



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΠΕΓΚΟΛΛΙ ΡΟΝΤΙΟΛΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

**Ρύθμιση της έκφρασης lncRNA από τους μεταγραφικούς παράγοντες
KLF5/GATA4/GATA6 στον καρκίνο του στομάχου**

**Regulation of lncRNA expression by KLF5/GATA4/GATA6 Transcription
factors in Gastric Cancer**

Επιβλέπων Καθηγητής: Αντώνιος Γιακουντής

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Παναγιώτης Λιάκος: Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη:

Ο καρκίνος του στομάχου χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας παγκοσμίως. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από έντονη ετερογένεια ανάμεσα στους ασθενείς και κατηγοριοποιείται σε πολλούς υπότυπους με βάση το ιστολογικό και το μοριακό της υπόβαθρο. Το βασικό πρόβλημα έγκειται στην καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, η οποία στα αρχικά της στάδια είναι ασυμπτωματική, με αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα θνησιμότητας ειδικά για τις πιο επιθετικές μορφές. Για αυτόν τον λόγο είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης διαγνωστικών δεικτών με υψηλή εξειδίκευση έναντι των αρχικών σταδίων της νόσου. Ολοένα και περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται στο μοριακό και γενετικό υπόβαθρο του γαστρικού καρκίνου, ανακαλύπτοντας γονίδια τα οποία εμφανίζουν γενετική ποικιλομορφία ως προς τον αριθμό των αντιγράφων τους στον καρκίνο και χαρακτηρίζονται από ογκογόνο δράση. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι μεταγραφικοί παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6 οι οποίοι φυσιολογικά δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής γενεαλογίας (lineage-survival factors) αφού εμπλέκονται στη διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων στα αναπτυξιακά στάδια του στομάχου. Οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες συνθέτουν ένα ογκογόνο δίκτυο στον γαστρικό καρκίνο και είναι σημαντικοί για την εξέλιξη της ασθένειας. Λόγω της σημαντικής φυσιολογικής τους λειτουργίας σε πολλούς ιστούς αυτές οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες δεν μπορούν να αποτελέσουν άμεσους θεραπευτικούς στόχους, συνεπώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα γονίδια-στόχοι τα οποία ελέγχουν. Αποδέκτες αυτής της ρύθμισης αποτελούν και τα lncRNAs τα οποία χαρακτηρίζονται από αυστηρή ιστο-ειδική έκφραση και παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου συχνά εξειδικεύοντας την δράση μεταγραφικών παραγόντων. Σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας ήταν η εύρεση lncRNA που να ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6. Για τον σκοπό αυτό έγινε βιοπληροφορική ανάλυση με χρήση δεδομένων CHIP-seq καθώς και μετα-ανάλυση δεδομένων RNA-seq από βιοψίες ασθενών. Επίσης μέσω της κλωνοποίησης shRNA σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, επιτεύχθηκε η παροδική σίγηση του KLF5, με σκοπό την φαινοτυπική μελέτη αλλά και την ταυτοποίηση 3 lncRNAs που ελέγχονται από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 και ονομάστηκαν REAKTs (lincRNA rEgulated by Kruppel GasTric).

Abstract:

Stomach cancer is a high incidence and high mortality disease worldwide. This cancer type is characterized by strong heterogeneity among patients and is categorized into many subtypes based on histological and molecular criteria. The high mortality rates relate with the delayed diagnosis of the disease, which is asymptomatic in its early stages. Therefore, it is imperative to develop highly specialized diagnostic markers. Biomedical research that focuses on the molecular and genetic background of gastric cancer has discovered oncogenes that predispose for gastric cancer due to genetic amplification of their loci. Such loci include the lineage-survival KLF5/GATA4/GATA6 transcription factors that normally are involved in the maintenance of specific cell types during the developmental stages of the stomach. These transcription factors interact and form an oncogenic regulatory complex with a crucial role in gastrointestinal cancer progression. However, their important physiological role excludes them from therapeutic targeting, so the target genes they control are of particular interest. Such targets are lncRNAs that are characterized by tissue-specific expression and play an important role in many types of cancer, specializing the function of transcription factors during progression of the disease. The goal of this thesis was to identify lncRNAs regulated by these transcription factors. To this end, bioinformatics analysis was performed using ChIP-seq data as well as RNA-seq data from patient biopsies. Also, through shRNA cloning into appropriate plasmid vectors, transient silencing of KLF5 was achieved, the cellular phenotype of KLF5 knock-down was observed and experimental validation of three lncRNAs controlled by the transcription factor KLF5 and termed REAKTs (lincRNA rEgulated by Kruppel GasTric) was performed.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα άτομα που συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Αντώνιο Γιακουντή για την αμέριστη συμπαράσταση που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου, τον κ.Ματθιόπουλο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να γίνω μέλος του εργαστηρίου και τον κ.Λιάκο για τη συμμετοχή του στην συμβουλευτική επιτροπή. Επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις συμβουλές τους και τη βοήθειά τους. Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένειά μου που πάντα αποτελούν την πιο σημαντική συνιστώσα της πορείας μου.

Περιεχόμενα

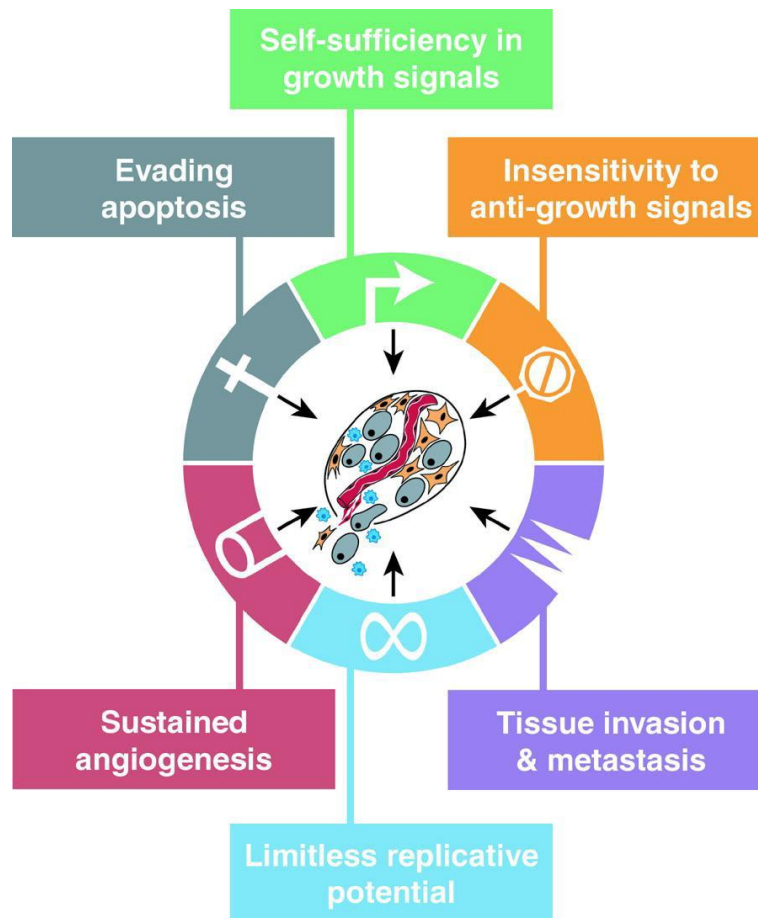
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Η βιολογία και τα βασικά χαρακτηριστικά της νεοπλασίας.....	1
1.2 Ο καρκίνος του στομάχου.....	6
1.2.1 Ανατομία και ιστολογία στομάχου.....	7
1.2.2 Τοπογραφική ανατομική ταξινόμηση υποτύπων καρκίνου του στομάχου.....	11
1.2.3 Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου.....	12
1.2.4 Μοριακή ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου.....	14
1.3 Εισαγωγή στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας KLFs και GATAs.....	18
1.3.1 Krüppel-like factors.....	18
1.3.2 GATAs.....	20
1.4 Δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στον καρκίνο του στομάχου.....	21
1.5 Long Non-Coding RNAs.....	23
1.5.1 Εισαγωγή στα Long Non-Coding RNAs.....	23
1.5.2 LncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες.....	27
ΣΚΟΠΟΣ.....	30
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	31
2.1 Υλικά.....	31
2.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς.....	31
2.1.2 Κυτταρικές σειρές.....	33
2.2 Μέθοδοι.....	33
2.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	33
2.2.2 Προετοιμασία των ολιγονουκλεοτιδίων shRNA και αντίδραση λιγάσης.....	34
2.2.3 Κλωνοποίηση πλασμιδιακών κατασκευών μέσω μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων.....	35
2.2.4 Διαγνωστικές πέψεις και διαγνωστική PCR.....	35
2.2.5 RNA Extraction.....	37
2.2.6 DNase Treatment.....	37
2.2.7 cDNA Synthesis.....	38
2.2.8 Quantitative PCR (qPCR).....	39
2.2.9 Colony Formation Assay (CFA).....	39

2.2.10 Απομόνωση πρωτεϊνών και μέτρηση συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford ...	40
2.2.11 Western Blot.....	41
3. Αποτελέσματα	44
3.1 Βιοπληροφορικό μέρος.....	46
3.1.1 Βιοπληροφορική ανάλυση μέσω Galaxy.....	46
3.1.2 Ανάλυση θερμικού χάρτη για τα σημεία πρόσδεσης των KLF5/GATA4/GATA6 ...	47
3.1.3 Μετα-ανάλυση δεδομένων RNA-seq	49
3.2 Πειραματικό μέρος.....	52
3.2.1 Διαγνωστικές πέψεις και PCR	52
3.2.2 Έκφραση μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 σε κυτταρικές σειρές	55
3.2.3 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης του KLF5 σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο	58
3.2.4 Αποτελέσματα CFA και παρατήρηση φαινοτύπου	59
3.2.5 Έλεγχος της έκφρασης των lncRNAs REAKT1/2/3 υπό τη μεταγραφική σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα KLF5.....	60
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση	62
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	67
5.1 Αναπτυξιακή στομάχου και πρότυπα έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων: από τον εμβρυϊκό στον ενήλικο στόμαχο.....	67
5.2 Lineage Survival Oncogenes	70
6. Βιβλιογραφία.....	73

1.Εισαγωγή

1.1 Η βιολογία και τα βασικά χαρακτηριστικά της νεοπλασίας

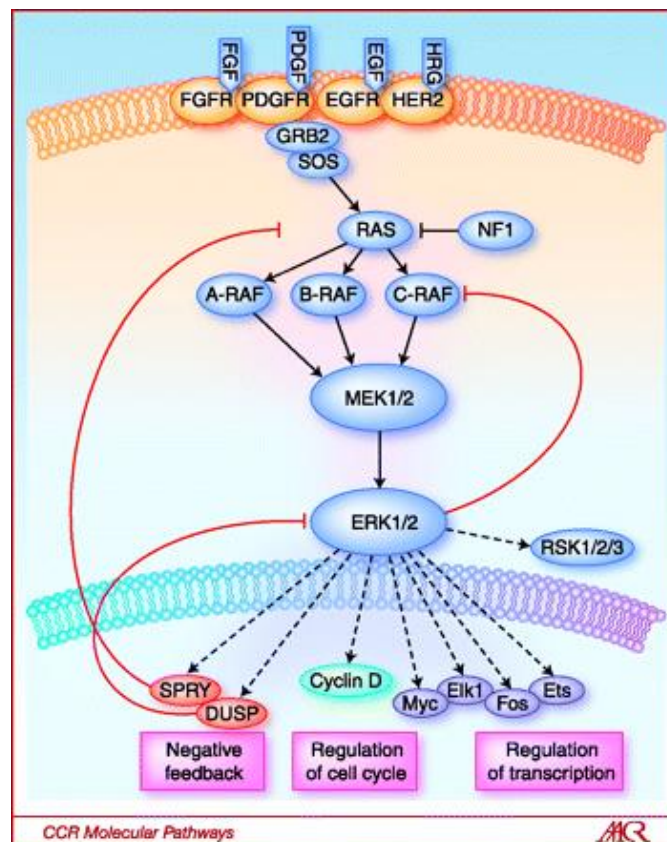
Η ασθένεια του καρκίνου αποτελεί μια σύγχρονη μάστιγα για τον άνθρωπο, που παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στα πλαίσια της διάγνωσης και θεραπείας, συνεχίζει να εμφανίζει ολοένα και μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας παγκοσμίως². Υπάρχουν πολλοί τύποι νεοπλασίας που αφορούν διαφορετικούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος με ετερογένεια στα ποσοστά επιδημιολογίας και προσδόκιμου ζωής ανάλογα με τη χώρα, την ηλικία και το φύλο³⁻⁵. Παρά την ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο, υπάρχουν κάποια βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, κοινά στους διάφορους τύπους νεοπλασίας. Τα χαρακτηριστικά αυτά αφορούν τη διατάραξη της ομοιόστασης των κυττάρων στη διαδικασία πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τη δημιουργία ενός μικρο-περιβάλλοντος που ευνοεί τον καρκινικό φαινότυπο^{6,7} (Εικ.1). Υπάρχουν έξι βασικά σημεία στη πολυδιάστατη ανάπτυξη της νεοπλασίας:



Εικόνα 1. Τα βασικά χαρακτηριστικά νεοπλασίας⁶.

Ενισχυμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό:

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι μια διεργασία οργανωμένη και αυστηρά ελεγχόμενη που βασίζεται σε συγκεκριμένα σημεία ελέγχου τα οποία θα καθορίσουν το μέγεθος του κυττάρου, την αντιγραφή του DNA, και την απόκριση σε βλάβη του DNA⁸. Πρόκειται για ένα σηματοδοτικό δίκτυο με βασικούς τελεστές κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες τυροσίνης (Cyclin-Dependent Kinases-CDKs), και το οποίο επάγεται από αυξητικούς/μιτογόνους παράγοντες⁹⁻¹¹. Στη νεοπλασία φαίνεται να διαταράσσεται αυτή η ρύθμιση με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση επηρεάζεται είτε λόγω της συνεχούς παραγωγής αυξητικών παραγόντων μέσα στο κύτταρο αλλά και στον εξωκυττάριο χώρο επηρεάζοντας και παρακείμενα κύτταρα, είτε λόγω αυξημένης παραγωγής των αντίστοιχων υποδοχέων αυξητικών παραγόντων καθιστώντας τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στη σηματοδότηση^{6,12,13}. Η υπερενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών Ras-ERK και PI3K-Akt είναι πολύ συχνές περιπτώσεις στον φαινότυπο του εκτεταμένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικ.2). Τελικός στόχος και των δύο μονοπατιών στον πυρήνα είναι ο μεταγραφικός παράγοντας MYC που επάγει την έκφραση CDKs και κυκλινών που είναι βασικοί ρυθμιστές των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου^{14,15}.



Εικόνα 2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK. Μέσα από έναν καταρράκτη σηματοδοτικών αντιδράσεων η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του ERK ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και επάγουν τον ογκογόνο φαινότυπο¹⁶.

Πολλαπλασιαστική αθανασία:

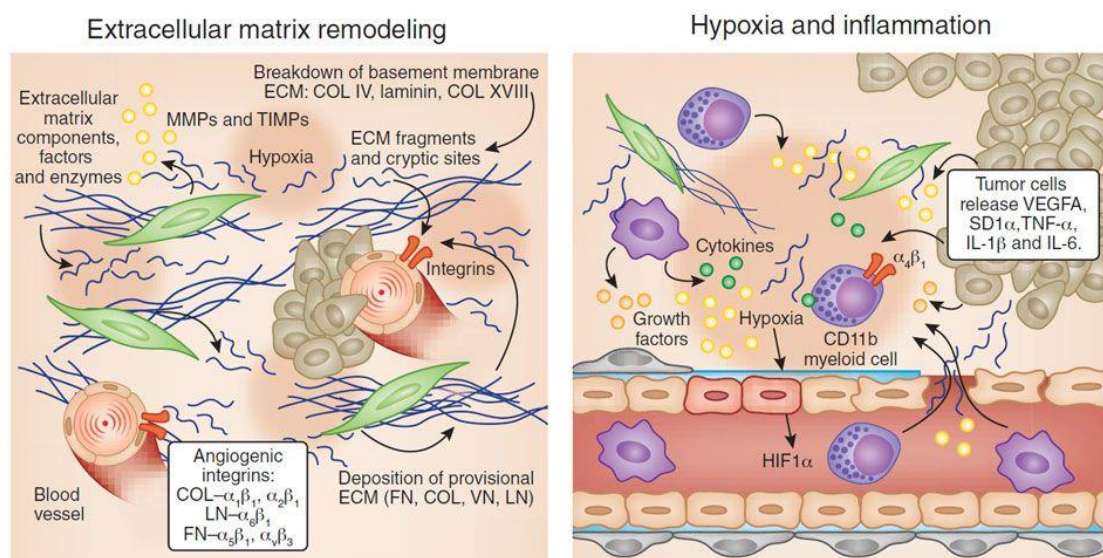
Σε συνδυασμό με την έντονη πολλαπλασιαστική ικανότητα, το καρκινικό κύτταρο καταφέρνει να διαιρείται συνεχόμενα αποφεύγοντας το φαινόμενο της γήρανσης και τελικά του κυτταρικού θανάτου. Όπως είναι γνωστό, το φαινόμενο της γήρανσης του κυττάρου είναι άμεσα συνδεδεμένο με την ύπαρξη τελομερών στο τέλος των χρωμοσωμάτων και τη δράση του αντίστοιχου ενζύμου, της τελομεράσης¹⁷. Οι αλληλουχίες των τελομερών 'προστατεύουν' τα χρωμοσώματα και με τη πάροδο του χρόνου περιορίζονται. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται υψηλή έκφραση του ενζύμου της τελομεράσης και γενικότερα η ικανότητα να διατηρούν το DNA των τελομερών^{6,18}. Αυτό τους προδίδει ένα προφίλ αθανασίας στο οποίο το δυναμικό της κυτταρικής διαίρεσης είναι ενισχυμένο και αποκτούν έναν ακόμη 'σύμμαχο' στο πλαίσιο της αυτονομίας¹⁹.

Αντίσταση σε ογκοκατασταλτικά σήματα:

Πολλές είναι οι περιπτώσεις καρκίνου που οφείλονται σε μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια η οποίες οδηγούν στην απενεργοποίηση τους²⁰. Συνήθως εμπλέκονται σε πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμίζοντας την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό. Τα πιο συχνά μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι η πρωτεΐνη TP53 και η RB (πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος). Το γονίδιο της TP53 χαρακτηρίζεται από έντονη γενετική παραλλαγή, και κατ' επέκταση μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης οι οποίες ενισχύουν τον κακοήθη φαινότυπο²¹. Η φυσιολογική της λειτουργία είναι αντι-αποπτωτική, απώλεια της λειτουργίας αυτής στη νεοπλασία, συνεπάγεται απορρύθμιση της απόπτωσης με επακόλουθη την συνεχή κυτταροδιαίρεση. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος ρυθμίζει γενικότερα την διαδοχή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου σε διάφορα σημεία, και πιο συγκεκριμένα η δράση της εστιάζει πριν από τη φάση S όπου δρα ως αναστολέας της κυτταρικής διαίρεσης²². Στους περισσότερους καρκίνους το μονοπάτι Rb είναι απενεργοποιημένο είτε λόγω μεταλλάξεων/ελλείψεων στο γονίδιο είτε λόγω απενεργοποίησής του²³. Επιπλέον ρυθμιστής κατασταλτικών σημάτων είναι και το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β, το οποίο έχει βρεθεί πως επαναπρογραμματίζεται στις νεοπλασίες, παρεκκλίνει από την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial Mesenchymal Transition-EMT). Η EMT οδηγεί σε έναν πιο μεσεγχυματικό φαινότυπο στον οποίο η κυτταρική δομή δεν είναι αυστηρή και καθορισμένη όπως στον επιθηλιακό και δίνει στα καρκινικά κύτταρα μια πιο επιθετική και διηθητική μορφή^{24 25,26}.

Επαγωγή αγγειογένεσης:

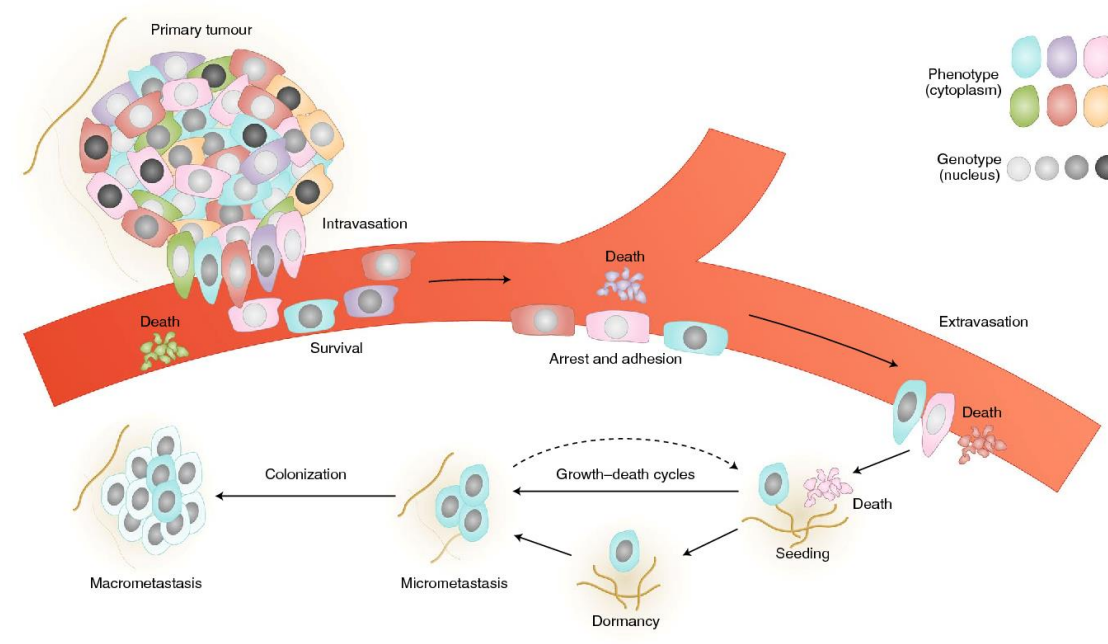
Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να εξασφαλίσουν ολόένα και περισσότερα θρεπτικά συστατικά και το απαραίτητο οξυγόνο για την ανάπτυξή τους, επάγουν ένα σύστημα αγγειογένεσης²⁷. Η διαρκής δημιουργία νέων αγγείων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του όγκου και για τη διατήρηση του νεοπλασματικού φαινοτύπου. Επίσης λόγω των συνθηκών υποξίας, η παροχή αίματος στον όγκο είναι άμεσα συνδεδεμένη και με τον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων²⁸. Σε μοριακό επίπεδο η αγγειογένεση ρυθμίζεται από μόρια επαγωγείς και αναστολείς όπως είναι ο αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και η θρομβοσπονδίνη αντίστοιχα (**Εικ.3**). Η όλη διαδικασία μπορεί να παρομοιαστεί με έναν διακόπτη ο οποίος στην περίπτωση του όγκου παραμένει ενεργός με αποτέλεσμα τα σηματοδοτικά μόρια-επαγωγείς να προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων που προϋπάρχουν²⁹. Επιπλέον, επαγωγείς της αγγειογένεσης στους όγκους είναι και οι πρωτεΐνες RAS και MYC, οι οποίες έχουν βρεθεί να οδηγούν σε αυξορρύθμιση προ-αγγειογενών παραγόντων³⁰. Το περιβάλλον που δημιουργείται επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να γίνουν πιο διηθητικά αποκτώντας μεταστατικές ιδιότητες εκμεταλλευόμενα το λεμφικό σύστημα.



Εικόνα 3. Οι αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά αλλά και η αυξημένη υποξία, είναι παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση σε έναν καρκινικό όγκο. Στον σχηματισμό των νέων αγγείων, συμμετέχουν πολλοί παράγοντες και σηματοδοτικά μόρια τους καρκινικού μικρο-περιβάλλοντος³¹.

Διηθητικότητα και μετάσταση σε νέους ιστούς

Η διήθηση και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων είναι μια διεργασία που αποτελείται από πολλά διαδοχικά βήματα. Αρχικά το κύτταρο αλλάζει μορφολογία και μπορεί να απομακρυνθεί από τα παρακείμενα κύτταρα και να περάσει σε διπλανά λεμφαγγεία και αιμοφόρα αγγεία (τοπική/παρακείμενη αγγειακή διήθηση). Έπειτα τα καρκινικά κύτταρα μεταφέρονται μέσω αυτών των συστημάτων και εισέρχονται στο παρέγχυμα απομακρυσμένων ιστών (εξ-αγγείωση) όπου δημιουργούν μικρομεταστάσεις οι οποίες με τη σειρά τους θα δώσουν μεγαλύτερους όγκους (καρκινικός αποικισμός) (Εικ.4)^{32,33}. Σε κυτταρικό επίπεδο, τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης μέσω επαφής με παρακείμενα κύτταρα, λόγω μειορρύθμισης της β-καδερίνης που είναι ένα μόριο-κλειδί για τη προσκόλληση κυττάρων^{34,35}. Έτσι αποκτούν διεισδυτικά χαρακτηριστικά και αντίσταση στην απόπτωση. Επίσης οδηγούνται στην επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάβαση (EMT) η οποία είναι πολύ συχνή κατά τα αναπτυξιακά στάδια της καρκινογένεσης με ταυτοποιημένη μοριακή βάση, καθώς έχουν βρεθεί μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι SNAIL και TWIST, οι οποίοι εμπλέκονται στην EMT κατά την φυσιολογική διαδικασία της εμβρυογένεσης και έχουν διαταραγμένη έκφραση σε διάφορους καρκίνους³⁶.



Εικόνα 4. Ο μεταστατικός φαινότυπος ενός όγκου αποτελεί και κριτήριο για τον βαθμό επιθετικότητάς του. Τα μεταστατικά κύτταρα προέρχονται από έναν υπο-κλώνο κυττάρων που βρίσκεται στον πρωτογενή όγκο³³.

Αποφυγή απόπτωσης

Τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται σε συνεχή κατάσταση στρες λόγω κυτταρικής υποξίας και χρωμοσωμικής ανισορροπίας του γονιδιώματος. Τέτοιες καταστάσεις θα ενεργοποιούσαν το μηχανισμό της απόπτωσης, γεγονός που δε συμβαίνει καθώς τα καρκινικά κύτταρα 'απενεργοποιούν' τη σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι υπάρχουν δύο βασικά αποπτωτικά μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές που έμμεσα μπορεί να ενεργοποιήσει το ενδογενές, στα κύτταρα του όγκου επηρεάζεται η έκφραση συγκεκριμένων παραγόντων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της απόπτωσης³⁷. Οι πιο συχνές περιπτώσεις είναι αυτές των μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*, των μεταλλάξεων του ρετινοβλαστώματος αλλά και η υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών παραγόντων όπως αυτοί της οικογένειας BCL³⁸⁻⁴⁰. Επιπλέον, σε πολλούς ασθενείς έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του παράγοντα TNF (Tumor Necrosis Factor) επηρεάζοντας έτσι το σηματοδοτικό μονοπάτι TNF/NF-κB, καταλήγοντας σε έναν αντι-αποπτωτικό φαινότυπο^{40,41}. Ως αποτέλεσμα, απορρυθμίζεται το αποπτωτικό μονοπάτι και παρά τον συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό το καρκινικό κύτταρο καταστέλλει την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου.

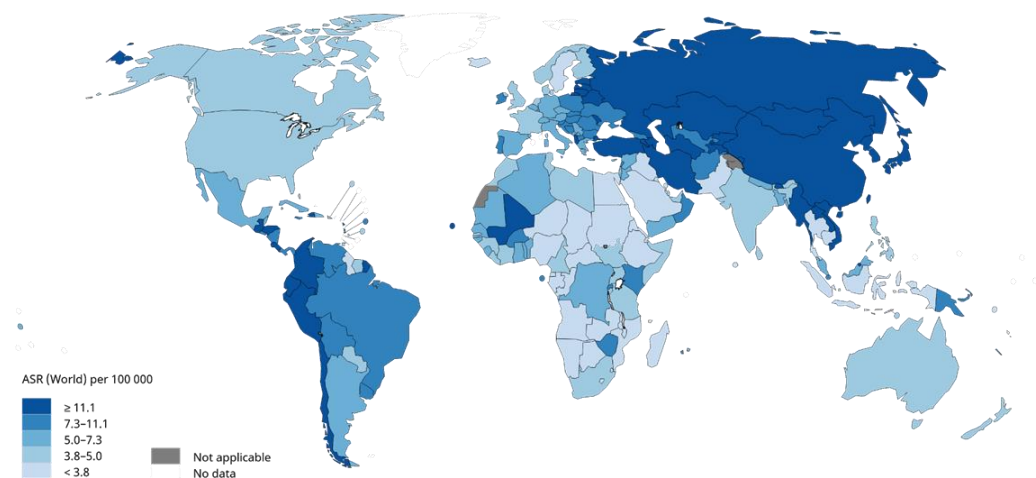
1.2 Ο καρκίνος του στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου κατέχει τη δεύτερη θέση σε θνησιμότητα και την τέταρτη σε συχνότητα παγκοσμίως⁴². Η δυσανάλογα υψηλότερη κατάταξη σε θνησιμότητα συγκριτικά με τη συχνότητα των κρουσμάτων οφείλεται κυρίως στην καθυστερημένη διάγνωση της ασθένειας καθώς αφενός κατηγοριοποιείται σε πολλούς υπότυπους και αφετέρου στα προχωρημένα στάδια η νόσος αποκτά επιθετικό χαρακτήρα. Ο βασικότερος εξωγενής παράγοντας κινδύνου είναι η μόλυνση από το ελικοβακτηρίδιο Πυλωρού (*Helicobacter pylori*) ενώ διατροφικές συνήθειες καθώς και η ποιότητα ζωής παίζουν ρόλο⁴³. Επίσης η νόσος έχει συσχετιστεί και με την μόλυνση από τον ιό Epstein-Barr⁴⁴. Όσον αφορά τη γεωγραφική κατανομή των περιπτώσεων αυτή ποικίλει, με τις χώρες υψηλού κινδύνου να βρίσκονται στην Ασία και Ανατολική Ευρώπη καθώς και στην κεντρική και νότια Αμερική (Εικ.5)⁴⁵. Η συχνότητα εμφάνισης διαφέρει ανάμεσα στα δύο φύλα και είναι πολύ υψηλότερη στους άντρες⁴⁶. Το 90% των περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου είναι αδενοκαρκινώματα, ωστόσο εντοπίζονται και άλλοι υπότυποι οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω.

Ο γαστρικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ των διαφορετικών υπότυπων και σταδίων της νεοπλασίας. Η έλλειψη κατάλληλων διαγνωστικών βιοδεικτών είναι ένα βασικό πρόβλημα για την έγκαιρη διάγνωση, ενώ η δυσκολία ταξινόμησης των περιπτώσεων στις διάφορες υποκατηγορίες της ασθένειας δυσκολεύει την αποτελεσματική θεραπεία. Επομένως

η ανάγκη εύρεσης τέτοιων βιοδεικτών με μεγάλη εξειδίκευση και σε επίπεδο σταδίου, γίνεται ολοένα και πιο επιτακτική.

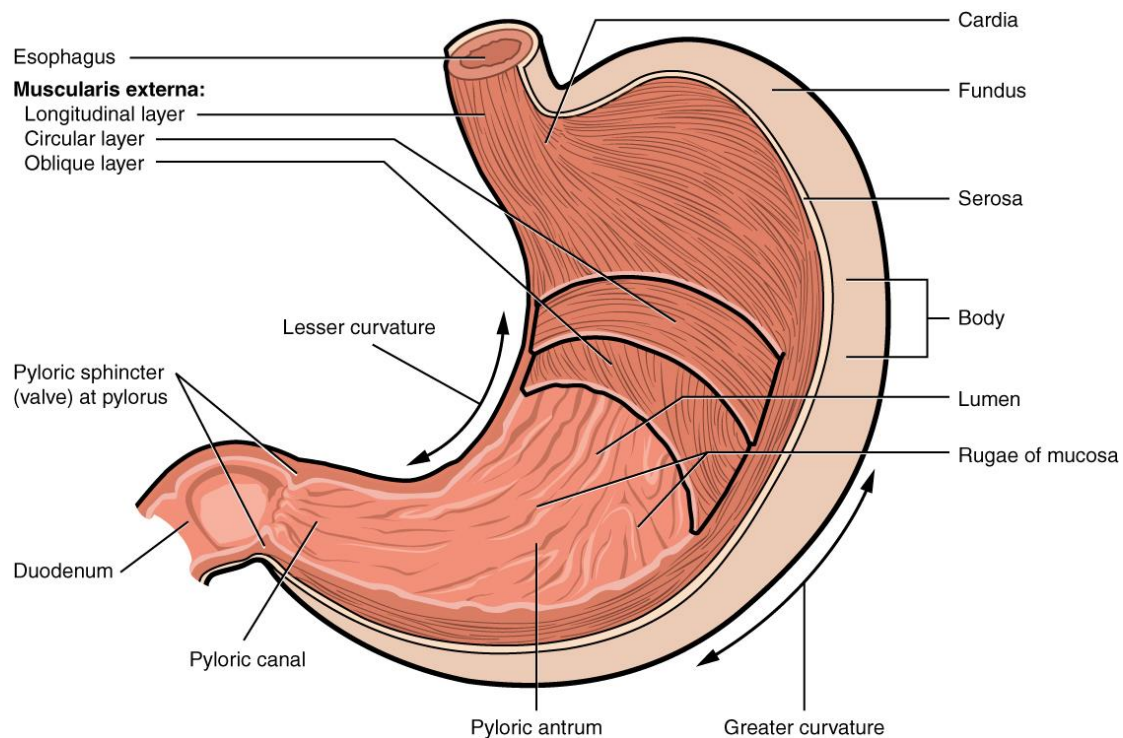
Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, stomach, both sexes, all ages



Εικόνα 5. Παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Ο χρωματικός κώδικας αντιπροσωπεύει την συχνότητα εμφάνισης με τις πιο έντονες αποχρώσεις να υποδεικνύουν και υψηλά ποσοστά⁴⁶.

1.2.1 Ανατομία και Ιστολογία στόμαχου

Το στομάχι ανήκει στα όργανα του γαστρεντερικού συστήματος. Ανατομικά αποτελείται από πέντε περιοχές (Εικ.6): την καρδιά μαζί με την γαστροοισοφαγική συμβολή όπου επικοινωνεί ο στόμαχος με τον οισοφάγο, τον θόλο, τον κορμό/σώμα, το άντρο και τον πυλωρό με χαρακτηριστικό τον πυλωρικό σφιγκτήρα που μοιάζει με δαχτυλίδι και διαχωρίζει τον στόμαχο από τον δωδεκαδάχτυλο⁴⁷. Ο θόλος και ο κορμός περιέχουν τους βασικούς αδένες έκκρισης οξέος, ενώ το άντρο αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα (G-κύτταρα) που παράγουν γαστρίνη⁴⁸.



Εικόνα 6. : Ανατομικά ο στομάχος αποτελείται από τέσσερις περιοχές: καρδιά, θόλος, σώμα, πυλωρός (πυλωρικό άντρο, πυλωρικός σφιγκτήρας)⁴⁹.

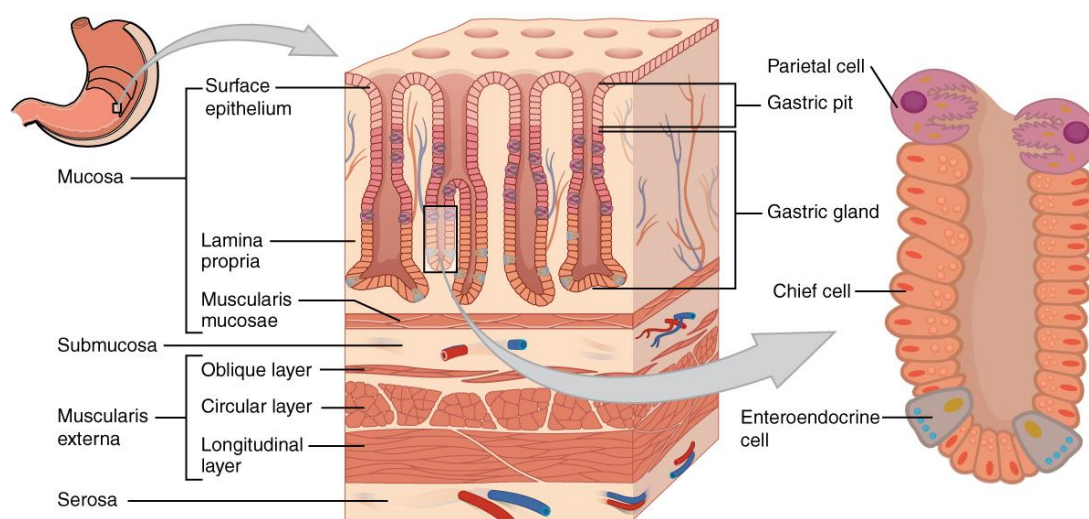
Η κατανόηση της κυτταρικής σύστασης και ανάπτυξης στο στομάχι είναι απαραίτητη για την κατανόηση της νεοπλασίας, που αφορά την απορρύθμιση της φυσιολογικής αναπτυξιακής διαδικασίας του στομάχου. Σε ιστολογικό επίπεδο λοιπόν τα τοιχώματα του στομάχου αποτελούνται από τέσσερις βασικούς χιτώνες (**Εικ.7**):

Βλεννογόνος (Mucosa): πρόκειται για ένα παχύ στρώμα που εκτείνεται σε όλο τον αυλό του στομάχου και απαρτίζεται από ένα μονόστιβο επιθήλιο (Surface epithelium) εσωτερικά του στομάχου, το οποίο συνίσταται από γαστρικά βοθρία (gastric pits)⁵⁰. Κάθε βοθρίο αντιπροσωπεύει ένα στόμιο που αποτελεί και την αφετηρία του γαστρικού αδένου (gastric gland) ο οποίος εκτείνεται πιο βαθιά στο βλεννογόνο (προς το εξωτερικό του στομάχου), έχει σωληνοειδές σχήμα και αποτελείται από συγκεκριμένα είδη κυττάρων που θα αναλυθούν παρακάτω. Μέσα στο βαθύ στρώμα του βλεννογόνου υπάρχει και χοριακός ιστός (lamina propria) πλούσιος σε λεμφαγγεία και κύτταρα του ανοσοποιητικού, και μια υποκείμενη μυϊκή στιβάδα (muscularis mucosae)⁵¹.

