ), Invitrogen	1
RNAase out (40 U/ $\mu\text{L}$ ), Invitrogen	0,5
ddH <sub>2</sub> O	0,5
<b>V<sub>τελικό</sub></b>	<b>20</b>

Με το πέρας των 2 ωρών, προστίθενται 380  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C.

### 3.2.12 Ποσοτική PCR (qPCR)

Το τελικό στάδιο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ή αλλιώς ποσοτική PCR (qPCR). Η ποσοτική PCR στηρίζεται στην ικανότητα της χρωστικής SYBRGREEN να δεσμεύεται έως και 1000 φορές ισχυρότερα σε δίκλωνο DNA και να φθορίζει. Ως εκ τούτου, παρατηρείται αύξηση του φθορισμού ανάλογη με την ενίσχυση του DNA σε κάθε κύκλο. Για την αποφυγή υπερεκτίμησης ή υποεκτίμησης της έκφρασης των υπό

μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού CFX Manager της Bio-Rad και του αντίστοιχου θερμοκυκλοποιητή, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του Microsoft Excel. Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον **Πίνακα 10** και οι συνθήκες στον **Πίνακα 11**.

**Πίνακας 10:** Η σύσταση της αντίδρασης qPCR.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
Δείγμα cDNA (template)	4
SYBR MIX: KAPA SYBR FAST UNIVERSAL 2x	10
ddH <sub>2</sub> O	4
Forward and Reverse primer (10 μM)	2
<b>V<sub>τελικό</sub></b>	<b>20</b>

**Πίνακας 11:** Συνθήκες αντίδρασης qPCR.

Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min
Αποδιάταξη	95 °C	20 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	58 °C	2 min
Επιμήκυνση	72 °C	15 sec
<b>Κύκλοι</b>	<b>45</b>	

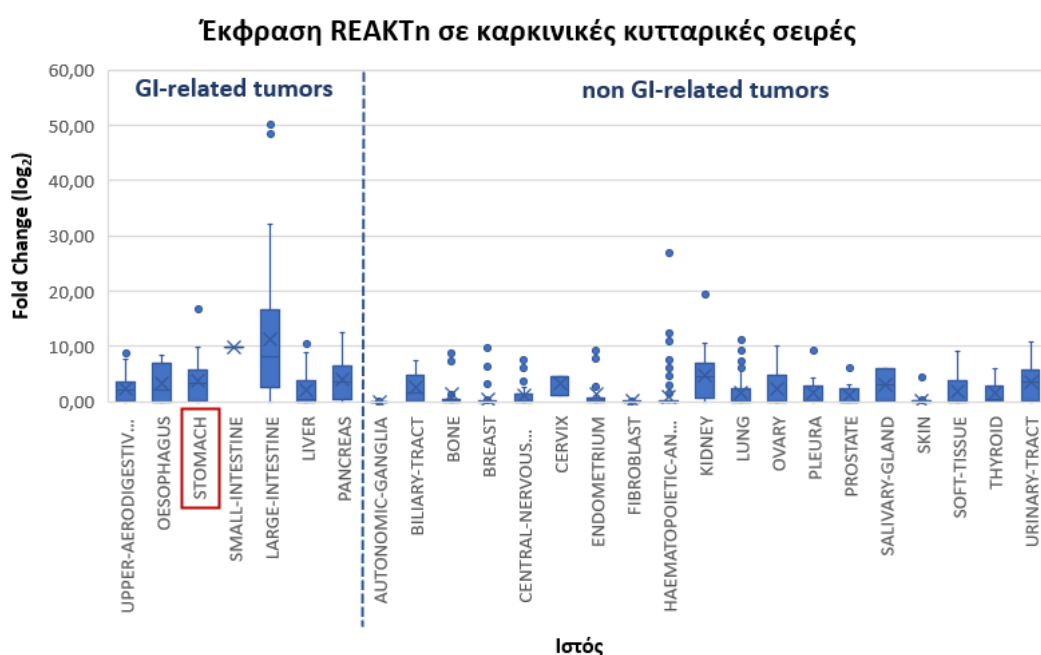
## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Ένας από τους κυριότερους στόχους του ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου είναι ο χαρακτηρισμός ποικίλων lncRNAs των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στον γαστρικό καρκίνο. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε μεταξύ άλλων, και το lncRNA REAKTn για περαιτέρω έρευνα, το οποίο είχε εντοπιστεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου.

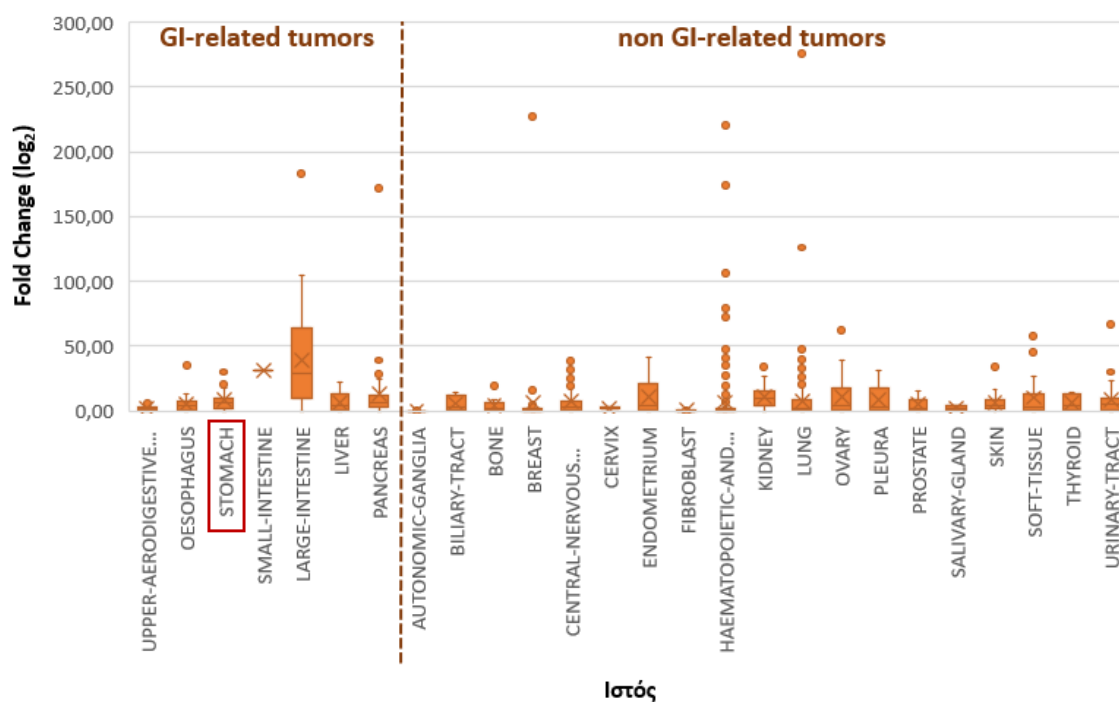
#### 4.1.1 Ανάλυση δεδομένων RNA-seq

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA για το lncRNA REAKTn και το πιθανό γονίδιο στόχο του, TG1, σε δείγματα από καρκινικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από όργανα ολόκληρου του ανθρώπινου οργανισμού. Στην **Εικόνα 14** φαίνεται η έκφραση του REAKTn στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές ανά ιστό. Γενικά, το συγκεκριμένο lncRNA φαίνεται να εκφράζεται σε παρόμοια επίπεδα σε όλους τους τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος χωρίς ιδιαίτερες διαφορές με την πλειοψηφία των υπολοίπων, ενώ είναι αξιοσημείωτα τα αυξημένα μέσα επίπεδα έκφρασής του σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου και στομάχου. Παρόμοιο προφίλ στην έκφρασή του παρουσιάζει και το TG1, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**.



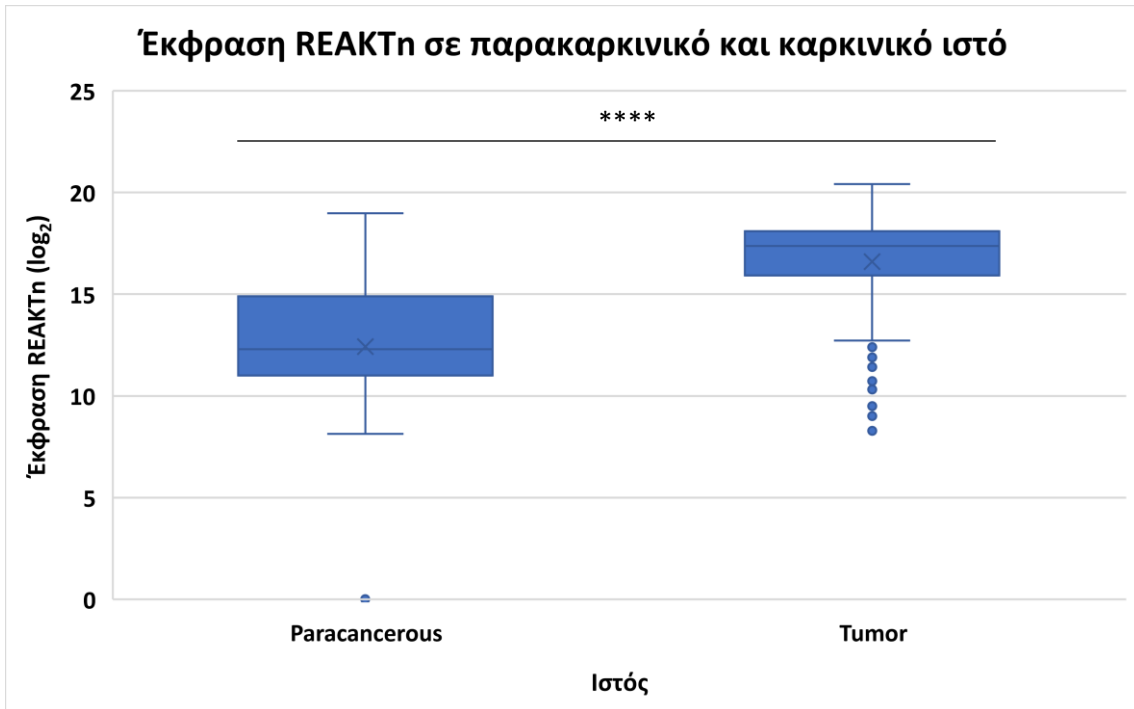
**Εικόνα 14:** Θηκόγραμμα (Box plot) επιπέδων έκφρασης του REAKTn σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

## Έκφραση TG1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

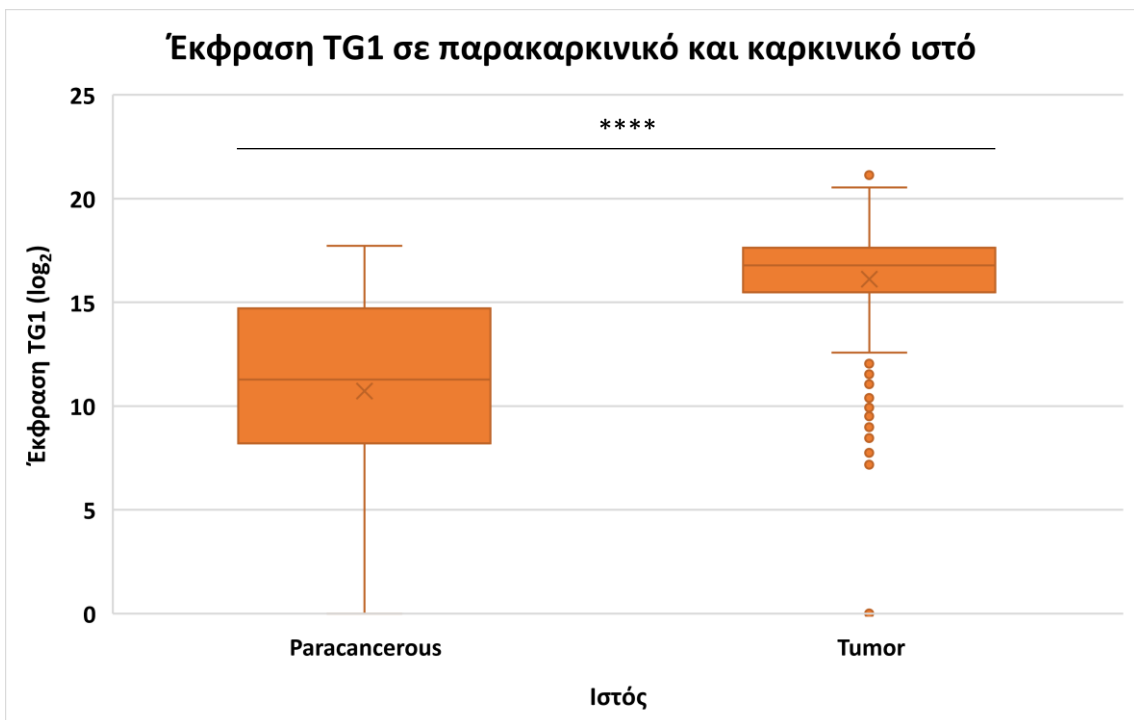


Εικόνα 15: Θηκόγραμμα (Box plot) επιπέδων έκφρασης του TG1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

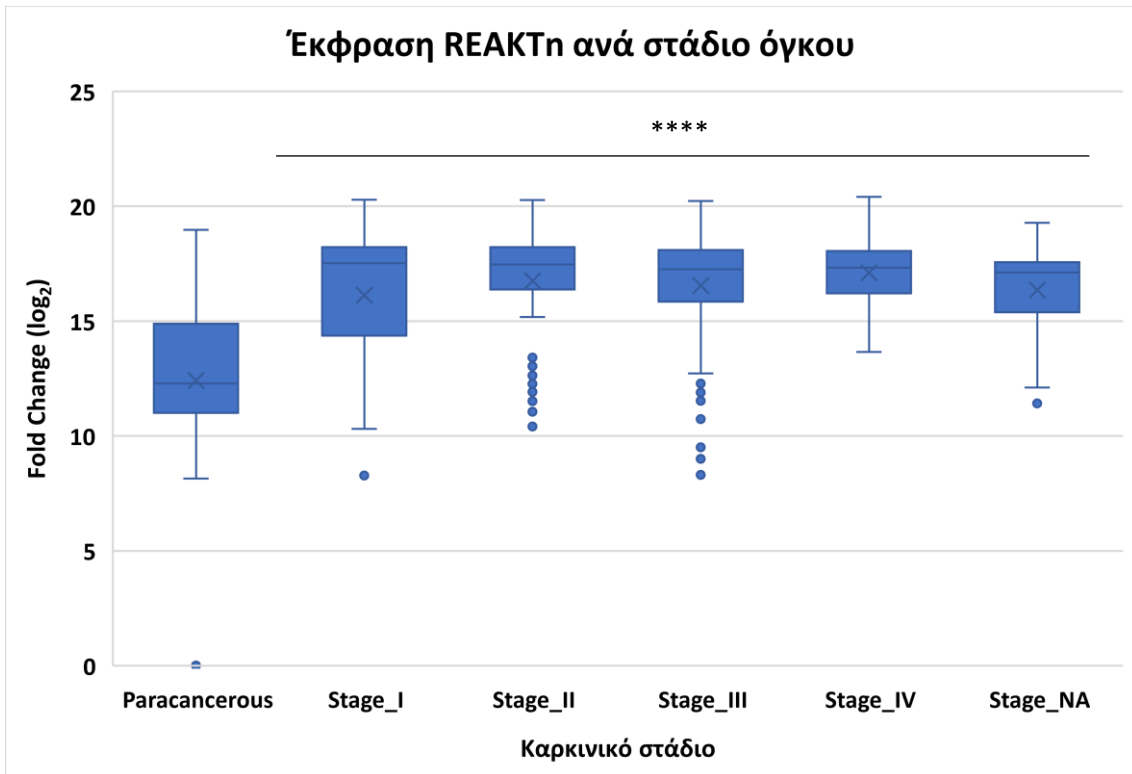
Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του REAKTη και του TG1 σε δείγματα παρακαρκινικού φυσιολογικού ιστού και σε βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο. Όπως είναι διακριτό από τις **Εικόνες 16** και **17**, η έκφραση του REAKTη και του TG1 αυξάνεται στον γαστρικό καρκίνο συγκριτικά με τον γειτονικό φυσιολογικό ιστό. Έπειτα, έγινε ανάλυση της έκφρασης των δύο αυτών γονιδίων και σε δείγματα γαστρικού καρκίνου από κάθε στάδιο (Στάδιο I-IV). Στις **Εικόνες 18** και **19** φαίνεται πως το προφίλ έκφρασης των δύο γονιδίων είναι παρόμοιο, καθώς και στις δύο περιπτώσεις η έκφραση αυξάνεται από την φυσιολογική κατάσταση (Paracancerous) στο πρώτο καρκινικό στάδιο, ενώ παραμένει σε σταθερά επίπεδα στον καρκίνο παρουσιάζοντας μικρές μόνο διαφοροποιήσεις από στάδιο σε στάδιο. Τέλος, στην **Εικόνα 20** απεικονίζεται η ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης του REAKTη και του TG1 σε δείγματα βιοψιών γαστρικού καρκίνου, όπου φαίνεται πως υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ τους ( $R^2=0,5805$ ).