Υποβλεννογόνος (Submucosa): Ακριβώς κάτω από το βλεννογόνο και προς το εξωτερικό του στομάχου υπάρχει ένα στρώμα χαλαρού συνδετικού ιστού πλούσιο σε αιμοφόρα αγγεία αλλά και νευρικά κύτταρα (πλέγμα Meissner) με βασικό ρόλο την εκκριτική ρύθμιση.

Μυϊκός (Muscularis Externa): εξωτερικά της υποβλεννογόνου εκτείνεται ο μυϊκός ιστός που είναι υπεύθυνος για τις κινήσεις του στομάχου. Αποτελείται από τρεις υποστιβάδες μυϊκών κυττάρων, την εξωτερική διαμήκη, την ενδιάμεση κυκλική και την εσωτερική που πρόκειται κυρίως για διάσπαρτα λεία μυϊκά κύτταρα παρά στιβάδα. Ενδιάμεσα στις στιβάδες υπάρχει το μυοεντερικό πλέγμα Auerbach μέσω του οποίου επιτελείται η σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων.

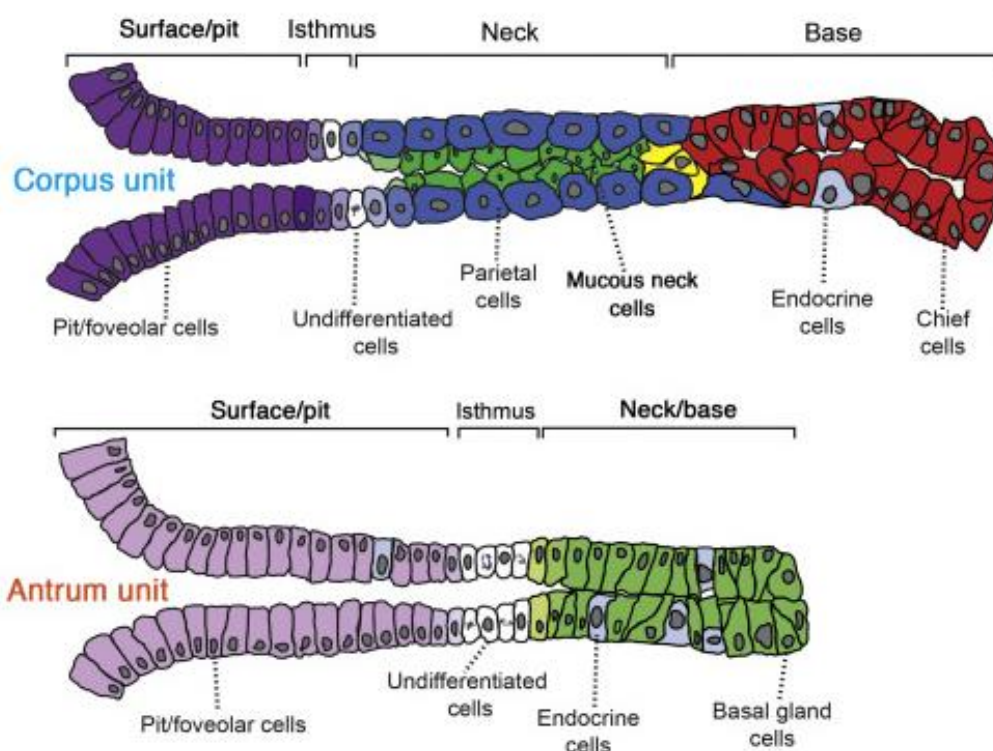
Ορογόνος (Serosa): το τελευταίο εξωτερικό τμήμα είναι ο ορογόνος χιτώνας και έχει έναν προστατευτικό ρόλο ως προς την εξάπλωση νεοπλασιών ή φλεγμονής. Αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα χαλαρού συνδετικού ιστού το οποίο το διαχωρίζει από την προηγούμενη μυϊκή στιβάδα και είναι πλούσιος σε αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία.



Εικόνα 7. Κυτταρικές στιβάδες του εσωτερικού στόμαχου. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65889>)

Το χαρακτηριστικό του γαστρικού βλεννογόνου είναι η έκκριση βλέννας, ορμονών, πεπτιδίων και άλλων ουσιών που θα δημιουργήσουν τελικά το γαστρικό υγρό. Στην εκκριντική αυτή διαδικασία συμμετέχει μια ποικιλία κυττάρων που βρίσκονται τόσο στα γαστρικά βοθρία όσο και στο βάθος του γαστρικού αδένου. Παρατηρώντας τον γαστρικό αδένου σε μεγέθυνση (**Εικ.8**), αυτός δομείται από τρεις περιοχές: το στόμιο/ισθμό (isthmus), τον αυχένα (neck) και τη βάση (base). Το στόμιο αποτελείται κυρίως από επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα και ακολουθεί ο αυχένος όπου εδράζουν βλεννογόνα/αυχενικά (Mucous neck cells) κύτταρα υπεύθυνα για τη παραγωγή βλέννας⁵². Πιο βαθιά εντοπίζονται βρεγματικά/οξεο-εκκριντικά (Parietal cells) και θεμέλια/πεπτικά (Chief Cells) κύτταρα τα οποία παράγουν HCl και πεψιγόνο αντίστοιχα⁵³. Οι γαστρικοί αδένες του στομάχου διαφέρουν ανάλογα με την τοπολογία τους, με τους οξυντικούς αδένες (κορμό) και τους πυλωρικούς (άντρο) να καλύπτουν τη μεγαλύτερη έκταση. Ένας πυλωρικός γαστρικός αδένος διαφέρει από έναν οξυντικό, καθώς ο πρώτος έχει διάσπαρτα ενδοκρινικά κύτταρα τα οποία

κατονομάζονται ανάλογα με την ορμόνη που παράγουν (Endocrine Cells), όπως για παράδειγμα τα G-κύτταρα που παράγουν γαστρίνη⁵⁴.



Εικόνα 8. Κυτταρική σύσταση των οξυντικών γαστρικών αδένων (Corpus Unit) και των πυλωρικών γαστρικών αδένων (Antrum Unit)⁵⁵.

Το επιθηλιακό κυτταρικό στρώμα του στομάχου υφίσταται βλάβες και υπάρχει η δυνατότητα αντικατάστασης αυτών των κυττάρων με νέα. Πολύ σημαντική είναι η ύπαρξη αδιαφοροποίητων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στη περιοχή του ισθμού/αυχένα, τα οποία θα διαφοροποιηθούν σε επιθηλιακά κύτταρα που μπορούν να μεταναστεύσουν από τον αυχένα στην επιφάνεια⁵⁶. Αυτή η διαδικασία της διαφοροποίησης, η οποία ελέγχεται από συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του στομάχου και αποτελεί σταθμό στην ανάπτυξη νεοπλασίας.

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

1.2.2 Τοπογραφική ανατομική ταξινόμηση υποτύπων καρκίνου του στομάχου

Σημείο αναφοράς για την κατηγοριοποίηση των όγκων του στομάχου με βάση την ανατομία αποτελεί η γαστρική καρδιά (gastric cardia). Οι όγκοι που εμφανίζονται κοντά στη περιοχή της καρδιοοισοφαγικής συμβολής ονομάζονται εγγύς/καρδιακοί όγκοι (Proximal/cardia tumours)⁵⁷. Σ' αυτές τις περιπτώσεις συνήθως είναι δύσκολο να εξακριβωθεί εάν ο όγκος βρίσκεται στη γαστροοισοφαγική συμβολή ή καθαρά στη τοπολογία της καρδιάς και συνήθως η θεραπευτική αντιμετώπιση έχει κοινά στοιχεία με αυτήν για τους όγκους του οισοφάγου⁵⁸. Απομακρυσμένοι από την τοπολογία της καρδιάς βρίσκονται οι μη καρδιακοί/απομακρυσμένοι όγκοι (Non Cardiac/distal tumours) που εμφανίζονται στις περιοχές του κορμού και του άντρου⁵⁹.

Ταξινομικά οι όγκοι διακρίνονται σε τρεις τύπους, σύμφωνα με τη διεθνή οργάνωση γαστρικού καρκίνου⁶⁰:

Τύπου I: όγκοι που αφορούν και τον οισοφάγο και μπορούν να επηρεάσουν την γαστροοισοφαγική συμβολή κοντά στη περιοχή της καρδιάς. Συνήθως είναι δύσκολη η διάκριση των όγκων σε αυτή την τοπολογία, και η θεραπευτική προσέγγιση είναι κοινή με αυτή για τους οισοφαγικούς όγκους.

Τύπου II: όγκοι που προέρχονται από το επιθήλιο της γαστρικής καρδιάς και συχνά αναφέρονται ως καρκινώματα της καρδιοοισοφαγικής συμβολής.

Τύπου III: όγκοι που εντοπίζονται μακριά από την καρδιά κυρίως στη περιοχή του κορμού και του άντρου και μπορούν να διεισδύσουν στη γαστροοισοφαγική συμβολή και στον οισοφάγο. Τα καρκινώματα τύπου II και τύπου III θεωρούνται καθαρά γαστρικά καρκινώματα και υφίστανται την αντίστοιχη θεραπεία⁵⁹.

Ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους υπάρχουν ανομοιότητες που αφορούν την επιδημιολογία, το προσδόκιμο ζωής, την κληρονομικότητα, την επιθετική μορφή του όγκου και κατ' επέκταση τη προγνωστική αποτελεσματικότητα. Για παράδειγμα οι εγγύς όγκοι (proximal) εμφανίζουν πιο συχνά μεταστάσεις σε λεμφαδένες, έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και η πρόγνωση είναι πιο δύσκολη σε σχέση με τους απομακρυσμένους όγκους (distal)⁶¹. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη δυσκολία ενδοσκοπικής παρατήρησης στη περιοχή της καρδιοοισοφαγικής συμβολής σε σχέση με το άντρο, και επίσης οι εγγύς όγκοι συνήθως κρύβουν μια κληρονομικότητα στα ποσοστά εμφάνισης.

1.2.3 Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου

Τα είδη των καρκινωμάτων που εντάσσονται στη κατηγορία του καρκίνου του στομάχου είναι λεμφώματα, σαρκώματα, στρωματικοί όγκοι γαστρεντερικού (Gastrointestinal stromal tumors-GIST), νευροενδοκρινείς όγκοι και η πιο συχνή περίπτωση είναι τα αδενοκαρκινώματα που αποτελούν το 90% των κακοηθών όγκων. Τα λεμφώματα δημιουργούνται στο κυτταρικό στρώμα του βλεννογόνου ή του υποβλεννογόνου από λεμφικούς ιστούς που σχετίζονται με τα βλεννογόνα κύτταρα (Mucosa-Associated Lymphoid Tissues-MALT) τα οποία αναπτύσσονται στις περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής που προκαλείται από το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού (*Helicobacter pylori*)⁶². Οι στρωματικοί όγκοι αποτελούν κακοήθειες του μεσεγχυματικού γαστρικού ιστού, ενώ οι νευροενδοκρινείς όγκοι προέρχονται από την ανάπτυξη εντεροχρωματικών κυττάρων στο στομάχι⁶³⁻⁶⁵. Οι διαφορετικοί αυτοί φαινότυποι έχουν ταξινομηθεί με σκοπό την καλύτερη πρόγνωση συνεπάγοντας αποτελεσματικότερη διάγνωση και θεραπεία.

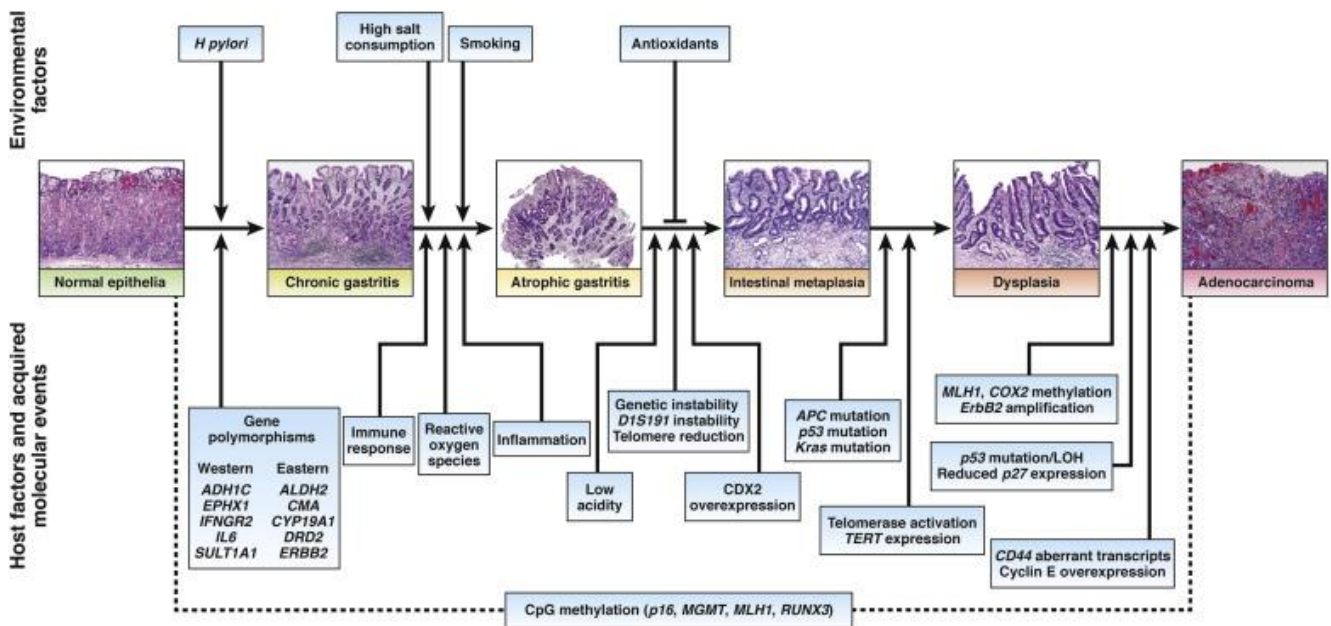
Έχουν υπάρξει αρκετά συστήματα ταξινόμησης των υποτύπων του καρκίνου του στομάχου με το σύστημα Laurén (1965) να αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο⁶⁶. Η κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση μικροσκοπικά και μακροσκοπικά ιστολογικά χαρακτηριστικά όπως είναι η μορφολογία και αρχιτεκτονική των κυττάρων ενώ συνυπολογίζεται και το είδος των κυττάρων των οποίων τα χαρακτηριστικά διαφοροποιούνται. Σύμφωνα με αυτήν, υπάρχουν τέσσερις τύποι: ο εντερικός τύπος (Intestinal Type), ο διάχυτος τύπος (Diffused Type), ο απροσδιόριστος τύπος (Indeterminate Type) και ο μικτός (Mixed Type)⁶⁷. Ο εντερικός υπότυπος είναι ο πιο συχνός, με ποσοστό εμφάνισης στο 54%, και συσχετίζεται με την εντερική μεταπλασία του γαστρικού βλεννογόνου όπως και με τη χρόνια ατροφική γαστρίτιδα⁶⁸⁻⁷⁰. Ακολουθεί ο διάχυτος τύπος σε ποσοστό 32% ο οποίος μαζί με τον εντερικό αποτελούν τις 2 βασικές κατηγορίες γαστρικών όγκων, ενώ οι δύο επόμενοι τύποι καταλαμβάνουν μικρότερο ποσοστό των περιπτώσεων⁷¹.

Εντερικός Τύπος

Βασικός εξωγενής αιτιολογικός παράγοντας του γαστρικού καρκίνου εντερικού τύπου, αποτελεί η λοίμωξη από το βακτήριο *Helicobacter pylori*, ανάμεσα σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η διατροφή και η ποιότητα ζωής⁷². Για να επέλθει η κακοήθεια προηγείται μια σειρά διαδοχικών ιστολογικών μεταβολών, με αφετηρία τη χρόνια μη-ατροφική γαστρίτιδα που μπορεί να προκληθεί από τη λοίμωξη του *H. pylori* σε συνδυασμό με γενετικούς παράγοντες⁷³. Ως αποτέλεσμα της χρόνιας λοίμωξης, η φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει βλάβη του γαστρικού επιθηλίου καθώς χάνονται βρεγματικά και πεπτικά κύτταρα του γαστρικού αδένου και αντικαθίστανται από μεταπλαστικά κύτταρα οδηγώντας σε ατροφική γαστρίτιδα^{59,74,75}. Αυτή η ατροφία εξελίσσεται σε εντερική μεταπλασία (Intestinal Metaplasia-IM), που αποτελεί ένα πρώιμο στάδιο της νεοπλασίας κατά το οποίο το

γαστρικό βλεννογόνο αποκτά έναν εντερικό φαινότυπο με καλυκοειδή κύτταρα (goblet cells) και εντερικό βλεννογόνο, η οποία θα δώσει τον φαινότυπο της δυσπλασίας και τελικά το αδενοκαρκίνωμα (Εικ.9)^{76,77}. Ο βαθμός στον οποίο η δυσπλασία θα εισχωρήσει στο χοριακό ιστό που περιβάλλει τους πλέον ατροφικούς γαστρικούς αδένες, καθορίζει και τη διηθητικότητα του καρκινώματος⁷⁸.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ανάπτυξη κακοήθειας στη περίπτωση του στομάχου και συγκεκριμένα της εντερικής μεταπλασίας, είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία η αιτιολογία της οποίας καθορίζεται και από το γενετικό υπόβαθρο. Η υπερέκφραση του ομοιοτικού μεταγραφικού παράγοντα CDX2 αποτελεί σταθμό στην εξέλιξη της εντερικής μεταπλασίας καθώς δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό στόμαχο⁷⁹. Επιπλέον έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις σε ογκογονίδια όπως το *c-met* και *k-Ras* που εμφανίζονται σε μεγάλο ποσοστό στους εντερικούς τύπους καρκίνου του στομάχου καταλύοντας σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της κακοήθειας, αλλά και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το TP53 που εμφανίζονται στο 60% των περιπτώσεων διηθητικού καρκινώματος⁸⁰⁻⁸².



Εικόνα 9. Βασικά στάδια ανάπτυξης γαστρικού αδενοκαρκινώματος εντερικού τύπου και παράγοντες κινδύνου¹.

Διάχυτος Τύπος

Σε αντίθεση με τον εντερικό τύπο καρκίνου του στομάχου που χαρακτηρίζεται από την εντερική μεταπλασία, ο διάχυτος τύπος (DGC) προέρχεται κατά βάση από το γαστρικό βλεννογόνο και έχει πιο επιθετικό φαινότυπο. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από απώλεια κυτταρικής προσκόλλησης με αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού γαστρικών αδένων, και την επακόλουθη διείσδυση σε παρακείμενους ιστούς⁶⁷. Συνήθως εμφανίζεται σε ηλικία 40-60 και η αιτιολογία

φαίνεται να καθορίζεται κυρίως από το γενετικό υπόβαθρο και πολύ λιγότερο από περιβαλλοντικούς παράγοντες, χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως^{59,83}. Η εμφάνισή του συγκεκριμένου υπότυπου σχετίζεται κυρίως με απώλεια έκφρασης της E-καδερίνης (CDH1), που αναφέρεται ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ενώ έχει συσχετιστεί και με λοίμωξη από *H. pylori*^{84,85}. Στον σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου διάχυτου τύπου (HDGC) ειδικά, κυριαρχεί το μοντέλο 'δύο χτύπημάτων' σχετικά με την E-καδερίνη. Το πρώτο χτύπημα αφορά τη αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου, και το επόμενο εντοπίζεται στην απενεργοποίηση και του δεύτερου αλληλομόρφου μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου CDH1⁸⁶. Η κατηγορία αυτή αφορά το 40% των περιπτώσεων αφήνοντας το υπόλοιπο ποσοστό ανεξερεύνητο ως προς την παθολογία^{83,87}.

Παρά το γεγονός ότι η ιστολογική και ανατομική ταξινόμηση έχει βοηθήσει αρκετά την επιστήμη της ιατρικής στην θεραπευτική κατεύθυνση που αρμόζει σε κάθε περίπτωση, η ανταπόκριση των ασθενών δεν είναι η ίδια. Ακόμη και μέσα στον ίδιο υπότυπο, οι περιπτώσεις διαφέρουν ανάλογα με το γενετικό/μοριακό προφίλ του ασθενή που παίζει καθοριστικό ρόλο και στην εκάστοτε θεραπευτική ανταπόκριση, στη διηθητικότητα του νεοπλασματος και στο προσδόκιμο ζωής. Καθώς γίνεται λόγος για μια εξαιρετικά ετερογενή νόσο τόσο σε μορφολογικό/ιστολογικό όσο και σε γενετικό/μοριακό επίπεδο, η μοριακή ταξινόμηση δεν θα μπορούσε να απουσιάζει.

1.2.4 Μοριακή ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου

Η ασθένεια του καρκίνου γενικότερα χαρακτηρίζεται από υψηλή μοριακή ετερογένεια και πολυπλοκότητα συνεπώς ταξινόμηση των κρουσμάτων βάση μοριακών κριτηρίων, όπως μεταλλάξεων σε ογκο-επαγωγικά ή κατασταλτικά γονίδια, αποτελεί τον κανόνα της σύγχρονης διάγνωσης για διάφορους τύπου καρκίνου όπως του πνεύμονα και του μαστού^{88,89}. Η ετερογένεια μπορεί να εντοπίζεται σε γενετικό και επιγενετικό υπόβαθρο, περιλαμβάνοντας μεταλλάξεις και αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων των γενετικών τόπων γονιδίων, με ανάλογες μεταβολές και σε μεταγραφομικό επίπεδο με διαταραγμένη έκφραση των αντίστοιχων μεταγράφων¹. Συγκεκριμένα για τον καρκίνο του στομάχου η μοριακή κατηγοριοποίηση επετεύχθη το 2014 από την ερευνητική συμπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA)⁹⁰. Το εγχείρημα αρχικά περιλάμβανε την ανάλυση δειγμάτων από 295 ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν ακολουθήσει κάποια θεραπεία και προέρχονταν από ιδρύματα σε παγκόσμια κλίμακα. Οι ερευνητές κατάφεραν να ταξινομήσουν τους όγκους σε τέσσερις βασικές κατηγορίες (**Εικ.10**): EBV-θετικοί (Epstein–Barr virus positive/EBV⁺), μικροδορυφορικά ασταθείς (Microsatellite Instability/MSI), γονιδιωματικά σταθεροί (Genomically Stable/GS) και χρωμοσωμικά ασταθείς (Chromosomal Instability /CIN).

EBV-θετικοί όγκοι (Epstein–Barr virus positive,EBV⁺):

Στο 5-10% των περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου έχει ανιχνευθεί ο ιός Epstein-Barr και οι όγκοι αυτών των περιπτώσεων εμφανίζονται συνήθως στην περιοχή του θόλου και του κορμού^{90,91}. Το χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας είναι η υπερμεθυλίωση CpG νησίδων σε υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη νεοπλασίας (όπως του Chromosomal Instability *CDKN2A*), δηλαδή αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση λόγω επιγενετικής ρύθμισης⁹². Με την εγκαθίδρυση του ιού στο σώμα του ξενιστή παράγεται μια ιική πρωτεΐνη η LMP2A η οποία φαίνεται να προκαλεί τη φωσφορυλίωση του STAT3 και κατ' επέκταση την έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT1, προάγοντας έτσι τη μεθυλίωση του DNA^{1,93}. Επίσης υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως ο ιός κωδικοποιεί για κάποια miRNAs τα οποία απορρυθμίζουν τον μηχανισμό της απόπτωσης εμποδίζοντας τη δράση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η BIM⁹⁴. Επιπρόσθετα, σ' αυτή την κατηγορία σημαντικό ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων έχει το γονίδιο *PIK3CA* (σε ποσοστό 80%) που δίνει την υπομονάδα της κινάσης PI3K η οποία συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικής ανάπτυξης και αύξησης. Επίσης σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων εμφανίζουν μεταλλάξεις στα γονίδια *ARID1A* (54%) και *BCOR* (23%) τα οποία εμπλέκονται στην αναδίπλωση της χρωματίνης και στην απόπτωση αντίστοιχα⁹⁵. Τέλος, εκτός από τις μεταλλάξεις, κάποια γονίδια φαίνεται να εμφανίζονται σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα των όγκων που εντάσσονται σ' αυτό τον υπότυπο όπως είναι τα PDL1 και PDL2 που εμπλέκονται στο σημείο ελέγχου της ανοσοαπόκρισης έναντι των καρκινικών κυττάρων και δίνουν ανασταλτικά σήματα⁹⁵⁻⁹⁷.

Όγκοι Αστάθειας Μικροδορυφόρων (Microsatellite Instability, MSI):

Αυτός ο υπότυπος καλύπτει το 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου και εμφανίζεται κυρίως στην περιοχή του κορμού και του πυλωρού στον στόμαχο^{90,98}. Οι μικροδορυφόροι αποτελούν μικρές αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων⁹⁹. Όταν απορρυθμίζεται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA 'Mismatch Repair-MMR' επέρχεται το φαινόμενο της αστάθειας μικροδορυφόρων όπου εμφανίζονται επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές αλληλουχίες¹⁰⁰. Η απορρύθμιση αυτή μπορεί να προκληθεί είτε από γαμετικές μεταλλάξεις είτε από επιγενετική σίγηση γονιδίων του μηχανισμού MMR που εξασφαλίζουν την ορθότητα της αντιγραφής του DNA, όπως η υπερμεθυλίωση του MLH1 που εμφανίζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων^{101,102}. Λόγω της ύπαρξης των επαναλαμβανόμενων μικροδορυφορικών αλληλουχιών, οι ρυθμοί και η συχνότητα μεταλλάξεων είναι αυξημένοι στους όγκους αυτής τη κατηγορίας. Έτσι χαρακτηρίζονται από έντονη μεταλλαξογόνο δράση σε ογκογονίδια όπως *PIK3CA*, *ERBB3*, και *EGFR* τα οποία εμπλέκονται και σε άλλους τύπους καρκίνου και είναι κομβικά σημεία στην εξέλιξη της νεοπλασίας¹⁰³⁻¹⁰⁶.

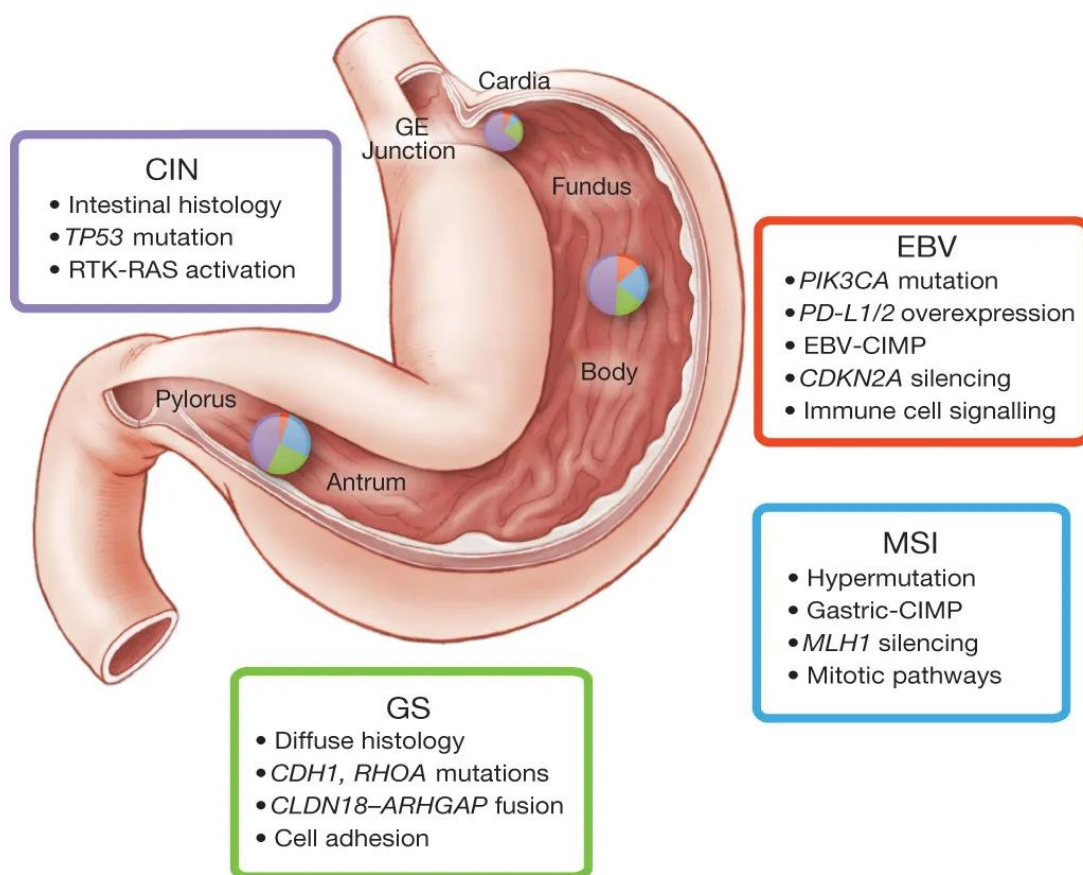
Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (Genomically Stable, GS):

Η γονιδιωματική σταθερότητα αναφέρεται στην απουσία χρωμοσωματικών αλλαγών δηλαδή ελλείψεων, μεταθέσεων κτλ. (Somatic Copy Number Alterations-SCNAs)¹⁰⁷. Αποτελούν το 20% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου και ανιχνεύονται σε σχετικά νεότερη ηλικία απ' ότι οι υπόλοιποι. Επίσης υπάρχει μια συσχέτιση με τη ταξινόμηση Laurén διότι κατά βάση ανήκουν και στον διάχυτο ιστολογικό υπότυπο καρκίνου του στομάχου, ενώ το κοινό τους σημείο είναι οι μεταλλάξεις στα γονίδια *CDH1*, *RHOA* και *CLDN18/ARHGAP*¹⁰⁸. Οι γαμετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της κινάσης *CDH1* όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως έχουν συσχετιστεί με τον κληρονομικό διάχυτο τύπο καρκίνου ενώ οι σωματικές μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο εντοπίστηκαν στο 37% των περιπτώσεων στη μελέτη του TCGA⁹⁰. Το *RHOA* αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια GTPασών και εμπλέκεται στη κυτταρική μορφολογία και πολικότητα, στη μετανάστευση κυττάρων αλλά και στην οργάνωση της ακτίνης¹⁰⁹. Στη περίπτωση των γονιδίων *CLDN18/ARHGAP*, αυτά συμμετέχουν στη κυτταρική κινητικότητα και στη κυτταρική προσκόλληση αντίστοιχα, ενώ συμβαίνει μια μετατόπιση μεταξύ τους στο πλαίσιο του γονιδιωματικά σταθερού όγκου δίνοντας έτσι και τον αντίστοιχο ιστολογικό φαινότυπο¹¹⁰. Η λειτουργία αυτών των συχνά μεταλλαγμένων γονιδίων στη κατηγορία των GSs στο πλαίσιο της κυτταρικής προσκόλλησης, εξηγεί τη σύνδεση του ιστολογικού φαινοτύπου (διάχυτου τύπου) με το γενετικό υπόβαθρο^{107,111}.

Χρωμοσωμικά ασταθείς όγκοι (Chromosomal Instability, CIN):

Η χρωμοσωμική αστάθεια των όγκων αυτής της κατηγορίας αφορά ανευπλοΐδιες και σε μεγάλες περιοχές χρωμοσωμάτων οι οποίες είτε ενισχύονται είτε απουσιάζουν στο καρκινικό γονιδίωμα^{112,113}. Όταν αυτές οι αλλαγές αφορούν ογκοκατασταλτικά γονίδια ή ογκογονίδια επέρχεται η ανάπτυξη νεοπλασίας. Αυτός ο μοριακός φαινότυπος είναι και ένας από τους λόγους της μεγάλης κλινικοπαθολογικής ετερογένειας του καρκίνου του στομάχου¹¹⁴. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει το 50% των περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου, με τα αδenoκαρκινώματα τέτοιου τύπου να εμφανίζονται στη περιοχή της γαστροοισοφαγικής συμβολής και της καρδιάς και ο ιστολογικός τους φαινότυπος να συνάδει με τον εντερικό τύπο κατά την ταξινόμηση Laurén⁹⁰. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις σ' αυτόν τον μοριακό υπότυπο αφορούν το σηματοδοτικό μονοπάτι *RTK/RAS*, όπως η γονιδιωματική ενίσχυση των γονιδίων *KRAS/NRAS*, *MET*, *HER2*, *HER3*, *JAK2*, *FGFR2*, *PIK3CA*, και *EGFR*^{90,107}. Επίσης ενισχυμένη είναι η έκφραση πολλών κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών που αποτελούν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (CDKs)¹¹⁵. Στη χρωμοσωμική αστάθεια μπορεί να ενταχθεί το φαινόμενο της απώλειας ετεροζυγωτίας όπως συμβαίνει κατά κόρον στη περίπτωση του γονιδίου *TP53* που είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στον καρκίνο του στομάχου^{116,117}. Τέλος, σε πολλαπλά αντίγραφα στο καρκινικό γονιδίωμα εντοπίστηκαν να υπάρχουν και γονίδια μεταγραφικών παραγόντων όπως *MYC*,

GATA4, GATA6 τα οποία είναι ογκογόνα ενώ χρωμοσωματικές περιοχές που περιέχουν ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ *PTEN, SMAD4, CDKN2A, ARID1A*) βρέθηκαν να εκλείπουν⁹⁰.



Εικόνα 10. Μοριακή ταξινόμηση υποτύπων καρκίνου του στομάχου και γενετικό υπόβαθρο⁹⁰.

Πέρα από την πολύπλοκη ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου, η αναπτυξιακή του διαδικασία είναι επίσης σημαντική για τη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ασθένειας. Το φαινόμενο της νεοπλασίας είναι κατά βάση μια απορρύθμιση της αναπτυξιακής πορείας ενός ιστού, ή μιας κυτταρικής γενεαλογίας που θα χάσει την ικανότητα διαφοροποίησης και θα αποκτήσει έναν βλαστικό φαινότυπο συνεχούς πολλαπλασιασμού. Η διαδικασία της διαφοροποίησης εμπεριέχει τη δημιουργία συγκεκριμένων κυτταρικών υποτύπων και ως μια αναπτυξιακή διαδικασία χαρακτηρίζεται από την στοχευμένη έκφραση γονιδίων. Είναι μια διαδικασία αυστηρής γονιδιακής ρύθμισης που επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (βλ. Παράρτημα). Συγκεκριμένα για την εμβρυογένεση του στομάχου στον ποντικό, υπάρχει ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται στο στάδιο του προ-γαστρικού ιστού ή ακόμη και πριν τη διαφοροποίηση του ενδοδέρματος. Ανάμεσα σε αυτούς, η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *Gata4/Gata6* που αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της

πρώιμης διαφοροποίησης του ενδοδέρματος, καθορίζει τα όρια του στόμαχου. Καθώς αναπτύσσεται το μοτίβο τοπικής οργάνωσης, οι παράγοντες αυτοί εκφράζονται στο πρόσθιο αρχέντερο στο σημείο που μελλοντικά θα αναπτυχθεί ο αδενικός στόμαχος με τον Gata4 να αποτελεί έναν γαστρικό δείκτη καθώς εκφράζεται στον κορμό και στο άντρο. Οποιαδήποτε απορρύθμιση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια κάποιας κυτταρικής γενεαλογίας, όπως είναι για παράδειγμα το στάδιο της ατροφικής γαστρίτιδας. Επίσης, άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως είναι ο Klf5 είναι σημαντικοί για τον διαχωρισμό του γαστρικού και εντερικού ιστού. Η έκφραση του Klf5 είναι χαρακτηριστική στο στάδιο του πρώιμου γαστρεντερικού σωλήνα και μετέπειτα στο ώριμο εντερικό επιθήλιο όπου ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στην μορφογένεση του στομάχου δεν εμπλέκεται άμεσα, ο αναπτυξιακός του ρόλος όμως στο εντερικό επιθήλιο είναι σημαντικός καθώς οι περισσότερες περιπτώσεις του γαστρικού καρκίνου αφορούν αδenoκαρκινώματα εντερικού τύπου. Συμπερασματικά, οι μεταγραφικοί παράγοντες Klf5 και Gata4/6 συμμετέχουν στην ορθή διαφοροποίηση και μορφογένεση του γαστρεντερικού συστήματος κατά την εμβρυική ανάπτυξη και στα πλαίσια της παρούσα εργασίας μελετήθηκε η συμβολή τους στον καρκίνο του στομάχου.

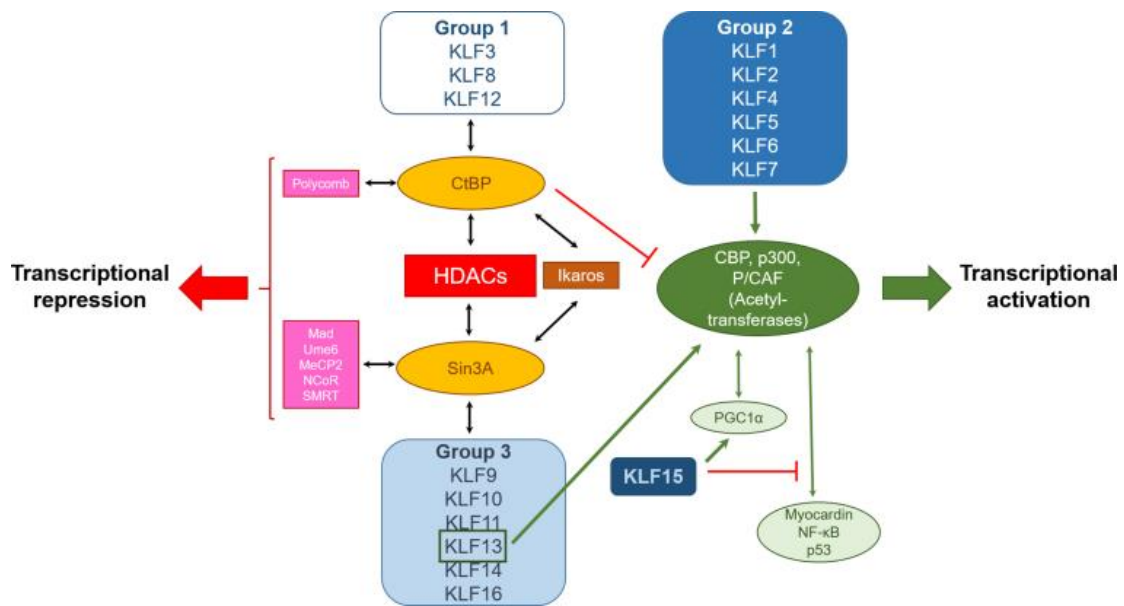
1.3 Εισαγωγή στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας KLFs και GATAs

1.3.1 Krüppel-like factors

Ο μεταγραφικός παράγοντας KLF5 ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των Krüppel-like factors με χαρακτηριστικό μοτίβο τα «δάκτυλα ψευδαργύρου» στην πρωτεϊνική τους δομή. Ονομάστηκαν έτσι από την ομόλογή τους πρωτεΐνη στη *Drosophila melanogaster* που φέρει το όνομα Krüppel και σχετίζεται με τη παράλυση του οργανισμού κατά την αναπτυξιακή του πορεία^{118,119}. Οι παράγοντες αυτοί μέσα από τα 3 συντηρημένα μοτίβα δακτυλίου ψευδαργύρου που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο, έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA σε αλληλουχίες CACCC ή GT, ενώ μέσω του N-τελικού τους άκρου μπορούν να αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεΐνες¹²⁰. Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια που αποτελείται από 18 πρωτεΐνες οι οποίες χωρίζονται σε τρεις ομάδες (**Εικ.11**):

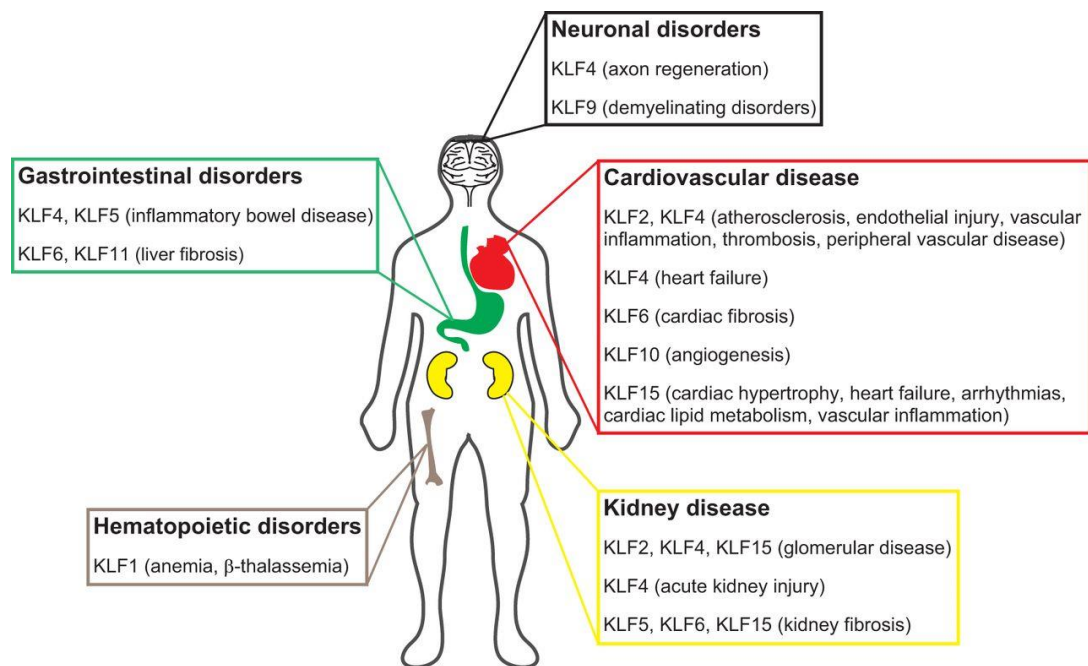
1^η ομάδα (KLF3, KLF8,KLF12) & 3^η ομάδα (KLF9, KLF10, KLF11, KLF13, KLF14,KLF16): αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς αναστολείς.

2^η ομάδα (KLF1,KLF2,KLF4,KLF5,KLF6,KLF7): πρόκειται για μεταγραφικούς ενεργοποιητές.



Εικόνα 11. Ομαδοποίηση μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας Krüppel-like factors, με βάση τη λειτουργία τους¹²⁰.

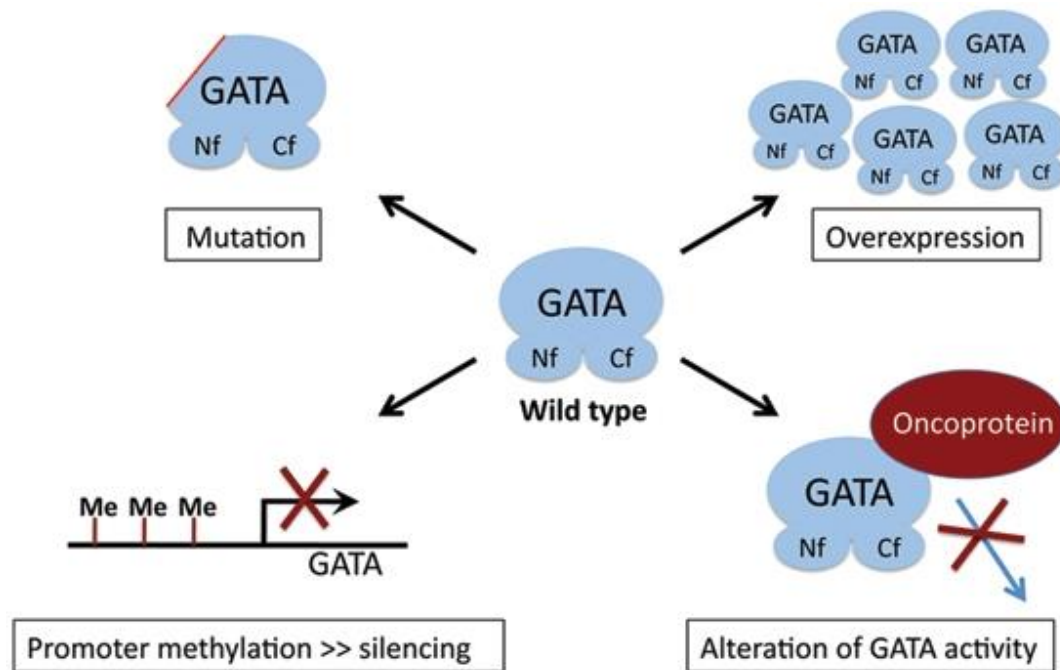
Οι μεταγραφικοί παράγοντες της 2^{ης} ομάδας όπως και η ισομορφή KLF13, για να γίνουν μεταγραφικοί ενεργοποιητές συνήθως ακετυλιώνονται καθώς προσδένονται σε ακετυλο-τρανσφεράσες όπως είναι οι πρωτεΐνες CREB (cAMP response element-binding protein) και p300^{121,122}. Η ακετυλίωση των μεταγραφικών αυτών παραγόντων, λόγω της προσέλευσης ακετυλο-τρανσφερασών κοντά στο DNA, πολλές φορές οδηγεί και στην ακετυλίωση ιστονών, με αποτέλεσμα την αναδίπλωση της χρωματίνης οδηγώντας σε μια μεταγραφικά ενεργή περιοχή¹²³. Γενικά οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των παραγόντων αυτών και οι πρωτεΐνες με τις οποίες θα αλληλεπιδράσουν (όπως p53, p21, SIN3A) παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δράση και τη λειτουργία τους^{124,125}. Επίσης σημαντικός είναι και ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος¹²⁶. Οι λειτουργίες των ισομορφών των KLFs εντοπίζονται σε πολλά από τα ανθρώπινα όργανα και συστήματα και η απορρύθμισή τους σχετίζεται με διάφορες ασθένειες (**Εικ.12**). Ανάμεσά τους πέρα από τις μεταβολικές ασθένειες (παχυσαρκία, διαβήτης τύπου 1) και τις καρδιομυοπάθειες, εντάσσεται και η ογκογένεση^{127,128}.



Εικόνα 12. Ασθένειες και διαταραχές στις οποίες εμπλέκονται οι μεταγραφικοί παράγοντες KLF. Ιστολογική ομαδοποίηση¹²⁹.

1.3.2 GATAs

Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτής της οικογένειας πήραν το όνομά τους από το μοτίβο της αλληλουχίας DNA (A/T GATA A/G) στο οποίο προσδέονται¹³⁰. Η πρωτεϊνική τους δομή απαρτίζεται από 2 δακτύλους ψευδαργύρου, υψηλά συντηρημένους σε όλα τα μέλη της οικογένειας, απαραίτητοι για την πρόσδεση στο DNA αλλά και για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (π.χ FOG1/2)^{131,132}. Μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες: στα αιμοποιητικά GATAs (GATA1, GATA2, GATA3) και στα ενδοδερμικά GATAs (GATA4, GATA5, GATA6)¹³³. Γενικότερα, οι παράγοντες αυτοί είναι γνωστοί για την εμπλοκή τους σε διάφορα αναπτυξιακά μονοπάτια και βοηθούν αδιαφοροποίητα προγονικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν και να πάρουν μια ιστολογική κατεύθυνση^{134,135}. Κυρίως εκφράζονται σε όργανα ενδοδερμικής και μεσοδερμικής προέλευσης με τους GATA4 και GATA6 να πρωταγωνιστούν στους γαστρεντερικούς ιστούς^{136,137}. Όπως και οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες στα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορούν να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες/ένζυμα συμπεριλαμβανομένου και χρωματινικών τροποποιητών (π.χ ακετυλο-τρανσφεράσες, μεθυλο-τρανσφεράσες) κι έτσι να ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση με υψηλή εξειδίκευση. Γενικά η λειτουργία των GATA μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να μεταβληθεί από μετάλλαξη, υπερέκφραση, υποέκφραση (συχνή είναι η περίπτωση της επιγενετικής σίγησης), ή μπορεί κάποια πρωτεϊνική τους αλληλεπίδραση να εμποδίσει τη δράση τους (**Εικ.13**)¹³⁸.



Εικόνα 13. Μοριακό υπόβαθρο διαταραχής λειτουργίας των GATA μεταγραφικών παραγόντων¹³⁸.

Οι μεταγραφικοί της πρώτης ομάδας που εμπλέκονται σε αρκετές περιπτώσεις λευχαιμιών ως αιμοποιητικοί μεταγραφικοί παράγοντες, έχουν μελετηθεί εκτενέστερα, ενώ οι παράγοντες της 2^{ης} ομάδας είναι λιγότερο μελετημένοι¹³⁹⁻¹⁴¹. Γενικά, υπάρχει μια σύγχυση στον χαρακτηρισμό των GATA4, GATA5, GATA6 ως ογκογονίδια ή ως ογκοκατασταλτικά γονίδια διότι φαίνεται πως εξαρτάται από τον ιστό και από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο εκφράζονται¹³⁸. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ειδικότητα της έκφρασής τους, καθώς βοηθούν στη διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών γενεαλογιών (κυτταρικών τύπων) και έτσι μπορεί να εξηγηθεί η δυνατότητά τους άλλοτε να επάγουν και άλλοτε να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό^{142,143}.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες των οικογενειών KLFs και GATAs είναι σημαντικοί ρυθμιστές της αναπτυξιακής βιολογίας και την οργανογένεσης στα θηλαστικά. Εστιάζοντας στον στομάχο, οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4, GATA6, και KLF5 και τα πρότυπα έκφρασής τους κατά την εμβρυογένεση και μορφογένεση του οργάνου αποτελούν βασικούς παράγοντες πρόκλησης κακοήθειας (βλ. Παράρτημα).

1.4 Δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στον καρκίνο του στομάχου

Με σκοπό την εύρεση νέων μοριακών στόχων είτε για θεραπεία είτε για διάγνωση, έχουν γίνει ολικές αναλύσεις γονιδιωμάτων καρκίνου του στομάχου σε μια έρευνα μεγάλης κλίμακας όπου ελέγχθηκαν 190 καρκινικές βιοψίες και 40 κυτταρικές σειρές

με χρήση SNP μικροσυστοιχιών¹⁴⁴. Στην μελέτη αυτή ελέγχθηκαν γονιδιωματικές μεταβολές δηλαδή ανευπλοϊδίες και χρωμοσωματικές μεταβολές και τα γονίδια που βρέθηκαν σε τέτοιες περιοχές κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη λειτουργία τους. Υπήρξαν 3 κατηγορίες γονιδίων: αυτά που συμμετέχουν στη σηματοδότηση RTK/RAS (*FGFR2*, *KRAS*, *MET*, *ERBB2*, *EGFR*), αυτά που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (*CDK6*, *CCND1*, *RB*, *CCNE1*, *CDKN2A/B*) και μια τελευταία κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων (*MYC*, *KLF5*, *GATA4*, *GATA6*). Ενώ οι μεταγραφικοί παράγοντες *KLF5*, *GATA4*, *GATA6* έχουν βρεθεί να ενισχύονται γενετικά (Genomic-amplification/SCNAs) και ανεξάρτητα σε διάφορους τύπους καρκίνου, φαίνεται ότι η συνδυαστική ενίσχυση και των τριών γονιδίων περιορίζεται στον καρκίνο του στομάχου ή γενικότερα σε όγκους του γαστρεντερικού συστήματος^{126,145-149}. Σε μεταγενέστερες μελέτες ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε συνδυασμό με γονιδιωματικές και μεταγραφομικές αναλύσεις οι Chia et al. το 2015 αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός ογκογόνου δικτύου ανάμεσα σ' αυτούς τους παράγοντες για τον καρκίνο του στομάχου. Με βάση τη συγκεκριμένη μελέτη, οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες ενισχύονται γενετικά στο 30% των όγκων σε ένα σύνολο 447 γονιδιωμάτων γαστρικού καρκίνου (254 γονιδιώματα από το TCGA και 193 από Ασιάτες ασθενείς). Βρέθηκαν κοινά μοτίβα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένους υποκινητές, ενώ η υποέκφρασή τους σε συνδυασμό ή μεμονωμένα συσχετίστηκε με αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού¹⁵⁰. Γενικά η έκφραση και των 3 μεταγραφικών παραγόντων έδινε έναν πιο ενισχυμένο καρκινικό φαινότυπο σε σύγκριση με τη μεμονωμένη τους έκφραση. Τέλος, στην ίδια μελέτη βρέθηκε το γονίδιο *HNF4a* (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) να ρυθμίζεται άμεσα και από τους 3 μεταγραφικούς παράγοντες. Ο *HNF4a* (ή *NR2A1*) είναι ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας με ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση όπως και οι μεταγραφικοί παράγοντες *GATA4/6*¹⁵¹. Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ενήλικα όργανα του ήπατος, του εντέρου και στους νεφρούς¹⁵²⁻¹⁵⁴. Έχει βρεθεί να εμπλέκεται στη ανάπτυξη ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων, καρκίνου του εντέρου και αποτελεί και έναν υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για τους γαστρικούς καρκίνους καθώς έχει βρεθεί η συμμετοχή του στο σηματοδοτικό μονοπάτι AMPKα-WNT5A¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι δύσκολο να αποτελέσουν άμεσους θεραπευτικούς στόχους καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας πολλαπλών ιστών στο ανθρώπινο σώμα^{129,159}. Η εύρεση των γονιδίων-στόχων του ογκογόνου δικτύου *KLF5/GATA4/GATA6* μπορεί να αποκαλύψει σημαντικούς βιοδείκτες για τη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου του στομάχου, όπως επίσης μπορεί να αποκαλύψει θεραπευτικούς στόχους. Τέτοιοι βιοδείκτες θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία σε ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο, αφενός για να γίνει πιο εύκολη η ταξινόμηση των περιπτώσεων στους διάφορους υπότυπους και αφετέρου για να επιτευχθεί μια

στοχευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία, με λιγότερες παρενέργειες. Τέτοιου είδους μοριακοί δείκτες αποτελούν τα lncRNAs.

1.5 Long Non-Coding RNAs

1.5.1 Εισαγωγή στα Long Non-Coding RNAs

Λόγω της ανάπτυξη ολιστικών μεθόδων γονιδιωματικής, μέσω των τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς, είναι πλέον γνωστό πως από το 85% του ανθρώπινου γονιδιώματος που μεταγράφεται, μόνο το 0,1% κωδικοποιεί για πρωτεΐνες, που σημαίνει πως το μεγαλύτερο μέρος του RNA ανήκει στα μη κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNAs-ncRNAs)^{160,161}. Η ευρύτερη κατηγορία του μη κωδικού RNA χωρίζεται σε δύο επιμέρους ομάδες με βάση το μέγεθος των μεταγράφων: τα long non-coding RNAs (lncRNAs) που έχουν μήκος πάνω από 200 νουκλεοτίδια και τα small non-coding RNA (sncRNA) με μέγεθος μικρότερο των 200 νουκλεοτιδίων¹⁶². Τα lncRNAs μεταγράφονται από την RNA Πολυμεράση II, έχουν 5'καλύπτρα, είναι πολυαδενυλιωμένα στο 3' άκρο, ενώ υφίστανται και εναλλακτικό μάτισμα μέσω του κλασικού μηχανισμού ματίσματος^{160,163}. Έχει αποδειχτεί η εμπλοκή τους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως η γονιδιακή ρύθμιση, η υποκυτταρική οργάνωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη, το γονιδιακό εντύπωμα, ο σχηματισμός των τελομερών, σταθεροποίηση πρωτεϊνών κ.α.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Χαρακτηρίζονται από χαμηλή συντήρηση σε επίπεδο αλληλουχίας, ωστόσο η δευτεροταγή τους δομή είναι υψηλά συντηρημένη καθώς από αυτήν εξαρτάται και ο μηχανισμός λειτουργίας τους¹⁶⁷. Η ποικιλομορφία των διαμορφώσεων που μπορούν να πάρουν, η θέση τους στο γονιδίωμα, ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός, και τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν καθορίζουν τα επιμέρους κριτήρια για την περαιτέρω κατηγοριοποίηση τους. Ένα βασικό κριτήριο κατηγοριοποίησης είναι η θέση τους στο γονιδίωμα (**Εικ.14**), όπου μπορεί να βρίσκονται ανάμεσα σε δύο κωδικά γονίδια (Intergenic lncRNAs), να προέρχονται από τη μη κωδική αλυσίδα DNA ενός κωδικού γονιδίου (Natural Antisense Transcripts) ή να προέρχονται από ιντρονικές περιοχές κωδικών γονιδίων (intronic lncRNAs)^{168,169}.

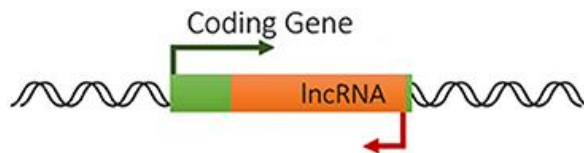
i Intergenic lncRNA



ii Antisense head to head lncRNA



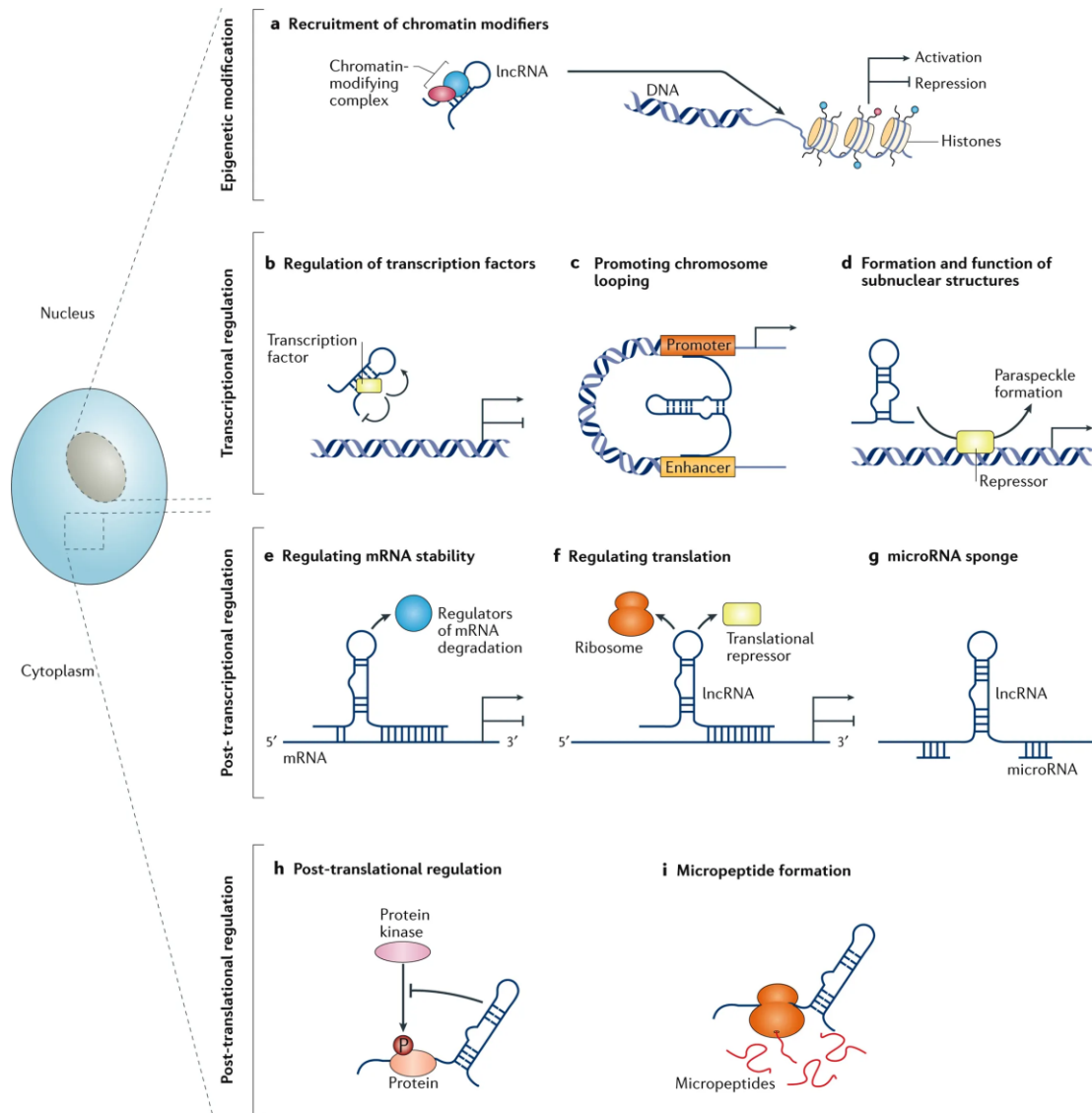
iii Antisense overlapping lncRNA



Εικόνα 14. Κατηγοριοποίηση των lncRNAs με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα¹⁷⁰.

Ένα επιπρόσθετο κριτήριο κατηγοριοποίησης των lncRNA είναι ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός βάση του οποίου διακρίνονται σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά ανάλογα με το που επιτελούν τις ρυθμιστικές τους λειτουργίες τους, (Εικ.15)^{171,172}. Στον πυρήνα τα lncRNAs αποτελούν βασικούς ρυθμιστές γονιδιακής έκφρασης, καθώς έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με χρωματινικά συμπλέγματα καθοδηγώντας τη δράση τους. lncRNAs όπως τα HOTAIR και Kcnaot1 στρατολογούν το επιγενετικό σύμπλεγμα PRC2 στην γονιδιωματική περιοχή HoxD και Kcna1 αντίστοιχα, όπου τα ιστονικά σήματα H3K27me3 οδηγούν σε επιγενετική σίγηση^{173,174}. Επιπλέον μπορούν να ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες και RBPs (RNA-Binding Proteins) καθώς και μεθυλοτρανσφεράσες ελέγχοντας έτσι στοχευμένα ποια γονίδια θα εκφραστούν. Σ' αυτή τη κατηγορία εντάσσονται lncRNAs που λειτουργούν ως πρωτεΐνες-ικριώματα (scaffold proteins) για να διευκολύνουν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις όπως είναι το lncRNA MALAT1. Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από lncRNAs (όπως το PCA3) είναι μέσω της υβριδοποίησής τους σε mRNA-στόχους (Μετα-μεταγραφική ρύθμιση). Τα lncRNAs GAS5 και H19, δρουν ως 'μοριακά δολώματα' που προσδέονται σε πρωτεΐνες-στόχους (π.χ GRs, p53) και δεν επιτρέπουν τη πρόσδεσή τους στο DNA. Επιπλέον πολλές φορές τα lncRNAs παρεμβάλλονται στην αλληλεπίδραση υποκινητών και ενισχυτών με αποτέλεσμα να επεμβαίνουν και στην αρχιτεκτονική/αναδίπλωση της χρωματίνης^{175,176}. Αυτή είναι η κατηγορία των eRNAs (enhancer RNAs) που

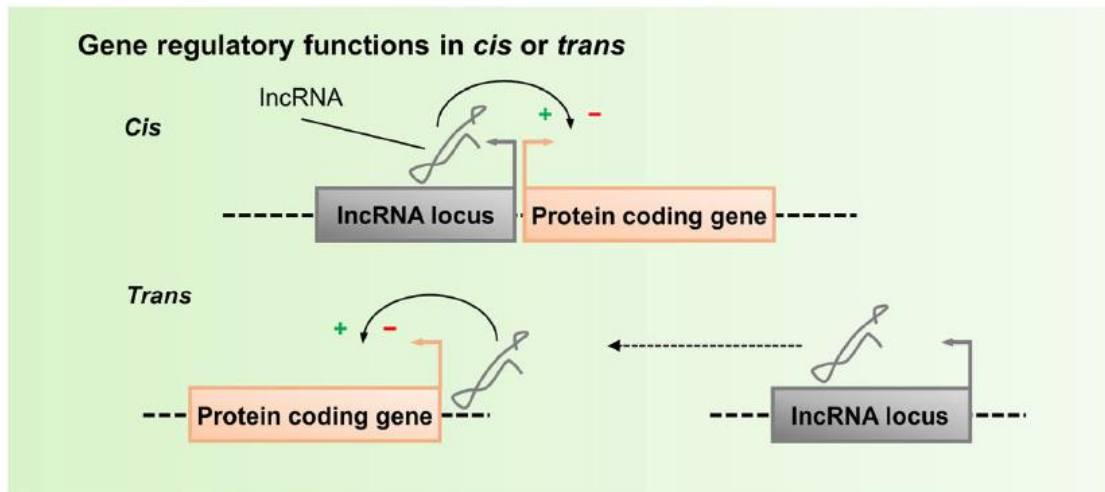
προέρχονται από τη μεταγραφή ενισχυτών, και ρυθμίζουν επίσης τη γονιδιακή έκφραση^{177,178}. Τέλος, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το NEAT1, κάποια lncRNAs συμμετέχουν στον σχηματισμό πυρηνικών δομών που ονομάζονται paraspeckles και οι οποίες αποτελούν δυναμικά συμπλέγματα mRNA και RBPs με ρόλο στη διαδικασία της μεταγραφής¹⁷⁹⁻¹⁸¹.



Εικόνα 15. Κατηγοριοποίηση των lncRNAs με βάση τους μηχανισμούς δράσης τους (πυρηνικά και κυτταροπλασματικά)¹⁸².

Τα πυρηνικά lncRNAs, εξειδικεύονται περαιτέρω με βάση την τοποθέτηση των γενετικών τους τόπων συγκριτικά με αυτούς των γονιδίων-στόχων τους πάνω στο γονιδίωμα (**Εικ.16**). Τα *cis*-acting lncRNAs ρυθμίζουν την έκφραση γειτονικών γονιδίων ενώ τα *trans*-acting lncRNAs στοχεύουν απομακρυσμένα γονίδια τα οποία μπορεί να βρίσκονται και σε διαφορετικά χρωμοσώματα^{183,184}. Υπάρχουν και οι περιπτώσεις στις οποίες το ίδιο το μετάγραφο δεν έχει κάποιο ρόλο αλλά η

διαδικασία μεταγραφής του lncRNA είναι αυτή που μπορεί να ενεργοποιήσει κάποιον ενισχυτή/υποκινητή^{185,186}. Τα κυτταροπλασματικά lncRNAs μπορεί να είναι μετάγραφα τα οποία μεταφέρονται από τον πυρήνα ή μετάγραφα των οποίων η βιογένεση γίνεται στο κυτταρόπλασμα (lncRNAs μιτοχονδριακού DNA)¹⁸⁷. Στη κατηγορία των κυτταροπλασματικών lncRNA, χαρακτηριστική είναι η περίπτωση των miRNA-sponges, στην οποία το lncRNA 'ανταγωνίζεται' κάποιο miRNA για την πρόσδεση στο mRNA-στόχο (π.χ lncARSR)^{188,189}. Επίσης μπορούν να επηρεάσουν δύο βασικές κυτταροπλασματικές διεργασίες πάνω στις πρωτεΐνες: την αναδίπλωση και τη μετάφρασή τους. Επίσης μπορούν να περιορίσουν τη δράση πρωτεϊνών οδηγώντας ή εμποδίζοντας την ουβικουιτίνωσή τους (π.χ lincRNA-p21-HIF-1α)^{164,190,191}.



Εικόνα 16. Κατηγοριοποίηση των lncRNAs σε cis-acting και trans-acting, με βάση την απόστασή τους από τα γονίδια-στόχους¹⁹².

1.5.2 LncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες

Τα lncRNAs προσελκύουν ολοένα και περισσότερο το ερευνητικό ενδιαφέρον ως προγνωστικοί και διαγνωστικοί δείκτες σε πολλές ασθένειες και πολύ περισσότερο στον καρκίνο καθώς έχουν χαρακτηριστεί για την εμπλοκή τους στον φαινότυπο της μετάστασης, της διήθησης και της κυτταρικής ανάπτυξης¹⁹³. Χαρακτηριστικά όπως η διαφορική τους έκφραση στον καρκίνο, η ιστο-ειδική τους έκφραση και η εμπλοκή τους σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες τα καθιστούν ιδανικούς μοριακούς βιοδείκτες. Επίσης, η παρουσία τους σε διάφορα βιολογικά υγρά όπως είναι το πλάσμα, τα ούρα και το γαστρικό υγρό κάνουν αξιοσημείωτη τη προγνωστική και διαγνωστική τους αξία¹⁹⁴. Πολλές περιπτώσεις lncRNA με καρκινοειδική έκφραση έχουν συσχετιστεί με το προσδόκιμο ζωής των ασθενών¹⁹⁵. Ένα από τα πρώτα χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το lncRNA-PCA3, εγκεκριμένο από τον FDA (Food and Drug Administration) ως διαγνωστικός δείκτης μαζί με το PSA (prostate specific antigen) για τον καρκίνο του προστάτη^{196,197}. Αντίστοιχες περιπτώσεις αποτελούν τα lncRNAs H19 και MALAT1 που είναι από τα πρώτα που χαρακτηρίστηκαν για την υψηλή τους καρκινοειδική έκφραση¹⁹⁸⁻²⁰¹. Βασικά παραδείγματα αποτελούν τα NEAT1, MEG3 και TP53TG1 και τα επίπεδα έκφρασής τους στις περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, καρκίνου του πνεύμονα, και καρκίνου του προστάτη. Η γονιδιωματική ενίσχυση ή έλλειψη των αντίστοιχων γονιδίων, έχουν διαφορετικό αντίκτυπο στις διαφορετικές περιπτώσεις νεοπλασίας, επηρεάζοντας σημαντικά τον κλινικό φαινότυπο του προσδόκιμου ζωής²⁰². Το NEAT1 λόγω γονιδιωματικής ενίσχυσης υπερεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη και αποτελεί ένα ογκογονίδιο που επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Ίδια δράση έχει και στον καρκίνο του στομάχου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις καρκίνων δρα ως ογκο-κατασταλτικό γονίδιο²⁰³⁻²⁰⁵. Σε αντίθεση το MEG3, είναι ένας ογκοκαταστολέας που μειορρυθμίζεται σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου και τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης συσχετίζονται και με χαμηλότερο προσδόκιμο ζωής στους ασθενείς²⁰⁶⁻²⁰⁸. Τέτοιες περιπτώσεις επιβεβαιώνουν την ιστοειδικότητα των lncRNA και τη προγνωστική τους σημασία για διάφορους τύπους καρκίνου.

Στον γαστρικό καρκίνο το TP53TG1 υφίσταται επιγενετική σίγηση μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του σε νησίδες CpG. Έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο, και η σίγησή του συσχετίζεται με αντίσταση σε χημειοθεραπείες και χαμηλό προσδόκιμο ζωής²⁰⁹. Ένα άλλο παράδειγμα είναι το TINCR το οποίο υπερεκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου λόγω της δράσης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα E2F1. Το TINCR καθοδηγεί τον STAU1 στο mRNA του CDKN2B οδηγώντας στη μείωση των επιπέδων του, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τελικά της ογκογένεσης²¹⁰. Επίσης μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF2 ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των CDKN1A/P21 και CDKN2B/P15 επηρεάζοντας την απόπτωση. Αποτελεί πιθανό

προγνωστικό δείκτη καθώς η έκφρασή του έχει συσχετιστεί με τη διηθητικότητα και το στάδιο της ογκογένεσης, όπως και με υψηλά ποσοστά υποτροπής των ασθενών²¹¹. Επιπλέον, αξιολογώντας προγνωστικούς δείκτες είναι το lncRNA PVT1, το οποίο υπερκεφράζεται σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο και έχει συσχετιστεί με τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων σε λεμφαδένες, με μετάσταση και χαμηλό προσδόκιμο ζωής^{212,213}. Ο μοριακός του μηχανισμός περιλαμβάνει έναν βρόχο θετικής ανάδρασης ανάμεσα στο PVT1 και στο FOXM1 ο οποίος ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων²¹⁴. Επίσης, έχει βρεθεί πως επάγει την αγγειογένεση μέσω του άξονα σηματοδότησης STAT3/VEGFA, αποτελώντας έτσι έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο²¹⁵. Ανάλογο παράδειγμα είναι και το lncRNA CASC15, η υπερέκφραση του οποίου επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση όπως και την ανάπτυξη του EMT φαινοτύπου. Στον πυρήνα αλληλεπιδρά με το EZH2 (υπομονάδα του επιγενετικού συμπλόκου PRC2) και με το WDR5 ρυθμίζοντας έτσι τον CDKN1A και κατ' επέκταση τον κυτταρικό κύκλο²¹⁶. Επόμενο παράδειγμα ισχυρού προγνωστικού και διαγνωστικού δείκτη για τον γαστρικό καρκίνο είναι το GAPLINC, που δρα με έναν κυτταροπλασματικό μηχανισμό εμποδίζοντας την αποικοδόμηση του CD44, μέσω ενδογενούς ανταγωνισμού με το miR211-3p το οποίο στοχεύει τον CD44. Ο CD44 είναι ρυθμιστής τους κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης²¹⁷. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι βιοδείκτες που είναι χαρακτηριστικοί του μεταστατικού ή του EMT φαινοτύπου και μπορούν να σηματοδοτήσουν και το στάδιο της ογκογένεσης²¹⁸. Το lncRNA HULC είναι ένας μοριακός βιοδείκτης με υψηλή εξειδίκευση για τη μετάσταση, που ενώ δεν εκφράζεται στον πρωτογενή όγκο του εντέρου, ανιχνεύεται στον καρκίνο του εντέρου με μετάσταση στο πάγκρεας^{219,220}. Στον γαστρικό καρκίνο είναι υπερεκφρασμένο και έχει σημαντική προγνωστική αξία καθώς έχει συνδεθεί με μετάσταση σε λεμφαδένες και σε απομακρυσμένους ιστούς όπως και με τον φαινότυπο EMT²²¹. Και σ' αυτή την περίπτωση καρκίνου υπάρχει στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου^{222,223}.