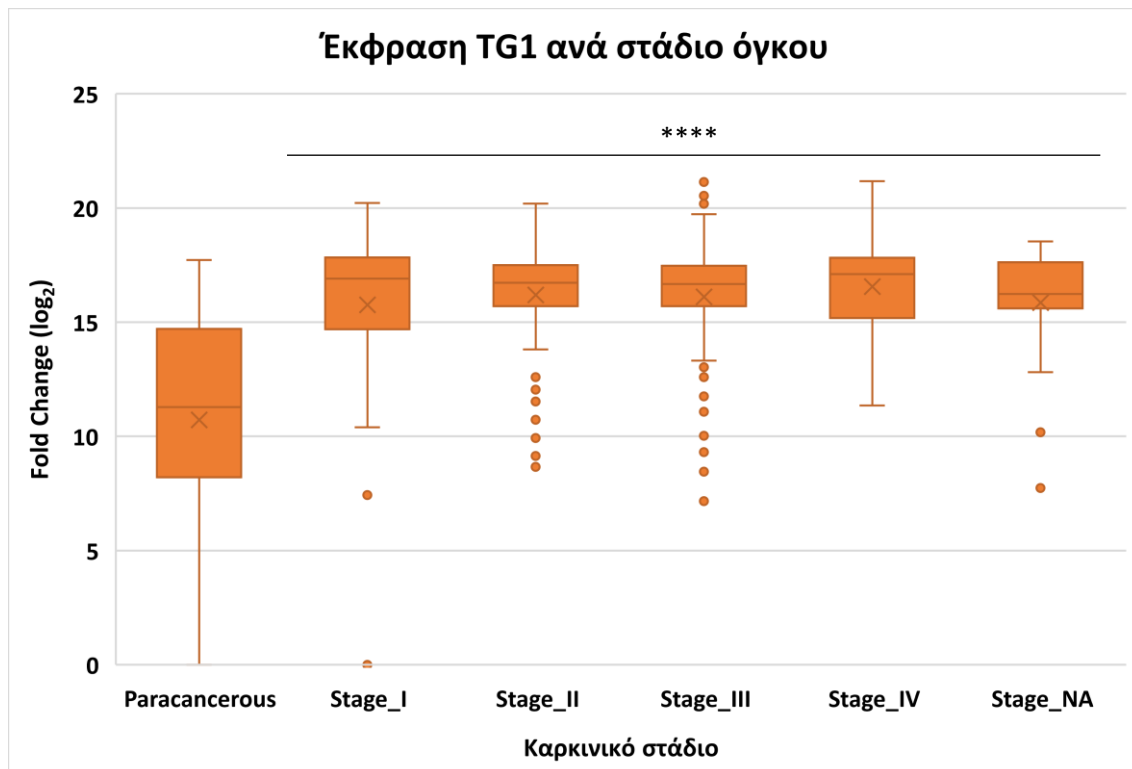
Εικόνα 16: Θηκόγραμμα (Box plot) επιπέδων έκφρασης του REAKTn σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό (\*\*\*\*: p-value < 0,0001).



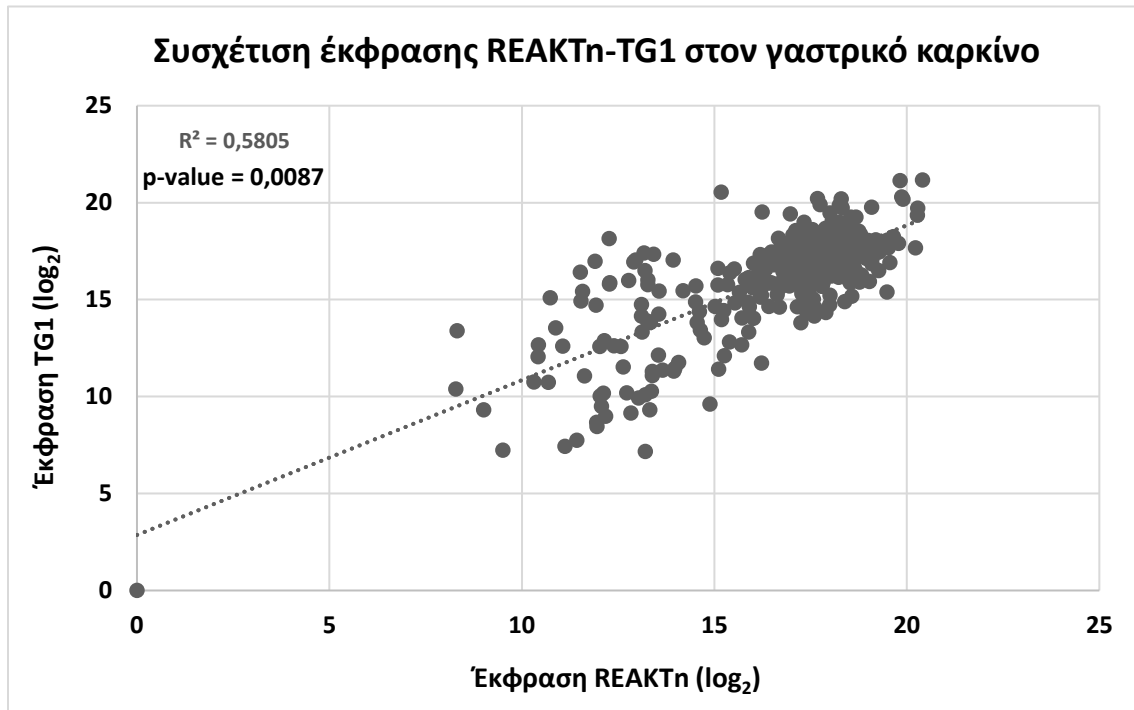
Εικόνα 17: Θηκόγραμμα (Box plot) επιπέδων έκφρασης του TG1 σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό (\*\*\*\*: p-value < 0,0001).



Εικόνα 18: Θηκόγραμμα (Box plot) επιπέδων έκφρασης του REAKTn ανά στάδιο γαστρικού καρκίνου (\*\*\*\*: p-value < 0,0001).



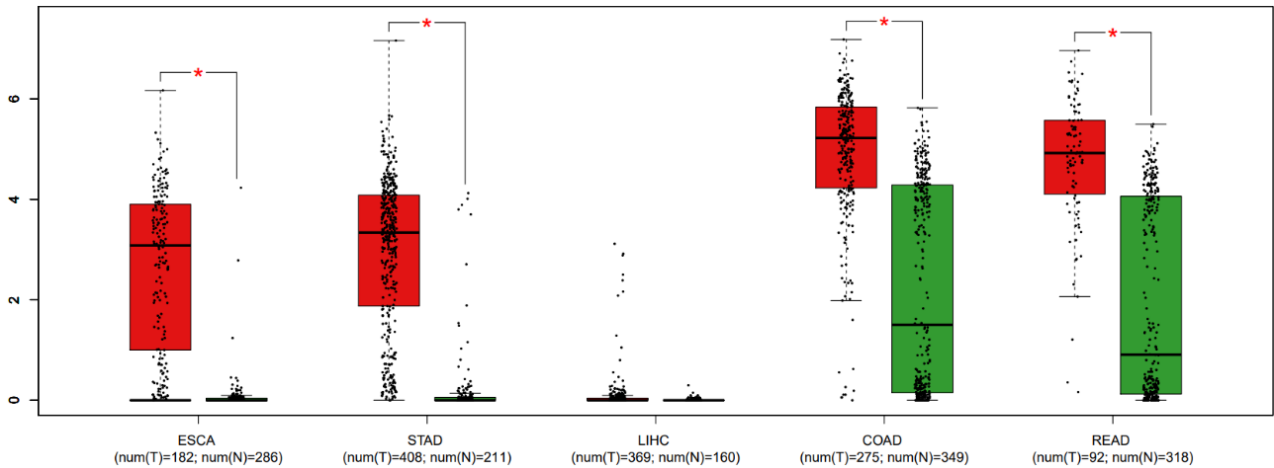
Εικόνα 19: Θηκόγραμμα (Box plot) επιπέδων έκφρασης του TG1 ανά στάδιο γαστρικού καρκίνου (\*\*\*\*: p-value < 0,0001).



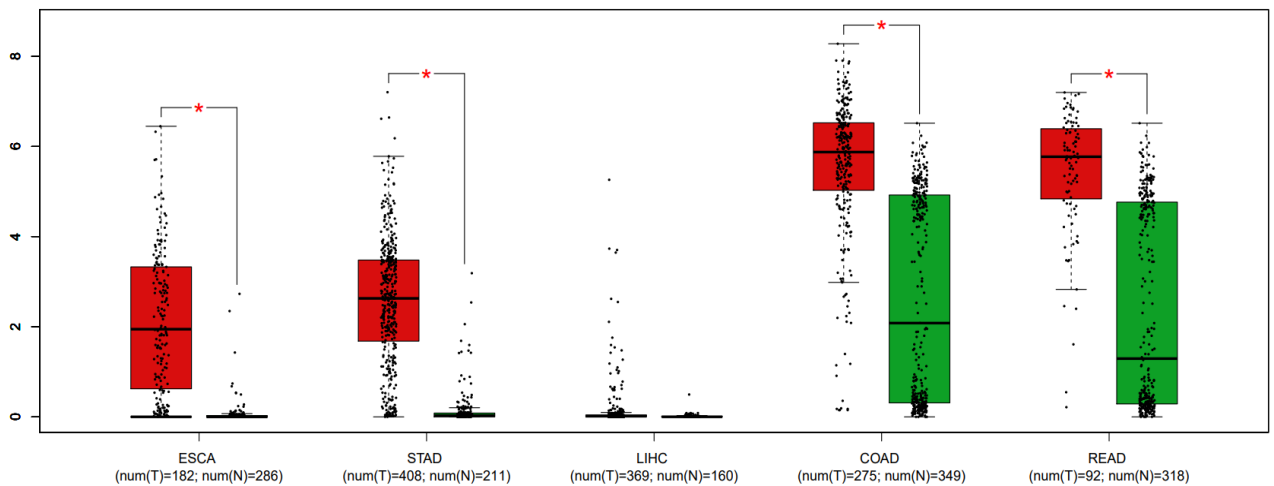
**Εικόνα 20:** Διάγραμμα συσχέτισης (Correlation plot) της έκφρασης των γονιδίων REAKTn και TG1 σε δείγματα βιοψιών ασθενών γαστρικού καρκίνου (\*\*: p-value < 0,01).

#### 4.1.2 Ανάλυση δεδομένων με τη χρήση του εργαλείου GEPIA

Συμπληρωματικά με την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης RNA για το REAKTn και το υποψήφιο γονίδιο στόχο του, χρησιμοποιήθηκε και το εργαλείο GEPIA για την κατασκευή διαγραμμάτων σύμφωνα με δεδομένα από τις ερευνητικές κοινοπραξίες TCGA και GTEx. Στην **Εικόνα 21** διακρίνεται η έκφραση του REAKTn σε πέντε τύπους καρκίνου (κόκκινο) του γαστρεντερικού συστήματος (οισοφάγος, στομάχι, ήπαρ και παχύ έντερο) συγκριτικά με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (πράσινο). Παρατηρείται, κατά μέσο όρο, πως φυσιολογικά το συγκεκριμένο lncRNA δεν εκφράζεται καθόλου στον οισοφάγο και στο στομάχι, ενώ η έκφρασή του αυξάνεται σημαντικά σε αυτούς τους τύπους καρκίνου. Στο ήπαρ το γονίδιο αυτό φαίνεται να μην εκφράζεται σε καμία από τις δύο συνθήκες, ενώ στο παχύ έντερο το REAKTn αυξορρυθμίζεται στον όγκο σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Αντίστοιχα, στη **Εικόνα 22** απεικονίζεται το προφίλ έκφρασης του TG1 στους προαναφερθέντες ιστούς, το οποίο είναι παρόμοιο με αυτό του REAKTn.