Η ανίχνευσή των lncRNA στο αίμα και στη λέμφο εντοπίζεται μέσα στα εξωσώματα, τα οποία αποτελούν κυστίδια που εμπεριέχουν πρωτεΐνες και διάφορα μόρια RNA που είναι σημαντικά για την εξέλιξη της νόσου²²⁴⁻²²⁶. Το σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των lncRNA, είναι η προστασία τους μέσα στα εξωσώματα ώστε να μπορούν να ανιχνεύονται εύκολα, προσφέροντας μια γρήγορη και αποτελεσματική πρόγνωση/διάγνωση χωρίς να είναι απαραίτητες οι επεμβατικές μέθοδοι²²⁷. Αν και ο κόσμος των εξωσωμάτων και των μη κωδικών RNA μορίων που βρίσκονται μέσα σε αυτά παραμένει ανεξερεύνητος, έχουν βρεθεί περιπτώσεις στις οποίες εξωσώματα καρκινικής προέλευσης περιλαμβάνουν στοχευμένα lncRNAs σε αυξημένα επίπεδα²²⁸. Στον γαστρικό καρκίνο τέτοιου είδους lncRNA, εκτός από αυτά που ήδη αναφέρθηκαν, αποτελεί το HOTTIP το οποίο βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο πλάσμα ασθενών και έχει συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια της ασθένειας, μετάσταση και χαμηλό προσδόκιμο ζωής. Μοριακά δρα με έναν κυτταροπλασματικό

μηχανισμό στοχεύοντας το miR-331-3p, με αποτέλεσμα μειωμένη έκφραση του HER2 και κατ' επέκταση έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό^{229,230}. Συγκεκριμένα για τον καρκίνο του στομάχου, το LINC00152 όπως και το ZFAS1 βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο πλάσμα ασθενών με μεγάλο ποσοστό εξειδίκευσης σε σύγκριση με υγιή άτομα^{231,232}. Το LINC00152 δρα επίσης με έναν κυτταροπλασματικό μηχανισμό και καταστέλλει την έκφραση του miR-193a-3p με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του MCL1 το οποίο επάγει τη μετάσταση. Επίσης το LINC00152 έχει ανιχνευτεί και στο γαστρικό υγρό ασθενών²³³. Επίσης στο γαστρικό υγρό ασθενών ανιχνεύεται και το lncRNA AA174084 με εξίσου υψηλή διαγνωστική αξία, χωρίς όμως να ανιχνεύεται στο αίμα²³⁴. Η έρευνα των lncRNA που εντοπίζονται σε εξωσώματα, αποκαλύπτει συνεχώς νέους σημαντικούς διαγνωστικούς δείκτες²²⁷.

ΣΚΟΠΟΣ

Οι μεταγραφικοί παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6 συνιστούν ένα ογκογόνο δίκτυο στον καρκίνο του στομάχου και βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα στο καρκινικό γονιδίωμα. Αποτελούν ογκογονίδια που ρυθμίζουν τη διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων σε αναπτυξιακό επίπεδο ενώ η διατάραξη της έκφρασή τους οδηγεί σε ογκογένεση. Δεδομένου ότι οι ίδιοι είναι δύσκολο να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους καθώς συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες πολλών ιστών, έμφαση δίνεται στα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον ανάμεσα σε αυτά τα γονίδια-στόχους αποτελούν τα lncRNAs, που αποτελούν πολύ καλούς βιοδείκτες λόγω υψηλής εξειδίκευσης σε ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο καθώς και λόγω διαφορικής και καρκινοειδικής έκφρασης. Σκοπός, λοιπόν, αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση lncRNA-στόχων που να ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας ChIP-seq δεδομένα από τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες συνδυαστικά με RNA-seq δεδομένα βιοψιών γαστρικού καρκίνου. Ακολούθησε σχεδιασμός και κλωνοποίηση shRNA έναντι των τριών μεταγραφικών παραγόντων με στόχο την RNAi σίγηση τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου. Απώτερος στόχος ήταν η φαινοτυπική παρατήρηση της σίγησης των αντίστοιχων πρωτεϊνών στα καρκινικά κύτταρα και η πειραματική απόδειξη της ρύθμισης lncRNA στόχων βάσει των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης. Μελλοντικός στόχος είναι η δημιουργία σταθερών διαγονιδιακών σειρών επαγόμενης καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων και η μελέτη επιλεγμένων lncRNA-στόχων.

2. Υλικά & Μέθοδοι

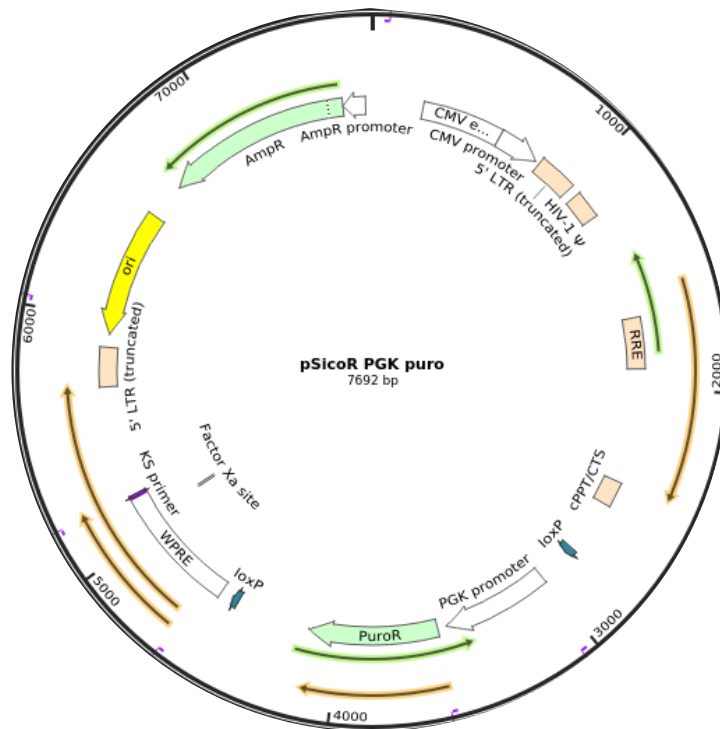
2.1 Υλικά

2.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς

Σχεδιάστηκαν siRNA αλληλουχίες ξεχωριστά για τους μεταγραφικούς παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6, οι οποίες μετατράπηκαν σε shRNAs με τα κατάλληλα άκρα για να ενσωματωθούν στους φορείς pSiCOR-PGK-puro και Tet-pLKO-puro. Οι φορείς χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών που να εκφράζουν shRNA προκειμένου να επιτευχθεί η σίγηση RNAi των μεταγράφων-στόχων.

pSiCOR-PGK-puro

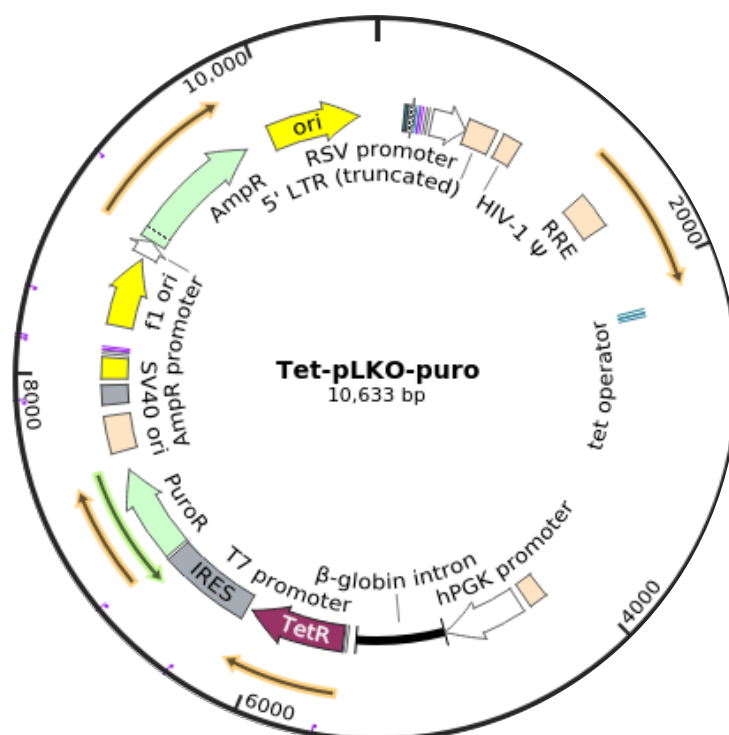
Ο πλασμιδιακός φορέας pSiCOR PGK puro (μέγεθος 7692bp) χρησιμοποιείται ως σύστημα παροδικής έκφρασης για τον γρήγορο έλεγχο της αποτελεσματικότητας των shRNAs καθώς δίνει φαινότυπο σε σύντομο χρονικό διάστημα (2-3 μέρες). Είναι κατάλληλος για γενετική τροποποίηση ευκαρυωτικών κυττάρων με λεντιούς καθώς περιλαμβάνει τα απαραίτητα στοιχεία για την ενσωμάτωση του ενθέματος (shRNA). Περιλαμβάνει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμικιλίνη για επιλογή σε βακτήρια XL1Blue, γονίδιο ανθεκτικότητας σε πουρομυκίνη για επιλογή σε ευκαρυωτικά κύτταρα και ιδιοσύστατο υποκινητή για τον έλεγχο της ένθεσης των oligo shRNAs (Εικ.17).



Εικόνα 17. Φυσικός χάρτης του pSiCOR-PGK-puro πλασμιδίου.

Tet-pLKO-puro

Ο πλασμιδιακός φορέας Tet-pLKO-puro (μέγεθος 10633bp) χρησιμοποιείται ως σύστημα επαγόμενης έκφρασης για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών, μια διαδικασία που είναι περισσότερο χρονοβόρα (3-4 μήνες) συγκριτικά με τον φορέα pSiCOR-PGK-puro. Είναι κατάλληλος για γενετική τροποποίηση ευκαρυωτικών κυττάρων με λεντιούς καθώς περιλαμβάνει τα απαραίτητα στοιχεία για την ενσωμάτωση του ενθέματος (shRNA). Περιλαμβάνει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη για επιλογή σε βακτήρια XL1Blue και γονίδιο ανθεκτικότητας σε πουρομυκίνη για επιλογή σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το χαρακτηριστικό του φορέα αυτού είναι το σύστημα Dox/TetR, που λειτουργεί μέσω των εξής στοιχείων: υπάρχουν 2 βασικές κατασκευές υπό τον έλεγχο 2 ιδιοσυστάτων υποκινητών hPGK και H1 (**Εικ.18**). Ο υποκινητής hPGK είναι υπεύθυνος για τη συνεχή έκφραση μιας πρωτεΐνης-καταστολέα TetR. Ο υποκινητής H1 είναι υπεύθυνος για την έκφραση του ενθέματος (shRNA) και εντός του υπάρχουν τα στοιχεία TRE (Tet-responsive element), που αποτελούν τον tet-χειριστή, στα οποία προσδένεται η πρωτεΐνη-καταστολέα TetR εμποδίζοντας έτσι την έκφραση του ενθέματος (shRNA). Παρουσία δοξυκυκλίνης (συνθετικό παράγωγο της τετρακυκλίνης), αυτή προσδένεται στη πρωτεΐνη-καταστολέα TetR και συνεπώς εμποδίζει τη πρόσδεσή της στον tet χειριστή (στοιχεία TRE) με αποτέλεσμα την έκφραση του shRNA. Απουσία δοξυκυκλίνης, η πρωτεΐνη-καταστολέα TetR προσδένεται στα στοιχεία TRE εμποδίζοντας την επαγωγή του H1 υποκινητή και κατ'επέκταση καταστέλλει και την έκφραση του shRNA.



Εικόνα 18. Φυσικός χάρτης του Tet-pLKO-puro πλασμιδίου.

2.1.2 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές:

MKN45: προέρχεται από αδenoκαρκίνωμα γαστρικού επιθηλίου ελάχιστα διαφοροποιημένο.

KATOIII: προέρχεται από ιστό πλευρικής μετάστασης αδenoκαρκινώματος (τύπου Signet ring cell).

NUGC4: προέρχεται από πλήρως διαφοροποιημένο αδenoκαρκίνωμα στομάχου

MCF7: προέρχεται από πλευρικό μεταστατικό ιστό στον καρκίνο του μαστού

SKBR: προέρχεται από πλευρικό μεταστατικό ιστό μαστικού αδένου

HT29: λεμφαδενική προέλευση από καρκίνο του παχέος εντέρου

HFE: φυσιολογική κυτταρική σειρά από με προέλευση από φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν αρχεία δεδομένων ChIP-seq (καρκινική σειρά KATOIII) με τις γονιδιωματικές συντεταγμένες πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 και ένα αρχείο με τις γονιδιωματικές συντεταγμένες όλων των περιοχών υποκινητών για lncRNAs, 2.500 βάσεις ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής (TSS-Transcriptional Start Site) του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το αρχείο με τις περιοχές υποκινητών περιλάμβανε 21.029 δεδομένα υποκινητών από τα οποία αξιοποιήθηκαν για την ανάλυση τα 4.000 που αντιστοιχούσαν σε lncRNAs καθώς τα υπόλοιπα 17.029 αφορούσαν ψευδογονίδια. Με τη χρήση του βιοπληροφορικού εργαλείου BedTools της πλατφόρμας Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) συγκρίθηκαν τα δεδομένα μεταξύ τους (3 αναλύσεις για κάθε μεταγραφικό παράγοντα) και το αποτέλεσμα ήταν η εύρεση όλων των lncRNAs που στους υποκινητές τους υπήρχαν μοτίβα πρόσδεσης για κάθε μεταγραφικό παράγοντα KLF5/GATA4/GATA6 ξεχωριστά. Έπειτα έγινε φιλτράρισμα των δεδομένων με κριτήρια το μήκος της αλληλουχίας πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα να είναι \geq από 200nt και η ένταση σήματος $>2.5-3$ fold σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (input).

Για την απεικόνιση των δεδομένων ChIP-seq σε μορφή θερμικού χάρτη, οι συντεταγμένες των περιοχών των υποκινητών όλων των ανθρώπινων lncRNAs, μαζί με ChIP-seq δεδομένα (αρχεία BAM) των μεταγραφικών παραγόντων στις κυτταρικές σειρές (AGS, KATOIII, YCC3) και ChIP-seq δεδομένα για τους ιστονικούς δείκτες

H3K4me3, H3K4me1, και H3K27Ac από μια κυτταρική σειρά (KATOIII) μεταφορώθηκαν στο πρόγραμμα seqMINER.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μεταγραφομική ανάλυση RNAseq δεδομένων από βιοψίες ασθενών αλλά και υγιών ατόμων, όπως και από καρκινικές κυτταρικές σειρές και η απεικόνισή τους σε θερμικούς χάρτες και διαγράμματα Volcano Plots. Με τη χρήση του προγράμματος Perseus έγινε η λογαρίθμηση των ήδη κανονικοποιημένων τιμών (τιμές RPKM) κι έπειτα μετατράπηκαν σε αποκλίσεις z (z-score) για τη δημιουργία των θερμικών χαρτών (Heatmaps). Με το ίδιο πρόγραμμα υπολογίστηκαν η στατιστική σημαντικότητα (τιμές μετασηματισμένες σε αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο/p-value) και το εύρος αλλαγής (τιμές μετασηματισμένες σε δυαδικό λογάριθμο) για την απεικόνισή τους σε διαγράμματα Volcano plot. Από τα διαγράμματα αυτά βρέθηκαν τα στατιστικώς σημαντικά αυξορυθμιζόμενα και μειορυθμιζόμενα γονίδια lncRNAs στις καρκινικές βιοψίες/καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς και συγκεντρώθηκαν σε ένα ξεχωριστό αρχείο.

Το τελευταίο βήμα αυτής της βιοπληροφορικής ανάλυσης ήταν η σύγκριση του αρχείου με τα διαφορικά εκφρασμένα lncRNAs, με τα 3 αρχεία μοτίβων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που προέκυψαν από τη προηγούμενη ανάλυση. Το αποτέλεσμα ήταν η εύρεση lncRNAs με διαφορετική έκφραση στον καρκίνο (στατιστικώς σημαντική) και πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στη περιοχή του υποκινητή τους (-2.500-0/TSS). Μέσω του γονιδιωματικού φυλλομετρητή UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) έγινε η απεικόνιση των κορυφών πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων και η πλοήγηση στις αλληλουχίες συγκεκριμένων lncRNA μεταγράφων.

Τέλος, ο σχεδιασμός των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές τεχνικές έγινε μέσω PrimerQuestTool της πλατφόρμας IDT (<https://eu.idtdna.com/site/home/country>) ενώ η αποτελεσματικότητά τους ελέγχθηκε μέσω του εργαλείου in silico PCR του φυλλομετρητή UCSC.

Η κατεργασία των εικόνων της ανάλυσης Colony Formation Assay έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ κι έπειτα μέσω της ιστοσελίδας <http://www.coolphptools.com/> έγινε ποσοτικοποίηση του ποσοστού της διαθέσιμης επιφάνειας που καλύφθηκε από κύτταρα σε κάθε δείγμα.

2.2.2 Προετοιμασία των ολιγονουκλεοτιδίων shRNA και αντίδραση λιγάσης

2μL sense oligos (100μM) αναμειγνύονται με 2μL antisense oligos (100μM) και 96μL annealing buffer (10x), ακολουθεί βρασμός στους 95 °C για 5 λεπτά κι αφού κατέβει η θερμοκρασία τους στους 30 °C ακολουθεί η αντίδραση της λιγάσης (**Πίνακας 1**). Η αντίδραση κρατάει 16 ώρες στους 16 °C, και 10 μL από την αντίδραση χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη διαδικασία μετασηματισμού. Τέλος

πραγματοποιείται και μια αντίδραση λιγάσης για τον αρνητικό μάρτυρα (self-ligation) στην οποία στη θέση του ενθέματος προστίθεται ddH₂O. Οι φορείς που χρησιμοποιούνται υφίστανται πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ώστε να έχουν τα κατάλληλα άκρα για την ενσωμάτωση του ενθέματος.

Πίνακας 1. Σύσταση αντίδρασης Λιγάσης.

	pSiCOR (50ng/μL)	pLKO (30ng/μL)
Buffer (T4 lig. NEB) (10X)	2μL	2 μL
Πλασμιδιακός φορέας	1,5 μL	2 μL
Ένθεμα (dsOligos)	10μL	4 μL
T4 DNA Λιγάση (NEB)	2μL	2 μL
H₂O	Μέχρι 20μL	Μέχρι 20μL

2.2.3 Κλωνοποίηση πλασμιδιακών κατασκευών μέσω μετασηματισμού βακτηριακών κυττάρων

Και οι δύο πλασμιδιακοί φορείς που περιείχαν το ένθεμα των shRNA κλωνοποιήθηκαν σε κύτταρα *E. coli* και συγκεκριμένα στο στέλεχος XL1.Blue το οποίο καταστέλλει τους πλασμιδιακούς ανασυνδυασμούς. Αρχικά αναμειγνύεται το εναιώρημα βακτηριακών κυττάρων με το πλασμιδιακό DNA και επώάζονται στον πάγο για 20 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί θερμικό σοκ (heatshock) με επώαση για 50 δευτερόλεπτα σε υδατόλουτρο στους 42°C και με το πέρας του χρόνου πραγματοποιείται και μια επώαση 2 λεπτών στον πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 900 mL LB (υγρό θρεπτικό μέσο) και επώαση για 50 λεπτά σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37 °C/160rpm. Στη συνέχεια γίνεται η επίστρωση μιας ποσότητας από την υγρή καλλιέργεια σε τρυβλία με LB-agar-100μg/mL Ampicillin, και ύστερα από ολονύκτια επώαση στους 37°C επιλέγεται μοναδιαίος κλώνος. Επόμενο βήμα είναι 2 διαδοχικές ανακαλλιέργειες, αρχικά σε 3 mL LB/6 ώρες-37 °C κι έπειτα σε 150 mL LB για όλη τη νύχτα/37 °C. Τέλος ύστερα από τη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 5.000rpm (4,500–6,000 x g) στους 4 °C, ακολουθεί η εξαγωγή πλασμιδιακού DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρίας Macherey Nagel Xtra Plasmid purification kit MIDI protocol.

2.2.4 Διαγνωστικές πέψεις και διαγνωστική PCR

Για τον έλεγχο της ένθεσης των shRNA στους πλασμιδικούς φορείς Tet-pLKO-puro pSiCOR-PGK-puro πραγματοποιούνται διαγνωστικές πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, διαφορετικά για κάθε πλασμιδιακή κατασκευή και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Μαζί με τα εξεταζόμενα δείγματα,

ηλεκτροφορούνται και οι αντίστοιχοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (άκοπο πλασμίδιο) για την εξακρίβωση των αποτελεσμάτων. Η πέψη (Πίνακας 2,3) διαρκεί 2 ώρες σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 42 °C, ενώ με το πέρας του χρόνου προστίθενται 10μL χρωστικής Loading Dye (6x) για να ακολουθήσει η ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 2. Σύσταση διαγνωστικής πέψης για τον φορέα pSiCOR.

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer CutSmart (10X)	5μL
Ένζυμο BamHI (NEB)	2 μL
Ένζυμο XbaI (NEB)	2 μL
Πλασμιδιακό DNA (pSiCOR)	5μL
H₂O	Μέχρι 50μL

Πίνακας 2. Σύσταση διαγνωστικής πέψης για τον φορέα pLKO.

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer CutSmart (10X)	5μL
Ένζυμο XhoI (NEB)	2 μL
Πλασμιδιακό DNA (pLKO)	10μL
H₂O	Μέχρι 50μL

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων διεξάγονται και διαγνωστικές PCR με εκκινητές σχεδιασμένους έτσι ώστε ο ένας να υβριδίζει σε αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα και ο άλλος σε αλληλουχία του εκάστοτε shRNA. Ο σχεδιασμός της αντίδρασης PCR παρατίθεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 3. Σύσταση αντίδρασης διαγνωστικής PCR.

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer KAPATaq (10x)	5μl
dNTPs	0,5μl
Primer F	1μl
Primer R	1μl
Πλασμιδιακό DNA (80 ng/μL)	1μl

Taq polymerase	0,3μl
ddH₂O	Μέχρι 50μL

Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα που προέκυψαν ως θετικά από τις διαγνωστικές πέψεις και PCR στάλθηκαν για αλληλούχηση για να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή του ενθέματος σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η αλληλούχηση κατά Sanger πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CeMIA (<https://cemia.eu>),

Ύστερα από την επιβεβαίωση της ένθεσης των shRNA στους πλασμιδιακούς φορείς, αυτοί εισήχθησαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου (MKN45, KATOIII) με χρήση συστήματος διαμόλυνσης με λεντι-ιούς και ακολούθησε η εξαγωγή RNA για τον έλεγχο της μεταγραφικής σίγησης.

2.2.5 RNA Extraction

Αφού προστεθούν 1000μL τριζόλη στα κύτταρα και με την πάροδο 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 200μL χλωροφόρμιο/30" vortex κι έπειτα φυγοκέντρηση στους 4°C/14.000rpm για 5 λεπτά. Ύστερα από την απομόνωση του υπερκειμένου σε άλλο erpendorf tube, προστίθεται ισοπροπανόλη σε ίση ποσότητα. Στη συνέχεια επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρούνται στους 4°C/14.000rpm για 15 λεπτά. Κατόπιν, απομακρύνεται το υπερκειμένο, προστίθεται στο ίζημα 500μL παγωμένης αιθανόλης 70%, και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στους 4°C/14.000rpm για 5 λεπτά. Έπειτα αφαιρείται το υπερκειμένο, και τα δείγματα αφήνονται με ανοιχτό καπάκι για 10-15 λεπτά για να εξατμιστούν όλες οι σταγόνες αιθανόλης και να μείνει μόνο το ίζημα. Τέλος, γίνεται η επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50μL RNase free H₂O, θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά και vortex, για να ακολουθήσει η αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

2.2.6 DNase Treatment

Συνεχίζοντας από το τελευταίο βήμα του προηγούμενου πρωτοκόλλου (RNA extraction), πραγματοποιείται μια ενζυμική αντίδραση δεσοξυριβονουκλεάσης με επώαση σε υδατόλουτρο/37°C για 1 ώρα. Η σύσταση της αντίδρασης παρατίθεται στον πίνακα 5. Με το πέρας της επώασης γίνεται προσθήκη 40μL οξικού νατρίου (pH=5,6, 3M) και 310μL ddH₂O. Ακολουθεί προσθήκη 400μL φαινόλη/χλωροφόρμιο, vortex και φυγοκέντρηση στους 4°C/14.000rpm για 5 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκειμένο σε νέο erpendorf tube, προστίθεται 1000μL παγωμένη αιθανόλη 100%, κι αφού γίνει μια ήπια ανάδευση τα δείγματα διατηρούνται στους -80 °C για 1 ώρα.

Μετά την επώαση τα δείγματα φυγοκεντρώνται στους 4°C/14.000rpm για 30 λεπτά κι έπειτα απορρίπτεται το υπερκείμενο. Ακολουθεί προσθήκη 500µL παγωμένη αιθανόλη 70% και φυγοκέντρηση στους 4°C/14.000rpm για 5 λεπτά. Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, και τα δείγματα αφήνονται με ανοιχτό καπάκι για 10-15 λεπτά για να εξατμιστούν όλες οι σταγόνες αιθανόλης και να μείνει μόνο το ίζημα. Τέλος, γίνεται η επαναδιάλυση του ιζήματος σε ddH₂O, θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά και vortex/spin down, για να ακολουθήσει η αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

Πίνακας 4. Σύσταση αντίδρασης DNάσης για τον χειρισμό του RNA.

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer (10X)	3µL
DNase enzyme	1µL
Sample	25µL
ddH₂O	Μέχρι 30µL

2.2.7 cDNA Synthesis

Αρχικά γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης RNA με χρήση Nanodrop. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες ποσότητες RNA δείγματος και διαλύονται στην αντίστοιχη ποσότητα ddH₂O έτσι ώστε τελικά να υπάρχει 1µg ποσότητας RNA σε τελικό όγκο 10µL. Προστίθενται 1µl oligodTs (10mM) και 1µl dNTPs (10mM) και τα δείγματα επώζονται για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 65 °C. Έπειτα αφού προστεθούν (στα ήδη υπάρχοντα 2µL) τα απαραίτητα συστατικά (**Πίνακας 6**) για την ενζυμική αντίδραση της cDNA σύνθεσης ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες. Με το πέρας της επώασης προστίθεται 380µL ddH₂O και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C.

Πίνακας 5. Σύσταση αντίδρασης cDNA σύνθεσης.

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer (5X)	4µL
DTT (100mM)	2µL
RNase out	1µL
MMLV (ThermoScientific)	1µL
Τελικός όγκος	20µL

2.2.8 Quantitative PCR (qPCR)

Η qPCR που πραγματοποιήθηκε βασίστηκε στη φθορίζουσα χρωστική SYBRgreen, η οποία παρεμβάλλεται στο δίκλωνο DNA, και η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν της BioRad. Χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα DNA σε υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις, ως standard δείγματα για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς για να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων (αντιστοίχιση των Cq με ποσότητες). Χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια ιδιοσύστατης έκφρασης, GAPDH και RPLP1 για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα CFX manager (BioRad) και τα συστατικά της αντίδρασης παρατίθενται στον πίνακα 7.

Πίνακας 6. Σύσταση QPCR αντίδρασης.

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
SYBRgreen Buffer Mix (2x)	10μL
Forward primer	1μL
Reverse primer	1μL
cDNA Template	4μL
ddH₂O	Μέχρι 20μL

2.2.9 Colony Formation Assay (CFA)

Πρόκειται για μια *in vitro* μέθοδο που βασίζεται στη χρώση κυττάρων και στη παρατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας και ανάπτυξης. Χρησιμοποιούνται 6-well πιάτα όπου προστίθενται καρκινικά κύτταρα (σε θρεπτικό μέσο) σε ποσότητα 10×10^5 και ακολουθεί ολονύκτια επώαση. Έπειτα από τον εκάστοτε επιθυμητό πειραματικό χειρισμό, ακολουθεί η χρώση των κυττάρων με μέσο που περιέχει διάλυμα Commassie-blue χρωστική κι αφού γίνει μια 5λεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, απομακρύνεται. Τέλος γίνονται και πάλι διαδοχικές πλύσεις με ddH₂O και τα πιάτα αφήνονται για να στεγνώσουν πριν την παρατήρηση του φαινοτύπου.

2.2.10 Απομόνωση πρωτεϊνών και μέτρηση συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Απομόνωση και κατεργασία πρωτεϊνών

Συλλέγονται τα επιθυμητά κύτταρα από τα οποία θα γίνει η εξαγωγή πρωτεϊνών, τοποθετούνται σε 1mL θρυψίνης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4 °C/3.000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος (κύτταρα) σε 50μL RIPA (10 mM Tris-Cl /pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 140 mM NaCl) και ακολουθεί vortex μέχρι να διαλυθεί πλήρως το ίζημα. Μέσω του διαλύματος RIPA, σπάνε οι κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων και εξασφαλίζεται η κατάλληλη ιοντική ισχύς ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

Μέθοδος Bradford

Πρόκειται για μια φασματοφωτομετρική μέθοδο μέτρησης συγκέντρωσης πρωτεϊνών που βασίζεται στη χρωστική Brilliant Blue G-250. Ύστερα από την απομόνωση πρωτεϊνών γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων με προσθήκη 1000μL αντιδραστηρίου Bradford σε 1μL δείγματος (διαλυμένο σε RIPA) και προσθήκη 100μL ddH₂O. Ακολουθεί έντονο vortex και η απορρόφηση μετρείται σε φασματοφωτόμετρο (λ=595 Hz) με τη χρήση κατάλληλων κυβετών. Η ποσοτικοποίηση που έγινε ήταν σχετική και όχι απόλυτη, επομένως η ποσότητα του RIPA στο οποίο διαλύθηκε το κάθε δείγμα διέφερε ανάλογα με τη συγκέντρωση, και προσαρμόστηκε έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις/απορροφήσεις των δειγμάτων να βρίσκονται κοντά στην ίδια τιμή. Ανάλογα με την ποσότητα RIPA που προστέθηκε σε κάθε δείγμα, ακολουθεί η προσθήκη SDS Loading Buffer (2X) (**Πίνακας 8**) σε αναλογία 1:1 με τον όγκο του RIPA στο οποίο είναι διαλυμένο το πρωτεϊνικό δείγμα. Σε αυτό το στάδιο τα διαλύματα των πρωτεϊνών είναι έτοιμα για να ακολουθήσει η μέθοδος του Western Blotting.

Πίνακας 8. Σύσταση διαλύματος 2x SDS Loading Buffer.

2X SDS Loading Buffer	
1M Tris pH6.8	2mL
50% Glycerol	4.6mL
10% SDS	1.6mL
0.5% Bromophenol Blue	0.4mL
β-mercaptoethanol	0.4mL
ddH ₂ O	1mL

2.2.11 Western Blot

Η μέθοδος του Western Blotting (ή αλλιώς ανοσοστύπωμα) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα μίγμα πρωτεϊνών. Βασίζεται πάνω στην ειδικότητα αντισώματος-αντιγόνου και στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση. Το είδος της ηλεκτροφόρησης που πραγματοποιήθηκε ήταν μια ασυνεχής ηλεκτροφόρηση. Ο όρος οφείλεται στη διαφορετική σύσταση και στο διαφορετικό pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του πηκτώματος SDS-Πολυακρυλαμιδίου.

Αφού συναρμολογηθεί το σύστημα κάθετης ηλεκτροφόρησης παρασκευάζεται το πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου. Σε πλαστικό σωλήνα, παρασκευάζεται το διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (separating ή resolving gel) σύστασης 10% και όγκου 10mL (**Πίνακας 9**). Το διάλυμα προστίθεται στο σύστημα κάθετων πλακών μέχρι ένα προκαθορισμένο σημείο, στην επιφάνειά του τοποθετείται ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη, και αφήνεται να πολυμεριστεί για 20-30 λεπτά.

Πίνακας 9. Σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού 10%.

Resolving gel 10%	
Συστατικά	Ποσότητες
H ₂ O	4,8 mL
40% acrylamide mix	2,5 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,5 mL
10% SDS	0,1 mL
10% Ammonium Persulfate	0,1 mL
TEMED	0,004 mL
Τελικός όγκος	10mL

Αφού αφαιρεθεί η ισοπροπανόλη και πολυμεριστεί το πήκτωμα, παρασκευάζεται το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) το οποίο είναι χαμηλότερης συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου σύστασης 5% και όγκου 2mL (**Πίνακας 10**). Προστίθεται στο ήδη πολυμερισμένο πήκτωμα διαχωρισμού και αφήνεται να πολυμεριστεί για 20-30 λεπτά.

Πίνακας 10. Σύσταση του πηκτώματος επιστοιβάξης 5%.

Stacking gel 5%	
Συστατικά	Ποσότητες
H ₂ O	1,48 mL
40% acrylamide mix	0,24 mL
1.5 M Tris (pH 6.8)	0,25 mL
10% SDS	0,2 mL
10% Ammonium Persulfate	0,2 mL
TEMED	0,002 mL
Τελικός όγκος	2mL

Μετά τον πολυμερισμό και του πηκτώματος επιστοιβάξης, το σύστημα των κάθετων πλακών τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Η σύσταση του Running Buffer είναι η εξής: 890mL ddH₂O, 100mL Running Buffer (10x-SDS), 10mL SDS 10% (**Πίνακας 11**).

Πίνακας 11. Σύσταση διαλύματος 10x Running Buffer (-SDS).

10x Running Buffer (-SDS)	
Συστατικά	Ποσότητες
Tris-base	30g
Glycine	144g
ddH ₂ O	Μέχρι 1 L

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των δειγμάτων για φόρτωμα στο πήκτωμα. Όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη ενότητα, στα δείγματα έχει ήδη προστεθεί 2x Loading Buffer, και το επόμενη βήμα είναι η θέρμανση των δειγμάτων στους 95-100°C για 5 λεπτά για να επιτευχθεί η αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής. Από την στιγμή που αποδιάσσονται οι πρωτεΐνες, τα δείγματα δεν αφήνονται στον πάγο διότι περιέχουν SDS το οποίο σε χαμηλές θερμοκρασίες καταβυθίζεται. Οπότε από την στιγμή της αποδιάταξης και μέχρι να φορτωθούν στην πηκτή, τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί το φόρτωμα 15μL από τα δείγματα στο πήκτωμα, το οποίο έχει ήδη τοποθετηθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Μαζί με τα δείγματα φορτώνονται και 7μL μάρτυρα μοριακού βάρους (Invitrogen, Prestained). Η ηλεκτροφόρηση αρχικά γίνεται στα 80V, μέχρι τα δείγματα να περάσουν στο resolving gel, κι από κει και πέρα η τάση αυξάνεται στα 110V μέχρι η χρωστική να φτάσει στο τέλος του πηκτώματος. Αφού ηλεκτροφορηθούν τα δείγματα, αφαιρούνται τα πηκτώματα από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και απομακρύνεται το stacking gel για να ακολουθήσει η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

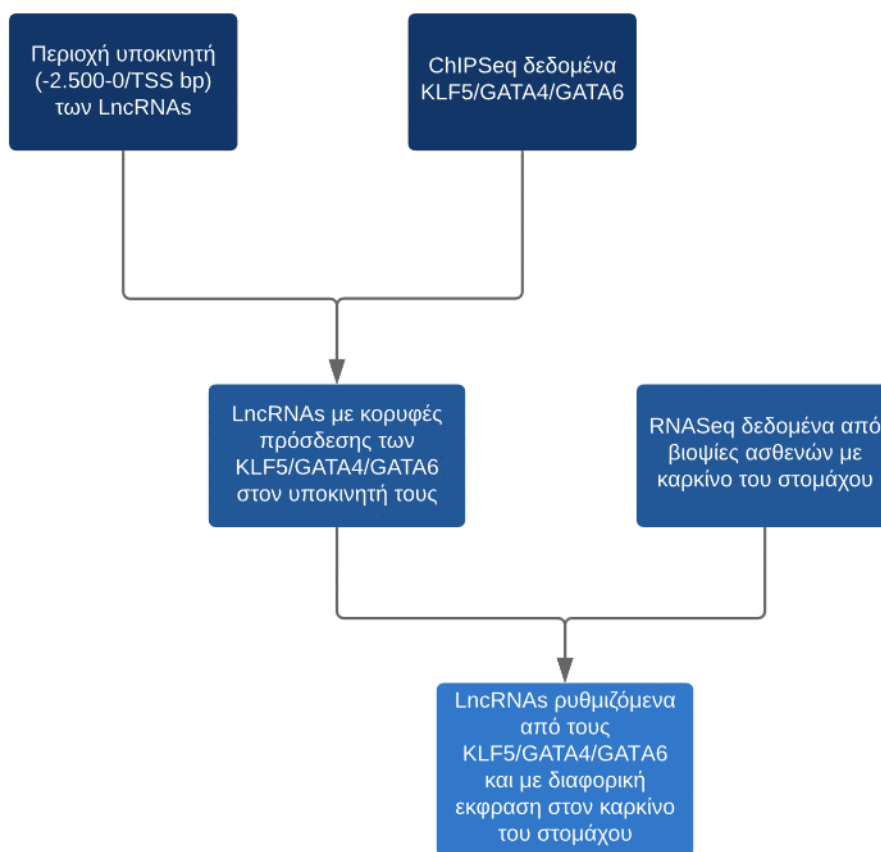
Αρχικά προετοιμάζεται το Transfer Buffer που περιλαμβάνει 200mL MeOH, 100mL Running Buffer (10x-SDS) και 700mL ddH₂O. Χρησιμοποιούνται διηθητικά χαρτιά Whatman τα οποία εξισορροπούνται σε Transfer Buffer για 5 λεπτά. Αφού τοποθετηθούν τα διηθητικά χαρτιά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το πήκτωμα στη σωστή σειρά και κατεύθυνση στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, αυτή συνδέεται σε συσκευή ηλεκτροφοδοσίας και ολοκληρώνεται μετά από 1.30 ώρα με εφαρμογή τάσης 110V. Ενδιάμεσα είναι σημαντικό να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία τους διαλύματος μεταφοράς με χρήση παγοκυστών. Με το πέρας της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αυτή ελέγχεται με την εμφάνιση του μάρτυρα στη μεμβράνη ο οποίος περιλαμβάνει χρωστική. Η εμφάνιση του μάρτυρα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υποδεικνύει και επιτυχή ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών.