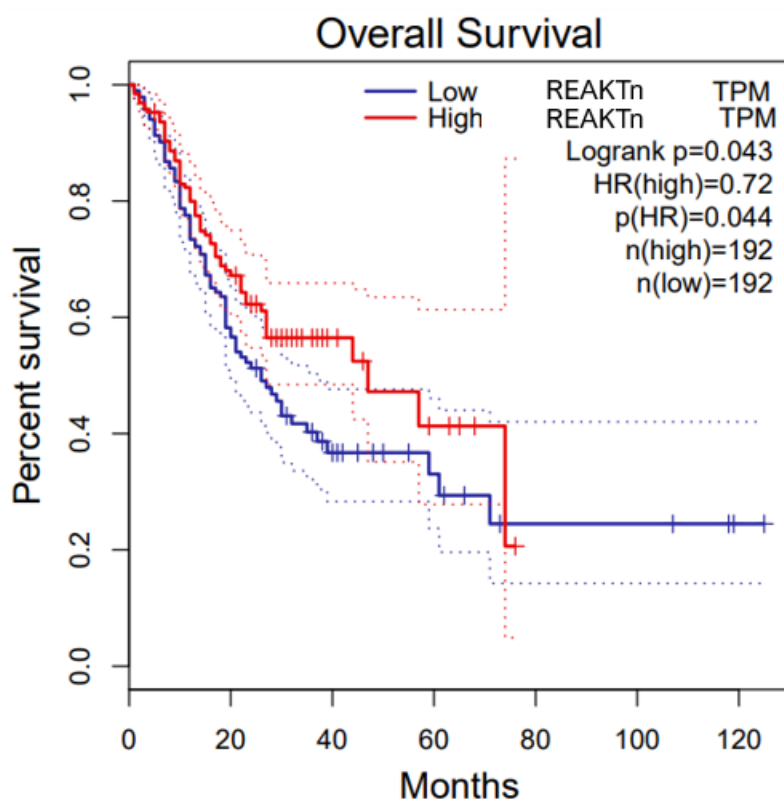
**Εικόνα 21:** Επίπεδα έκφρασης του REAKTn σε πέντε τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος (κόκκινο) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (πράσινο). **ESCA:** Esophageal Carcinoma, **STAD:** Adenocarcinoma, **LIHC:** Liver Hepatocellular Carcinoma, **COAD:** Colon Adenocarcinoma, **READ:** Rectum Adenocarcinoma.



**Εικόνα 22:** Επίπεδα έκφρασης του REAKTn TG1 σε πέντε τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος (κόκκινο) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (πράσινο). **ESCA:** Esophageal Carcinoma, **STAD:** Adenocarcinoma, **LIHC:** Liver Hepatocellular Carcinoma, **COAD:** Colon Adenocarcinoma, **READ:** Rectum Adenocarcinoma.

Επιπροσθέτως, μέσω του εργαλείου GEPIA έγινε δυνατή η απεικόνιση της επιβίωσης των ασθενών με γαστρικό καρκίνο ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA REAKTn. Στην **Εικόνα 23** είναι εμφανές πως η υψηλότερη έκφραση του REAKTn (High-κόκκινο) συσχετίζεται με μικρότερο χρόνο επιβίωσης των ασθενών με γαστρικό καρκίνο, συγκριτικά με τους ασθενείς που εκφράζουν το συγκεκριμένο lncRNA σε χαμηλότερα επίπεδα (Low-μπλε).



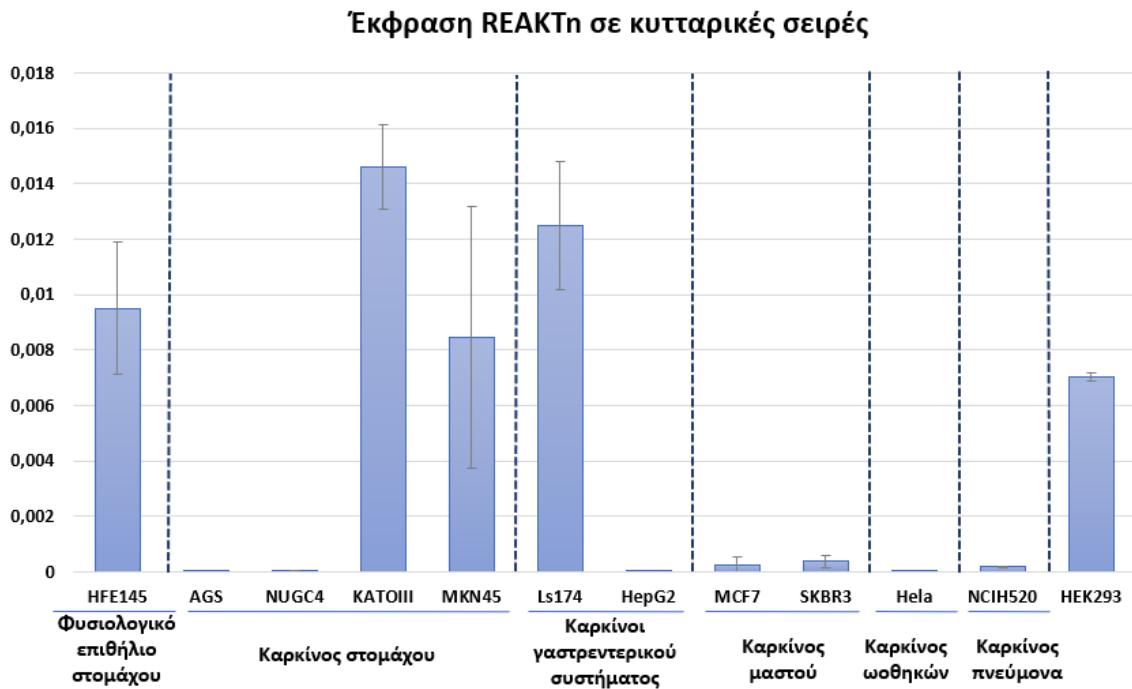


**Εικόνα 23:** Διάγραμμα επιβίωσης των ασθενών με γαστρικό καρκίνο σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA REAKTn.

#### 4.2 Χαρακτηρισμός της έκφρασης REAKTn και TG1 σε κυτταρικές σειρές

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του προφίλ έκφρασης του lncRNA REAKTn και του υποψήφιου mRNA στόχου του, TG1, σε διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου. Μελετήθηκαν συνολικά 12 κυτταρικές σειρές από τις οποίες είχε απομονωθεί RNA που μετατράπηκε σε cDNA κατά τη διάρκεια προηγούμενων πειραμάτων του εργαστηρίου. Τα δείγματα cDNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για ποσοτική PCR (qPCR), με σκοπό την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων REAKTn και TG1 σε κάθε κυτταρική σειρά. Στην **Εικόνα 24** φαίνονται τα, κανονικοποιημένα ως προς την έκφραση του GAPDH, αποτελέσματα της qPCR για το lncRNA REAKTn και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις. Παρατηρούμε πως το REAKTn εκφράζεται μόνο στις κυτταρικές σειρές στομάχου (HFE-145, KATOIII και MKN45) και παχέος εντέρου (Ls174). Επιπλέον, ανάμεσα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου την υψηλότερη έκφραση για το REAKTn εμφανίζουν οι σειρές KATOIII και MKN45. Τα κύτταρα HEK-293 ελέγχθηκαν καθώς είναι τα περισσότερο δεκτικά στη γενετική τροποποίηση και λειτουργούν ως «εύχρηστο επιθηλιακό κυτταρικό μοντέλο».

Στην **Εικόνα 25** απεικονίζονται τα, κανονικοποιημένα ως προς την έκφραση του GAPDH, αποτελέσματα της qPCR για το TG1 και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις. Το προφίλ έκφρασης του TG1 είναι παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται για το lncRNA, με εξαίρεση την υψηλή έκφραση που εμφανίζουν τα κύτταρα AGS και NCIH520.



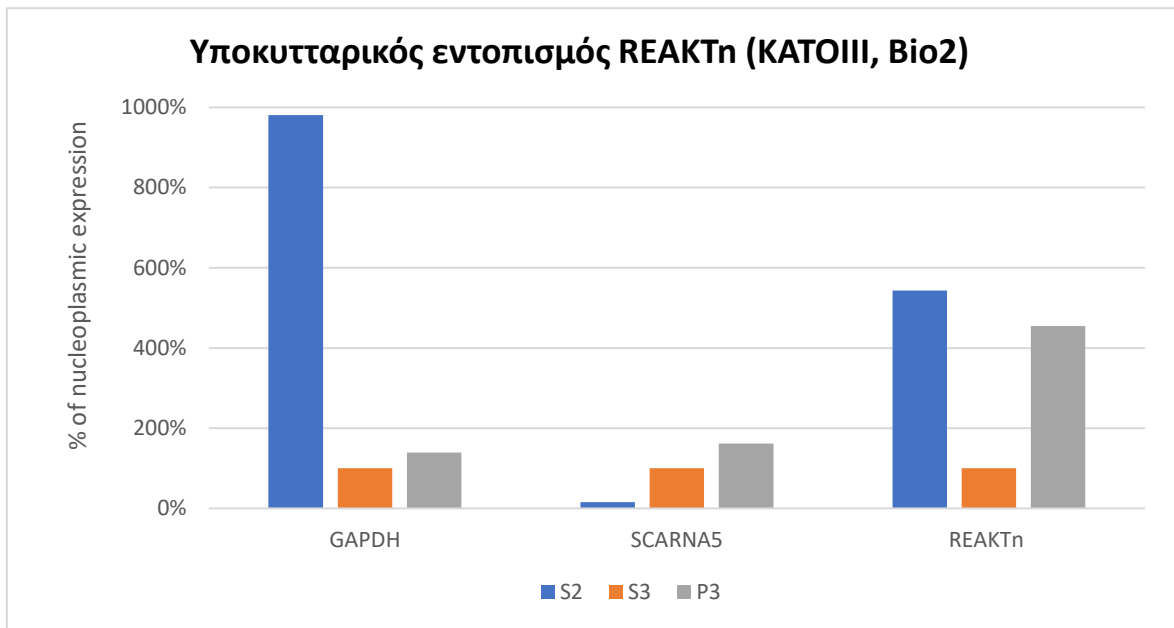
Εικόνα 24: Επίπεδα έκφρασης REAKTn σε 12 κυτταρικές σειρές.



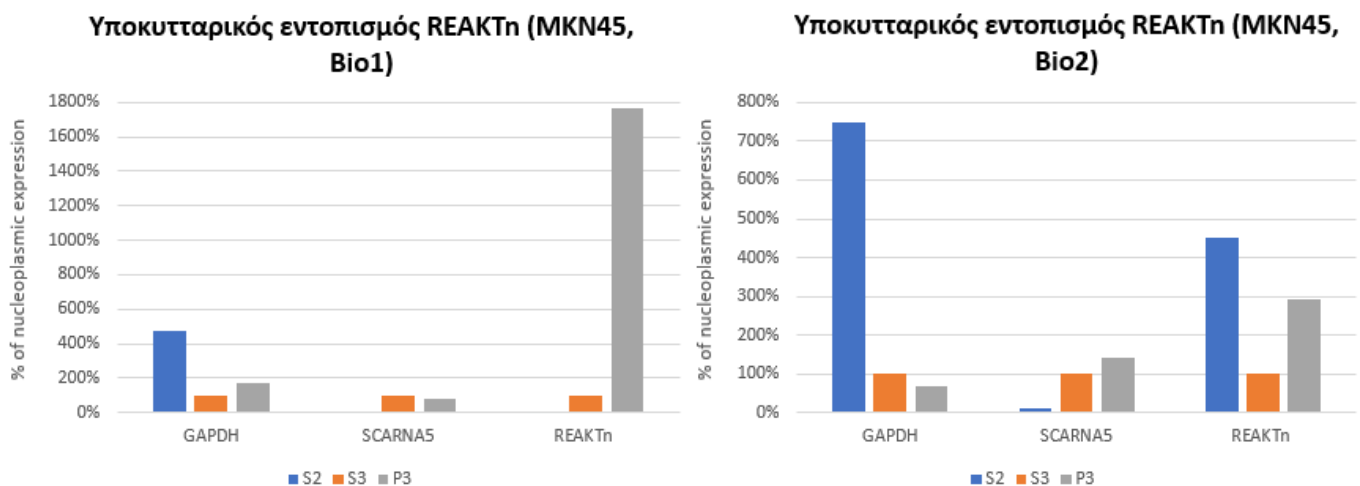
Εικόνα 25: Επίπεδα έκφρασης TG1 σε 12 κυτταρικές σειρές.

### 4.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός REAKTn σε κύτταρα KATOIII και MKN45

Για την λεπτομερέστερη μελέτη του lncRNA REAKTn ακολούθησε πείραμα υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε δείγματα των κυτταρικών σειρών KATOIII και MKN45, που προηγουμένως παρουσίασαν την υψηλότερη έκφραση REAKTn. Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να βρεθεί ο εντοπισμός των μεταγράφων του REAKTn μέσα στο κύτταρο. Τρία ήταν τα υποκυτταρικά κλάσματα που ελέγχθηκαν μέσω qPCR για την έκφραση του REAKTn: i) το S2 που αντιστοιχεί στο κυτταρόπλασμα, ii) το S3 που αντιστοιχεί στο πυρηνόπλασμα και iii) το P3 που αντιστοιχεί στην χρωματίνη. Για την αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως κυτταροπλασματικός δείκτης το γονίδιο GAPDH που βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα και ως χρωματινικός δείκτης το γονίδιο του lncRNA SCARNA5 που βρίσκεται κατά βάση στην χρωματίνη. Στην **Εικόνα 26** φαίνονται τα αποτελέσματα του υποκυτταρικού εντοπισμού στην κυτταρική σειρά KATOIII μόνο για τη δεύτερη βιολογική επανάληψη, διότι η πρώτη κρίθηκε μη αξιόπιστη. Παρατηρείται πως στα κύτταρα KATOIII το lncRNA REAKTn βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στην χρωματίνη σε παρόμοια επίπεδα. Αντίστοιχα, στην **Εικόνα 27** φαίνονται τα αποτελέσματα στην κυτταρική σειρά MKN45 και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις, με την πρώτη να εμφανίζει εξαιρετικά υψηλή έκφραση του REAKTn στο χρωματινικό κλάσμα και μηδενική στο κυτταροπλασματικό, σε αντίθεση με τη δεύτερη που παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο με αυτό των κυττάρων KATOIII, γεγονός που πιθανώς να εξηγείται λόγω επιμόλυνσης των κλασμάτων. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι το μετάγραφο του REAKTn σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα έχει παρουσία κυρίως στο χρωματινικό κλάσμα ενώ ένα μέρος του δύναται να εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 26: Επίπεδα έκφρασης REAKTn στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα των κυττάρων KATOIII (Bio2).

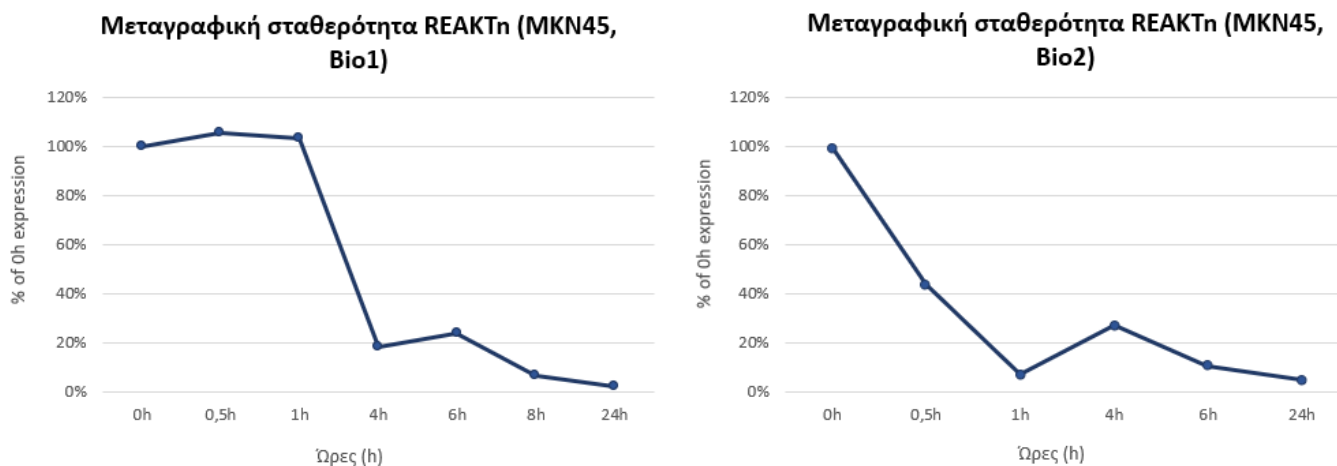


Εικόνα 27: Επίπεδα έκφρασης REAKTn στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα των κυττάρων MKN45 και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις (Bio1 & 2).

#### 4.4 Μεταγραφική σταθερότητα REAKTn σε κύτταρα MKN45

Στο πλαίσιο του χαρακτηρισμού του lncRNA REAKTn, με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον πιθανό τρόπο δράσης του, συμπεριλαμβάνεται και η μελέτη της μεταγραφικής του σταθερότητας. Έτσι, για τον έλεγχο του ρυθμού αποικοδόμησης των μεταγράφων του REAKTn χρησιμοποιήθηκαν δείγματα της κυτταρικής σειράς MKN45, στα οποία έγινε εξαγωγή ολικού RNA ανά τακτά χρονικά διαστήματα έπειτα από χορήγηση του αντιβιοτικού ακτινομυκίνης D που αναστέλλει την μεταγραφή. Επομένως, μετά την χορήγηση ακτινομυκίνης D λαμβάνεται ένα στιγμιότυπο των

μεταγράφων που υπάρχουν στα κύτταρα τη δεδομένη χρονική στιγμή. Τα αποτελέσματα του πειράματος ελέγχου της μεταγραφικής σταθερότητας του REAKTn και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις φαίνονται στην **Εικόνα 28**, όπου παρατηρείται χαμηλή σταθερότητα, καθώς μεταξύ μίας και τριών ωρών ο αριθμός των μεταγράφων μειώνεται κατακόρυφα, καθιστώντας το lncRNA ασταθές.



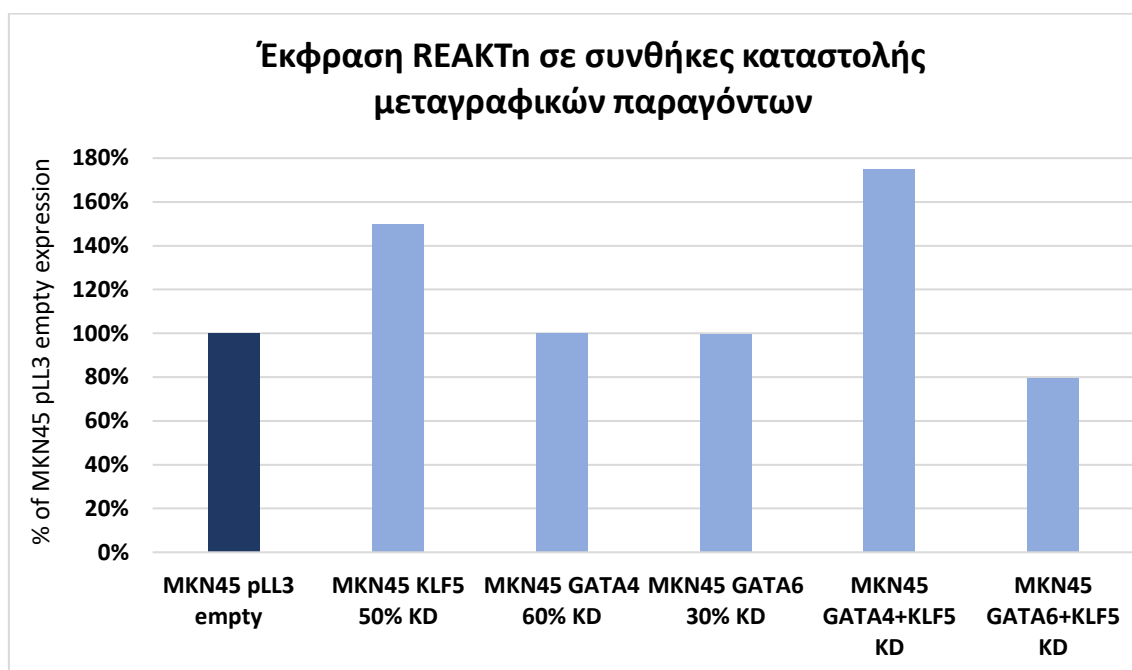
**Εικόνα 28:** Επίπεδα έκφρασης REAKTn σε κύτταρα MKN45 σε τακτά χρονικά διαστήματα ύστερα από χορήγηση ακτινομυκίνης D (Bio1 & 2).

#### 4.5 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης REAKTn και TG1 σε συνθήκες καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων KLF5, GATA4 και GATA6

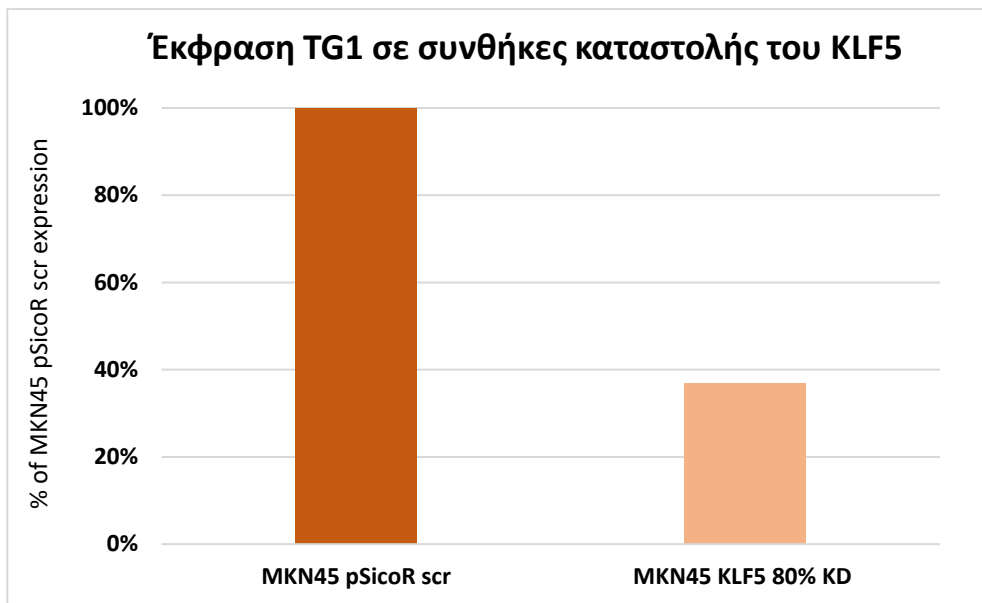
Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν κατατάξει μία ομάδα γονιδίων ως lncRNAs που ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 (Kruppel-Like Factor 5), ο οποίος αποτελεί έναν ρυθμιστή της κυτταρικής γενεαλογίας (lineage-survival factor), καθώς συμμετέχει στην διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Είναι γνωστό πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σχηματίζει ένα ογκογόνο δίκτυο με τους, όμοιας κατηγορίας, μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και GATA6, προωθώντας την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου [122]. Επομένως, στοχεύοντας στην συλλογή πληροφοριών για τον τρόπο ρύθμισης του υπό μελέτη lncRNA REAKTn που εμπίπτει στην προαναφερόμενη κατηγορία, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του REAKTn σε δείγματα που είχαν προηγουμένως σιγηθεί οι παραπάνω ογκογόνοι μεταγραφικοί παράγοντες, είτε ξεχωριστά, είτε συνδυαστικά. Στην **Εικόνα 29** φαίνονται τα αποτελέσματα ποσοτικής PCR για το REAKTn σε κύτταρα MKN45 που παρουσιάζουν καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων MKN45 που διαμολύνθηκαν με άδειο pLL3.7

φορέα, δηλαδή πλασμίδιο που δεν έφερε shRNA αλληλουχία που να στοχεύει κάποιον μεταγραφικό παράγοντα. Σε ό,τι αφορά τα δείγματα καταστολής της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA, η έκφραση του REAKTn δεν μεταβάλλεται, σε σύγκριση με το δείγμα-μάρτυρα. Στην περίπτωση της σίγησης του KLF5 κατά 50% και της συνδυαστικής καταστολής των KLF5/GATA4, παρατηρείται μία μικρή υπερέκφραση του REAKTn συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τέλος, σε συνθήκες καταστολής των KLF5/GATA6 παρατηρείται μία μείωση στην έκφραση του REAKTn κατά 21% σε σχέση με το control.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR για το πιθανό γονίδιο στόχο του REAKTn, TG1, σε δείγμα κυττάρων MKN45 που παρουσιάζουν σίγηση του KLF5 κατά 80%. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων MKN45 που διαμολύνθηκαν με pSicoR φορέα που φέρει shRNA αλληλουχία που δεν στοχεύει κανένα από τα γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά στο γονιδίωμα (scg). Όπως διακρίνεται από την **Εικόνα 30**, όταν ο KLF5 έχει σιγηθεί κατά 80%, το TG1 παρουσιάζει μείωση στην έκφρασή του κατά 63%. Συμπερασματικά, τα παραπάνω δεδομένα θα μπορούσαν να υποδηλώνουν ότι το REAKTn είναι αρνητικά ρυθμιζόμενο από τον KLF5, σε αντίθεση με το πιθανό γονίδιο στόχο του που φαίνεται να ρυθμίζεται θετικά, είτε άμεσα είτε έμμεσα, από τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα στα κύτταρα MKN45.



**Εικόνα 29:** Επίπεδα έκφρασης REAKTn σε δείγματα κυττάρων MKN45 με καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6.



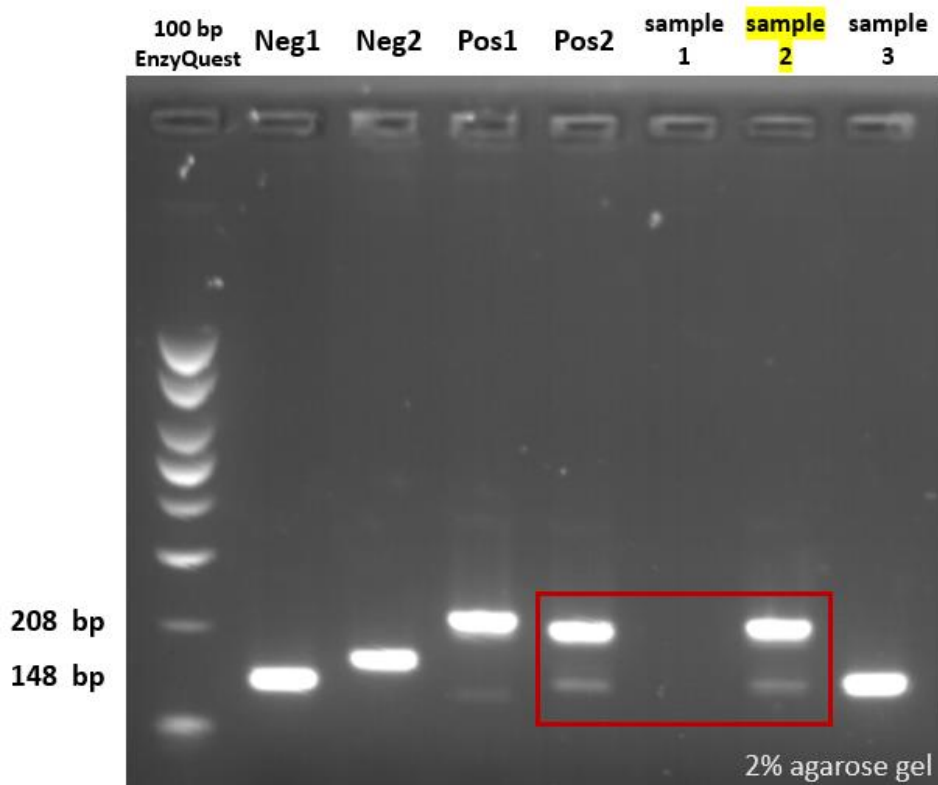
**Εικόνα 30:** Επίπεδα έκφρασης TG1 σε δείγμα κυττάρων MKN45 με καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 κατά 80%.

#### 4.6 Κλωνοποίηση shRNA αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR

Με σκοπό την ανάκτηση πληροφοριών για την σχέση μεταξύ του lncRNA REAKTn και του υποψήφιου γονιδίου στόχου του REAKTn TG1, εκπονήθηκε πείραμα παροδικής καταστολής της έκφρασης του lncRNA.

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: i) το δείγμα χωρίς ένθεμα στην αντίδραση λιγάσης (self-ligation control) και ii) ο φορέας pSicoR που δεν έχει κοπεί με κάποιο ένζυμο και δεν φέρει ένθεμα (pSicoR empty). Στο δείγμα του άκοπου φορέα pSicoR αναμένεται μία ζώνη στα 148 ζεύγη βάσεων, ενώ στο δείγμα self-ligation control αναμένεται μία ζώνη λίγο πιο κάτω από τα 148 ζεύγη βάσεων λόγω της απώλειας μερικών νουκλεοτιδίων κατά την πέψη του φορέα. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα από παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου: i) δείγμα θετικό για την ένθεση ενός shRNA που στοχεύει άλλο γονίδιο και είχε κλωνοποιηθεί σε τροποποιημένο φορέα pSicoR με αναμενόμενη ζώνη στα 211 ζεύγη βάσεων και ii) δείγμα θετικό για την ένθεση ενός shRNA που στοχεύει ένα άλλο γονίδιο και είχε κλωνοποιηθεί σε φορέα pSicoR με αναμενόμενη ζώνη στα 208 ζεύγη βάσεων. Για τα υπό μελέτη δείγματα που ελέγχθηκαν για ένθεση του shRNA που στοχεύει το REAKTn, μία ζώνη γύρω στα 148 ζεύγη βάσεων αντιστοιχεί σε ανεπιτυχή ένθεση, ενώ μία ζώνη στα 208 ζεύγη βάσεων συνεπάγεται επιτυχή ένθεση. Για την ταυτοποίηση του μήκους κάθε ζώνης χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100 bp της

εταιρείας EnzyQuest. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αγαρόζη φαίνονται στην **Εικόνα 31**, από την οποία επιβεβαιώνεται ότι το δείγμα 2 (sample 2) είναι θετικό για την ένθεση της shRNA αλληλουχίας στον pSicoR φορέα, καθώς παρουσιάζει μία ζώνη στα 208 ζεύγη βάσεων όμοια με τον δεύτερο θετικό μάρτυρα (Pos2).