Επόμενο βήμα είναι η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στη μεμβράνη για να ακολουθήσει στη συνέχεια η προσθήκη των αντισωμάτων. Οι μεμβράνες επάζονται σε 5mL διαλύματος TBST 5% (100mL TBS 20x, Tween_20 σε τελική συγκέντρωση 0,1%, 5 gr αποβουτυρωμένο γάλα). Η επώαση διαρκεί 1 ώρα σε συνεχή ανάδευση, ώστε η επιφάνεια των μεμβρανών να έρχεται σε συνεχή επαφή με το διάλυμα. Ακολουθεί η επώαση με 10mL από το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο είναι ήδη διαλυμένο σε TBST 5% και σε αραιώση 1:1000. Μετά από 1 ώρα επώασης υπό ανάδευση, ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με PBST. Έπειτα γίνεται η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό ανάδευση, και ακολουθούν και πάλι διαδοχικές πλύσεις με PBST.

Τέλος, πραγματοποιείται η εμφάνιση του φιλμ: η μεμβράνη τοποθετείται σε πλαστική επιφάνεια με ίσους όγκους των δύο αντιδραστηρίων του υποστρώματος χημειοφωταύγειας ECL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η εμφάνιση του φιλμ εκτελείται σε σκοτεινό θάλαμο με διαδοχική εμφάπτισή του σε δοχεία που περιέχουν υγρό ανάπτυξης, υγρό στερέωσης και τέλος νερό για σταθεροποίηση.

3. Αποτελέσματα

Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων, αυτά κατηγοριοποιούνται σε δύο μέρη: τη βιοπληροφορική ανάλυση και το πειραματικό μέρος. Το μέρος της βιοπληροφορικής ανάλυσης αποσκοπούσε στην εύρεση υποψήφιων lncRNA στόχων με πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή τους και με καρκινοειδική έκφραση (Εικ.19). Έτσι, αρχικά με τη χρήση ChIP-seq δεδομένων για τους μεταγραφικούς παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6 βρέθηκαν lncRNAs με πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής μέχρι 2.500bp. Αυτή η γονιδιωματική περιοχή μεγέθους 2.500bp αποτελεί μια ευρύτερη περιοχή που εμπεριέχει την περιοχή του υποκινητή. Για να εξακριβωθεί η θέση του υποκινητή, ακολούθησε μια ανάλυση heatmap με χρήση ChIP-seq δεδομένων για ιστονικούς δείκτες χαρακτηριστικούς για ενεργούς υποκινητές. Συγκρίνοντας τα μοτίβα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων και τα μοτίβα εμφάνισης των ιστονικών δεικτών, εξακριβώθηκε η θέση του υποκινητή και επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτήν. Η εμφάνιση κορυφών πρόσδεσης στον υποκινητή των lncRNAs που συγκεντρώθηκαν, δεν σημαίνει και καρκινοειδική έκφραση. Έτσι, ακολούθησε και μια μετα-ανάλυση RNA-Seq δεδομένων ασθενών και υγιών ατόμων και βρέθηκαν lncRNAs με διαφορετική έκφραση στον καρκίνο του στομάχου. Ύστερα από τη τελική σύγκριση αυτών των lncRNAs με τα προηγούμενα που βρέθηκαν από τη πρώτη βιοπληροφορική ανάλυση συγκεντρώθηκαν υποψήφια lncRNAs με διαφορετική έκφραση στον καρκίνο του στομάχου και με πρότυπα πρόσδεσης στον υποκινητή τους. Από αυτά επιλέχθηκαν 3 πιλοτικά lncRNAs (REAKTs) που ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξορρυθμιζόμενα στις βιοψίες ασθενών και με υψηλή ένταση ChIP-seq σημάτων πρόσδεσης του KLF5, για να μελετηθούν πειραματικά. Επομένως απώτερος σκοπός του βιοπληροφορικής ανάλυσης ήταν η εύρεση lncRNA στόχων για την επακόλουθη πειραματική τους μελέτη.



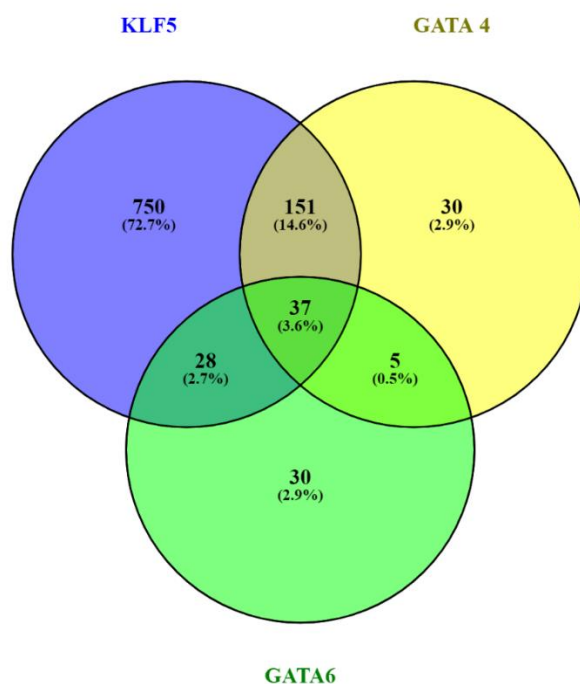
Εικόνα 19. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των βημάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης.

Στο πειραματικό μέρος ελέγχθηκε η έκφραση των REAKTs υπό τη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα KLF5. Αρχικά ελέγχθηκε η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου, ώστε να επιλεγεί η κατάλληλη για να ακολουθήσει η σίγηση (επιλέχθηκε η MKN45 με κριτήρια που περιγράφονται παρακάτω). Έπειτα σχεδιάστηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς κατάλληλα shRNA ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη γονιδιακή σίγηση του KLF5 στη κυτταρική σειρά καρκίνου του στομάχου MKN45. Ακολούθως ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της σίγησης σε μεταγραφικό (QPCR) αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Western blotting). Τέλος, αφού επιβεβαιώθηκε η επιτυχής και σημαντική μείωση του KLF5 και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μελετήθηκε η έκφραση των REAKTs (lincRNA rEgulated by Kruppel GasTric-REACT) και κατά πόσο αυτή επηρεάστηκε λόγω της σίγησης του KLF5.

3.1 Βιοπληροφορικό μέρος

3.1.1 Βιοπληροφορική ανάλυση μέσω Galaxy

Στο πρώτο μέρος της βιοπληροφορικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν ChIP-seq δεδομένα για τους μεταγραφικούς παράγοντες KLF5, GATA4, GATA6 που παρείχαν πληροφορίες για τις περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη. Τα δεδομένα αυτά συγκρίθηκαν με τις γονιδιωματικές συντεταγμένες όλων των περιοχών υποκινητών των lncRNAs του γονιδιώματος (-2.500-0/TSS). Με τη χρήση του βιοπληροφορικού εργαλείου Bedtools της πλατφόρμας Galaxy βρέθηκαν όλα τα lncRNAs που εμφανίζουν πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5, GATA4, GATA6 στην περιοχή του υποκινητή. Συνολικά εντοπίστηκαν 810 lncRNAs με πρότυπα πρόσδεσης που περιλαμβάνουν είτε μεμονωμένα κάθε μεταγραφικό παράγοντα είτε συνδυασμούς 2 ή και 3 παραγόντων στον ίδιο υποκινητή, τα οποία συνοψίζονται σε ένα διάγραμμα Venn (Εικ. 20). Πρότυπα πρόσδεσης από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 υπήρχαν στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων (72,7%), ενώ πρόσδεση και των τριών μεταγραφικών παραγόντων παρατηρήθηκε στο 3,6% του συνόλου των lncRNA.

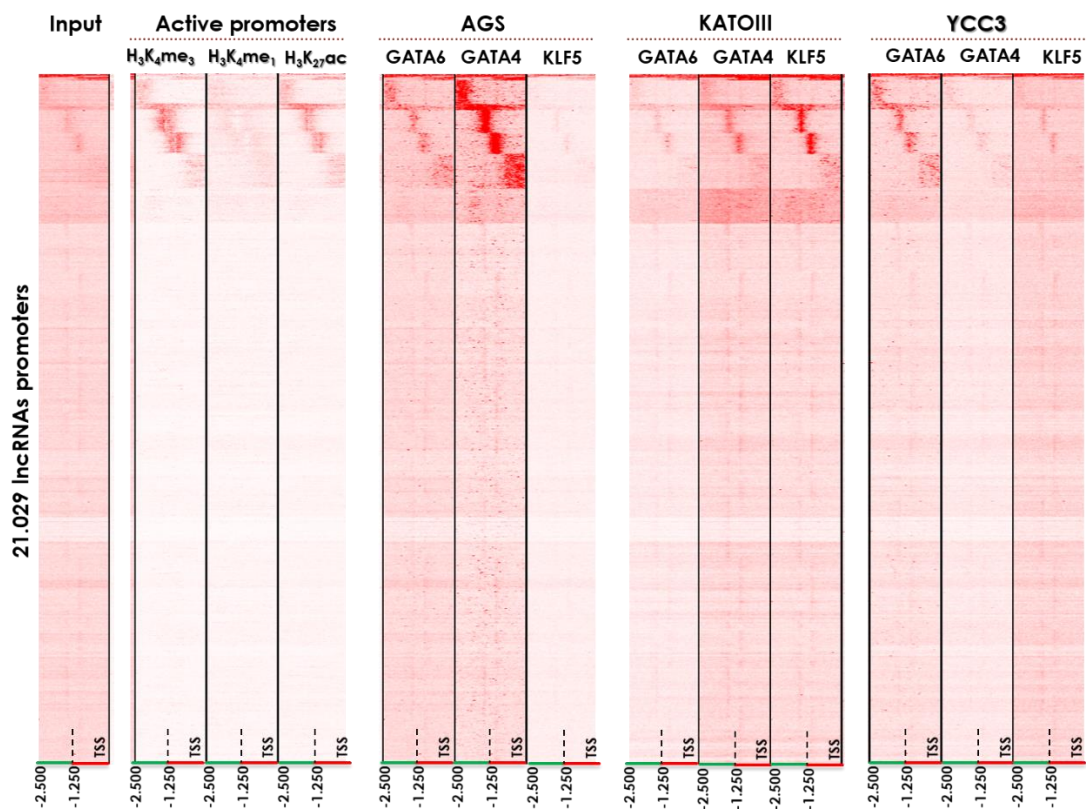


Εικόνα 20. Διάγραμμα Venn που απεικονίζει το ποσοστό των lncRNAs που εμφανίζουν κορυφές πρόσδεσης στη περιοχή του υποκινητή από τους 3 μεταγραφικούς παράγοντες.

3.1.2 Ανάλυση θερμικού χάρτη για τα σημεία πρόσδεσης των KLF5/GATA4/GATA6

Το γονιδιωματικό τμήμα των 2.500bp αποτελεί μια ευρύτερη περιοχή που μπορεί να περιλαμβάνει και τον υποκινητή των γονιδίων. Για να εντοπιστεί με ακρίβεια η θέση του έγινε μια επιπρόσθετη απεικόνιση σε μορφή θερμικού χάρτη των ChIP-seq δεδομένων για τους ιστονικούς δείκτες H3K4me3, H3K4me1, και H3K27Ac οι οποίοι είναι χαρακτηριστικοί για τα ρυθμιστικά στοιχεία των υποκινητών και ενισχυτών. Γενικά οι υποκινητές χαρακτηρίζονται από έντονο σήμα H3K4me3 και από μειωμένης έντασης σήμα H3K4me1. Στους ενισχυτές ισχύει το αντίστροφο ενώ, το επιγενετικό σήμα H3K27Ac είναι αυξημένο και στα δύο είδη ρυθμιστικών στοιχείων αφού σχετίζεται με ανοιχτή δομή χρωματίνης. Τα ChIP-seq δεδομένα των ιστονικών τροποποιήσεων συσχετίστηκαν με τα αντίστοιχα ChIP-seq δεδομένα των μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και με τις γονιδιωματικές συντεταγμένες όλων των lncRNA υποκινητών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με την μορφή θερμικού χάρτη στην εικόνα 21. Κάθε οριζόντια γραμμή στον χάρτη αντιστοιχεί και σε έναν lncRNA υποκινητή (21.000 στο σύνολο της ανάλυσης μαζί με τα ψευδογονίδια) ενώ στον οριζόντιο άξονα και για κάθε στήλη φαίνεται η κατανομή του ChIP-seq σήματος ανοδικά του σημείου θέσης έναρξης της μεταγραφής. Δηλαδή στα δεξιά της κάθε στήλης βρίσκεται το σημείο 0, ενώ στα αριστερά η θέση -2.500 (βάσεις).

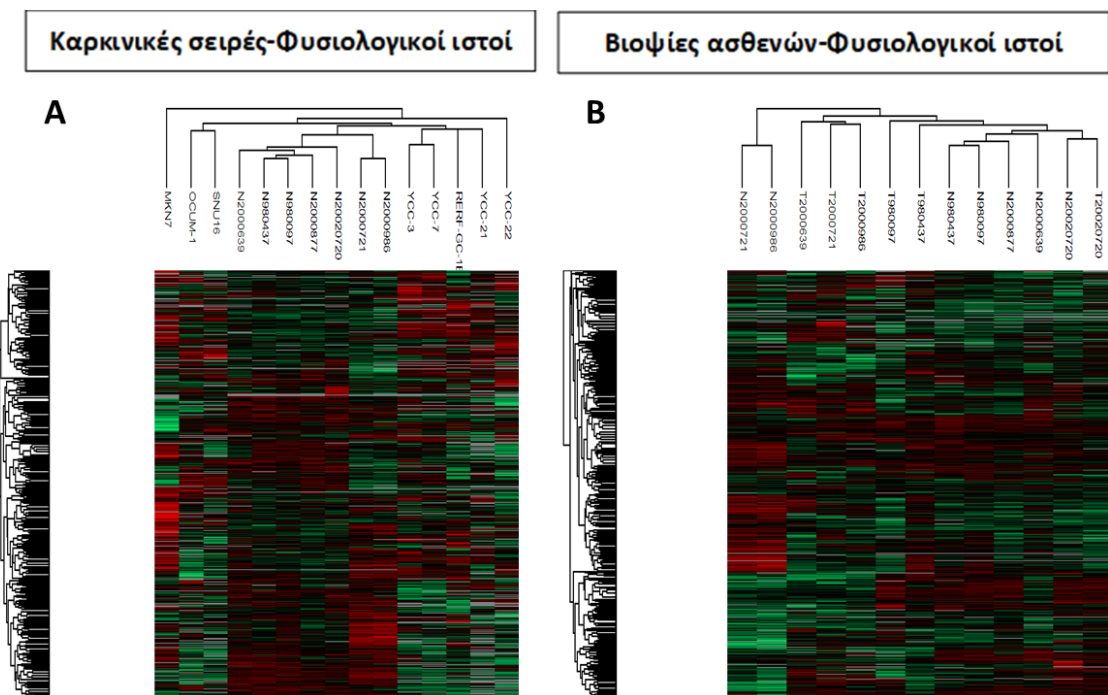
Παρατηρώντας τα μοτίβα των σημάτων στην ομάδα υποκινητών, είναι αρκετά έντονα στη περίπτωση των H3K27Ac και H3K4me3 και μειωμένης έντασης στο σήμα H3K4me1, επιβεβαιώνοντας την πρόσδεση σε περιοχή ενεργού υποκινητή και όχι ενισχυτή. Τα δεδομένα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων τα οποία είναι ομαδοποιημένα ανάλογα με τη κυτταρική σειρά, δείχνουν ένα παρεμφερές μοτίβο πρόσδεσης και για τους 3 μεταγραφικούς παράγοντες τα οποία συμπίπτουν με τα ιστονικά σήματα, γεγονός που υποδηλώνει τον εντοπισμό τους στη περιοχή ενεργών υποκινητών lncRNAs. Το κοινό αυτό μοτίβο διατηρείται και στις 3 κυτταρικές σειρές αλλά με διαφορά στην ένταση των σημάτων, γεγονός που συμφωνεί με τη διαφορετική συμβολή των μεταγραφικών παραγόντων στη γονιδιακή έκφραση, ανάλογα με τη καρκινική κυτταρική σειρά. Τέλος, είναι εμφανής η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων ενεργότητας των υποκινητών με τα σήματα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, γεγονός που επιτρέπει τον ακριβή εντοπισμό του υποκινητή για κάθε υποψήφιο lncRNA.



Εικόνα 21. Ανάλυση θερμικού χάρτη με χρήση δεδομένων ChIP-seq για τα μοτίβα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων GATA6/GATA4/KLF5 στις κυτταρικές σειρές AGS/KATOIII/YCC3, δεδομένων ChIP-seq για τις επιγενετικές τροποποιήσεις H3K27Ac/H3K4me3/H3K4me1 στην κυτταρική σειρά KATOIII, και δεδομένων με γονιδιωματικές συντεταγμένες των περιοχών υποκινητών για όλα τα lncRNAs (21.029 ψευδογονίδια και lncRNA γονίδια). Στον άξονα γ απεικονίζονται όλα τα lncRNAs και στον άξονα χ για κάθε στήλη φαίνεται η περιοχή του υποκινητή ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής έως -2.500 βάσεις. Οι στήλες εμφανίζονται από αριστερά προς δεξιά ως εξής: Input, το οποίο αντιστοιχεί σε μη ανοσοκατακρημισμένη χρωματίνη και χρησιμοποιείται ως control κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης, ομάδα ενεργών lncRNA υποκινητών με αυξημένα τα επιγενετικά σήματα H3K27Ac και H3K4me3 όπως περιεγράφηκε και προηγουμένως και 3 διαδοχικές ομάδες ανάλογα με την κυτταρική σειρά για τα μοτίβα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6. Το έντονο κόκκινο χρώμα υποδηλώνει παρουσία είτε της αντίστοιχης επιγενετικής τροποποίησης είτε του μεταγραφικού παράγοντα ανά περίπτωση. Αυξημένη χρωματική ένταση αντιστοιχεί και σε πιο έντονο σήμα.

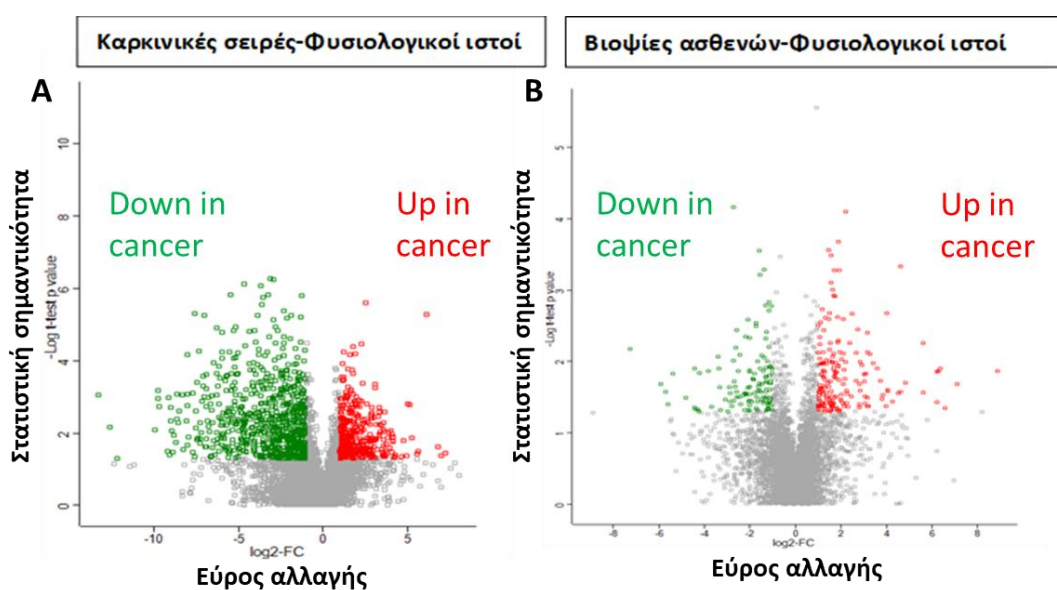
3.1.3 Μετα-ανάλυση δεδομένων RNA-seq

Τα σήματα πρόσδεσης των ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων δεν εξασφαλίζουν και την καρκινοειδική έκφραση. Η επόμενη ανάλυση αποσκοπούσε στην εύρεση lncRNA που να είναι διαφορετικά εκφρασμένα στον καρκίνο σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς. Έτσι, από τη μετα-ανάλυση μεταγραφικών δεδομένων από υγιείς και καρκινικές βιοψίες αλλά και από καρκινικές σειρές, κατασκευάστηκαν θερμικοί χάρτες και διαγράμματα Volcano Plot. Στον κατακόρυφο άξονα απεικονίζεται το πλήθος των γονιδίων, ενώ στον οριζόντιο παρατίθενται τα διαφορετικά δείγματα σε στήλες τα οποία ομαδοποιούνται ανάλογα με το πρότυπο έκφρασης με ένα δένδρογραμμα. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που υποεκφράζονται και με κόκκινο αυτά που υπερεκφράζονται στις καρκινικές βιοψίες/καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Η ανάλυση θερμικού χάρτη έγινε και για τις καρκινικές βιοψίες και για τις καρκινικές σειρές όπως φαίνεται στην **Εικ.22**. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται έντονη ετερογένεια. Ωστόσο στις καρκινικές σειρές (**Εικ. 22A**) είναι διακριτή η ομαδοποίηση των φυσιολογικών ιστών και των καρκινικών σειρών λόγω ομοιογένειας της γονιδιακής έκφρασης. Αντίστοιχα στην εικόνα 22B οι καρκινικές βιοψίες ομαδοποιούνται ξεχωριστά σε σχέση με τις φυσιολογικές.



Εικόνα 22. Ανάλυση θερμικού χάρτη πάνω σε RNASeq δεδομένα. Εικόνα A: Σύγκριση γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα σε φυσιολογικούς ιστούς ασθενών (συμβολίζονται με το γράμμα N) και σε καρκινικές σειρές (YCC, SNU16, MKN7, OCUM-1). Εικόνα B: Σύγκριση γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα σε φυσιολογικούς ιστούς ασθενών και βιοψίες ασθενών (συμβολίζονται με το γράμμα T).

Ακολούθησε η κατασκευή διαγραμμάτων Volcano Plot αφού πρώτα υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα και το εύρος κατανομής των τιμών γονιδιακής έκφρασης. Στα διαγράμματα απεικονίζονται με πράσινο και κόκκινο χρώμα τα γονίδια στα οποία η γονιδιακή έκφραση είναι στατιστικώς σημαντικά μεταβαλλόμενη ($p\text{-value} \leq 0,05$) και το εύρος αλλαγής των τιμών έκφρασης τους κυμαίνεται στις τιμές ≥ 2 (υπερεκφραζόμενα στον καρκίνο) και ≤ -2 (υπερεκφραζόμενα στον φυσιολογικό ιστό). Τα υπόλοιπα γονίδια που δεν πληρούν τα παραπάνω κριτήρια και συνεπώς δεν είναι διαφορετικά εκφρασμένα, απεικονίζονται με γκρι χρώμα. Στον άξονα y αναπαρίσταται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του $p\text{-value}$, ενώ στον άξονα x ο δυαδικός λογάριθμος του εύρους αλλαγής (Εικ. 23).



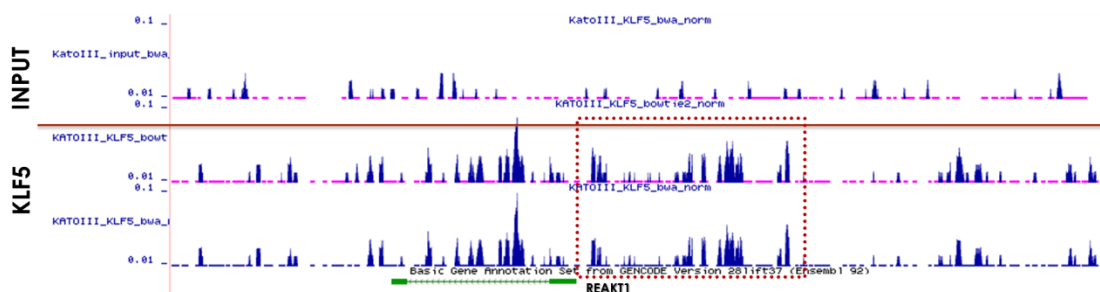
Εικόνα 23. Διαγράμματα Volcano Plot που απεικονίζουν την στατιστική σημαντικότητα της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης (άξονας y) και το εύρος αλλαγής των τιμών (άξονας x). Στην εικόνα A απεικονίζεται η σύγκριση ανάμεσα σε φυσιολογικούς ιστούς και καρκινικές σειρές, ενώ στην εικόνα B συγκρίνεται η έκφραση ανάμεσα σε φυσιολογικούς ιστούς και βιοψίες ασθενών. Με πράσινο χρώμα φαίνονται τα γονίδια που υποεκφράζονται στον καρκίνο σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ με κόκκινο αυτά που υπερεκφράζονται στον καρκίνο.

Παρατηρείται σημαντική διαφορά στον αριθμό των γονιδίων με διαφορετική έκφραση στις καρκινικές βιοψίες σε σχέση με τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στις βιοψίες, ο αριθμός των γονιδίων που είναι αυξορυθμιζόμενα ή μειορυθμιζόμενα στον καρκίνο είναι μικρότερος σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές, γεγονός που εξηγείται από την σύσταση ενός όγκου, η οποία δεν είναι ομοιογενής και υπάρχουν υποπληθυσμοί κυττάρων με διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Για τη περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα βιοψιών. Ακολούθησε η σύγκριση των δεδομένων από τη μεταγραφομική ανάλυση με αυτά που προέκυψαν από το προηγούμενο μέρος της βιοπληροφορικής ανάλυσης των προτύπων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων. Το αποτέλεσμα ήταν η συγκέντρωση μιας λίστας lncRNA με διαφορετική έκφραση στον καρκίνο του στομάχου και με πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στην περιοχή του υποκινητή τους (Πίνακας 12).

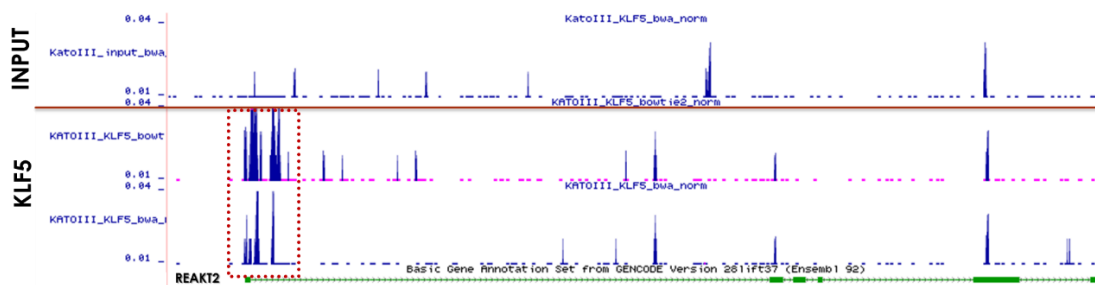
Πίνακας 12. lncRNAs με διαφορετική έκφραση στον καρκίνο και με πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στην περιοχή του υποκινητή τους.

Πρότυπα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή του υποκινητή	Αυξορυθμιζόμενα lncRNAs στον καρκίνο	Μειορυθμιζόμενα lncRNAs στον καρκίνο
KLF5	30	15
GATA4	8	3
GATA6	2	2
KLF5/GATA4/GATA6	2	1

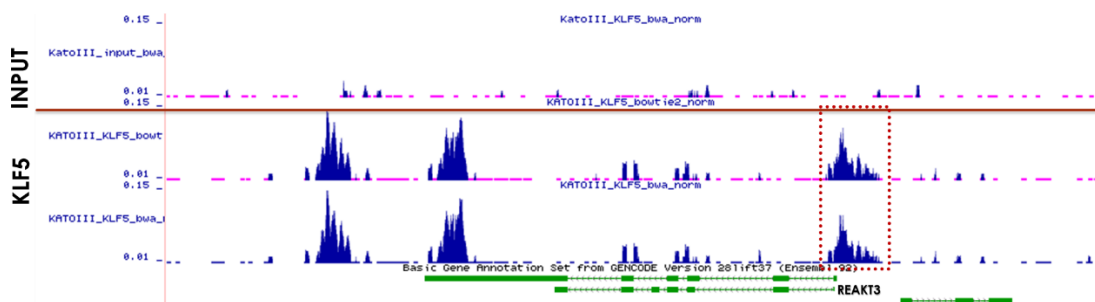
Ακολούθως επιλέχθηκαν πιλοτικά τρία lncRNAs με πρότυπα πρόσδεσης από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 τα οποία είναι υπερεκφρασμένα στον καρκίνο του στομάχου σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Ονομάστηκαν REAKT1,2,3 (lincRNA rEgulated by Kruppel GasTric-**REAKT**) και ακολούθησε η περαιτέρω μελέτη της έκφρασής τους σε πειραματικό επίπεδο. Στις εικόνες απεικονίζονται οι κορυφές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 στη περιοχή υποκινητών των lncRNA REAKT1,2,3 όπως φαίνονται μέσω πλοήγησης στον φυλλομετρητή UCSC (Εικ. 24-26). Τα δεδομένα που απεικονίζονται αφορούν 2 βιολογικές επαναλήψεις από δείγματα της κυτταρικής σειράς KATOIII και το δείγμα INPUT (μη ανοσοκατακρισμένη χρωματίνη), που αποτελεί το control της μεθόδου ChIP-seq. Με πράσινο χρώμα φαίνονται τα μετάγραφα των REAKT1/2/3.



Εικόνα 24. Εικόνα πλοήγησης στον φυλλομετρητή UCSC με δεδομένα ChIP-seq. Με πράσινο χρώμα φαίνεται το μετάγραφο του REAKT1, με φορά μεταγραφής από δεξιά προς τα αριστερά. Μέσα σε αυτό, οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε ιντρονικές περιοχές ενώ τα πράσινα γεμάτα πλαίσια σε εξόνια. Με κόκκινο πλαίσιο απεικονίζονται οι κορυφές πρόσδεσης του KLF5 στην περιοχή του υποκινητή ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής.



Εικόνα 25. Εικόνα πλοήγησης στον φυλλομετρητή UCSC με δεδομένα ChIP-seq. Με πράσινο χρώμα φαίνεται το μετάγραφο του REAKT2, με φορά μεταγραφής από αριστερά προς τα δεξιά. Μέσα σε αυτό, οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε ιντρονικές περιοχές ενώ τα πράσινα γεμάτα πλαίσια σε εξόνια. Με κόκκινο πλαίσιο υποδεικνύονται οι κορυφές πρόσδεσης του KLF5 στην περιοχή του υποκινητή ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής.



Εικόνα 26. Εικόνα πλοήγησης στον φυλλομετρητή UCSC με δεδομένα ChIP-seq. Με πράσινο χρώμα φαίνεται το μετάγραφο του REAKT3, με φορά μεταγραφής από δεξιά προς τα αριστερά. Μέσα σε αυτό, οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε ιντρονικές περιοχές ενώ τα πράσινα γεμάτα πλαίσια σε εξόνια. Με κόκκινο πλαίσιο υποδεικνύονται οι κορυφές πρόσδεσης του KLF5 στην περιοχή του υποκινητή ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής.

3.2 Πειραματικό μέρος

3.2.1 Διαγνωστικές πέψεις και PCR

Φορέας pSiCOR

Για τον έλεγχο της ένθεσης των ολιγονουκλεοτιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pSiCOR, έγινε διαγνωστική πέψη με τη χρήση των ενζύμων SmaI/XbaI (Minotech). Έπειτα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στην περίπτωση ανεπιτυχούς εισαγωγής του ενθέματος, ύστερα από την πέψη προκύπτουν 2 ζώνες με τη μεγαλύτερη να εμφανίζεται κοντά στις 6.700bp και τη δεύτερη περίπου 330bp.

Η διαφορά συγκριτικά με ένα δείγμα που έχει εισαχθεί το shRNA είναι το μέγεθος της δεύτερης ζώνης, που είναι κοντά στις 370bp με μια πολύ μικρή διαφορά από τον αρνητικό μάρτυρα. Για την επιτυχή εξαγωγή συμπερασμάτων λοιπόν, χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας που είναι άκοπος pSiCOR φορέας και ένας θετικός μάρτυρας (pSiCOR φορέας με ενσωματωμένο shRNA επιβεβαιωμένο με αλληλούχηση). Όπως φαίνεται και στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης η διαφορά ανάμεσα σε θετικό και αρνητικό μάρτυρα είναι πολύ μικρή ωστόσο ανιχνεύσιμη, με τις ζώνες των θετικών δειγμάτων (KLF5.2, GATA4.2, GATA6.1, GATA6.2) να ευθυγραμμίζονται με τη ζώνη του θετικού μάρτυρα (Εικ. 27). Εξαιρέση αποτελούν τα δείγματα KLF5.1 και GATA4.1 στα οποία δεν έχει πετύχει η ενζυμική πέψη.

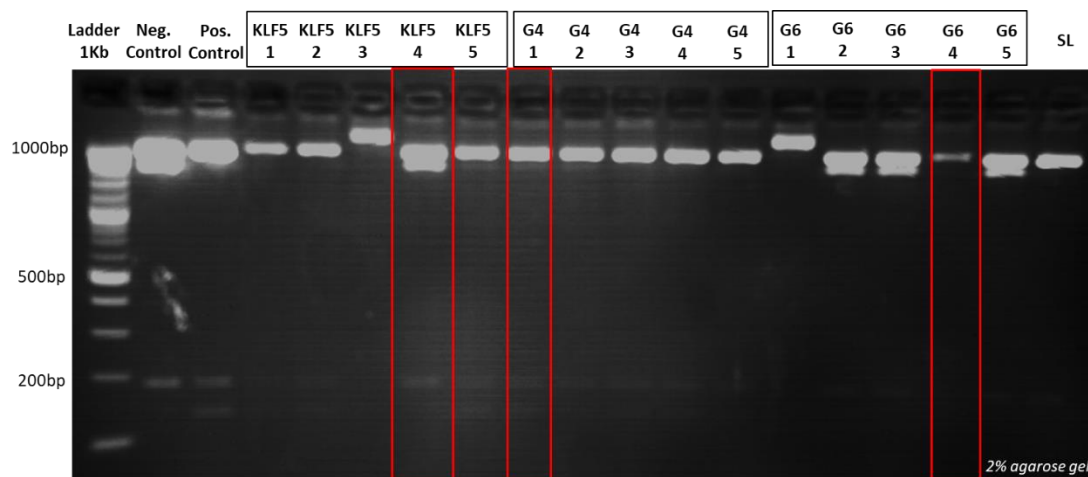


Εικόνα 27. Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής πέψης για τον φορέα pSiCOR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στην πρώτη στήλη φαίνονται οι ζώνες του Ladder 1Kb. Ακολουθεί ο αρνητικός μάρτυρας (άκοπος φορέας) με τη δεύτερη ζώνη κοντά στις 330bp, έπειτα ο θετικός μάρτυρας με τη δεύτερη ζώνη κοντά στις 370bp. Στη συνέχεια παρατίθενται τα υπο εξέταση δείγματα KLF5/GATA4/GATA6. Ελέγχθηκαν 2 μοναδιαίες αποικίες για κάθε πλασμιδιακή κατασκευή (π.χ. KLF5.1 και KLF5.2). Σε κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι ζώνες των δειγμάτων που ευθυγραμμίζονται με τη ζώνη του θετικού μάρτυρα στις 370bp.

Φορέας Tet-pLKO-puro

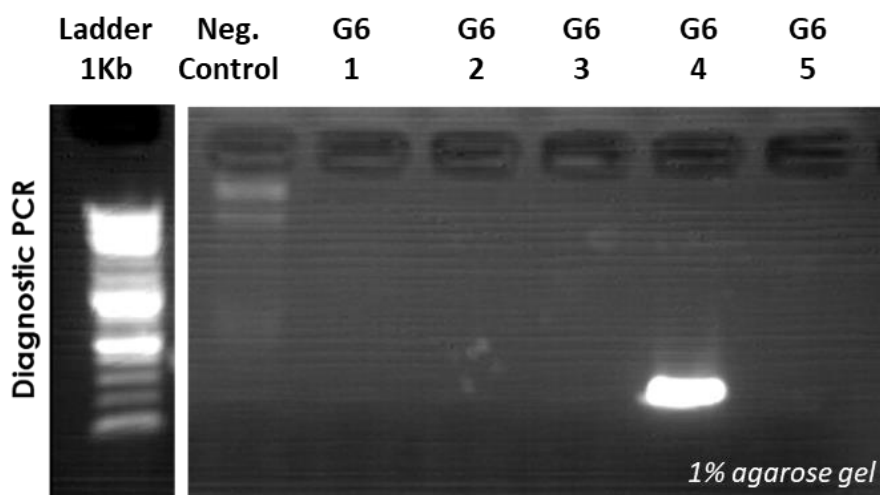
Αντίστοιχη μεθοδολογία ακολουθήθηκε και για τον pLKO φορέα με τη διαφορά πως ο έλεγχος της ένθεσης των shRNAs έγινε με τη χρήση του ενζύμου XhoI. Στον μη ανασυνδυασμένο φορέα υπάρχουν 2 θέσης αναγνώρισης του XhoI με αποτέλεσμα ύστερα από την πέψη να προκύπτουν 2 ζώνες: μια ζώνη κοντά στις 8.500bp και μια κοντά στις 200bp. Στην αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων που εισάγονται στον φορέα υπάρχει κι εκεί μια θέση αναγνώρισης για το ένζυμο XhoI. Έτσι στον θετικό μάρτυρα αλλά και στα δείγματα τα οποία έχουν λάβει το ένθεμα προκύπτει άλλη μια ζώνη λίγο πιο χαμηλά από τις 200bp. Επομένως, στα αρνητικά δείγματα το πλασμίδιο πέπτεται σε 2 σημεία, ενώ στα θετικά υπάρχουν 3 θέσεις κοπής. Συνολικά ελέγχθηκαν 5 δείγματα για κάθε shRNA δηλαδή, πλασμιδιακό DNA από 5 μοναδιαίες βακτηριακές αποικίες. Στην εικόνα 28 επισημαίνονται με κόκκινο πλαίσιο τα δείγματα που επιλέχθηκαν για αλληλούχηση. Τα δείγματα KLF5.4 και G4.1 εμφανίζουν 2 ζώνες κοντά στις 200bp που υποδεικνύουν θετικά δείγματα. Τα

δείγματα G6.2, G6.3, G6.5 φαίνεται να είναι αρνητικά καθώς έχουν ίδιο πρότυπο ζωνώσεων με τον αρνητικό μάρτυρα. Ενώ τα πλασμίδια στα δείγματα KLF5.3, G6.1, G6.4 δεν έχουν κοπεί από το ένζυμο. Το δείγμα G6.4 είναι αυτό που επιλέχθηκε για έλεγχο με αλληλούχηση ύστερα από τον έλεγχο με PCR (Εικ.29). Το τελευταίο δείγμα (SL/Self-Ligation) αποτελεί κι αυτό έναν αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης λιγάσης.



Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής πέψης για τον φορέα pLKO σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στην πρώτη στήλη φαίνονται οι ζώνες του Ladder 1Kb. Ακολουθεί ο αρνητικός μάρτυρας (άκοπος φορέας) όπου εμφανίζονται 2 ζώνες, μια αρκετά μεγάλη στην αρχή του πηγαδιού και μια δεύτερη ζώνη κοντά στις 200bp, έπειτα ο θετικός μάρτυρας στον οποίο εμφανίζεται και μια τρίτη ζώνη πιο χαμηλά από τις 200bp. Στη συνέχεια παρατίθενται τα υπό εξέταση δείγματα KLF5/GATA4/GATA6. Ελέγχθηκαν 5 μοναδιαίες αποικίες για κάθε πλασμιδιακή κατασκευή (π.χ KLF5.1-5) και ο αρνητικός μάρτυρας του SL. Σε κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι ζώνες των δειγμάτων που ευθυγραμμίζονται με τις ζώνες του θετικού μάρτυρα και τα δείγματα αυτά στάλθηκαν για αλληλούχηση, μια ζώνη στις 200bp και μια που μεταναστεύει λίγο πιο χαμηλά.

Ακολούθησε διαγνωστική PCR για τα δείγματα G6.1-G6.5 με τον έναν εκκινητή να υβριδίζεται στον σκελετό του πλασμιδίου και τον άλλον στο shRNA για το GATA6. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, και η εμφάνιση ζώνης συμφωνεί με την επιτυχή ενσωμάτωση του ενθέματος στο πλασμίδιο για το δείγμα G6.4. Γενικότερα για όλες τις πλασμιδιακές κατασκευές οι οποίες ελέγχθηκαν με διαγνωστικές πέψεις, έγιναν και διαγνωστικές PCR με τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών κι έπειτα ελέγχθηκαν μέσω αλληλούχησης για την ταυτοποίηση της θετικής ένθεσης και σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Ενδεικτικά παρατίθεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα τέτοιας διαγνωστικής PCR που αφορά τις GATA6 πλασμιδιακές κατασκευές (Εικ.29).



Εικόνα 29. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων διαγνωστικής PCR για τον pLKO φορέα σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας ο οποίος αντιστοιχεί σε φορέα χωρίς ένθεμα. Η εμφάνιση ζώνης κοντά στις 200bp αντιστοιχεί και σε επιτυχή ενσωμάτωση του ενδέματος (shRNA) στον pLKO φορέα.

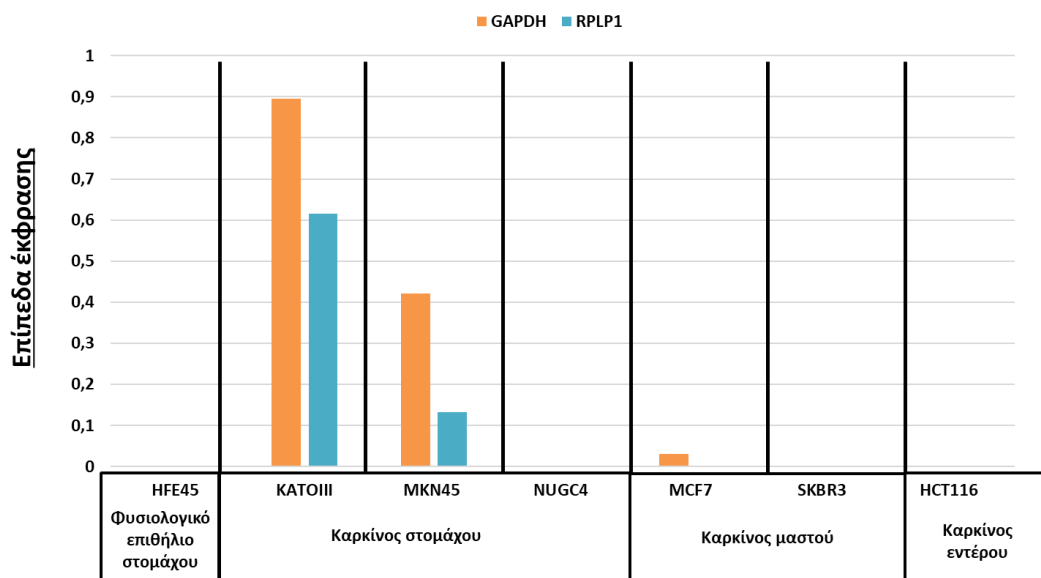
Εν κατακλείδι, δημιουργήθηκαν με επιτυχία πλασμιδιακές κατασκευές pSiCOR και pLKO που φέρουν shRNA για τους μεταγραφικούς παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6 ξεχωριστά. Οι φορείς αυτοί θα χρησιμοποιηθούν για την RNA αποσιώπηση των γονιδίων στόχων σε ευκαρυωτικά καρκινικά κύτταρα, μέσω συστήματος διαμόλυνσης με λεντιούς. Στο πλαίσιο αυτή της πτυχιακής εργασίας ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της RNA σίγησης μόνο για το γονίδιο-στόχο KLF5 χρησιμοποιώντας την κατασκευή pSiCOR/shKLF5.

3.2.2 Έκφραση μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 σε κυτταρικές σειρές

Για να διεξαχθεί ένα πείραμα μεταγραφικής σίγησης ενός γονιδίου σε κυτταρικές σειρές θα πρέπει πρώτα να εξασφαλιστεί η έκφραση του γονιδίου σε αυτές. Έτσι ύστερα από εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA έγινε μια ποσοτική PCR με χρήση κατάλληλων εκκινήτων για τον έλεγχο της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στις εξής κυτταρικές σειρές: HFE45, KATOIII, MKN45, NUGC4, MCF7, SKBR3, HCT116. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν ως προς δύο γονίδια ιδιοσύστατης έκφρασης: GAPDH και RPLP1. Τα διαγράμματα που ακολουθούν δείχνουν πως ο GATA4 εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του στομάχου KATOIII και NUGC4 με χαμηλότερη αλλά ανιχνεύσιμη έκφραση στα MKN45 όπως συμβαίνει και με τους υπόλοιπους δύο μεταγραφικούς παράγοντες (Εικ. 30-32). Σε όλες τις περιπτώσεις και οι τρεις παράγοντες εκφράζονται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα στις καρκινικές γαστρικές σειρές συγκριτικά με την φυσιολογική γαστρική. Η έκφραση των KLF5/GATA4/GATA6 στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές είναι πολύ μικρή σε σχέση με αυτές του γαστρικού καρκίνου. Επίσης παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στην κανονικοποίηση ως προς το GAPDH και ως προς RPLP1, λόγω της διαφοράς ιδιοσύστατης έκφρασης ανάμεσα στα δύο γονίδια. Με βάση τα παραπάνω

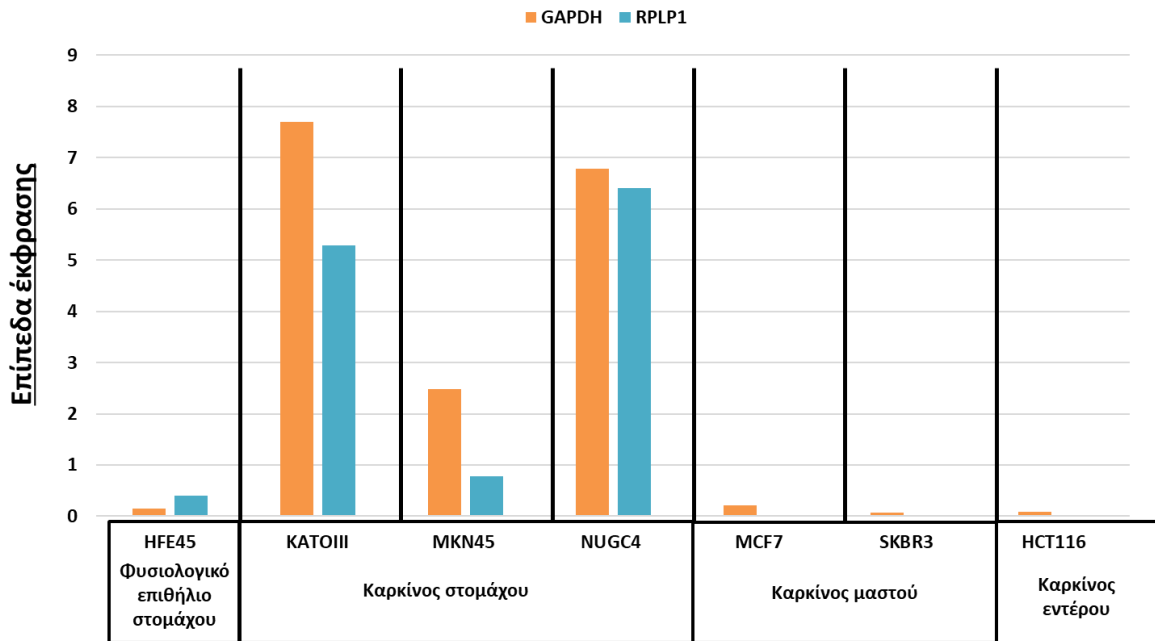
επιλέχθηκαν τα MKN45 κύτταρα τα οποία εκφράζουν μεν σε χαμηλότερα επίπεδα τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες συγκριτικά με τις υπόλοιπες, αλλά είναι πιο εύρηστα στις πρακτικές κυτταροκαλλιέργειας.

Έκφραση GATA4 σε κυτταρικές σειρές



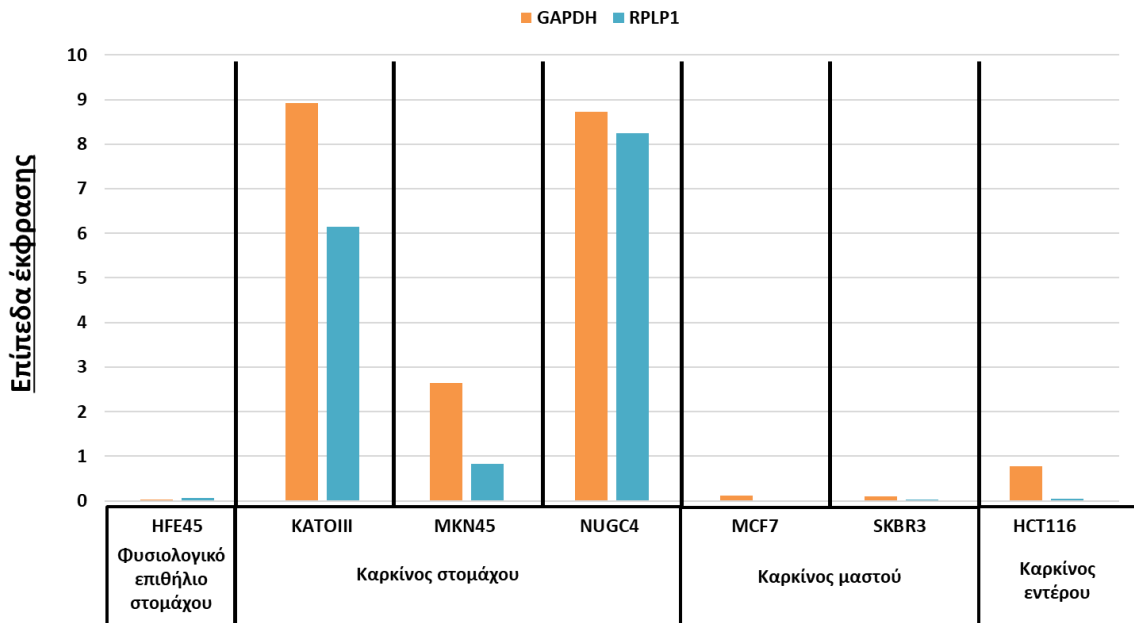
Εικόνα 30. Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 στις κυτταρικές σειρές που αναφέρονται. Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιημένα ως προς το housekeeping γονίδιο GAPDH, ενώ με μπλε χρώμα ως προς το housekeeping γονίδιο RPLP1.

Έκφραση GATA6 σε κυτταρικές σειρές



Εικόνα 31. Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 στις κυτταρικές σειρές που αναφέρονται. Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιημένα ως προς το housekeeping γονίδιο GAPDH, ενώ με μπλε χρώμα ως προς το housekeeping γονίδιο RPLP1.

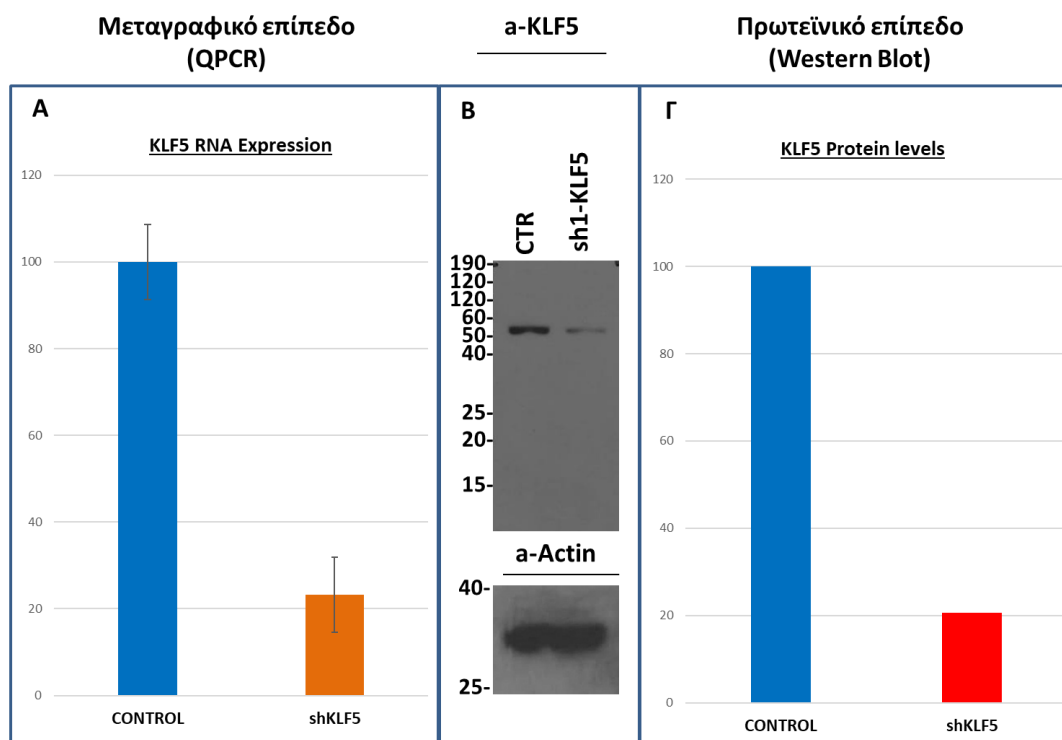
Έκφραση KLF5 σε κυτταρικές σειρές



Εικόνα 32. Διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 στις κυτταρικές σειρές που αναφέρονται. Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιημένα ως προς το housekeeping γονίδιο GAPDH, ενώ με μπλε χρώμα ως προς το housekeeping γονίδιο RPLP1.

3.2.3 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης του KLF5 σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο

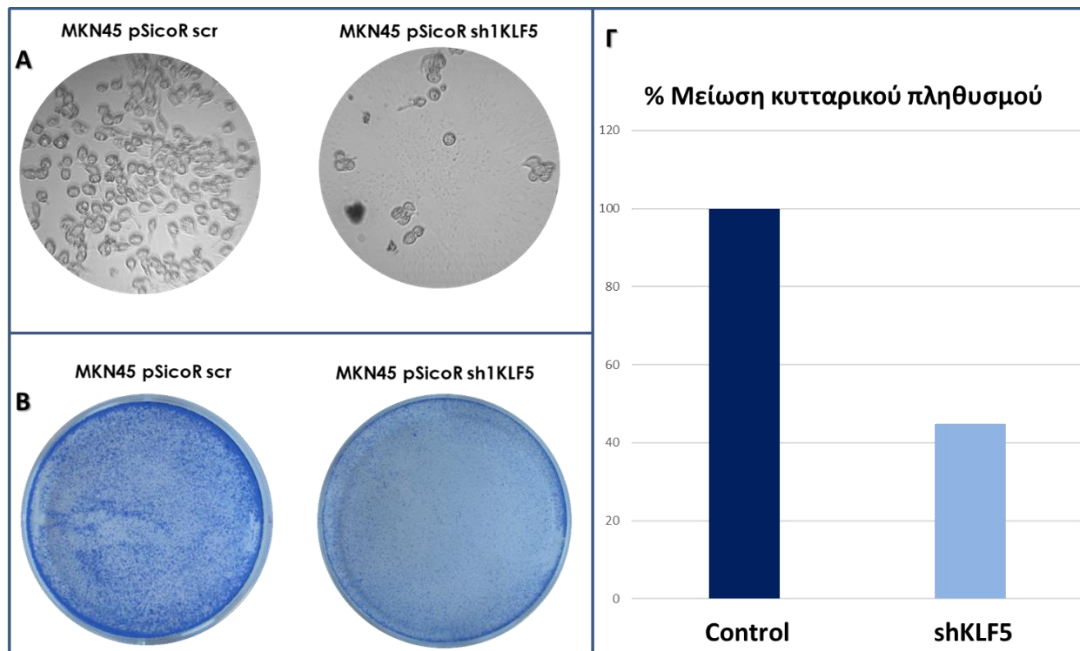
Επόμενο βήμα ήταν η χρήση του πλασμιδιακού φορέα pSiCOR ο οποίος περιείχε shRNA που στοχεύει το μετάγραφο του KLF5, και ο έλεγχος της αποτελεσματικότητάς του σε κύτταρα MKN45. Επίσης ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που εκφράζουν scrambled shRNA το οποίο παράγει ένα siRNA τυχαίας αλληλουχίας που δεν στοχεύει πουθενά στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε μέσω παραγωγής και χρήσης λεντιών. Ύστερα από συλλογή των κυττάρων σε τριζόλη, εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA, πραγματοποιήθηκε qPCR με εκκινητές ειδικούς για το KLF5 μετάγραφο. Οι ποσότητες έκφρασης κανονικοποιήθηκαν ως προς δύο ιδιοσύστατα γονίδια, GAPDH/RPLP1, και για τη κατασκευή του διαγράμματος υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα του KLF5 μεταγράφου σημείωσαν σημαντική μείωση σε ποσοστό 76,8% (**Εικ.33Α**). Με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών KLF5 και Actin πραγματοποιήθηκε ανοσοσύτρωμα για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών τους επιπέδων (**Εικ.33Β**). Ως πρωτεΐνη κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της οποίας φαίνεται να είναι αμετάβλητα ανάμεσα σε δείγμα control και στο δείγμα που σιγήθηκε το γονίδιο του KLF5, επιβεβαιώνοντας την ποσοτικοποίηση κατά Bradford των δειγμάτων που προηγήθηκε του ανοσοστυπώματος. Τα επίπεδα της KLF5 πρωτεΐνης είναι εμφανώς μειωμένα σε σύγκριση με το δείγμα μάρτυρα (CONTROL), επιβεβαιώνοντας την επιτυχή σίγηση σε ποσοστό 79,4% και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (η σχετική ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση του προγράμματος ImageJ) (**Εικ.33Γ**). Τα ποσοστά της σίγησης ανάμεσα σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο είναι παρόμοια, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα του shRNA που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 33. Α) Αποτελεσματικότητα της σίγησης του KLF5 σε μεταγραφικό επίπεδο ύστερα από την διεξαγωγή QPCR. Β) Western blotting με χρήση αντισωμάτων έναντι του KLF5 και Actin. Γ) Αποτελεσματικότητα της σίγησης σε πρωτεϊνικό επίπεδο μετά από σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης και κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των δειγμάτων CTR και sh1KLF5 ως προς αυτά της Ακτίνης.

3.2.4 Αποτελέσματα CFA και παρατήρηση φαινοτύπου

Ύστερα από την διαμόλυνση κυττάρων MKN45 με λεντιούς που φέρουν το πλασμίδιο pSiCOR/shKLF5 με σκοπό τη σίγηση του γονιδίου-στόχου KLF5 παρατηρήθηκε ο φαινότυπος των κυττάρων με μικροσκόπιο (**Εικ.34Α**). Ο φαινότυπος παρατηρήθηκε σε κύτταρα control τα οποία έχουν δεχτεί πλασμίδιο pSiCOR/Scrambled που περιέχει ένα shRNA το οποίο δε στοχεύει πουθενά στο γονιδίωμα, και συγκρίθηκε με κύτταρα που έχουν λάβει το πλασμίδιο pSiCOR/shKLF5. Η εικόνα μικροσκοπίου δείχνει εμφανή και έντονη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα που έχει γίνει σίγηση του γονιδίου KLF5. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και ο φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων σε μακροσκοπικό επίπεδο μέσω της παρατήρησης της επιφάνειας που καλύπτεται από κυτταρικές αποικίες (ανάλυση Colony Formation Assay, **Εικ.34Β**). Τα αποτελέσματα του αριθμού των κλώνων ανάμεσα στο δείγμα control και στο pSiCOR/shKLF5 φαίνονται στην **Εικ.34Γ**, όπου παρατηρήθηκε μείωση του κυτταρικού πληθυσμού σε ποσοστό 55,2%.

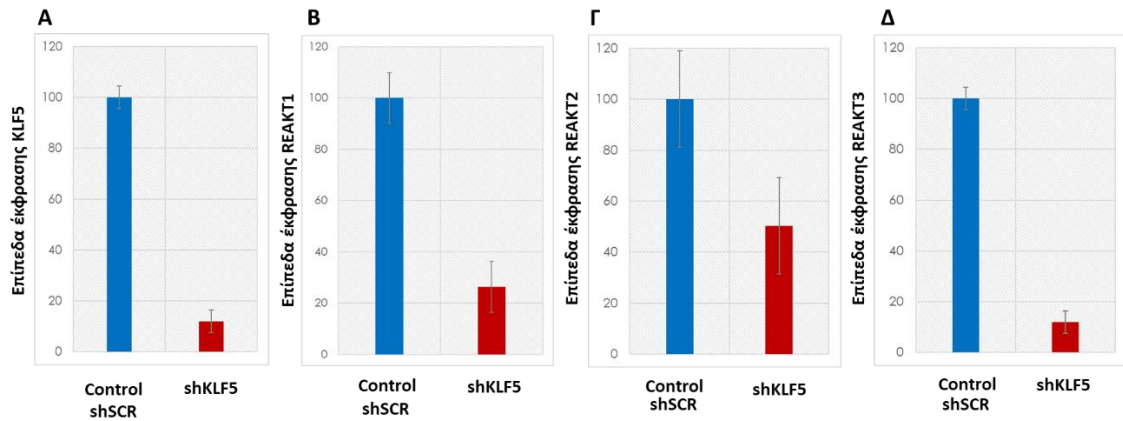


Εικόνα 34. Α) Παρατήρηση κυτταρικού φαινοτύπου σε μικροσκόπιο. Β) Παρατήρηση κυτταρικού φαινοτύπου με τη μέθοδο χρώσης κυττάρων CFA. Γ) Ποσοστό μείωσης αριθμού κλώνων υπό τη σίγηση του KLF5.

3.2.5 Έλεγχος της έκφρασης των lncRNAs REAKT1/2/3 υπό τη μεταγραφική σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα KLF5

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην ενότητα της βιοπληροφορικής ανάλυσης, επιλέχθηκαν πιλοτικά 3 lncRNAs που ονομάστηκαν REAKT1/2/3, τα οποία είναι αυξορυθμιζόμενα στον καρκίνο του στομάχου, εμφανίζουν πρότυπα πρόσδεσης του KLF5 στην περιοχή του υποκινητή τους (Εικ.24-26). Σκοπός ήταν η μελέτη των επιπτώσεων από τη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 στην έκφραση αυτών των lncRNA στα καρκινικά κύτταρα MKN45. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης έγινε μέσω qPCR με χρήση ειδικών εκκινήτων, ενώ τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τα ιδιοσύστατα γονίδια GAPDH και RPLP1 και απεικονίστηκε ο μέσος όρος. Ως μάρτυρας ορίστηκε η έκφραση των εκάστοτε μεταγράφων σε MKN45 κύτταρα που είχαν δεχτεί pSicoR/shScrambled το οποίο δε στοχεύει πουθενά στο γονιδίωμα. Όπως αποδεικνύεται από τα διαγράμματα της εικόνας 35, σε μια επιτυχή σίγηση του KLF5 σε ποσοστό 86%, η έκφραση των REAKT1, REAKT2, REAKT3 μειώθηκε σε ποσοστό 73,6%, 50% και 92,6% σε σύγκριση με τα control, αντίστοιχα. Συμπερασματικά με βάση τα παραπάνω, αποδεικνύεται ότι ο KLF5 ελέγχει τα συγκεκριμένα lncRNAs στον καρκίνο του στομάχου, και η απουσία του επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση των REAKTs.

Έκφραση των REAKT1/2/3 υπό τη σίγηση του KLF5



Εικόνα 35. Διαγράμματα απεικόνισης των επιπέδων έκφρασης σε κύτταρα MKN45 στα οποία έχει πραγματοποιηθεί σίγηση του KLF5 με χρήση του φορέα pSiCOR/shKLF5, σε σύγκριση με το δείγμα control (κύτταρα MKN45 τα οποία έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα pSiCOR/shScrambled). **Διάγραμμα Α)** Επίπεδα έκφρασης KLF5, τα οποία μειώθηκαν σε ποσοστό 86% σε σύγκριση με το control. **Διάγραμμα Β)** Επίπεδα έκφρασης του REAKT1 υπό τη σίγηση του KLF5 (73,6% μείωση έκφρασης). **Διάγραμμα Γ)** Επίπεδα έκφρασης του REAKT2 υπό τη σίγηση του KLF5 (50% μείωση έκφρασης). **Διάγραμμα Δ)** Επίπεδα έκφρασης του REAKT3 υπό τη σίγηση του KLF5 (92,6% μείωση έκφρασης).

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Παρά τις αξιόλογες προσπάθειες που έχουν γίνει για την αντιμετώπιση του καρκίνου του στομάχου, συνεχίζει να κατέχει υψηλή θέση στην παγκόσμια κατάταξη συχνότητας εμφάνισης και θνησιμότητας. Το 8.3% των θανάτων που ευθύνονται στην ασθένεια του καρκίνου παγκόσμια, αντιστοιχεί στον γαστρικό καρκίνο. Η ανάγκη εύρεσης αξιόπιστων βιοδεικτών με μεγάλη εξειδίκευση ακόμη και στους υπότυπους του γαστρικού καρκίνου είναι μείζονος σημασίας και για την κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση αλλά κυρίως για την έγκαιρη διάγνωση. Ολοένα και περισσότερες έρευνες στρέφονται στο μοριακό και γενετικό υπόβαθρο της ασθένειας, με σκοπό την κατανόηση της ανάπτυξης της νεοπλασίας και την εύρεση κατάλληλων διαγνωστικών δεικτών. Σ' αυτό το πεδίο εντάσσονται οι έρευνες γύρω από τη λειτουργία των lncRNAs, καθώς τα τελευταία χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση έκφρασης ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον ιστό. Επίσης εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες και ασθένειες όπως και στην ογκογένεση. Δεδομένης της ιστοειδικής έκφρασης σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου και κάποιες φορές και σε διαφορετικούς υπότυπους της νόσου, τα lncRNAs έχουν αναδειχθεί ως σημαντικοί προγνωστικοί και διαγνωστικοί δείκτες όπως επίσης και θεραπευτικοί στόχοι²³⁵. Υπάρχουν πολλές μεθοδολογίες οι οποίες ολοένα και αυξάνονται για τη θεραπευτική στόχευση των lncRNA, ενώ υπάρχουν ήδη σχεδιασμένα φάρμακα που στοχεύουν lncRNAs στον καρκίνο και βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών²³⁶.

Στοχευμένα για τον καρκίνο του στομάχου έχουν βρεθεί lncRNAs που εμπλέκονται σε συγκεκριμένα στάδια της νόσου και έχουν ρόλο στον καρκινικό φαινότυπο. Για παράδειγμα, το lncRNA GMAN έχει συσχετιστεί με χαμηλό προσδόκιμο ζωής των ασθενών και μετάσταση του καρκίνου του στομάχου. Είναι αυξορυθμιζόμενο σε βιοψίες γαστρικού καρκίνου, και ελέγχει τα επίπεδα της πρωτεΐνης ephrin A1 σε μεταφραστικό επίπεδο²³⁷. Η ephrin A1 εμπλέκεται στη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων και επάγει τη μετάστασή τους²³⁸. Ένα άλλο lncRNA με χαρακτηρισμένο μηχανισμό είναι το UCA1, το οποίο μέσω του άξονα UCA1/miR-203/ZEB2 ρυθμίζει τον μεταστατικό φαινότυπο γαστρικών καρκίνων²³⁹. Άλλο ένα παράδειγμα αποτελεί το LINC00324 που αλληλεπιδρά με μια RBP (RNA-Binding Protein) πρωτεΐνη, την HuR, και ελέγχει έτσι την έκφραση του FAM83B με επίδραση και πάλι στον καρκινικό φαινότυπο^{240,241,241}. Υπάρχουν αρκετές τέτοιες ερευνητικές περιπτώσεις που αποκαλύπτουν αξιόλογους βιοδείκτες για την ασθένεια και μέσω την εξακρίβωσης των μηχανισμών δράσης των lncRNA αποτελούν και πιθανούς θεραπευτικούς στόχους²⁴²⁻²⁴⁴.

Η εύρεση κατάλληλων lncRNAs στόχων, των οποίων η έκφραση διαταράσσεται στον καρκίνο του στομάχου απαιτεί ολιστικές μεταγραφομικές αναλύσεις δεδομένων

μεγάλης κλίμακας. Πέρα από τη διαφορική τους έκφραση στον καρκίνο του στομάχου λαμβάνεται υπόψη η συσχέτισή τους με το προσδόκιμο ζωής των ασθενών, με την εμφάνιση μεταστάσεων καθώς και με άλλα κλινικά χαρακτηριστικά. Πολλές έρευνες που αφορούν τον καρκίνο του στομάχου ακολουθούν τέτοιες προσεγγίσεις βρίσκοντας διαφορικά εκφρασμένα lncRNAs και μέσα από μελέτες δικτύων συνέκφρασης (co-expression networks) τα συσχετίζουν με τα επίπεδα mRNA γονιδίων που εμπλέκονται στην ογκογένεση²⁴⁵. Η πιο πρόσφατη δημοσιευμένη έρευνα τέτοιου είδους είναι αυτή των Zhang *et al.*, 2020 στην οποία βρέθηκαν mRNAs και lncRNAs με διαταραγμένη έκφραση σε βιοψίες καρκίνου του στομάχου σε σχέση με φυσιολογικές βιοψίες, μέσω ανάλυσης μικροσυστοιχιών. Οι ερευνητές, δημιουργώντας ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, κατέληξαν σε κάποιες πιθανές κυτταρικές διεργασίες στις οποίες μπορεί να εμπλέκονται οι διαφορικά εκφρασμένες πρωτεΐνες. Επίσης μελέτησαν τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των lncRNAs ως *cis-acting*, με γονίδια τα οποία βρίσκονται κοντά (10kb) στον γονιδιωματικό τους τόπο, αλλά και ως *trans-acting* με απομακρυσμένα γονίδια²⁴⁶.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποσκοπεί στην εύρεση lncRNAs που είναι διαφορικά εκφρασμένα στον καρκίνο του στομάχου λόγω ρύθμισης από τους μεταγραφικούς παράγοντες KLF5/GATA4/GATA6. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν ογκογονίδια που εμπλέκονται στην διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων στα αναπτυξιακά στάδια του στομάχου (lineage survival oncogenes) και ο ρόλος τους στη παθογένεια της νόσου είναι αναγνωρισμένος. Με τη χρήση ChIP-seq δεδομένων για τους μεταγραφικούς παράγοντες αλλά και για τους ιστονικούς δείκτες H3K4me3, H3K4me1, και H3K27Ac έγινε μια ανάλυση θερμικού χάρτη που έδειχνε κοινά μοτίβα πρόσδεσης κι ένα πανομοιότυπο πρότυπο έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων ανάμεσα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου (**Εικ. 21**). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη μελέτη των Chia *et al.*, 2015 για την ύπαρξη ενός ογκογόνου δικτύου μεταξύ τους¹⁵⁰. Παρόμοια μελέτη έχει γίνει για τον μεταγραφικό παράγοντα SOX2 στον καρκίνο του οισοφάγου, ο οποίος δημιουργεί ένα ογκογόνο δίκτυο με τον μεταγραφικό παράγοντα FOXE1²⁴⁷. Επίσης το κοινό μοτίβο ανάμεσα στα ιστονικά σήματα και στα σήματα πρόσδεσης επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε αλληλουχίες ενεργών υποκινητών και όχι απλά στη περιοχή ανοδικά της θέσης έναρξης μεταγραφής (-2.500-0) των lncRNAs. Ένα επόμενο συμπέρασμα είναι η ύπαρξη ετερογένειας ακόμη και στη συμβολή των μεταγραφικών αυτών παραγόντων στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές, καθώς η ένταση του σήματος για κάθε παράγοντα του συμπλόκου πάνω στους υποκινητές-στόχους διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Η εύρεση lncRNAs που εμφανίζουν πρότυπα πρόσδεσης των ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή τους είναι μια ημιτελής μεθοδολογία για την εύρεση lncRNA στόχων. Η πρόσδεση των KLF5/GATA4/GATA6 δε σημαίνει και καρκινοειδική

έκφραση των lncRNAs. Για το λόγο αυτό ακολούθησε η μεταγραφομική ανάλυση σε καρκινικές βιοψίες έναντι φυσιολογικών ιστών.

Οι αναλύσεις θερμικού χάρτη και τα διαγράμματα Volcano, έγιναν με RNA δεδομένα από καρκινικές κυτταρικές σειρές και από βιοψίες ασθενών με καρκίνο του στομάχου. Η εικόνα 22 αντιπροσωπεύει την ετερογένεια της νόσου, η οποία αντικατοπτρίζεται σε πολύ πιο έντονο βαθμό στις βιοψίες σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί καθώς ο καρκίνος του στομάχου είναι ετερογενής ανάμεσα στους διαφορετικούς ασθενείς αλλά ακόμη και μέσα στον ίδιο τον όγκο οι κυτταρικοί πληθυσμοί διαφέρουν μεταξύ τους (Tumor Microenvironment Heterogeneity)²⁴⁸⁻²⁵⁰. Αφού ολοκληρώθηκε και το δεύτερο μέρος της βιοπληροφορικής ανάλυσης επιλέχθηκαν πιλοτικά τρία lncRNAs (REAKT1,2,3) με διαφορετική έκφραση στον καρκίνο του στομάχου και με πρότυπα πρόσδεσης κυρίως από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 με σκοπό τον έλεγχο της έκφρασής τους έπειτα από πειραματική σίγηση της KLF5 πρωτεΐνης.

Απώτερος πειραματικός σκοπός ήταν η γονιδιακή σίγηση (RNAi) όλων των μεταγραφικών παραγόντων αρχικά στην κυτταρική σειρά MKN45 με χρήση συστήματος λεντι-ιών και συστηματική ανίχνευση διαφορικά εκφρασμένων lncRNA. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά διότι πληρεί το κριτήριο της σημαντικής έκφρασης και των τριών μεταγραφικών παραγόντων, ενώ χαρακτηρίζεται από εύχρηστα κύτταρα ως προς την διαδικασία της κυτταροκαλλιέργειας. Ο έλεγχος της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές έδειξε πως εκφράζονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό στις καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου (**Εικ. 30-32**) γεγονός που συνάδει με την υπερέκφρασή τους στον καρκίνο του στομάχου λόγω γονιδιωματικής ενίσχυσης όπως υποστηρίζει η βιβλιογραφία. Επίσης, παρατηρείται στην εικόνα 32 πως η έκφραση του KLF5 στη κυτταρική σειρά του φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου είναι μη ανιχνεύσιμη, ενώ παρατηρείται έκφραση στις σειρές καρκίνου του εντέρου, μια παρατήρηση που συμφωνεί και πάλι με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν πως ο μεταγραφικός παράγοντας KLF5 δεν εκφράζεται στον ενήλικο στόμαχο, αλλά κυρίως στο γαστρεντερικό επιθήλιο²⁵¹.