**Εικόνα 31:** Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής PCR σε πηκτική αγαρόζη 2% για έλεγχο ένθεσης shRNA για το γονίδιο REAKTn στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR. Φαίνονται κατά σειρά: ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest), το self-ligation control (Neg1), ο άκοπος φορέας pSicoR (Neg2), ο πρώτος (Pos1-211 bp) και ο δεύτερος θετικός μάρτυρας (Pos2-208 bp) και τα τρία προς εξέταση δείγματα (sample1, 2, 3).

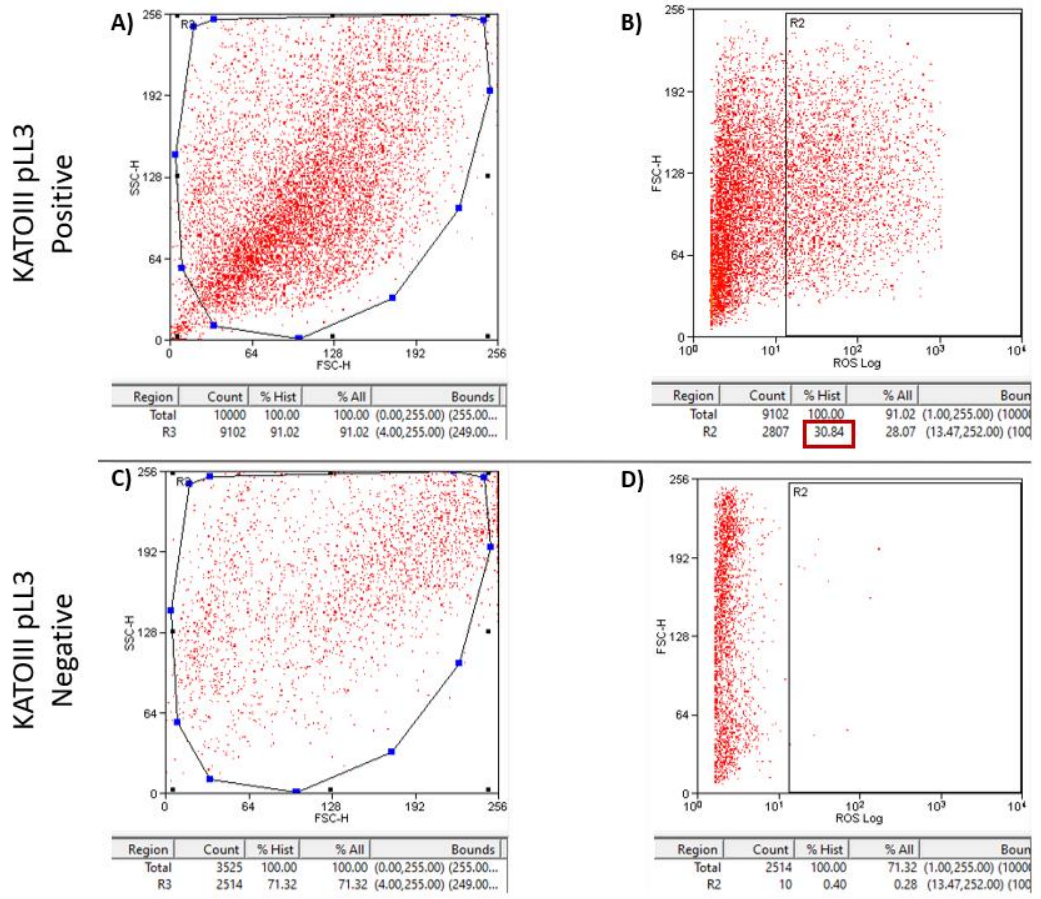
#### 4.7 Έλεγχος ποσοστού διαμόλυνσης κυττάρων KATOIII και MKN45

Με σκοπό τον προσδιορισμό του ποσοστού των κυττάρων που διαμολύνθηκαν επιτυχώς από τους λεντιούς, πραγματοποιήθηκε ανάλυση φθορισμού έπειτα από κυτταρομετρία ροής των διαμολυσμένων κυττάρων (FACS- Fluorescence-Activated Cell Sorting). Η ανάλυση αυτή καθίσταται δυνατή μόνο με την χρήση ενός πλασμιδιακού φορέα που περιλαμβάνει ένα γονίδιο πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP), όπως ο pLL3.7. Συνεπώς, για την διαμόλυνση των κυττάρων μέσω λεντιών χρησιμοποιήθηκε η

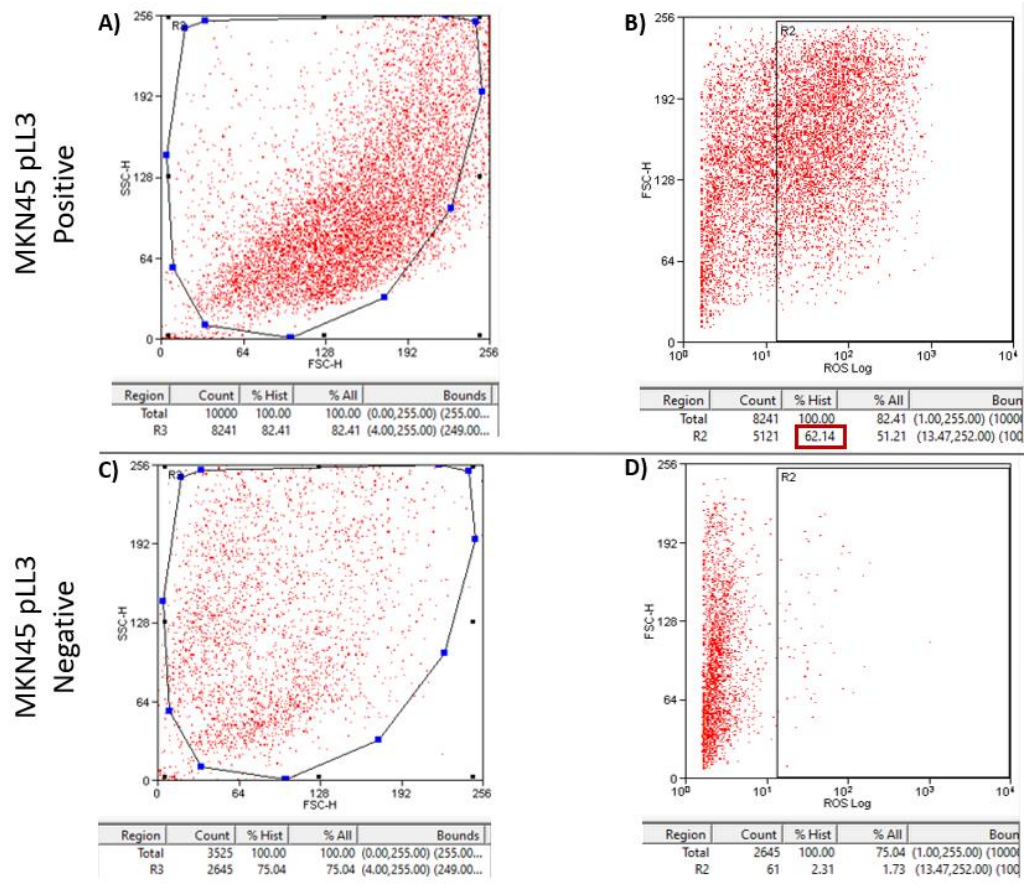


DNA κατασκευή του φορέα pLL3.7, στην οποία είχε κλωνοποιηθεί μία διαφορετική shRNA αλληλουχία που στοχεύει το REAKTn.

Η μελέτη έγινε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου KATOIII και MKN45. Για κάθε κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (Negative Control) ένα δείγμα που δεν είχε διαμολυνθεί με λεντιούς, ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζουν αυτοφθορισμό. Σε καθένα από τα ακόλουθα διαγράμματα κάθε κουκίδα αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό κύτταρο. Για την κυτταρική σειρά KATOIII στην **Εικόνα 32A** και **32C** φαίνεται το διάγραμμα SSC-FSC, στο οποίο μεγαλύτερες τιμές στον άξονα x αντιστοιχούν σε μεγαλύτερο μέγεθος κυττάρων, ενώ μεγαλύτερες τιμές στον άξονα y αντιστοιχούν σε εντονότερη σφαιρικότητα κυττάρων. Η περιοχή R3 περιλαμβάνει τα κύτταρα που επιλέγονται για την συνέχεια της ανάλυσης, καθώς εκτός της συγκεκριμένης περιοχής βρίσκονται τα θραύσματα κυττάρων. Στο διάγραμμα της **Εικόνας 32D**, η περιοχή R2 περιλαμβάνει τα κύτταρα που παρουσιάζουν αυτοφθορισμό, καθώς προέρχονται από το δείγμα που δεν διαμολύνθηκε με ιούς και αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα (KATOIII pLL3 Negative). Αντίθετα, στο διάγραμμα της **Εικόνας 32B**, η περιοχή R2 περιλαμβάνει τα κύτταρα που φθορίζουν λόγω επιτυχούς διαμόλυνσής τους από τους ιούς και τα οποία αντιστοιχούν στο 30,84% των συνολικών κυττάρων KATOIII που ταξινομήθηκαν με βάση τον φθορισμό τους. Στην **Εικόνα 33** φαίνονται τα αντίστοιχα διαγράμματα για την κυτταρική σειρά MKN45, από τα οποία προέκυψε πως το ποσοστό της διαμόλυνσης ήταν 62,14%.



Εικόνα 32: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης FACS για την κυτταρική σειρά KATOIII.

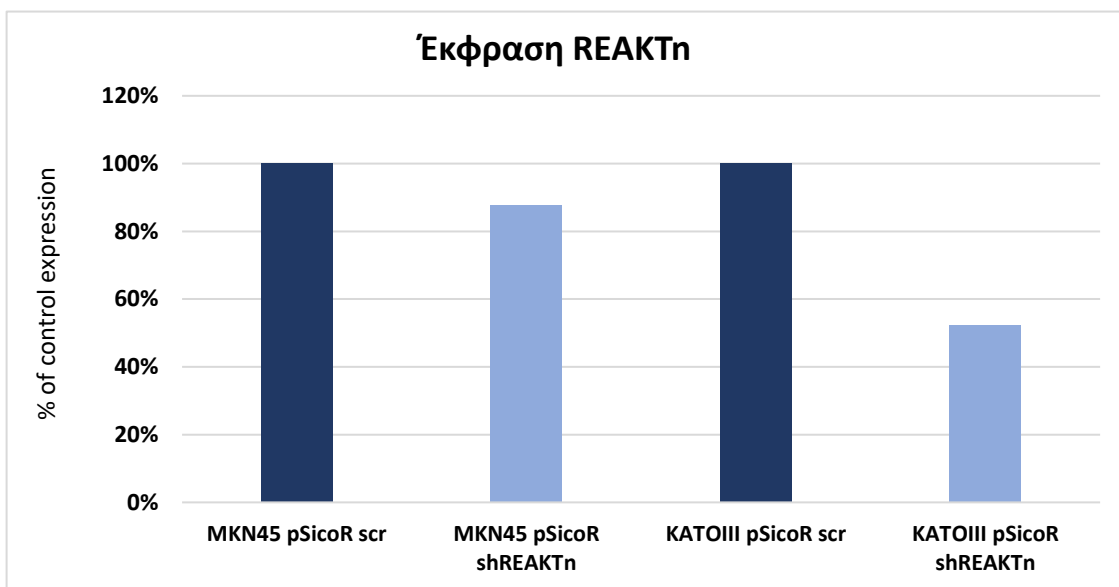


Εικόνα 33: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης FACS για την κυτταρική σειρά MKN45.

## 4.8 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης REAKTn και TG1 έπειτα από παροδική σίγηση του REAKTn σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου

### 4.8.1 Παροδική σίγηση REAKTn μέσω shRNA αλληλουχίας σε φορέα pSicoR

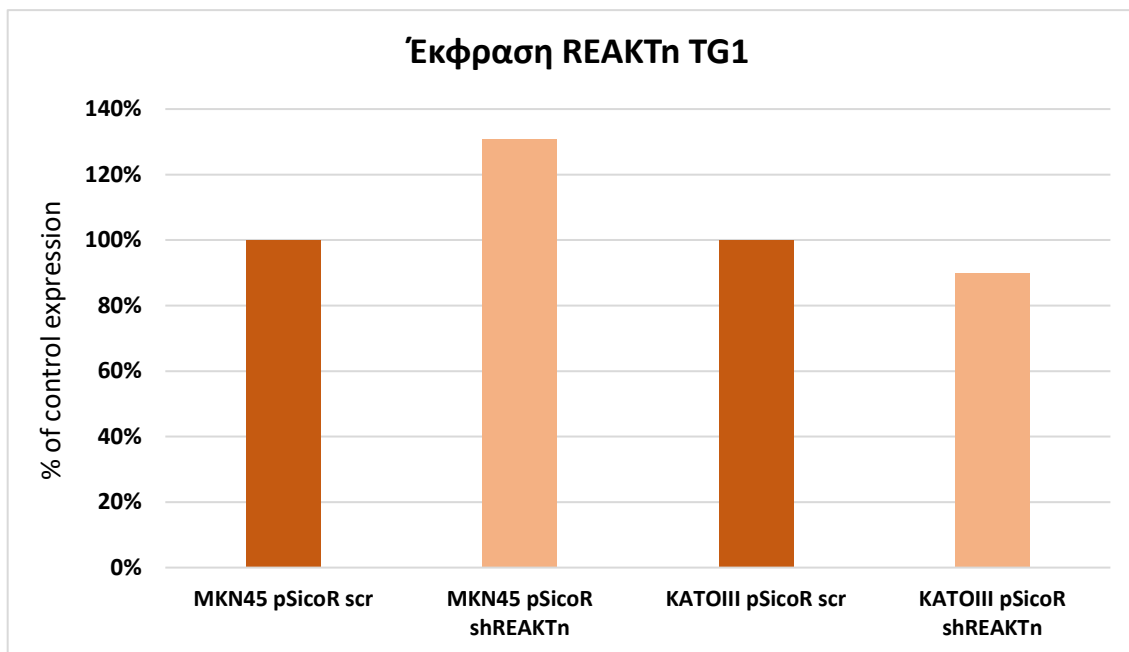
Αφού επιβεβαιώθηκε η επιτυχής ένθεση της shRNA αλληλουχίας που στοχεύει το REAKTn στον πλασμιδιακό φορέα pSicoR (**Εικόνα 31**), η συγκεκριμένη DNA κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση κυττάρων MKN45 και KATOIII με στόχο την παροδική σίγηση του lncRNA και την μελέτη των επιπέδων έκφρασης αυτού καθώς και του υποψήφιου στόχου του. Στην **Εικόνα 34** φαίνονται τα κανονικοποιημένα ως προς την έκφραση του GAPDH, αποτελέσματα της qPCR για το REAKTn ύστερα από την παροδική σίγησή του σε κύτταρα MKN45 και KATOIII. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκε μία DNA κατασκευή που φέρει μία shRNA αλληλουχία που δεν στοχεύει σε κανένα γονίδιο (scr), κλωνοποιημένη σε pSicoR φορέα. Σε κύτταρα MKN45 παρατηρείται μείωση της έκφρασης του REAKTn κατά 12% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ σε κύτταρα KATOIII εντοπίζεται καταστολή της έκφρασης του REAKTn κατά 48% συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.



**Εικόνα 34:** Επίπεδα έκφρασης REAKTn σε κύτταρα MKN45 και KATOIII ύστερα από παροδική σίγηση με την χρήση του φορέα pSicoR.

Αντίστοιχα, στην **Εικόνα 35** φαίνονται τα κανονικοποιημένα ως προς την έκφραση του GAPDH, αποτελέσματα της qPCR για το REAKTn TG1 ύστερα από την παροδική σίγηση του lncRNA στα ίδια κύτταρα MKN45 και KATOIII. Στα MKN45 κύτταρα το TG1 φαίνεται να παρουσιάζει μία αύξηση στην έκφρασή του κατά 31% σε σχέση με το control, ενώ

στα κύτταρα KATOIII η έκφρασή του μειώνεται κατά 10% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

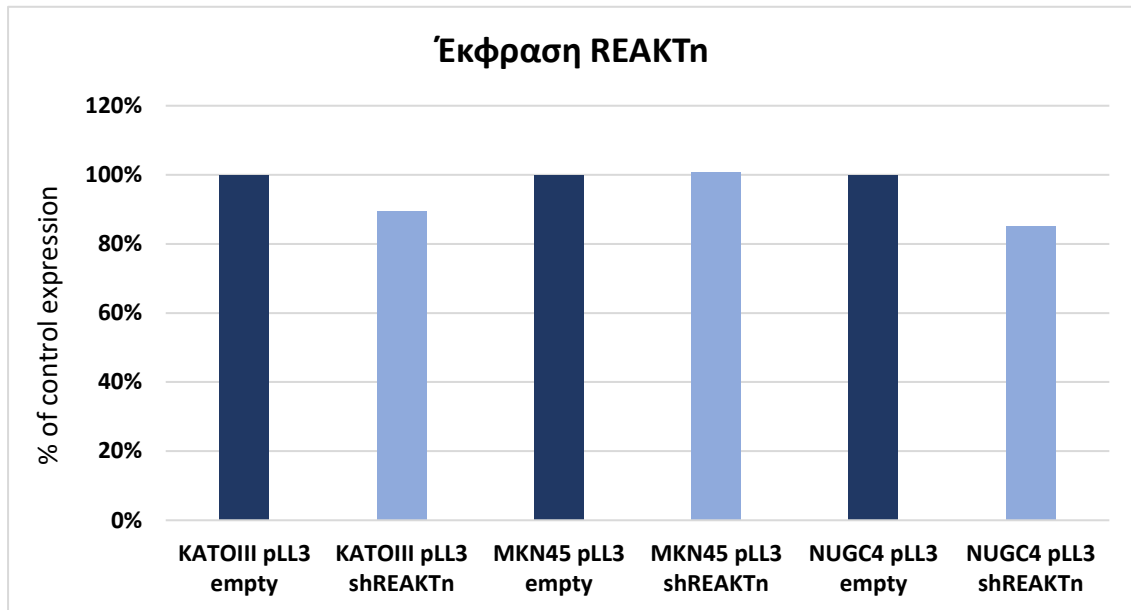


**Εικόνα 35:** Επίπεδα έκφρασης TG1 σε κύτταρα MKN45 και KATOIII ύστερα από παροδική σίγηση του REAKTn με την χρήση του φορέα pSicoR.

#### 4.8.2 Παροδική σίγηση REAKTn μέσω shRNA αλληλουχίας σε φορέα pLL3.7

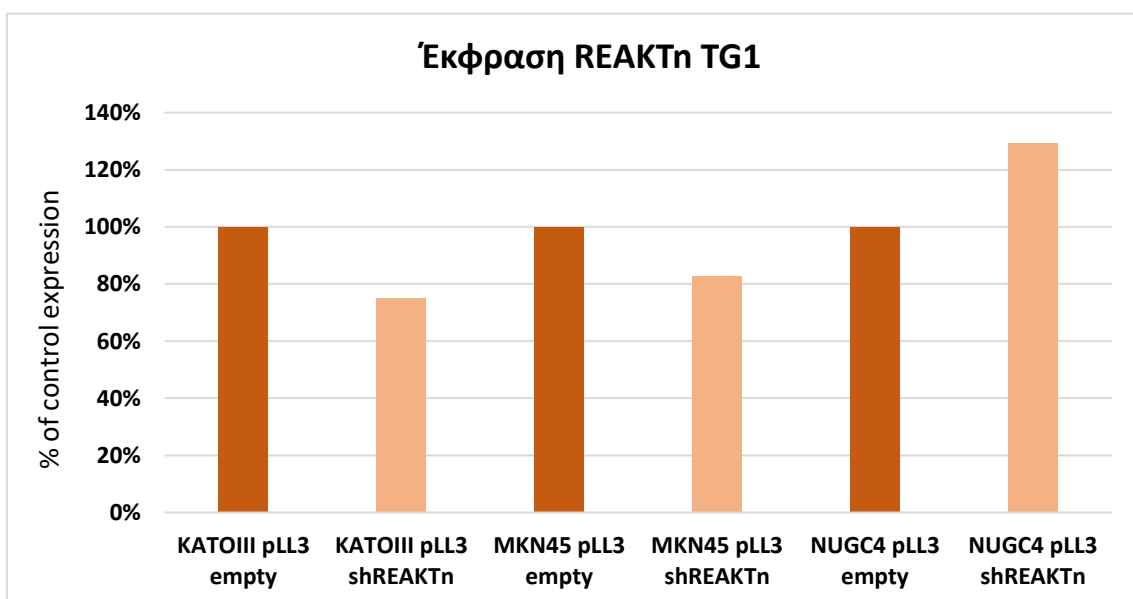
Όπως αναφέρθηκε, σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου είχε κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα pLL3.7 μία διαφορετική shRNA αλληλουχία που στοχεύει το REAKTn. Η συγκεκριμένη κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση κυττάρων KATOIII, MKN45 και NUGC4 με σκοπό τόσο την πραγματοποίηση ανάλυσης FACS, όσο και τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων REAKTn και TG1 ύστερα από την παροδική σίγηση του lncRNA μέσω ενός διαφορετικού και ίσως αποτελεσματικότερου shRNA. Στην **Εικόνα 36** παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα ως προς την έκφραση του GAPDH, αποτελέσματα της qPCR για το REAKTn ύστερα από την παροδική σίγησή του σε κύτταρα KATOIII, MKN45 και NUGC4. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων που διαμολύνθηκε με άδειο φορέα pLL3.7, δηλαδή πλασμίδιο χωρίς κάποιο ένθεμα. Στα κύτταρα KATOIII παρατηρείται μείωση της έκφρασης του REAKTn κατά 11% σε σχέση με το αρνητικό control. Παράλληλα, στα κύτταρα MKN45 η έκφραση του REAKTn δεν μεταβάλλεται καθόλου στις δύο υπό

μελέτη συνθήκες, ενώ στα κύτταρα NUGC4 παρατηρείται μία σίγηση του REAKTn κατά 15% συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.



**Εικόνα 36:** Επίπεδα έκφρασης REAKTn σε κύτταρα KATOIII, MKN45 και NUGC4 ύστερα από παροδική σίγηση με την χρήση του φορέα pLL3.7.

Αντίστοιχα, στην **Εικόνα 37** φαίνονται τα κανονικοποιημένα ως προς την έκφραση του GAPDH, αποτελέσματα της qPCR για το REAKTn TG1 μετά από την παροδική σίγηση του lncRNA στα ίδια κύτταρα. Στα κύτταρα KATOIII παρατηρείται μείωση της έκφρασης του TG1 κατά 25% σε σχέση με το control, ενώ στα κύτταρα MKN45 η έκφραση του TG1 μειώθηκε κατά 18%. Αντίθετα, στα κύτταρα NUGC4 το TG1 υπερεκφράζεται κατά 30% σε σύγκριση με τον μάρτυρα.



**Εικόνα 38:** Επίπεδα έκφρασης TG1 σε κύτταρα KATOIII, MKN45 και NUGC4 ύστερα από παροδική σίγηση του REAKTn με την χρήση του φορέα pLL3.7.

## 5. Συζήτηση

Το γενικότερο ερευνητικό πρόγραμμα του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής εστιάζει στην ανακάλυψη και τον χαρακτηρισμό νέων lncRNAs, τα οποία θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικά διαγνωστικούς ή προγνωστικούς βιοδείκτες, επιλύοντας ένα από τα βασικότερα προβλήματα που αφορούν την νόσο του γαστρικού καρκίνου και δεν είναι άλλο από την καθυστερημένη διάγνωσή της.

Στο πλαίσιο της μελέτης ενός lncRNA με σκοπό την μελλοντική χρήση του ως βιοδείκτη, εμπίπτει και η ταυτοποίηση των γονιδίων στόχων του, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο επιτελείται η δράση του [123]. Γι' αυτόν τον λόγο, το ερευνητικό ενδιαφέρον του εργαστηρίου στρέφεται κυρίως στον χαρακτηρισμό *cis*-δραστικών lncRNA, δηλαδή lncRNA τα οποία στοχεύουν και ρυθμίζουν γονίδια που βρίσκονται σε γειτονική θέση στο γονιδίωμα [124]. Βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί ποικίλα παραδείγματα *cis*-δραστικών lncRNA που συμμετέχουν στις διαδικασίες της καρκινογένεσης, επιδρώντας σε γειτονικά τους γονίδια. Ένα από αυτά είναι το lncRNA HMGA1-lnc, το οποίο φυσιολογικά φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά το ογκογονίδιο HMGA1, που συμμετέχει στην αλλαγή της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης, στοχεύοντας στην ενεργοποίηση της έκφρασης πολλών γονιδίων που προάγουν την καρκινογένεση και στην αναστολή κομβικών ογκοκαταστολέων. Ειδικότερα, μέσω πειράματος σίγησης του HMGA1-lnc με τη χρήση siRNAs παρατηρήθηκε πως η μειορρύθμιση του συγκεκριμένου lncRNA σε κύτταρα πνευμονικού αδενοκαρκινώματος, οδηγεί σε σημαντική αύξηση της έκφρασης του γειτονικού, κωδικοποιητικού γονιδίου HMGA1, επιβεβαιώνοντας την θετική συσχέτιση μεταξύ τους [123]. Παράλληλα, το lncRNA MAPKAPK5-AS1 αποδείχθηκε με τη βοήθεια *in vitro* και *in vivo* δοκιμασιών πως προωθεί την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου μέσω δύο μηχανισμών. Ο ένας από τους δύο περιλαμβάνει την στρατολόγηση, από το συγκεκριμένο lncRNA, ενεργοποιητών της μετάφρασης του γειτονικού του mRNA MK5 (p38 MAP kinase-activated protein kinase), το οποίο στη συνέχεια, οδηγεί στην, μεσολαβούμενη από τον c-Jun, μεταγραφική ενεργοποίηση του παράγοντα SNAI1 που αποτελεί καίριο ρυθμιστή του EMT [125]. Επιπρόσθετα, και στον γαστρικό καρκίνο έχουν χαρακτηριστεί lncRNAs που δρουν *in cis*, όπως είναι το MACC1-AS1, το οποίο όταν υπερεκφράζεται,

σταθεροποιεί το mRNA του γειτονικού του ογκογονιδίου MACC1 μέσω ενεργοποίησης της AMPK και μετατόπισης της Lin28 στο κυτταρόπλασμα. Η ρύθμιση αυτή προάγει την καρκινογένεση σε γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς αποσκοπεί στην ενίσχυση της γλυκόλυσης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας, με αποτέλεσμα να δίνεται στα καρκινικά κύτταρα ένα πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα λόγω μεταβολικής πλαστικότητας [126].

Επομένως, και η παρούσα πτυχιακή εργασία εντάσσεται στο ερευνητικό πρόγραμμα που περιγράφηκε παραπάνω, καθώς στοχεύει στην μελέτη του lncRNA REAKTn, το οποίο μέσω αρχικών βιοπληροφορικών αναλύσεων φαίνεται να συνιστά υποψήφιο *cis*-δραστικό lncRNA που πιθανώς ρυθμίζει το γειτονικό του γονίδιο REAKTn TG1 και κατέχει ρόλο στην προώθηση του γαστρικού καρκίνου.

Αρχικά, για την βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα αλληλούχησης RNA για το REAKTn και τον υποψήφιο στόχο του, TG1, από δείγματα διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών που προέρχονται από ποικίλα όργανα του σώματος, από βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο σε διαφορετικά στάδια, καθώς επίσης και από φυσιολογικό παρακαρκινικό ιστό. Από τα ανωτέρω δεδομένα, παρατηρήθηκε πως η έκφραση του REAKTn και του TG1 αυξάνεται γύρω στις 16 φορές από την φυσιολογική κατάσταση στο πρώτο στάδιο γαστρικού καρκίνου και έπειτα σταθεροποιείται στα υπόλοιπα καρκινικά στάδια (**Εικόνες 18, 19**). Επίσης, από την ανάλυση συσχέτισης της **Εικόνας 20**, καθίσταται εμφανής μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στα δύο υπό μελέτη γονίδια. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο GEPIA για την απεικόνιση δεδομένων έκφρασης των γονιδίων REAKTn και TG1 σε πέντε διαφορετικούς τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος συγκριτικά με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς, από την οποία φαίνεται πως στον γαστρικό καρκίνο η έκφραση των δύο γονιδίων αυξάνεται κατά μέσο όρο έως και 4 φορές στη λογαριθμική κλίμακα, σε σχέση με την φυσιολογική κατάσταση, στην οποία η έκφραση είναι σχεδόν μηδενική (**Εικόνες 21, 22**). Τέλος, η ανάλυση επιβίωσης που έγινε μέσω του εργαλείου GEPIA κατέδειξε συσχέτιση μεταξύ της υψηλής έκφρασης του REAKTn με κακή πρόγνωση των ασθενών με γαστρικό καρκίνο λόγω χαμηλότερου χρόνου επιβίωσης (**Εικόνα 23**). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται πως: i) το lncRNA REAKTn εμφανίζει θετική συσχέτιση με το υποψήφιο mRNA στόχο TG1 και τα δύο αυτά γονίδια υπερεκφράζονται

στον γαστρικό καρκίνο, ii) η αλλαγή στην έκφρασή τους παρατηρείται ήδη από το πρώτο στάδιο της νόσου και σταθεροποιείται στα επόμενα και iii) η υψηλή έκφραση του lncRNA REAKTn σχετίζεται με κακή πρόγνωση για τους ασθενείς γαστρικού καρκίνου. Επομένως, το REAKTn θα μπορούσε να αποτελέσει διαγνωστικό δείκτη για την έγκαιρη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου στα αρχικά και ασυμπτωματικά στάδια, καθώς επίσης και προγνωστικό δείκτη για την πρόβλεψη της εξέλιξης της ασθένειας και την λήψη των κατάλληλων μέτρων δράσης.