Στο πλαίσιο τη συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας κατασκευάστηκαν οι απαραίτητες πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν shRNAs ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή RNAi σίγηση. Επιβεβαιώθηκε η κλωνοποίηση των shRNA και στους 2 πλασμιδιακούς φορείς (pSiCOR και pLKO) με αλληλούχηση. Επίσης ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα του φορέα pSiCOR/shKLF5 με παροδική έκφραση shRNA έναντι του μεταγραφικού παράγοντα KLF5. Η αποτελεσματική σίγηση επιβεβαιώθηκε με RT-qPCR δίνοντας μια 76,8% μείωση του μεταγράφου σε σύγκριση με το control, όπως και με Western Blot επιβεβαιώνοντας τη σίγηση επίσης σε ποσοστό 79,4% (**Εικ. 33**). Επίσης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 33B, η πρωτεΐνη ανιχνεύεται ακριβώς στο μοριακό βάρος

που αναμένεται, δηλαδή στα 55KD, επιβεβαιώνοντας και την ειδικότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε. Ο έλεγχος της αποτελεσματικής σίγησης σε μεταγραφικό αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο είναι απαραίτητος για την επιβεβαίωση του επιτυχούς σχεδιασμού του shRNA και της επακόλουθης RNAi σίγησης. Ωστόσο η χρήση του φορέα pSiCOR, αν και είναι μια πολύ χρήσιμη επιλογή για τη γρήγορη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αποτελεσματικότητα των shRNA (3-4 μέρες), δεν αποτελεί ένα σταθερό μοριακό εργαλείο σίγησης. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητος και ο έλεγχος της λειτουργίας του pLKO-tet συστήματος και η δημιουργία των αντίστοιχων σταθερών κυτταρικών σειρών για την επαγόμενη έκφραση των shRNA. Επίσης μεγάλο ενδιαφέρον θα είχαν πειράματα συνδυαστικής σίγησης ανάμεσα στους 3 μεταγραφικούς παράγοντες, διερευνώντας έτσι τη συνεργασία τους για τη γονιδιακή ρύθμιση στόχων, συνδυαστικά και με τα CHIP-seq αποτελέσματα.

Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα του shRNA, ωστόσο μελλοντικά θα πρέπει να σχεδιαστεί κι ένα δεύτερο shRNA που να στοχεύει σε διαφορετική αλληλουχία του μεταγράφου για να επιβεβαιωθεί η μη τυχαιότητα της σίγησης. Μέσω της CFA ανάλυσης και της μικροσκοπικής παρατήρησης, φαίνεται ότι η μείωση των επιπέδων του KLF5 έχει σημαντικό αντίκτυπο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, με μεγάλη διαφορά στον φαινότυπο συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (**Εικ.34**). Η εικόνα αυτή συμφωνεί με την ογκογόνο δράση του μεταγραφικού παράγοντα και αποκαλύπτει τον σημαντικό του ρόλο για την διατήρηση του καρκινικού φαινοτύπου. Η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έφτασε σε ποσοστό 55,2%, ωστόσο λαμβάνοντας υπόψιν τις εικόνες από το μικροσκόπιο, το ποσοστό αυτό αποτελεί υποεκτίμηση του πραγματικού φαινοτύπου που μπορεί να αποδοθεί στην έμμεση διαδικασία εκτίμησης της καλυπτόμενης από κύτταρα επιφάνειας. Με την μελλοντική δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών με τον tet-pLKO-origo για επαγόμενη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα θα μπορέσει να μελετηθεί ο κυτταρικός φαινότυπος εκτενέστερα (μορφολογία, αριθμός κυττάρων, δυνατότητα μετάστασης και διήθησης).

Η βιοπληροφορική ανάλυση που έγινε με βάση ChIPSeq δεδομένα σε συνδυασμό με τη μεταγραφομική ανάλυση, αποκάλυψε τρία lncRNAs που ονομάστηκαν REAKTs τα οποία είναι αυξορυθμιζόμενα στον καρκίνο του στομάχου και εμφανίζουν πρότυπα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 στον υποκινητή τους. Με qPCR ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των lncRNAs REAKT1,2,3 υπό τη σίγηση του KLF5 (**Εικ.35**). Σημειώθηκε σημαντική μείωση (70-90%) των μεταγράφων REAKT, υποδηλώνοντας τη θετική ρύθμισή τους από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5. Αυτή είναι μια πολύ ισχυρή ένδειξη ρύθμισης αυτών των lncRNAs από τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5. Εάν η φυσιολογική του λειτουργία είναι να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση αυτών των lncRNAs, αφού ο ίδιος βρίσκεται σε γονιδιωματική

ενίσχυση και υπερεκφράζεται, μπορεί να ευθύνεται και για την υπερέκφραση αυτών των lncRNA στον γαστρικό καρκίνο. Ωστόσο, σε οποιαδήποτε περίπτωση απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για την εξακρίβωση του μηχανισμού δράσης και ρύθμισης των REAKTs, αλλά και του τρόπου με τον οποίο μπορεί να εμπλέκονται στον ογκοεπαγωγικό φαινότυπο. Παρόμοια μελέτη που συσχετίζει τη συνεργασία των ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων KLF5 και MYC με lncRNAs δημοσιεύτηκε πρόσφατα από την ερευνητική ομάδα Tong-peng Xu et al., 2019. Στην έρευνα αυτή βρέθηκε το LINC00346 να υπερεκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου, και επιβεβαιώθηκε ότι καταστολή του άξονα KLF5/MYC/LINC00346 οδηγεί σε ογκογόνο φαινότυπο²⁵². Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα το LINC00346, είναι κυτταροπλασματικός μέσω παρεμπόδισης της δράσης του miR-34a-5p οδηγώντας σε αυξορύθμιση των Notch1, AXL και CD44. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αποτελούν ένδειξη του ρυθμιστικού ρόλου που μπορεί να έχει ο μεταγραφικός παράγοντας KLF5 σε lncRNAs στον καρκίνο του στομάχου, μια υπόθεση που υποστηρίζει και η παρούσα πτυχιακή εργασία. Ωστόσο το LINC00436 αποτελεί ένα κυτταροπλασματικό lncRNA, ενώ η αυτή η πτυχιακή εργασία εστιάζει στην εύρεση πυρηνικών lncRNA που να ελέγχονται από τον KLF5 στον καρκίνο του στομάχου, που μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεν υπάρχει κάποια αναφορά. Διαφορετικά ερευνητικά αποτελέσματα έχουν υπάρξει για τον καρκίνο του μαστού, όπου ένα lncRNA το PVT1 ελέγχει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 και ενισχύει την ογκογένεση μέσω του μονοπατιού β-κατενίνης²⁵³. Επίσης, στον καρκίνο του μαστού ένα άλλο lncRNA, το RP1, αυξορυθμίζεται από τον KLF5 (μέσω της πρωτεΐνης p300) και επάγει την καρκινική ανάπτυξη και μετάσταση μέσω της παρεμπόδισης της μετάφρασης του p27kip1²⁵⁴. Σε όλες τις περιπτώσεις, ακριβώς επειδή τα lncRNAs δρουν με πολύπλοκο τρόπο μέσω αλληλεπίδρασης και με άλλες πρωτεΐνες και η εμπλοκή τους στον καρκινικό φαινότυπο μπορεί να είναι έμμεση, η εύρεση των REAKTs είναι μια αρχή στην προσπάθεια αναζήτησης ιστοειδικών βιοδεικτών για τον καρκίνο του στομάχου.

Μελλοντικοί στόχοι της ερευνητικής δουλειάς στην οποία εντάσσεται αυτή η πτυχιακή εργασία είναι η επιτυχής σίγηση και των τριών μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να ακολουθήσει η αλληλούχηση του RNA για να βρεθούν ποια lncRNAs έχουν διαφορετική έκφραση, πειράματα FACS για να μελετηθεί ο φαινότυπος της απόπτωσης, περαιτέρω μελέτες πάνω στην κυτταρική ανάπτυξη/πολλαπλασιασμό, πειράματα RNA pull-down για να βρεθούν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν τα REAKTs και βέβαια η μελέτη του ογκογόνου φαινοτύπου και σε *in vivo* συστήματα.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

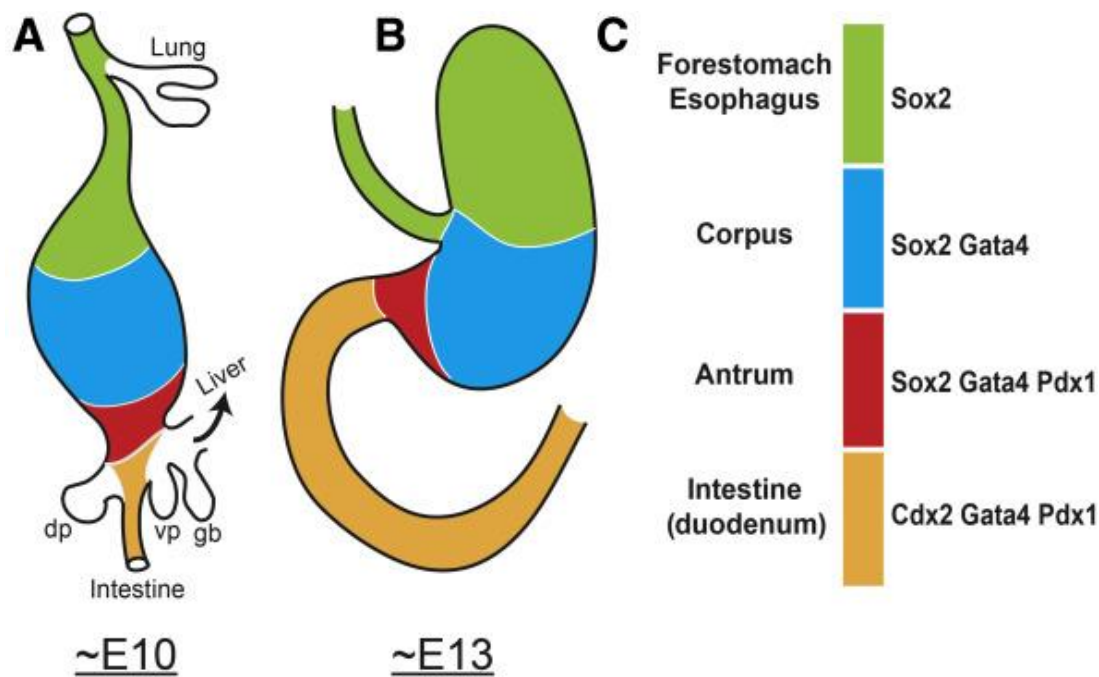
5.1 Αναπτυξιακή στομάχου και πρότυπα έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων: από τον εμβρυϊκό στον ενήλικο στόμαχο

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η απορρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6, και KLF5 επάγει την ογκογένεση στο στομάχι και σε άλλους ιστούς γαστρεντερικής προέλευσης. Για να γίνει κατανοητή η ογκοεπαγωγική δράση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων θα πρέπει να γίνει η περιγραφή της εμπλοκής τους στην φυσιολογική αναπτυξιακή διαδικασία. Η γαστρική ιστογένεση προέρχεται από την ενδοδερμική βλαστική στοιβάδα κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης. Η γαστριδίωση είναι ένα κρίσιμο αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο σχηματίζεται μια εσώτερη κοιλότητα, το αρχέντερο και ένα άνοιγμα προς τα έξω, ο βλαστοπόρος²⁵⁵. Ο σχηματισμός αυτός που ονομάζεται γαστρίδιο αποτελείται από τρεις βλαστικές στοιβάδες: εξώδερμα, μεσοδερμα, ενδόδερμα²⁵⁶. Πιο συγκεκριμένα για τον σχηματισμό του ενδοδέρματος (που είναι και η βασική στοιβάδα από τη οποία θα προκύψει ο στόμαχος) επιβλαστικά κύτταρα του γαστριδίου εισβάλλουν στην αρχική λωρίδα (primitive streak), οργανώνονται σε μονόστιβα επιθηλιακά φύλλα τα οποία με τη σειρά τους δημιουργούν το εμπρόσθιο (μελλοντικό πρόσθιο αρχέντερο) και το οπίσθιο (μελλοντικό οπίσθιο αρχέντερο) μέρος του πρώιμου γαστρεντερικού σωλήνα (ΠΓΣ)²⁵⁷. Η διαφοροποίηση του ενδοδέρματος, σε συνδυασμό με τη δημιουργία του μεσοδέρματος και μιας σειράς εγκολπώσεων του σώματος θα δώσουν την τελική διαμόρφωση του εμβρυϊκού γαστρεντερικού σωλήνα (πρόσθιο αρχέντερο/foregut, μέσο αρχέντερο/midgut, οπίσθιο αρχέντερο/hindgut) από τον οποίο θα προκύψουν τα επιμέρους όργανα. Σ' αυτό το στάδιο ο εμβρυϊκός γαστρεντερικός σωλήνας δεν είναι εξειδικευμένος²⁵⁸. Μέσα από σηματοδοτικά δίκτυα και πρότυπα έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων αναπτύσσεται ένα τοπικό πρότυπο οργάνωσης, για να ακολουθήσουν οι διαδικασίες οργανο-ειδικής διαφοροποίησης. Σε μια σύνοψη λοιπόν η ανάπτυξη του στομάχου μπορεί να χωριστεί σε 3 διαδοχικά στάδια:

1. Διαφοροποίηση ενδοδέρματος
2. Σχηματισμός πρώιμου (primitive) γαστρεντερικού σωλήνα και των τοπικών προτύπων οργάνωσης
3. Μορφογένεση και διαφοροποίηση στοχευμένων κυτταρικών τύπων ανάλογα με το όργανο²⁵⁹

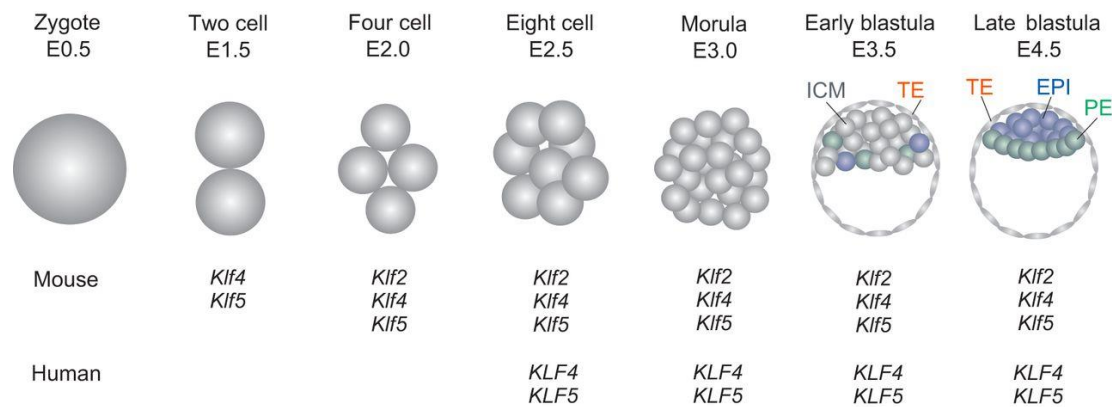
Το δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται από αυτό το σημείο και μετά είναι αρκετά πολύπλοκο και διαφέρει ανάλογα με τον ιστό. Συγκεκριμένα για τον στόμαχο, πειράματα σε ποντικούς έδειξαν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες πρωταγωνιστές είναι Foxa1/2/3, Gata4/6 και Sox2 οι οποίοι εκφράζονται από το μη διαφοροποιημένο ακόμη ενδόδερμα ώστε να δώσει το πρόσθιο αρχέγονο έντερο

από το οποίο θα προκύψει και ο στόμαχος (Εικ.36)²⁶⁰. Επίσης, μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να εκφράζονται και στο στάδιο του προ-γαστρικού ιστού. Ο τρόπος με τον οποίο οι παράγοντες FoxAs εμπλέκονται στην τοπική ανάπτυξη του στομάχου δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί, αλλά είναι γνωστό πως ρυθμίζουν την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) η οποία περιορίζεται στο αρχέντερο που θα δώσει τη περιοχή του άντρου και του πυλωρού²⁶¹. Η απώλεια την έκφρασης του Pdx1 δίνει έναν φαινότυπο ψευδοπυλωρικής μεταπλασίας και οδηγεί σε απώλεια των ενδοκρινικών κυττάρων που παράγουν γαστρίνη^{131,262}. Επίσης σημαντική είναι η δράση του Sox2 (Sex determining region Y-box 2) καθώς εκφράζεται μόνο στο πρόσθιο αρχέντερο που θα διαφοροποιηθεί σε στόμαχο, και η εξειδικευμένη του παρουσία στη τοπολογία της γαστροοισοφαγικής συμβολής φαίνεται να καθορίζει αυτό το όριο²⁶³. Από την άλλη πλευρά, μιλώντας για το οπίσθιο αρχέντερο, σημαντική είναι η έκφραση του Cdx2 (caudal type homeobox 2) που καθορίζει την διαφοροποίηση του εντερικού ιστού²⁶⁴. Φαίνεται να υπάρχει μια σχέση ανάμεσα σ αυτούς τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες για τον καθορισμό των ορίων ανάμεσα σε οισοφάγο/στομάχι/έντερο καθώς η απουσία του Cdx2 οδηγεί στην έκφραση του Sox2 στο έντερο με τελικό φαινότυπο οισοφάγου και όχι γαστρικό φαινότυπο όπως θα ήταν αναμενόμενο^{55,264}. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Gata4 και Gata6 είναι σημαντικοί ρυθμιστές της πρώιμης διαφοροποίησης του ενδοδέρματος γενικότερα και σε πολλά όργανα²⁶⁵. Καθώς αναπτύσσεται το μοτίβο τοπικής οργάνωσης, οι παράγοντες αυτοί εκφράζονται στο πρόσθιο αρχέντερο στο σημείο που μελλοντικά θα αναπτυχθεί ο αδενικός στόμαχος με τον Gata4 να αποτελεί έναν γαστρικό δείκτη καθώς εκφράζεται στον κορμό και στο άντρο⁵⁵. Ο Gata4 είναι από τους πρώτους που προσδένονται τη χρωματίνη νωρίς κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και επιτρέπουν έτσι την προσέλευση κι άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι ο Hnf3. Η απουσία του δυσχεραίνει την εγκαθίδρυση γαστρικού φαινοτύπου²⁶⁶. Από την οπτική γωνία της σηματοδότησης αυτή εκτείνεται σε 2 βασικούς άξονες: Η διαφοροποίηση του γαστρικού επιθηλίου ελέγχεται από μεσεγχυματικά σήματα όπως είναι οι πρωτεΐνες BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) και μέλη της οικογένειας TGF-β (Transforming Growth Factor-β), ενώ ενδοδερμικής προέλευσης σήματα όπως τα Sonic hedgehog (Shh) και Indian hedgehog (Ihh) είναι επίσης καθοριστικά για τη μορφογένεση^{267,268}.



Εικόνα 36. Πρότυπα έκφρασης βασικών μεταγραφικών παραγόντων κατά την ανάπτυξη του εμβρυϊκού στομάχου⁵⁵.

Όσον αφορά τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 (γνωστός και ως IKLF και BTEB2), ο ρόλος του εντοπίζεται νωρίς στην εμβρυογένεση ήδη από την πρώτη κυτταρική διαίρεση πριν από τον σχηματισμό της επιβλάστης (Εικ.37)¹²⁹. Εμπλέκεται στον σχηματισμό των τριών κυτταρικών γενεαλογιών/τύπων πριν από την εμφύτευση. Επάγει τον σχηματισμό των TE (Trophectoderm) και EPI (Epiblast) ενώ εμποδίζει τον σχηματισμό του PE (Primitive Endoderm) που αποτελούν τις 3 βασικές κυτταρικές γενεαλογίες πριν την εμφύτευση^{269,270}. Ο βασικός του ρόλος είναι η διατήρηση της πολυδυναμικότητας των βλαστοκυττάρων, εμποδίζοντας την εξέλιξη της διαφοροποίησης, ενώ λειτουργεί και ως επαγωγέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού^{271,272}. Η έκφραση του Klf5 είναι χαρακτηριστική στο στάδιο του πρώιμου γαστρεντερικού σωλήνα και μετέπειτα στο ώριμο εντερικό επιθήλιο όπου ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό^{251,273}. Στην μορφογένεση του στομάχου δεν εμπλέκεται άμεσα, ο αναπτυξιακός του ρόλος όμως στο εντερικό επιθήλιο είναι σημαντικός μιας και όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι περισσότερες περιπτώσεις του γαστρικού καρκίνου αφορούν αδenoκαρκινώματα εντερικού τύπου.



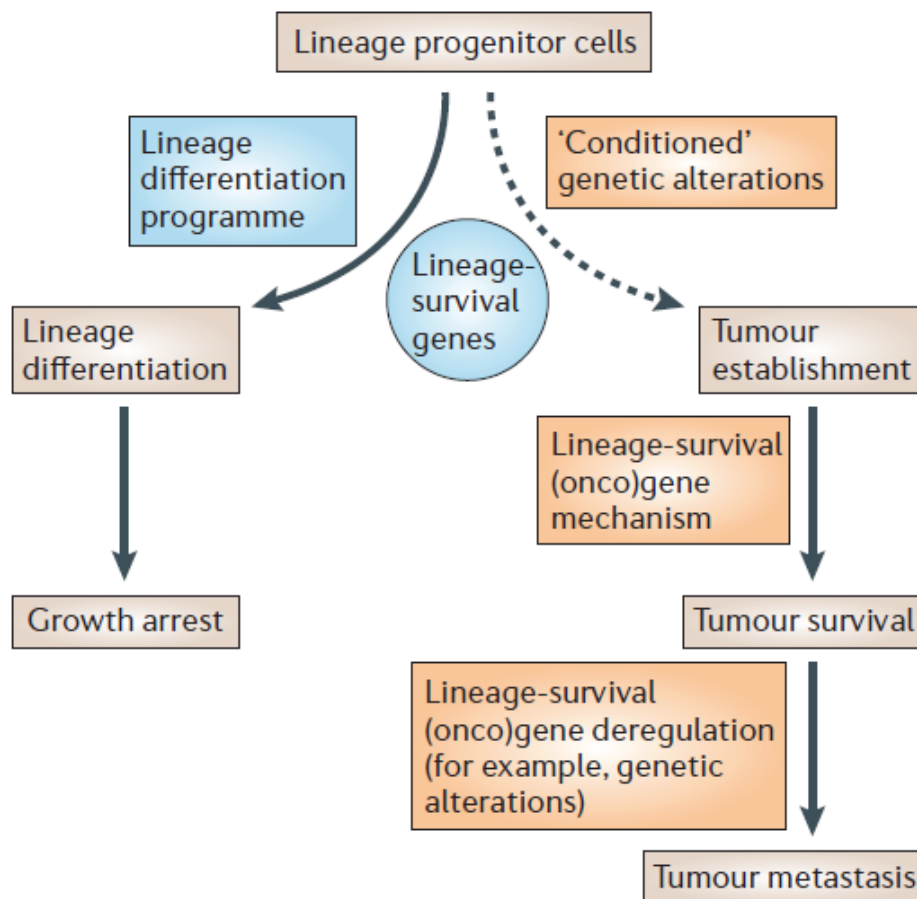
Εικόνα 37. Έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια ¹²⁹.

Με βάση τη λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων KLF5/GATA4/GATA6 και την εμπλοκή τους σε αναπτυξιακούς μηχανισμούς και μονοπάτια αλλά και στη διαφοροποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών γενεαλογιών/τύπων, η διατάραξη της λειτουργίας τους μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Πρόκειται για ένα είδος ογκογονιδίων που ελέγχουν τη διατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών γενεαλογιών σε έναν ιστό (Lineage-survival oncogenes) ενώ οι γονιδιακοί τους τόποι ενισχύονται γενετικά δημιουργώντας πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα του καρκίνου του στομάχου ^{144,146,274,275}.

5.2 Lineage Survival Oncogenes

Η πολυπλοκότητα της ογκογένεσης έχει ωθήσει τους επιστήμονες στη διερεύνηση της ασθένειας σε πολλά επίπεδα και από πολλές οπτικές γωνίες. Υπάρχουν δύο βασικές θεωρίες που εξηγούν την εξέλιξη του όγκου και παρεκκλίνουν μεταξύ τους: η προσέγγιση με βάση τα ογκογονίδια (oncogene addiction) και η προσέγγιση με βάση τη κυτταρική γενεαλογία (lineage addiction)²⁷⁶. Η πρώτη που αναφέρθηκε από τον Bernard Weinstein υποστηρίζει ότι ανεξάρτητα από τις πολλαπλές γενετικές διαταραχές που σημειώνονται στον όγκο, ο φαινότυπος διαρκούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης εξαρτάται από κλασικά ογκογονίδια (όπως το MYC και RAS)^{277,278}. Περιγράφει δηλαδή μια θεωρία σύμφωνα με την οποία, υπάρχει ένας 'εθισμός' ως προς το ογκογονίδιο (ή μια συνεχή ογκογόνο δραστηριότητα) ο οποίος αποτελεί και το βασικό προαπαιτούμενο του καρκινικού φαινοτύπου^{278,279}. Η δεύτερη προσέγγιση συνδυάζει το γενετικό υπόβαθρο με την κυτταρική γενεαλογία, και επικεντρώνεται σε γονίδια με ειδικότητα έκφρασης ως προς τον κυτταρικό τύπο, που εμπλέκονται σε αναπτυξιακά μονοπάτια²⁸⁰. Οι Garraway and Sellers περιέγραψαν αυτή τη θεωρία τονίζοντας ότι όταν απορρυθμίζονται οι ρυθμιστές μιας συγκεκριμένης κυτταρικής γενεαλογίας, τότε επάγεται η ογκογένεση με τα καρκινικά κύτταρα να προέρχονται από τον συγκεκριμένο κυτταρικό υποπληθυσμό (Εικ.38)²⁸¹. Η βασική διαφορά των δύο προσεγγίσεων έγκειται στους παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η καρκινική δραστηριότητα. Στην oncogene addiction θεωρία

η κυτταρική σηματοδότηση των καρκινικών κυττάρων διαφέρει από τα υγιή κύτταρα δίνοντας έναν αντι-αποπτωτικό φαινότυπο από τον οποίο εξαρτάται και η εξέλιξη της νόσου²⁸². Πρόκειται για μια νέα κυτταρική/καρκινοειδική δραστηριότητα που μεταμορφώνει τα κύτταρα σε καρκινικά. Στην lineage addiction θεωρία γίνεται λόγος για απορρύθμιση ήδη υπαρχόντων αναπτυξιακών μηχανισμών που αποκτούν μια ανεξέλεγκτη δραστηριότητα, χωρίς να εμφανίζονται νέες καρκινοειδικές κυτταρικές λειτουργίες²⁸¹. Γονίδια που έχουν κάποιο ρόλο σε τέτοιους μηχανισμούς και εμφανίζουν διαταραγμένη λειτουργία στον καρκίνο, συνήθως επειδή υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα, ονομάζονται lineage survival oncogenes. Στην εικόνα συνοψίζονται τα βήματα αυτού του είδους της ογκογένεσης με βασικά σημεία την γενετική διαταραχή/αλλοίωση των γονιδίων αυτών και στη συνέχεια την εμπλοκή τους στην εξέλιξη της νόσου.



Εικόνα 38: Ρόλος των lineage survival γονιδίων, στην ανάπτυξη και εγκαθίδρυση του όγκου²⁸¹.

Η πιο γνωστή περίπτωση τέτοιου ογκογονιδίου είναι ο μεταγραφικός παράγοντας MITF (microphthalmia-associated transcription factor) ο οποίος έχει κύριο ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό τύπο των μελανοκυττάρων²⁸³⁻²⁸⁵. Συμμετέχει στις κυτταρικές λειτουργίες του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης μέσω των οποίων ρυθμίζει τη

διαφοροποίηση και τη διατήρηση της γενεαλογίας των μελανοκυττάρων^{286,287}. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει πως στο 15-20% των μελανωμάτων, ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας είναι γονιδιωματικά ενισχυμένος, δηλαδή υπάρχει σε πολλά αντίγραφα στο γονιδίωμα.

6. Βιβλιογραφία

- 1 Tan, P. & Yeoh, K. G. Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **149**, 1153-1162 e1153, doi:10.1053/j.gastro.2015.05.059 (2015).
- 2 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).
- 3 Global Burden of Disease Cancer, C. *et al.* Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* **3**, 524-548, doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688 (2017).
- 4 Brown, K. F. *et al.* The fraction of cancer attributable to modifiable risk factors in England, Wales, Scotland, Northern Ireland, and the United Kingdom in 2015. *Br J Cancer* **118**, 1130-1141, doi:10.1038/s41416-018-0029-6 (2018).
- 5 Ng, C. J., Teo, C. H., Abdullah, N., Tan, W. P. & Tan, H. M. Relationships between cancer pattern, country income and geographical region in Asia. *BMC Cancer* **15**, 613, doi:10.1186/s12885-015-1615-0 (2015).
- 6 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 7 Binnewies, M. *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* **24**, 541-550, doi:10.1038/s41591-018-0014-x (2018).
- 8 Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. & Taylor, S. S. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **22**, R966-980, doi:10.1016/j.cub.2012.10.006 (2012).
- 9 Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol* **1170**, 29-40, doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2 (2014).
- 10 Hulleman, E. & Boonstra, J. Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **58**, 80-93, doi:10.1007/PL00000780 (2001).
- 11 Walker, J. L., Fournier, A. K. & Assoian, R. K. Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 395-405, doi:10.1016/j.cytogfr.2005.03.003 (2005).
- 12 Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-1134, doi:10.1016/j.cell.2010.06.011 (2010).
- 13 Hynes, N. E. & MacDonald, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 177-184, doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010 (2009).
- 14 Sears, R. *et al.* Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**, 2501-2514, doi:10.1101/gad.836800 (2000).
- 15 Sever, R. & Brugge, J. S. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, doi:10.1101/cshperspect.a006098 (2015).
- 16 Pratilas, C. A. & Solit, D. B. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res* **16**, 3329-3334, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3064 (2010).
- 17 Hewitt, G. *et al.* Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* **3**, 708, doi:10.1038/ncomms1708 (2012).
- 18 Yaswen, P. *et al.* Therapeutic targeting of replicative immortality. *Semin Cancer Biol* **35 Suppl**, S104-S128, doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.007 (2015).

- 19 Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H. & Shay, J. W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* **8**, 69, doi:10.1186/s13073-016-0324-x (2016).
- 20 Morris, L. G. & Chan, T. A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer* **121**, 1357-1368, doi:10.1002/cncr.29140 (2015).
- 21 Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001008, doi:10.1101/cshperspect.a001008 (2010).
- 22 Du, W. & Searle, J. S. The rb pathway and cancer therapeutics. *Curr Drug Targets* **10**, 581-589, doi:10.2174/138945009788680392 (2009).
- 23 Zhao, J., Zhang, Z., Liao, Y. & Du, W. Mutation of the retinoblastoma tumor suppressor gene sensitizes cancers to mitotic inhibitor induced cell death. *Am J Cancer Res* **4**, 42-52 (2014).
- 24 Klymkowsky, M. W. & Savagner, P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* **174**, 1588-1593, doi:10.2353/ajpath.2009.080545 (2009).
- 25 Hao, Y., Baker, D. & Ten Dijke, P. TGF-beta-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20112767 (2019).
- 26 Syed, V. TGF-beta Signaling in Cancer. *J Cell Biochem* **117**, 1279-1287, doi:10.1002/jcb.25496 (2016).
- 27 Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* **2**, 213-219, doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.213 (2006).
- 28 Lv, X. *et al.* The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis* **4**, 19-24, doi:10.1016/j.gendis.2016.11.003 (2017).
- 29 Baeriswyl, V. & Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **19**, 329-337, doi:10.1016/j.semcancer.2009.05.003 (2009).
- 30 Retraction. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **23**, 129, doi:10.1016/j.ccr.2012.11.004 (2013).
- 31 Weis, S. M. & Cheresh, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* **17**, 1359-1370, doi:10.1038/nm.2537 (2011).
- 32 Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* **70**, 5649-5669, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1040 (2010).
- 33 Lawson, D. A., Kessenbrock, K., Davis, R. T., Pervolarakis, N. & Werb, Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat Cell Biol* **20**, 1349-1360, doi:10.1038/s41556-018-0236-7 (2018).
- 34 Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890, doi:10.1016/j.cell.2009.11.007 (2009).
- 35 Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 69-84, doi:10.1038/s41580-018-0080-4 (2019).
- 36 Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. & Weinberg, R. A. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 128-134, doi:10.1038/nrc.2017.118 (2018).
- 37 Brown, J. M. & Attardi, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **5**, 231-237, doi:10.1038/nrc1560 (2005).
- 38 Yip, K. W. & Reed, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27**, 6398-6406, doi:10.1038/onc.2008.307 (2008).
- 39 Fernald, K. & Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* **23**, 620-633, doi:10.1016/j.tcb.2013.07.006 (2013).

- 40 Vousden, K. H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604, doi:10.1038/nrc864 (2002).
- 41 Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-1337, doi:10.1038/sj.onc.1210220 (2007).
- 42 Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90, doi:10.3322/caac.20107 (2011).
- 43 Wroblewski, L. E., Peek, R. M., Jr. & Wilson, K. T. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* **23**, 713-739, doi:10.1128/CMR.00011-10 (2010).
- 44 Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M. & Yoshiyama, H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses* **4**, 3420-3439, doi:10.3390/v4123420 (2012).
- 45 Stock, M. & Otto, F. Gene deregulation in gastric cancer. *Gene* **360**, 1-19, doi:10.1016/j.gene.2005.06.026 (2005).
- 46 Ajani, J. A. *et al.* Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17036, doi:10.1038/nrdp.2017.36 (2017).
- 47 Kim, T. H. & Shivdasani, R. A. Stomach development, stem cells and disease. *Development* **143**, 554-565, doi:10.1242/dev.124891 (2016).
- 48 Soybel, D. I. Anatomy and physiology of the stomach. *Surg Clin North Am* **85**, 875-894, doi:10.1016/j.suc.2005.05.009 (2005).
- 49 Kang, H. C. *et al.* Beyond the GIST: mesenchymal tumors of the stomach. *Radiographics* **33**, 1673-1690, doi:10.1148/rg.336135507 (2013).
- 50 Choi, E. *et al.* Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. *Gut* **63**, 1711-1720, doi:10.1136/gutjnl-2013-305964 (2014).
- 51 Gelberg, H. B. Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicol Pathol* **42**, 54-66, doi:10.1177/0192623313518113 (2014).
- 52 Eicher, A. K., Berns, H. M. & Wells, J. M. Translating Developmental Principles to Generate Human Gastric Organoids. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **5**, 353-363, doi:10.1016/j.jcmgh.2017.12.014 (2018).
- 53 Bredemeyer, A. J. *et al.* The gastric epithelial progenitor cell niche and differentiation of the zymogenic (chief) cell lineage. *Dev Biol* **325**, 211-224, doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.025 (2009).
- 54 Stave, R., Brandtzaeg, P., Nygaard, K. & Fausa, O. The transitional body-antrum zone in resected human stomachs. Anatomical outline and parietal-cell and gastrin-cell characteristics in peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* **13**, 685-691, doi:10.3109/00365527809181782 (1978).
- 55 Willet, S. G. & Mills, J. C. Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: from Embryogenesis to Adult Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 546-559, doi:10.1016/j.jcmgh.2016.05.006 (2016).
- 56 Mills, J. C. & Shivdasani, R. A. Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology* **140**, 412-424, doi:10.1053/j.gastro.2010.12.001 (2011).
- 57 Hu, B. *et al.* Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol* **3**, 251-261, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021 (2012).
- 58 Hayakawa, Y., Sethi, N., Sepulveda, A. R., Bass, A. J. & Wang, T. C. Oesophageal adenocarcinoma and gastric cancer: should we mind the gap? *Nat Rev Cancer* **16**, 305-318, doi:10.1038/nrc.2016.24 (2016).
- 59 Correa, P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am* **42**, 211-217, doi:10.1016/j.gtc.2013.01.002 (2013).

- 60 Siewert, J. R. & Stein, H. J. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* **85**, 1457-1459, doi:10.1046/j.1365-2168.1998.00940.x (1998).
- 61 Yu, X. *et al.* Clinicopathologic characteristics and prognosis of proximal and distal gastric cancer. *Onco Targets Ther* **11**, 1037-1044, doi:10.2147/OTT.S157378 (2018).
- 62 Al-Akwaa, A. M., Siddiqui, N. & Al-Mofleh, I. A. Primary gastric lymphoma. *World J Gastroenterol* **10**, 5-11, doi:10.3748/wjg.v10.i1.5 (2004).
- 63 Sanchez-Hidalgo, J. M. *et al.* Gastrointestinal stromal tumors: A multidisciplinary challenge. *World J Gastroenterol* **24**, 1925-1941, doi:10.3748/wjg.v24.i18.1925 (2018).
- 64 Lawrence, B. *et al.* The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* **40**, 1-18, vii, doi:10.1016/j.ecl.2010.12.005 (2011).
- 65 Gluckman, C. R. & Metz, D. C. Gastric Neuroendocrine Tumors (Carcinoids). *Curr Gastroenterol Rep* **21**, 13, doi:10.1007/s11894-019-0684-7 (2019).
- 66 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* **64**, 31-49, doi:10.1111/apm.1965.64.1.31 (1965).
- 67 Marques-Lespier, J. M., Gonzalez-Pons, M. & Cruz-Correa, M. Current Perspectives on Gastric Cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **45**, 413-428, doi:10.1016/j.gtc.2016.04.002 (2016).
- 68 Parsonnet, J. *et al.* Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* **83**, 640-643, doi:10.1093/jnci/83.9.640 (1991).
- 69 Berth, F., Bollschweiler, E., Drebber, U., Hoelscher, A. H. & Moenig, S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol* **20**, 5679-5684, doi:10.3748/wjg.v20.i19.5679 (2014).
- 70 Park, Y. H. & Kim, N. Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer. *J Cancer Prev* **20**, 25-40, doi:10.15430/JCP.2015.20.1.25 (2015).
- 71 Cislo, M. *et al.* Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology. *Oncotarget* **9**, 19427-19442, doi:10.18632/oncotarget.24827 (2018).
- 72 Guggenheim, D. E. & Shah, M. A. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Surg Oncol* **107**, 230-236, doi:10.1002/jso.23262 (2013).
- 73 Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tannenbaum, S. & Archer, M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* **2**, 58-60, doi:10.1016/s0140-6736(75)90498-5 (1975).
- 74 Goldenring, J. R. & Nomura, S. Differentiation of the gastric mucosa III. Animal models of oxyntic atrophy and metaplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G999-1004, doi:10.1152/ajpgi.00187.2006 (2006).
- 75 Carcas, L. P. Gastric cancer review. *J Carcinog* **13**, 14, doi:10.4103/1477-3163.146506 (2014).
- 76 Correa, P. & Piazuelo, M. B. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis* **13**, 2-9, doi:10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x (2012).
- 77 Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* **52**, 6735-6740 (1992).
- 78 Rugge, M. *et al.* Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol* **24**, 167-176, doi:10.1097/00000478-200002000-00001 (2000).
- 79 Almeida, R. *et al.* Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol* **199**, 36-40, doi:10.1002/path.1246 (2003).