Κατά τον αρχικό χαρακτηρισμό του προφίλ έκφρασης του REAKTn σε 12 διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου μέσω qPCR, διαπιστώθηκε η κυτταροειδική και ιστοειδική έκφραση του lncRNA, καθώς εκφράζεται μόνο σε κυτταρικές σειρές στομάχου (HFE145, KATOIII, MKN45) και παχέος εντέρου (Ls174), γεγονός που επιβεβαιώνει και την γενικότερη εξειδικευμένη έκφραση των lncRNAs σε επίπεδο ιστού (**Εικόνα 24**, [127]). Η ίδια ανάλυση για το πιθανό γονίδιο στόχο απέδειξε μία πιθανή συσχέτιση μεταξύ των δύο γονιδίων, καθώς το TG1 παρουσίασε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το lncRNA στις κυτταρικές σειρές, με εξαίρεση τα υψηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα AGS και NCIH520, εύρημα που μπορεί να εξηγηθεί από το ότι το TG1 αποτελεί γονίδιο HOX με ποικίλους ρόλους στην ανάπτυξη σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και κατ'επέκταση όγκους (**Εικόνα 25**, [128]). Επιπλέον, η σημαντική αλλαγή της κλίμακας έκφρασης από το REAKTn στο TG1, δικαιολογείται από το γεγονός ότι τα lncRNAs γενικώς εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα κωδικοποιητικά μετάγραφα [129].

Δεδομένου ότι ο τρόπος δράσης ενός lncRNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον εντοπισμό των μεταγράφων του μέσα στο κύτταρο, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR για την ανάλυση της έκφρασης του REAKTn στα τρία διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα των γαστρικών καρκινικών κυτταρικών σειρών KATOIII και MKN45, που στο προηγούμενο πείραμα εμφάνισαν την υψηλότερη έκφραση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν πως στην κυτταρική σειρά KATOIII, το lncRNA εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στην χρωματίνη (**Εικόνα 26**). Παράλληλα, στην πρώτη βιολογική επανάληψη των κυττάρων MKN45 φαίνεται ξεκάθαρα ο χρωματινικός εντοπισμός του REAKTn, ενώ στην δεύτερη επανάληψη τα αποτελέσματα σχεδόν συμπίπτουν με αυτά της σειράς KATOIII (**Εικόνα 27**). Από τα παραπάνω αποτελέσματα



εξάγεται το συμπέρασμα πως το lncRNA REAKTn κατέχει σίγουρα χρωματινικό εντοπισμό στο κύτταρο και πιθανώς ένα μέρος των μεταγράφων του να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Ο εντοπισμός του REAKTn στην χρωματίνη ενισχύει την υπόθεση της *cis*-δραστικότητάς του, καθώς τα *cis*-δραστικά lncRNAs εντοπίζονται κυρίως σε αυτό το κλάσμα, ώστε να ρυθμίζουν την έκφραση των γειτονικών τους γονιδίων σε μεταγραφικό ή επιγενετικό επίπεδο [130]. Επίσης, η εύρεση κάποιων μεταγράφων του REAKTn και στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, δίνει το έναυσμα για περαιτέρω έρευνα πάνω στις πιθανές λειτουργικές δράσεις του lncRNA και σε αυτό το υποκυτταρικό διαμέρισμα και για την ανακάλυψη πιθανών νέων στόχων του. Ακόμη, για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων υποκυτταρικού εντοπισμού λόγω διαφορών μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων που παρατηρήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ως μελλοντική προσέγγιση προτείνεται η χρήση του RNA Fluorescence *In Situ* Hybridization (RNA FISH) [131].

Σε συνέχεια της μελέτης για τον τρόπο δράσης του lncRNA REAKTn, πραγματοποιήθηκε και ανάλυση της μεταγραφικής του σταθερότητας σε κύτταρα MKN45. Από την **Εικόνα 28** καθίσταται εμφανής η χαμηλή σταθερότητα των μεταγράφων του REAKTn, καθώς περίπου στη μία ώρα ο αριθμός των μεταγράφων του μειώνεται δραματικά. Αυτό ενισχύει ακόμη περισσότερο την θεωρία για την *in cis* δράση του lncRNA, καθώς βιβλιογραφικά αναφέρεται πως τα lncRNAs με πυρηνικό εντοπισμό που λειτουργούν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης γειτονικών γονιδίων, υπόκεινται σε γρήγορη αποικοδόμηση καθώς δρουν αμέσως μετά την μεταγραφή τους στον πυρήνα, χωρίς να χρειάζεται η μετατόπισή τους σε άλλο κυτταρικό διαμέρισμα [132].

Αφού ολοκληρώθηκε ο αρχικός χαρακτηρισμός του REAKTn (προφίλ έκφρασης σε κυτταρικές σειρές, υποκυτταρικός εντοπισμός και μεταγραφική σταθερότητα), πραγματοποιήθηκαν qPCR για το lncRNA και το TG1 σε δείγματα καταστολής τριών μεταγραφικών παραγόντων από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, με στόχο την ανάδειξη του μηχανισμού ρύθμισης του υπό μελέτη lncRNA. Το ενδιαφέρον στράφηκε κυρίως στον μεταγραφικό παράγοντα ελέγχου της κυτταρικής γενεαλογίας KLF5, καθώς προηγούμενες βιοπληροφορικές αναλύσεις δεδομένων CHIP-seq του εργαστηρίου (δεν παρουσιάζονται στην παρούσα πτυχιακή εργασία) είχαν κατατάξει το REAKTn σε μία ομάδα lncRNAs ρυθμιζόμενα από τον KLF5 (lncRNAs rEgulated by

Kruppel gasTric). Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλά lncRNAs που ρυθμίζονται από τον KLF5 και συμβάλλουν στην πρόοδο του γαστρικού καρκίνου, όπως είναι για παράδειγμα το LINC00346, το οποίο υπερεκφράζεται στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, σχετίζεται με κακή πρόγνωση των ασθενών και η έκφρασή του ενισχύεται λόγω πρόσδεσης του KLF5 στον υποκινητή του [133]. Παράλληλα, ο μεταγραφικός παράγοντας KLF5 αποδείχθηκε πως σχηματίζει ένα δίκτυο επαγωγής του γαστρικού καρκίνου σε συνεργασία με τους παράγοντες GATA4 και GATA6, οπότε δείγματα σίγησης και αυτών των παραγόντων ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό με τον KLF5, συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση [122]. Έτσι, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 29** έδειξαν πως οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA δεν επηρεάζουν καθόλου την έκφραση του REAKTn, ενώ στα δείγματα με την 50% σίγηση του KLF5 και με την συνδυαστική καταστολή KLF5/GATA4 παρατηρήθηκε μία μικρή υπερέκφραση του REAKTn, η οποία δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική, καθώς η σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων δεν ήταν αρκετά ισχυρή για να μπορέσει να έχει αξιόπιστη επίδραση στην έκφραση του lncRNA στόχου. Επιπλέον, όταν ο KLF5 καταστέλλεται σε συνδυασμό με τον GATA6, η έκφραση του REAKTn μειώνεται κατά 21%, γεγονός που έρχεται σε ασυμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα. Γενικότερα, από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως οι παράγοντες GATA δεν ελέγχουν την έκφραση του lncRNA REAKTn, ενώ η ρύθμιση του REAKTn από τον KLF5 χρήζει συμπληρωματικής έρευνας. Επιπροσθέτως, σε δείγμα καταστολής του KLF5 κατά 80% η έκφραση του REAKTn TG1 μειώθηκε κατά 63%, αποτέλεσμα που είναι εύλογο δεδομένου ότι ο KLF5 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με καίριο ρόλο στην ανάπτυξη και άρα, είναι λογικό να συμμετέχει στην ρύθμιση γονιδίων HOX, όπως το TG1 (**Εικόνα 30**). Μένει να αποδειχθεί αν η εν λόγω ρύθμιση οφείλεται σε απευθείας σύνδεση του KLF5 στην χρωματίνη του γονιδίου στόχου ή αν σε αυτήν παρεμβάλλεται και το REAKTn.

Ακολούθως, προκειμένου να διαλευκανθεί η σχέση μεταξύ των γονιδίων REAKTn και TG1, πραγματοποιήθηκε πείραμα παροδικής σίγησης του lncRNA REAKTn μέσω shRNA αλληλουχίας κλωνοποιημένης σε πλασμιδιακό φορέα pSicoR, με τη βοήθεια λεντικού συστήματος διαμόλυνσης των κυτταρικών σειρών KATOIII και MKN45. Στην **Εικόνα 34**, παρατηρείται η καταστολή της έκφρασης του REAKTn κατά 12% στα κύτταρα MKN45 και κατά 48% στα κύτταρα KATOIII. Παράλληλα, στα ίδια δείγματα μετρήθηκαν και τα

επίπεδα έκφρασης του TG1, τα οποία αυξήθηκαν κατά 31% στα κύτταρα MKN45 και μειώθηκαν κατά 10% στα KATOIII (**Εικόνα 35**). Η υπερέκφραση του TG1 που παρατηρείται στην κυτταρική σειρά MKN45, δεν έχει βιολογική σημασία καθώς δεν επιτεύχθηκε ισχυρή αναστολή της έκφρασης του lncRNA, ώστε να οδηγήσει σε αξιόπιστη αλλαγή των επιπέδων έκφρασης του πιθανού στόχου. Αντίθετα, στα κύτταρα KATOIII, λαμβάνοντας υπόψη την σχεδόν κατά το ήμισυ μείωση της έκφρασης του REAKTn, η επακόλουθη 10% μείωση των επιπέδων έκφρασης του TG1, θα μπορούσε να αποτελεί το πρώτο βήμα για την πειραματική απόδειξη της θετικής ρύθμισης μεταξύ των δύο γονιδίων. Με στόχο την επίτευξη καλύτερων ποσοστών σίγησης του REAKTn για την ακριβέστερη αξιολόγηση της σχέσης REAKTn-TG1, χρησιμοποιήθηκε μία δεύτερη DNA κατασκευή που έφερε μία διαφορετική shRNA αλληλουχία που στοχεύει το REAKTn και ήταν κλωνοποιημένη σε φορέα pLL3.7. Ωστόσο, η αλλαγή της shRNA αλληλουχίας και του πλασμιδιακού φορέα δεν απέφερε ισχυρότερα ποσοστά καταστολής της έκφρασης του lncRNA σε καμία από τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν (**Εικόνα 36**) και συνεπώς, οι μικρές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση του TG1 δεν οφείλονται στο REAKTn (**Εικόνα 37**). Παρόλα αυτά, εξαιτίας του GFP γονιδίου που περιλαμβάνεται στην αλληλουχία του φορέα pLL3.7, κατέστη δυνατή η ανάλυση FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), για την μέτρηση του ποσοστού επιτυχούς διαμόλυνσης των κυττάρων από τους λεντιούς, παράγοντας που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα της σίγησης. Από την ανάλυση διαπιστώθηκαν μέτρια ποσοστά διαμόλυνσης των κυτταρικών σειρών (**Εικόνες 32, 33**), γεγονός που επεξηγεί εν μέρει την μη επιτυχή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης του REAKTn. Ειδικότερα στα κύτταρα KATOIII που παρουσίασαν και το μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης (48%) του lncRNA REAKTn, το ποσοστό επιτυχούς διαμόλυνσής τους από τους λεντιούς ήταν μόλις 30,84%, γεγονός που καταδεικνύει την πληθώρα των παραγόντων που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της σίγησης (**Εικόνες 32, 34**). Για παράδειγμα, μία ακόμη παράμετρος που συμβάλλει στην επιτυχία της γονιδιακής σίγησης μέσω της τεχνολογίας RNAi είναι τα επίπεδα έκφρασης του ίδιου του shRNA στα κύτταρα, τα οποία θα μπορούσαν να προσδιοριστούν μέσω μίας stem-loop qPCR [134].

Εν κατακλείδι, στις μελλοντικές προσεγγίσεις της μελέτης του REAKTn θα μπορούσαν να περιλαμβάνονται πειράματα με την χρήση της τεχνολογίας CRISPR-Cas9 για

knockout του lncRNA ή της παραλλαγής CRISPR activation για την υπερέκφραση του REAKTn και παρατήρηση τόσο των επιπέδων έκφρασης του TG1 ώστε να διαλευκανθεί η σχέση μεταξύ των δύο γονιδίων, όσο και του φαινοτύπου σε κάθε περίπτωση για την συλλογή πληροφοριών σχετικά με την λειτουργία του συγκεκριμένου lncRNA [135, 136]. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι συνοδεύονται από την πιθανότητα να μην είναι δυνατός ο σχηματισμός κυττάρων-κλώνων, λόγω των έντονων αλλαγών στην έκφραση ζωτικής σημασίας γονιδίων. Επομένως, εναλλακτική λύση θα μπορούσε να αποτελέσει η δημιουργία ενός μοριακού εργαλείου επαγόμενης από την τετρακυκλίνη σίγησης (tetracycline-inducible system) του REAKTn, ώστε η μειωμένη έκφραση του lncRNA να μην είναι μόνιμη και πιθανώς επιβλαβής για τα κύτταρα [137].

## Βιβλιογραφία

1. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.
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. Shah, D. and D. Bentrem, *Environmental and genetic risk factors for gastric cancer*. J Surg Oncol, 2022. **125**(7): p. 1096-1103.
4. Ferlay, J., et al., *Cancer statistics for the year 2020: An overview*. Int J Cancer, 2021.
5. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
6. Thrift, A.P. and T.H. Nguyen, *Gastric Cancer Epidemiology*. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2021. **31**(3): p. 425-439.
7. Sexton, R.E., et al., *Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies*. Cancer Metastasis Rev, 2020. **39**(4): p. 1179-1203.
8. Hatakeyama, M., *Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 688-94.
9. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994. **61**: p. 1-241.
10. Slavin, T.P., et al., *Genetics of gastric cancer: what do we know about the genetic risks?* Transl Gastroenterol Hepatol, 2019. **4**: p. 55.
11. Oue, N., et al., *Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells*. Int J Clin Oncol, 2019. **24**(7): p. 771-778.
12. Seeneevassen, L., et al., *Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
13. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17036.
14. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
15. Waldum, H.L. and R. Fossmark, *Types of Gastric Carcinomas*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(12).
16. 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.
17. Zheng, H., et al., *Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray*. J Clin Pathol, 2007. **60**(3): p. 273-7.
18. Polkowski, W., et al., *Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction*. Ann Surg Oncol, 1999. **6**(3): p. 290-7.
19. Yang, H., W.J. Yang, and B. Hu, *Gastric epithelial histology and precancerous conditions*. World J Gastrointest Oncol, 2022. **14**(2): p. 396-412.
20. Kang, J.M., et al., *CDX1 and CDX2 expression in intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer*. J Korean Med Sci, 2011. **26**(5): p. 647-53.

21. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
22. Berlth, F., et al., *Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(19): p. 5679-84.
23. Liu, L., et al., *A cohort study and meta-analysis between histopathological classification and prognosis of gastric carcinoma*. Anticancer Agents Med Chem, 2013. **13**(2): p. 227-34.
24. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications*. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
25. Togasaki, K., et al., *Wnt Signaling Shapes the Histologic Variation in Diffuse Gastric Cancer*. Gastroenterology, 2021. **160**(3): p. 823-830.
26. Praud, D., et al., *Cigarette smoking and gastric cancer in the Stomach Cancer Pooling (StoP) Project*. Eur J Cancer Prev, 2018. **27**(2): p. 124-133.
27. Iyer, P., et al., *Diffuse gastric cancer: histologic, molecular, and genetic basis of disease*. Transl Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**: p. 52.
28. Chia, N.Y. and P. Tan, *Molecular classification of gastric cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(5): p. 763-9.
29. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
30. Yang, J., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype*. Cancer Lett, 2020. **495**: p. 191-199.
31. Shannon-Lowe, C. and A. Rickinson, *The Global Landscape of EBV-Associated Tumors*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 713.
32. Imai, S., J. Nishikawa, and K. Takada, *Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 4371-8.
33. Saito, M. and K. Kono, *Landscape of EBV-positive gastric cancer*. Gastric Cancer, 2021. **24**(5): p. 983-989.
34. Sakuma, K., et al., *High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma*. Int J Cancer, 2004. **112**(2): p. 273-8.
35. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *PI3K-PKB/Akt pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a011189.
36. Sopjani, M., et al., *JAK2-mediated Intracellular Signaling*. Curr Mol Med, 2021. **21**(5): p. 417-425.
37. Zak, K.M., et al., *Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2*. Structure, 2017. **25**(8): p. 1163-1174.
38. Rodriquenz, M.G., et al., *MSI and EBV Positive Gastric Cancer's Subgroups and Their Link With Novel Immunotherapy*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
39. Ellegren, H., *Microsatellites: simple sequences with complex evolution*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(6): p. 435-45.
40. Ratti, M., et al., *Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(22): p. 4151-4162.
41. Puliga, E., et al., *Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows*. Cancer Treat Rev, 2021. **95**: p. 102175.

42. Hu, G., et al., *Epigenetic Silencing of the MLH1 Promoter in Relation to the Development of Gastric Cancer and its use as a Biomarker for Patients with Microsatellite Instability: a Systematic Analysis*. Cell Physiol Biochem, 2018. **45**(1): p. 148-162.
43. Cristescu, R., et al., *Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes*. Nat Med, 2015. **21**(5): p. 449-56.
44. Usui, G., et al., *DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer*. Digestion, 2021. **102**(1): p. 25-32.
45. Shenoy, S., *CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 10477-10486.
46. 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.
47. Kage, H., et al., *Dichotomous roles of claudins as tumor promoters or suppressors: lessons from knockout mice*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(23): p. 4663-4672.
48. Dhakras, P., et al., *Gastrointestinal cancers: current biomarkers in esophageal and gastric adenocarcinoma*. Transl Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**: p. 55.
49. Geigl, J.B., et al., *Defining 'chromosomal instability'*. Trends Genet, 2008. **24**(2): p. 64-9.
50. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology*. Neoplasia, 2017. **19**(5): p. 412-420.
51. Aubrey, B.J., A. Strasser, and G.L. Kelly, *Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(5).
52. Lim, B., et al., *Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1190-201.
53. Song, Z., et al., *Progress in the treatment of advanced gastric cancer*. Tumour Biol, 2017. **39**(7): p. 1010428317714626.
54. Cann, C. and K.K. Ciombor, *Systemic therapy for gastric cancer: Perioperative strategies and beyond*. J Surg Oncol, 2022. **125**(7): p. 1151-1160.
55. Tan, Z., *Recent Advances in the Surgical Treatment of Advanced Gastric Cancer: A Review*. Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 3537-3541.
56. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
57. Johnston, F.M. and M. Beckman, *Updates on Management of Gastric Cancer*. Curr Oncol Rep, 2019. **21**(8): p. 67.
58. Lee, S., et al., *Gastric cancer screening uptake trends in Korea: results for the National Cancer Screening Program from 2002 to 2011: a prospective cross-sectional study*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(8): p. e533.
59. Matsuoka, T. and M. Yashiro, *Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(26): p. 2818-2832.
60. Lee, H., Z. Zhang, and H.M. Krause, *Long Noncoding RNAs and Repetitive Elements: Junk or Intimate Evolutionary Partners?* Trends Genet, 2019. **35**(12): p. 892-902.
61. Wu, R., et al., *Characters, functions and clinical perspectives of long non-coding RNAs*. Mol Genet Genomics, 2016. **291**(3): p. 1013-33.
62. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
63. Han Li, C. and Y. Chen, *Small and Long Non-Coding RNAs: Novel Targets in Perspective Cancer Therapy*. Curr Genomics, 2015. **16**(5): p. 319-26.

64. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
65. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
66. Qin, T., J. Li, and K.Q. Zhang, *Structure, Regulation, and Function of Linear and Circular Long Non-Coding RNAs*. Front Genet, 2020. **11**: p. 150.
67. Jiang, C., et al., *Identifying and functionally characterizing tissue-specific and ubiquitously expressed human lncRNAs*. Oncotarget, 2016. **7**(6): p. 7120-33.
68. Batista, P.J. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease*. Cell, 2013. **152**(6): p. 1298-307.
69. Carlevaro-Fita, J. and R. Johnson, *Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization*. Mol Cell, 2019. **73**(5): p. 869-883.
70. Cabili, M.N., et al., *Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution*. Genome Biol, 2015. **16**(1): p. 20.
71. Miao, H., et al., *A long noncoding RNA distributed in both nucleus and cytoplasm operates in the PYCARD-regulated apoptosis by coordinating the epigenetic and translational regulation*. PLoS Genet, 2019. **15**(5): p. e1008144.
72. Hombach, S. and M. Kretz, *Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning*. Adv Exp Med Biol, 2016. **937**: p. 3-17.
73. Yao, R.W., Y. Wang, and L.L. Chen, *Cellular functions of long noncoding RNAs*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(5): p. 542-551.
74. Ouyang, J., et al., *Long non-coding RNAs are involved in alternative splicing and promote cancer progression*. Br J Cancer, 2022. **126**(8): p. 1113-1124.
75. Fox, A.H., et al., *Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation*. Trends Biochem Sci, 2018. **43**(2): p. 124-135.
76. Rashid, F., A. Shah, and G. Shan, *Long Non-coding RNAs in the Cytoplasm*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(2): p. 73-80.
77. Paraskevopoulou, M.D. and A.G. Hatzigeorgiou, *Analyzing MiRNA-LncRNA Interactions*. Methods Mol Biol, 2016. **1402**: p. 271-286.
78. Li, L.J., et al., *Translation of noncoding RNAs: Focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs*. Exp Cell Res, 2017. **361**(1): p. 1-8.
79. Yang, F., et al., *Reciprocal regulation of HIF-1alpha and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect*. Mol Cell, 2014. **53**(1): p. 88-100.
80. Bhat, A.A., et al., *Role of non-coding RNA networks in leukemia progression, metastasis and drug resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 57.
81. Shi, X., et al., *Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases*. Cancer Lett, 2013. **339**(2): p. 159-66.
82. Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.
83. Gil, N. and I. Ulitsky, *Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs*. Nat Rev Genet, 2020. **21**(2): p. 102-117.
84. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *lncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
85. Engreitz, J.M., et al., *Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing*. Nature, 2016. **539**(7629): p. 452-455.



86. Groff, A.F., et al., *In Vivo Characterization of Linc-p21 Reveals Functional cis-Regulatory DNA Elements*. Cell Rep, 2016. **16**(8): p. 2178-2186.
87. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
88. Garitano-Trojaola, A., et al., *Long non-coding RNAs in haematological malignancies*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(8): p. 15386-422.
89. Lee, S., et al., *Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins*. Cell, 2016. **164**(1-2): p. 69-80.
90. He, J. and X. Ma, *Interaction Between LncRNA and UPF1 in Tumors*. Front Genet, 2021. **12**: p. 624905.
91. Lange, M., R. Begolli, and A. Giakountis, *Non-Coding Variants in Cancer: Mechanistic Insights and Clinical Potential for Personalized Medicine*. Noncoding RNA, 2021. **7**(3).
92. Bartonicek, N., J.L. Maag, and M.E. Dinger, *Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 43.
93. Peng, W.X., P. Koirala, and Y.Y. Mo, *LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer*. Oncogene, 2017. **36**(41): p. 5661-5667.
94. Lan, W.G., et al., *Silencing of long non-coding RNA ANRIL inhibits the development of multidrug resistance in gastric cancer cells*. Oncol Rep, 2016. **36**(1): p. 263-70.
95. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm*. Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
96. Li, H., et al., *Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(8): p. 2318-29.
97. Liu, J., et al., *LncRNA H19 Promoted the Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastasis in Gastric Cancer via Activating Wnt/beta-Catenin Signaling*. Dig Dis, 2022. **40**(4): p. 436-447.
98. Sun, W., et al., *Roles of long noncoding RNAs in gastric cancer and their clinical applications*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(11): p. 2231-7.
99. Sun, M., et al., *Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 319.
100. Wei, G.H. and X. Wang, *lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017. **21**(17): p. 3850-3856.
101. Fattahi, S., et al., *LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: A novel approach to personalized medicine*. J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3189-3206.
102. 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.
103. Gu, Y., et al., *LncRNAs: emerging biomarkers in gastric cancer*. Future Oncol, 2015. **11**(17): p. 2427-41.
104. Bolha, L., M. Ravnik-Glavac, and D. Glavac, *Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer*. Dis Markers, 2017. **2017**: p. 7243968.
105. Silva, A., M. Bullock, and G. Calin, *The Clinical Relevance of Long Non-Coding RNAs in Cancer*. Cancers (Basel), 2015. **7**(4): p. 2169-82.

106. Shi, T., G. Gao, and Y. Cao, *Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics*. Dis Markers, 2016. **2016**: p. 9085195.
107. Brotto, D.B., et al., *Contributions of HOX genes to cancer hallmarks: Enrichment pathway analysis and review*. Tumour Biol, 2020. **42**(5): p. 1010428320918050.
108. Shenoy, U.S., et al., *Molecular implications of HOX genes targeting multiple signaling pathways in cancer*. Cell Biol Toxicol, 2022. **38**(1): p. 1-30.
109. Lappin, T.R., et al., *HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms*. Ulster Med J, 2006. **75**(1): p. 23-31.
110. Li, B., Q. Huang, and G.H. Wei, *The Role of HOX Transcription Factors in Cancer Predisposition and Progression*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
111. Shah, N. and S. Sukumar, *The Hox genes and their roles in oncogenesis*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(5): p. 361-71.
112. Yuan, C., et al., *Elevated HOXA1 expression correlates with accelerated tumor cell proliferation and poor prognosis in gastric cancer partly via cyclin D1*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**: p. 15.
113. Ding, W.J., et al., *HOXB8 promotes tumor metastasis and the epithelial-mesenchymal transition via ZEB2 targets in gastric cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2017. **143**(3): p. 385-397.
114. Li, J., et al., *HOXC10 promotes cell migration, invasion, and tumor growth in gastric carcinoma cells through upregulating proinflammatory cytokines*. J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3579-3591.
115. Zhu, H., et al., *HOXD9 promotes the growth, invasion and metastasis of gastric cancer cells by transcriptional activation of RUFY3*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 412.
116. Botti, G., et al., *Noncoding RNAs within the HOX gene network in tumor pathogenesis and progression*. J Cell Physiol, 2018. **234**(1): p. 395-413.
117. Kong, W., et al., *Long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR: Pathogenic roles and therapeutic opportunities in gastric cancer*. Genes Dis, 2022. **9**(5): p. 1269-1280.
118. Qu, X., et al., *HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) in cancer*. Cancer Lett, 2019. **454**: p. 90-97.
119. Ghafouri-Fard, S., et al., *HOX transcript antisense RNA: An oncogenic lncRNA in diverse malignancies*. Exp Mol Pathol, 2021. **118**: p. 104578.
120. Lambeth, L.S. and C.A. Smith, *Short hairpin RNA-mediated gene silencing*. Methods Mol Biol, 2013. **942**: p. 205-32.
121. Cheng, Y., et al., *LARP7 is a potential tumor suppressor gene in gastric cancer*. Lab Invest, 2012. **92**(7): p. 1013-9.
122. 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.
123. Stewart, G.L., et al., *Deregulation of a Cis-Acting lncRNA in Non-small Cell Lung Cancer May Control HMGA1 Expression*. Front Genet, 2020. **11**: p. 615378.
124. Fatica, A. and I. Bozzoni, *Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(1): p. 7-21.
125. Yang, T., et al., *Long noncoding RNA MAPKAPK5-AS1 promotes colorectal cancer progression by cis-regulating the nearby gene MK5 and acting as a let-7f-1-3p sponge*. J Exp Clin Cancer Res, 2020. **39**(1): p. 139.

126. Zhao, Y., et al., *The lncRNA MACC1-AS1 promotes gastric cancer cell metabolic plasticity via AMPK/Lin28 mediated mRNA stability of MACC1*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 69.
127. Ward, M., et al., *Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs*. J Hum Transcr, 2015. **1**(1): p. 2-9.
128. Luo, Z., S.K. Rhie, and P.J. Farnham, *The Enigmatic HOX Genes: Can We Crack Their Code?* Cancers (Basel), 2019. **11**(3).
129. Park, Y.B. and J.M. Kim, *Identification of long non-coding RNA-mRNA interactions and genome-wide lncRNA annotation in animal transcriptome profiling*. J Anim Sci Technol, 2023. **65**(2): p. 293-310.
130. Tong, C. and Y. Yin, *Localization of RNAs in the nucleus: cis- and trans- regulation*. RNA Biol, 2021. **18**(12): p. 2073-2086.
131. Hinten, M., et al., *Visualizing Long Noncoding RNAs on Chromatin*. Methods Mol Biol, 2016. **1402**: p. 147-164.
132. Clark, M.B., et al., *Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability*. Genome Res, 2012. **22**(5): p. 885-98.
133. Xu, T.P., et al., *KLF5 and MYC modulated LINC00346 contributes to gastric cancer progression through acting as a competing endogenous RNA and indicates poor outcome*. Cell Death Differ, 2019. **26**(11): p. 2179-2193.
134. Cheng, A., et al., *Stem-loop RT-PCR quantification of siRNAs in vitro and in vivo*. Oligonucleotides, 2009. **19**(2): p. 203-8.
135. Rosenlund, I.A., et al., *CRISPR/Cas9 to Silence Long Non-Coding RNAs*. Methods Mol Biol, 2021. **2348**: p. 175-187.
136. Rankin, C.R., et al., *Overexpressing Long Noncoding RNAs Using Gene-activating CRISPR*. J Vis Exp, 2019(145).
137. Li, J., et al., *shRNA targeting long non-coding RNA CCAT2 controlled by tetracycline-inducible system inhibits progression of bladder cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(20): p. 28989-97.