- 80 Yasui, W., Sentani, K., Motoshita, J. & Nakayama, H. Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scand J Surg* **95**, 225-231, doi:10.1177/145749690609500403 (2006).
- 81 Yasui, W. *et al.* Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* **4**, 113-121, doi:10.1007/pl00011733 (2001).
- 82 Churin, Y. *et al.* Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol* **161**, 249-255, doi:10.1083/jcb.200208039 (2003).
- 83 Petrovchich, I. & Ford, J. M. Genetic predisposition to gastric cancer. *Semin Oncol* **43**, 554-559, doi:10.1053/j.seminoncol.2016.08.006 (2016).
- 84 Barber, M. *et al.* Mechanisms and sequelae of E-cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol* **216**, 295-306, doi:10.1002/path.2426 (2008).
- 85 Graziano, F., Humar, B. & Guilford, P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol* **14**, 1705-1713, doi:10.1093/annonc/mdg486 (2003).
- 86 Grady, W. M. *et al.* Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* **26**, 16-17, doi:10.1038/79120 (2000).
- 87 Ansari, S., Gantuya, B., Tuan, V. P. & Yamaoka, Y. Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19082424 (2018).
- 88 Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8418-8423, doi:10.1073/pnas.0932692100 (2003).
- 89 Rudin, C. M. *et al.* Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer* **19**, 289-297, doi:10.1038/s41568-019-0133-9 (2019).
- 90 Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**, 202-209, doi:10.1038/nature13480 (2014).
- 91 Murphy, G., Pfeiffer, R., Camargo, M. C. & Rabkin, C. S. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* **137**, 824-833, doi:10.1053/j.gastro.2009.05.001 (2009).
- 92 Ang, Y. L., Yong, W. P. & Tan, P. Translating gastric cancer genomics into targeted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* **100**, 141-146, doi:10.1016/j.critrevonc.2016.02.007 (2016).
- 93 Kaneda, A., Matsusaka, K., Aburatani, H. & Fukayama, M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res* **72**, 3445-3450, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3919 (2012).
- 94 Marquitz, A. R., Mathur, A., Nam, C. S. & Raab-Traub, N. The Epstein-Barr Virus BART microRNAs target the pro-apoptotic protein Bim. *Virology* **412**, 392-400, doi:10.1016/j.virol.2011.01.028 (2011).
- 95 Sunakawa, Y. & Lenz, H. J. Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Curr Treat Options Oncol* **16**, 17, doi:10.1007/s11864-015-0331-y (2015).
- 96 Seo, A. N. *et al.* Intratumoural PD-L1 expression is associated with worse survival of patients with Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *Br J Cancer* **117**, 1753-1760, doi:10.1038/bjc.2017.369 (2017).
- 97 Liang, Q. *et al.* Integrative identification of Epstein-Barr virus-associated mutations and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastroenterology* **147**, 1350-1362 e1354, doi:10.1053/j.gastro.2014.08.036 (2014).

- 98 Ratti, M., Lampis, A., Hahne, J. C., Passalacqua, R. & Valeri, N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci* **75**, 4151-4162, doi:10.1007/s00018-018-2906-9 (2018).
- 99 Funkhouser, W. K., Jr. *et al.* Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* **14**, 91-103, doi:10.1016/j.jmoldx.2011.11.001 (2012).
- 100 Yamamoto, H. & Imai, K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* **89**, 899-921, doi:10.1007/s00204-015-1474-0 (2015).
- 101 Hudler, P. Genetic aspects of gastric cancer instability. *ScientificWorldJournal* **2012**, 761909, doi:10.1100/2012/761909 (2012).
- 102 Ottini, L. *et al.* Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Ann Oncol* **17 Suppl 7**, vii97-102, doi:10.1093/annonc/mdl960 (2006).
- 103 Karakas, B., Bachman, K. E. & Park, B. H. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* **94**, 455-459, doi:10.1038/sj.bjc.6602970 (2006).
- 104 Kiavue, N. *et al.* ERBB3 mutations in cancer: biological aspects, prevalence and therapeutics. *Oncogene*, doi:10.1038/s41388-019-1001-5 (2019).
- 105 Pines, G., Kostler, W. J. & Yarden, Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett* **584**, 2699-2706, doi:10.1016/j.febslet.2010.04.019 (2010).
- 106 Arienti, C., Pignatta, S. & Tesei, A. Epidermal Growth Factor Receptor Family and its Role in Gastric Cancer. *Front Oncol* **9**, 1308, doi:10.3389/fonc.2019.01308 (2019).
- 107 Corso, S. & Giordano, S. How Can Gastric Cancer Molecular Profiling Guide Future Therapies? *Trends Mol Med* **22**, 534-544, doi:10.1016/j.molmed.2016.05.004 (2016).
- 108 Katona, B. W. & Rustgi, A. K. Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **3**, 211-217, doi:10.1016/j.jcmgh.2017.01.003 (2017).
- 109 Prudnikova, T. Y., Rawat, S. J. & Chernoff, J. Molecular pathways: targeting the kinase effectors of RHO-family GTPases. *Clin Cancer Res* **21**, 24-29, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0827 (2015).
- 110 Tanaka, A. *et al.* Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset. *Oncotarget* **9**, 29336-29350, doi:10.18632/oncotarget.25464 (2018).
- 111 Nam, S., Kim, J. H. & Lee, D. H. RHOA in Gastric Cancer: Functional Roles and Therapeutic Potential. *Front Genet* **10**, 438, doi:10.3389/fgene.2019.00438 (2019).
- 112 Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649, doi:10.1038/25292 (1998).
- 113 Skierucha, M. *et al.* Molecular alterations in gastric cancer with special reference to the early-onset subtype. *World J Gastroenterol* **22**, 2460-2474, doi:10.3748/wjg.v22.i8.2460 (2016).
- 114 Rajagopalan, H., Nowak, M. A., Vogelstein, B. & Lengauer, C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 695-701, doi:10.1038/nrc1165 (2003).
- 115 Chen, T., Xu, X. Y. & Zhou, P. H. Emerging molecular classifications and therapeutic implications for gastric cancer. *Chin J Cancer* **35**, 49, doi:10.1186/s40880-016-0111-5 (2016).
- 116 Tohdo, H., Yokozaki, H., Haruma, K., Kajiyama, G. & Tahara, E. p53 gene mutations in gastric adenomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **63**, 191-195, doi:10.1007/bf02899260 (1993).

- 117 Grabsch, H. I. & Tan, P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Dig Surg* **30**, 150-158, doi:10.1159/000350876 (2013).
- 118 Wieschaus, E., Nusslein-Volhard, C. & Kluding, H. Kruppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. *Dev Biol* **104**, 172-186, doi:10.1016/0012-1606(84)90046-0 (1984).
- 119 Miller, I. J. & Bieker, J. J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 2776-2786, doi:10.1128/mcb.13.5.2776 (1993).
- 120 Pollak, N. M., Hoffman, M., Goldberg, I. J. & Drosatos, K. Kruppel-like factors: Crippling and un-crippling metabolic pathways. *JACC Basic Transl Sci* **3**, 132-156, doi:10.1016/j.jacbts.2017.09.001 (2018).
- 121 Miyamoto, S. *et al.* Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **23**, 8528-8541, doi:10.1128/mcb.23.23.8528-8541.2003 (2003).
- 122 Song, C. Z., Keller, K., Chen, Y. & Stamatoyannopoulos, G. Functional interplay between CBP and PCAF in acetylation and regulation of transcription factor KLF13 activity. *J Mol Biol* **329**, 207-215, doi:10.1016/s0022-2836(03)00429-7 (2003).
- 123 Sengupta, T., Chen, K., Milot, E. & Bieker, J. J. Acetylation of EKLF is essential for epigenetic modification and transcriptional activation of the beta-globin locus. *Mol Cell Biol* **28**, 6160-6170, doi:10.1128/MCB.00919-08 (2008).
- 124 Yang, Y., Tarapore, R. S., Jarmel, M. H., Tetreault, M. P. & Katz, J. P. p53 mutation alters the effect of the esophageal tumor suppressor KLF5 on keratinocyte proliferation. *Cell Cycle* **11**, 4033-4039, doi:10.4161/cc.22265 (2012).
- 125 Yang, Y. *et al.* Loss of transcription factor KLF5 in the context of p53 ablation drives invasive progression of human squamous cell cancer. *Cancer Res* **71**, 6475-6484, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1702 (2011).
- 126 Tetreault, M. P., Yang, Y. & Katz, J. P. Kruppel-like factors in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**, 701-713, doi:10.1038/nrc3582 (2013).
- 127 McConnell, B. B. & Yang, V. W. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* **90**, 1337-1381, doi:10.1152/physrev.00058.2009 (2010).
- 128 Brey, C. W., Nelder, M. P., Hailemariam, T., Gaugler, R. & Hashmi, S. Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. *Int J Biol Sci* **5**, 622-636, doi:10.7150/ijbs.5.622 (2009).
- 129 Bialkowska, A. B., Yang, V. W. & Mallipattu, S. K. Kruppel-like factors in mammalian stem cells and development. *Development* **144**, 737-754, doi:10.1242/dev.145441 (2017).
- 130 Chlon, T. M. & Crispino, J. D. Combinatorial regulation of tissue specification by GATA and FOG factors. *Development* **139**, 3905-3916, doi:10.1242/dev.080440 (2012).
- 131 Larsson, L. I., Madsen, O. D., Serup, P., Jonsson, J. & Edlund, H. Pancreatic-duodenal homeobox 1 -role in gastric endocrine patterning. *Mech Dev* **60**, 175-184, doi:10.1016/s0925-4773(96)00609-0 (1996).
- 132 Cantor, A. B. & Orkin, S. H. Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 117-128, doi:10.1016/j.semcdb.2004.10.006 (2005).
- 133 Bresnick, E. H., Katsumura, K. R., Lee, H. Y., Johnson, K. D. & Perkins, A. S. Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Res* **40**, 5819-5831, doi:10.1093/nar/gks281 (2012).

- 134 Aronson, B. E., Stapleton, K. A. & Krasinski, S. D. Role of GATA factors in development, differentiation, and homeostasis of the small intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **306**, G474-490, doi:10.1152/ajpgi.00119.2013 (2014).
- 135 Bassalart, C., Valverde-Estrella, L. & Chazaud, C. Primitive Endoderm Differentiation: From Specification to Epithelialization. *Curr Top Dev Biol* **128**, 81-104, doi:10.1016/bs.ctdb.2017.12.001 (2018).
- 136 Molkenkin, J. D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* **275**, 38949-38952, doi:10.1074/jbc.R000029200 (2000).
- 137 Haveri, H. *et al.* Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa. *BMC Gastroenterol* **8**, 9, doi:10.1186/1471-230X-8-9 (2008).
- 138 Zheng, R. & Blobel, G. A. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer* **1**, 1178-1188, doi:10.1177/1947601911404223 (2010).
- 139 Shimamoto, T. *et al.* GATA-1, GATA-2, and stem cell leukemia gene expression in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **8**, 1176-1180 (1994).
- 140 Katsumura, K. R. *et al.* Human leukemia mutations corrupt but do not abrogate GATA-2 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E10109-E10118, doi:10.1073/pnas.1813015115 (2018).
- 141 Crispino, J. D. & Horwitz, M. S. GATA factor mutations in hematologic disease. *Blood* **129**, 2103-2110, doi:10.1182/blood-2016-09-687889 (2017).
- 142 Lin, L. *et al.* Activation of GATA binding protein 6 (GATA6) sustains oncogenic lineage-survival in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4251-4256, doi:10.1073/pnas.1011989109 (2012).
- 143 Lentjes, M. H. *et al.* The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Rev Mol Med* **18**, e3, doi:10.1017/erm.2016.2 (2016).
- 144 Deng, N. *et al.* A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut* **61**, 673-684, doi:10.1136/gutjnl-2011-301839 (2012).
- 145 Li, Y. *et al.* Overexpression of KLF5 is associated with poor survival and G1/S progression in pancreatic cancer. *Aging (Albany NY)* **11**, 5035-5057, doi:10.18632/aging.102096 (2019).
- 146 Giefing, M. *et al.* Chromosomal gains and losses indicate oncogene and tumor suppressor gene candidates in salivary gland tumors. *Neoplasia* **55**, 55-60 (2008).
- 147 Akiyama, Y. *et al.* GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* **23**, 8429-8439, doi:10.1128/mcb.23.23.8429-8439.2003 (2003).
- 148 Beroukhim, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905, doi:10.1038/nature08822 (2010).
- 149 Sulahian, R. *et al.* An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer. *Oncogene* **33**, 5637-5648, doi:10.1038/onc.2013.517 (2014).
- 150 Chia, N. Y. *et al.* Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development. *Gut* **64**, 707-719, doi:10.1136/gutjnl-2013-306596 (2015).
- 151 Walesky, C. & Apte, U. Role of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) in cell proliferation and cancer. *Gene Expr* **16**, 101-108, doi:10.3727/105221615X14181438356292 (2015).

- 152 Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E. & Darnell, J. E., Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* **4**, 2353-2365, doi:10.1101/gad.4.12b.2353 (1990).
- 153 Chartier, F. L., Bossu, J. P., Laudet, V., Fruchart, J. C. & Laine, B. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene* **147**, 269-272, doi:10.1016/0378-1119(94)90079-5 (1994).
- 154 Sasaki, S., Hara, A., Sakaguchi, M., Nangaku, M. & Inoue, Y. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates megalin expression in proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res* **17**, 87-92, doi:10.1016/j.bbrep.2018.11.010 (2019).
- 155 Cai, S. H., Lu, S. X., Liu, L. L., Zhang, C. Z. & Yun, J. P. Increased expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha transcribed by promoter 2 indicates a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Therap Adv Gastroenterol* **10**, 761-771, doi:10.1177/1756283X17725998 (2017).
- 156 Chellappa, K., Robertson, G. R. & Sladek, F. M. HNF4alpha: a new biomarker in colon cancer? *Biomark Med* **6**, 297-300, doi:10.2217/bmm.12.23 (2012).
- 157 Chang, H. R. *et al.* HNF4alpha is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer. *Gut* **65**, 19-32, doi:10.1136/gutjnl-2014-307918 (2016).
- 158 Yeh, M. M., Bosch, D. E. & Daoud, S. S. Role of hepatocyte nuclear factor 4-alpha in gastrointestinal and liver diseases. *World J Gastroenterol* **25**, 4074-4091, doi:10.3748/wjg.v25.i30.4074 (2019).
- 159 Tremblay, M., Sanchez-Ferras, O. & Bouchard, M. GATA transcription factors in development and disease. *Development* **145**, doi:10.1242/dev.164384 (2018).
- 160 Berretta, J. & Morillon, A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Rep* **10**, 973-982, doi:10.1038/embor.2009.181 (2009).
- 161 Hangauer, M. J., Vaughn, I. W. & McManus, M. T. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet* **9**, e1003569, doi:10.1371/journal.pgen.1003569 (2013).
- 162 Iyer, M. K. *et al.* The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet* **47**, 199-208, doi:10.1038/ng.3192 (2015).
- 163 Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* **43**, 904-914, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018 (2011).
- 164 Noh, J. H., Kim, K. M., McClusky, W. G., Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **9**, e1471, doi:10.1002/wrna.1471 (2018).
- 165 Kanduri, C. Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 102-111, doi:10.1016/j.bbagr.2015.05.006 (2016).
- 166 Fatica, A. & Bozzoni, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* **15**, 7-21, doi:10.1038/nrg3606 (2014).
- 167 Pang, K. C., Frith, M. C. & Mattick, J. S. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet* **22**, 1-5, doi:10.1016/j.tig.2005.10.003 (2006).
- 168 Balas, M. M. & Johnson, A. M. Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer. *Noncoding RNA Res* **3**, 108-117, doi:10.1016/j.ncrna.2018.03.001 (2018).
- 169 Moran, V. A., Perera, R. J. & Khalil, A. M. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res* **40**, 6391-6400, doi:10.1093/nar/gks296 (2012).
- 170 Wang, P. The Opening of Pandora's Box: An Emerging Role of Long Noncoding RNA in Viral Infections. *Front Immunol* **9**, 3138, doi:10.3389/fimmu.2018.03138 (2018).
- 171 Djebali, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101-108, doi:10.1038/nature11233 (2012).

- 172 Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* **22**, 1775-1789, doi:10.1101/gr.132159.111 (2012).
- 173 Rinn, J. L. *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311-1323, doi:10.1016/j.cell.2007.05.022 (2007).
- 174 Sunamura, N. *et al.* Regulation of functional KCNQ1OT1 lncRNA by beta-catenin. *Sci Rep* **6**, 20690, doi:10.1038/srep20690 (2016).
- 175 Kim, T. K. *et al.* Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182-187, doi:10.1038/nature09033 (2010).
- 176 Orom, U. A. *et al.* Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell* **143**, 46-58, doi:10.1016/j.cell.2010.09.001 (2010).
- 177 Melo, C. A. *et al.* eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription. *Mol Cell* **49**, 524-535, doi:10.1016/j.molcel.2012.11.021 (2013).
- 178 Zhang, Y. *et al.* Chromatin connectivity maps reveal dynamic promoter-enhancer long-range associations. *Nature* **504**, 306-310, doi:10.1038/nature12716 (2013).
- 179 Fox, A. H. & Lamond, A. I. Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000687, doi:10.1101/cshperspect.a000687 (2010).
- 180 Li, R., Harvey, A. R., Hodgetts, S. I. & Fox, A. H. Functional dissection of NEAT1 using genome editing reveals substantial localization of the NEAT1_1 isoform outside paraspeckles. *RNA* **23**, 872-881, doi:10.1261/rna.059477.116 (2017).
- 181 Lellahi, S. M. *et al.* The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response. *J Biol Chem* **293**, 18965-18976, doi:10.1074/jbc.RA118.004473 (2018).
- 182 Tang, Y., Zhou, T., Yu, X., Xue, Z. & Shen, N. The role of long non-coding RNAs in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **13**, 657-669, doi:10.1038/nrrheum.2017.162 (2017).
- 183 Engreitz, J. M., Ollikainen, N. & Guttman, M. Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 756-770, doi:10.1038/nrm.2016.126 (2016).
- 184 Groff, A. F. *et al.* In Vivo Characterization of Linc-p21 Reveals Functional cis-Regulatory DNA Elements. *Cell Rep* **16**, 2178-2186, doi:10.1016/j.celrep.2016.07.050 (2016).
- 185 Engreitz, J. M. *et al.* Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature* **539**, 452-455, doi:10.1038/nature20149 (2016).
- 186 Anderson, K. M. *et al.* Transcription of the non-coding RNA upperhand controls Hand2 expression and heart development. *Nature* **539**, 433-436, doi:10.1038/nature20128 (2016).
- 187 Mercer, T. R. *et al.* The human mitochondrial transcriptome. *Cell* **146**, 645-658, doi:10.1016/j.cell.2011.06.051 (2011).
- 188 Liao, C. *et al.* LncARSR sponges miR-129-5p to promote proliferation and metastasis of bladder cancer cells through increasing SOX4 expression. *Int J Biol Sci* **16**, 1-11, doi:10.7150/ijbs.39461 (2020).
- 189 Olgun, G., Sahin, O. & Tastan, O. Discovering lncRNA mediated sponge interactions in breast cancer molecular subtypes. *BMC Genomics* **19**, 650, doi:10.1186/s12864-018-5006-1 (2018).
- 190 Yang, F., Zhang, H., Mei, Y. & Wu, M. Reciprocal regulation of HIF-1alpha and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect. *Mol Cell* **53**, 88-100, doi:10.1016/j.molcel.2013.11.004 (2014).
- 191 Rashid, F., Shah, A. & Shan, G. Long Non-coding RNAs in the Cytoplasm. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**, 73-80, doi:10.1016/j.gpb.2016.03.005 (2016).

- 192 Kopp, F. Molecular functions and biological roles of long non-coding RNAs in human
physiology and disease. *J Gene Med* **21**, e3104, doi:10.1002/jgm.3104 (2019).
- 193 Huarte, M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med* **21**, 1253-1261,
doi:10.1038/nm.3981 (2015).
- 194 Boukouris, S. & Mathivanan, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource
of disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl* **9**, 358-367, doi:10.1002/prca.201400114
(2015).
- 195 Zhu, X. *et al.* A long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of
gastric cancer. *Mol Cancer* **15**, 60, doi:10.1186/s12943-016-0544-0 (2016).
- 196 Bussemakers, M. J. *et al.* DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in
prostate cancer. *Cancer Res* **59**, 5975-5979 (1999).
- 197 de Kok, J. B. *et al.* DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate
tumors. *Cancer Res* **62**, 2695-2698 (2002).
- 198 Montecino-Rodriguez, E. M. & Loor, F. Haematopoietic cell transfers between
C57BL/6 mice differing at the *lpr* or *gld* locus. *Immunology* **74**, 127-131 (1991).
- 199 Luo, J. H. *et al.* Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular
carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology* **44**, 1012-1024,
doi:10.1002/hep.21328 (2006).
- 200 Li, Z. X. *et al.* MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer Manag Res* **10**, 6757-
6768, doi:10.2147/CMAR.S169406 (2018).
- 201 Liu, Y., He, A., Liu, B., Huang, Z. & Mei, H. Potential Role of lncRNA H19 as a Cancer
Biomarker in Human Cancers Detection and Diagnosis: A Pooled Analysis Based on
1585 Subjects. *Biomed Res Int* **2019**, 9056458, doi:10.1155/2019/9056458 (2019).
- 202 Begolli, R., Sideris, N. & Giakountis, A. lncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer:
From Molecular Function to Clinical Potential. *Cancers (Basel)* **11**,
doi:10.3390/cancers11101524 (2019).
- 203 Chakravarty, D. *et al.* The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a
critical modulator of prostate cancer. *Nat Commun* **5**, 5383,
doi:10.1038/ncomms6383 (2014).
- 204 Dong, P. *et al.* Long Non-coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy
in Human Tumors. *Front Genet* **9**, 471, doi:10.3389/fgene.2018.00471 (2018).
- 205 Fu, J. W., Kong, Y. & Sun, X. Long noncoding RNA NEAT1 is an unfavorable prognostic
factor and regulates migration and invasion in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*
142, 1571-1579, doi:10.1007/s00432-016-2152-1 (2016).
- 206 Mondal, T. *et al.* MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes
through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat Commun* **6**, 7743,
doi:10.1038/ncomms8743 (2015).
- 207 Binabaj, M. M. *et al.* The prognostic value of long noncoding RNA MEG3 expression in
the survival of patients with cancer: A meta-analysis. *J Cell Biochem* **119**, 9583-9590,
doi:10.1002/jcb.27276 (2018).
- 208 Zhang, J. J., Guo, S. H. & Jia, B. Q. Down-regulation of long non-coding RNA MEG3
serves as an unfavorable risk factor for survival of patients with breast cancer. *Eur Rev
Med Pharmacol Sci* **20**, 5143-5147 (2016).
- 209 Diaz-Lagares, A. *et al.* Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA
TP53 target 1 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E7535-E7544,
doi:10.1073/pnas.1608585113 (2016).
- 210 Xu, T. P. *et al.* E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric
cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death
Dis* **8**, e2837, doi:10.1038/cddis.2017.205 (2017).

- 211 Xu, T. P. *et al.* SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene* **34**, 5648-5661, doi:10.1038/onc.2015.18 (2015).
- 212 Ren, X. *et al.* High Expression of long non-coding RNA PVT1 predicts metastasis in Han and Uygur Patients with Gastric Cancer in Xinjiang, China. *Sci Rep* **9**, 548, doi:10.1038/s41598-018-36985-x (2019).
- 213 Ding, J. *et al.* Expression and clinical significance of the long non-coding RNA PVT1 in human gastric cancer. *Onco Targets Ther* **7**, 1625-1630, doi:10.2147/OTT.S68854 (2014).
- 214 Xu, M. D. *et al.* A Positive Feedback Loop of lncRNA-PVT1 and FOXM1 Facilitates Gastric Cancer Growth and Invasion. *Clin Cancer Res* **23**, 2071-2080, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0742 (2017).
- 215 Zhao, J. *et al.* lncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene* **37**, 4094-4109, doi:10.1038/s41388-018-0250-z (2018).
- 216 Wu, Q. *et al.* Long non-coding RNA CASC15 regulates gastric cancer cell proliferation, migration and epithelial mesenchymal transition by targeting CDKN1A and ZEB1. *Mol Oncol* **12**, 799-813, doi:10.1002/1878-0261.12187 (2018).
- 217 Hu, Y. *et al.* Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer. *Cancer Res* **74**, 6890-6902, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0686 (2014).
- 218 Xu, Q. *et al.* Long non-coding RNA regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Cell Death Dis* **7**, e2254, doi:10.1038/cddis.2016.149 (2016).
- 219 Xie, H., Ma, H. & Zhou, D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* **2013**, 136106, doi:10.1155/2013/136106 (2013).
- 220 Matouk, I. J. *et al.* Highly upregulated in liver cancer noncoding RNA is overexpressed in hepatic colorectal metastasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **21**, 688-692, doi:10.1097/meg.0b013e328306a3a2 (2009).
- 221 Zhao, Y. *et al.* Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical and in vitro investigation. *Oncol Rep* **31**, 358-364, doi:10.3892/or.2013.2850 (2014).
- 222 Yu, X., Zheng, H., Chan, M. T. & Wu, W. K. HULC: an oncogenic long non-coding RNA in human cancer. *J Cell Mol Med* **21**, 410-417, doi:10.1111/jcmm.12956 (2017).
- 223 Jin, C. *et al.* Long non-coding RNA HULC as a novel serum biomarker for diagnosis and prognosis prediction of gastric cancer. *Oncotarget* **7**, 51763-51772, doi:10.18632/oncotarget.10107 (2016).
- 224 Huang, T. & Deng, C. X. Current Progresses of Exosomes as Cancer Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Int J Biol Sci* **15**, 1-11, doi:10.7150/ijbs.27796 (2019).
- 225 Xu, R. *et al.* Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 617-638, doi:10.1038/s41571-018-0036-9 (2018).
- 226 Kosaka, N. *et al.* Exploiting the message from cancer: the diagnostic value of extracellular vesicles for clinical applications. *Exp Mol Med* **51**, 31, doi:10.1038/s12276-019-0219-1 (2019).
- 227 Zhao, W., Liu, Y., Zhang, C. & Duan, C. Multiple Roles of Exosomal Long Noncoding RNAs in Cancers. *Biomed Res Int* **2019**, 1460572, doi:10.1155/2019/1460572 (2019).
- 228 Huang, X. *et al.* Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* **14**, 319, doi:10.1186/1471-2164-14-319 (2013).
- 229 Liu, X. H. *et al.* lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. *Mol Cancer* **13**, 92, doi:10.1186/1476-4598-13-92 (2014).

- 230 Zhao, R. *et al.* Exosomal long noncoding RNA HOTTIP as potential novel diagnostic and prognostic biomarker test for gastric cancer. *Mol Cancer* **17**, 68, doi:10.1186/s12943-018-0817-x (2018).
- 231 Li, Q. *et al.* Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer. *Tumour Biol* **36**, 2007-2012, doi:10.1007/s13277-014-2807-y (2015).
- 232 Pan, L. *et al.* Exosomes-mediated transfer of long noncoding RNA ZFAS1 promotes gastric cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* **143**, 991-1004, doi:10.1007/s00432-017-2361-2 (2017).
- 233 Pang, Q. *et al.* Increased expression of long intergenic non-coding RNA LINC00152 in gastric cancer and its clinical significance. *Tumour Biol* **35**, 5441-5447, doi:10.1007/s13277-014-1709-3 (2014).
- 234 Shao, Y. *et al.* Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer. *Cancer* **120**, 3320-3328, doi:10.1002/cncr.28882 (2014).
- 235 Vitiello, M., Tuccoli, A. & Polisenio, L. Long non-coding RNAs in cancer: implications for personalized therapy. *Cell Oncol (Dordr)* **38**, 17-28, doi:10.1007/s13402-014-0180-x (2015).
- 236 Ling, H., Fabbri, M. & Calin, G. A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 847-865, doi:10.1038/nrd4140 (2013).
- 237 Zhuo, W. *et al.* Long Noncoding RNA GMAN, Up-regulated in Gastric Cancer Tissues, Is Associated With Metastasis in Patients and Promotes Translation of Ephrin A1 by Competitively Binding GMAN-AS. *Gastroenterology* **156**, 676-691 e611, doi:10.1053/j.gastro.2018.10.054 (2019).
- 238 Beauchamp, A. & Debinski, W. Ephs and ephrins in cancer: ephrin-A1 signalling. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 109-115, doi:10.1016/j.semcdb.2011.10.019 (2012).
- 239 Gong, P. *et al.* lncRNA UCA1 promotes tumor metastasis by inducing miR-203/ZEB2 axis in gastric cancer. *Cell Death Dis* **9**, 1158, doi:10.1038/s41419-018-1170-0 (2018).
- 240 Zou, Z. *et al.* Long intergenic non-coding RNA 00324 promotes gastric cancer cell proliferation via binding with HuR and stabilizing FAM83B expression. *Cell Death Dis* **9**, 717, doi:10.1038/s41419-018-0758-8 (2018).
- 241 Liu, H. *et al.* Long Non-coding RNA LINC00941 as a Potential Biomarker Promotes the Proliferation and Metastasis of Gastric Cancer. *Front Genet* **10**, 5, doi:10.3389/fgene.2019.00005 (2019).
- 242 Lin, M. T., Song, H. J. & Ding, X. Y. Long non-coding RNAs involved in metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* **24**, 3724-3737, doi:10.3748/wjg.v24.i33.3724 (2018).
- 243 Tian, X. *et al.* Differentially Expressed lncRNAs in Gastric Cancer Patients: A Potential Biomarker for Gastric Cancer Prognosis. *J Cancer* **8**, 2575-2586, doi:10.7150/jca.19980 (2017).
- 244 Xuan, Y. & Wang, Y. Long non-coding RNA SNHG3 promotes progression of gastric cancer by regulating neighboring MED18 gene methylation. *Cell Death Dis* **10**, 694, doi:10.1038/s41419-019-1940-3 (2019).
- 245 Qi, D., Wang, Q., Wu, M. & Zhang, X. Comprehensive bioinformatics analysis of lncRNAs in gastric cancer. *Oncol Lett* **17**, 1279-1291, doi:10.3892/ol.2018.9707 (2019).
- 246 Zhang, Y. *et al.* Comprehensive analysis of the regulatory network of differentially expressed mRNAs, lncRNAs and circRNAs in gastric cancer. *Biomed Pharmacother* **122**, 109686, doi:10.1016/j.biopha.2019.109686 (2019).
- 247 Bass, A. J. *et al.* SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet* **41**, 1238-1242, doi:10.1038/ng.465 (2009).

- 248 Junttila, M. R. & de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**, 346-354, doi:10.1038/nature12626 (2013).
- 249 Yuan, Y. Spatial Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a026583 (2016).
- 250 Runa, F. *et al.* Tumor microenvironment heterogeneity: challenges and opportunities. *Curr Mol Biol Rep* **3**, 218-229, doi:10.1007/s40610-017-0073-7 (2017).
- 251 Bell, S. M. *et al.* Kruppel-like factor 5 controls villus formation and initiation of cytodifferentiation in the embryonic intestinal epithelium. *Dev Biol* **375**, 128-139, doi:10.1016/j.ydbio.2012.12.010 (2013).
- 252 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* **26**, 2179-2193, doi:10.1038/s41418-018-0236-y (2019).
- 253 Tang, J. *et al.* LncRNA PVT1 regulates triple-negative breast cancer through KLF5/beta-catenin signaling. *Oncogene* **37**, 4723-4734, doi:10.1038/s41388-018-0310-4 (2018).
- 254 Jia, X. *et al.* KLF5 regulated lncRNA RP1 promotes the growth and metastasis of breast cancer via repressing p27kip1 translation. *Cell Death Dis* **10**, 373, doi:10.1038/s41419-019-1566-5 (2019).
- 255 Siggia, E. D. & Warmflash, A. Modeling Mammalian Gastrulation With Embryonic Stem Cells. *Curr Top Dev Biol* **129**, 1-23, doi:10.1016/bs.ctdb.2018.03.001 (2018).
- 256 Sharon, N., Mor, I., Golan-lev, T., Fainsod, A. & Benvenisty, N. Molecular and functional characterizations of gastrula organizer cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **29**, 600-608, doi:10.1002/stem.621 (2011).
- 257 McLin, V. A., Henning, S. J. & Jamrich, M. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **136**, 2074-2091, doi:10.1053/j.gastro.2009.03.001 (2009).
- 258 Zorn, A. M. & Wells, J. M. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 221-251, doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113344 (2009).
- 259 Grapin-Botton, A. & Melton, D. A. Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* **16**, 124-130, doi:10.1016/s0168-9525(99)01957-5 (2000).
- 260 Shih, H. P. *et al.* A Gene Regulatory Network Cooperatively Controlled by Pdx1 and Sox9 Governs Lineage Allocation of Foregut Progenitor Cells. *Cell Rep* **13**, 326-336, doi:10.1016/j.celrep.2015.08.082 (2015).
- 261 Nomura, S. *et al.* Evidence for repatterning of the gastric fundic epithelium associated with Menetrier's disease and TGFalpha overexpression. *Gastroenterology* **128**, 1292-1305, doi:10.1053/j.gastro.2005.03.019 (2005).
- 262 Sakai, H. *et al.* PDX1 homeobox protein expression in pseudopyloric glands and gastric carcinomas. *Gut* **53**, 323-330, doi:10.1136/gut.2003.026609 (2004).
- 263 Raghoebir, L. *et al.* SOX2 redirects the developmental fate of the intestinal epithelium toward a premature gastric phenotype. *J Mol Cell Biol* **4**, 377-385, doi:10.1093/jmcb/mjs030 (2012).
- 264 Gao, N., White, P. & Kaestner, K. H. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* **16**, 588-599, doi:10.1016/j.devcel.2009.02.010 (2009).
- 265 Holtzinger, A. & Evans, T. Gata4 regulates the formation of multiple organs. *Development* **132**, 4005-4014, doi:10.1242/dev.01978 (2005).
- 266 Jacobsen, C. M. *et al.* Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium. *Dev Biol* **241**, 34-46, doi:10.1006/dbio.2001.0424 (2002).

- 267 Smith, D. M., Nielsen, C., Tabin, C. J. & Roberts, D. J. Roles of BMP signaling and Nkx2.5 in patterning at the chick midgut-foregut boundary. *Development* **127**, 3671-3681 (2000).
- 268 Ramalho-Santos, M., Melton, D. A. & McMahon, A. P. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* **127**, 2763-2772 (2000).
- 269 Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* **19**, 1129-1155, doi:10.1101/gad.1303605 (2005).
- 270 Lin, S. C., Wani, M. A., Whitsett, J. A. & Wells, J. M. Klf5 regulates lineage formation in the pre-implantation mouse embryo. *Development* **137**, 3953-3963, doi:10.1242/dev.054775 (2010).
- 271 Jiang, J. *et al.* A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **10**, 353-360, doi:10.1038/ncb1698 (2008).
- 272 Kwak, M. K. *et al.* Expression of Kruppel-like factor 5 in human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**, 163-167, doi:10.1007/s00432-007-0265-2 (2008).
- 273 McConnell, B. B. *et al.* Kruppel-like factor 5 is important for maintenance of crypt architecture and barrier function in mouse intestine. *Gastroenterology* **141**, 1302-1313, 1313 e1301-1306, doi:10.1053/j.gastro.2011.06.086 (2011).
- 274 Zhang, X. *et al.* Somatic Superenhancer Duplications and Hotspot Mutations Lead to Oncogenic Activation of the KLF5 Transcription Factor. *Cancer Discov* **8**, 108-125, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0532 (2018).
- 275 Dulak, A. M. *et al.* Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res* **72**, 4383-4393, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3893 (2012).
- 276 Garraway, L. A. *et al.* "Lineage addiction" in human cancer: lessons from integrated genomics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**, 25-34, doi:10.1101/sqb.2005.70.016 (2005).
- 277 Compere, S. J. *et al.* The ras and myc oncogenes cooperate in tumor induction in many tissues when introduced into midgestation mouse embryos by retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2224-2228, doi:10.1073/pnas.86.7.2224 (1989).
- 278 Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science* **297**, 63-64, doi:10.1126/science.1073096 (2002).
- 279 Weinstein, I. B. & Joe, A. Oncogene addiction. *Cancer Res* **68**, 3077-3080; discussion 3080, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3293 (2008).
- 280 Garraway, L. A. & Sellers, W. R. From integrated genomics to tumor lineage dependency. *Cancer Res* **66**, 2506-2508, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4604 (2006).
- 281 Garraway, L. A. & Sellers, W. R. Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 593-602, doi:10.1038/nrc1947 (2006).
- 282 Torti, D. & Trusolino, L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol Med* **3**, 623-636, doi:10.1002/emmm.201100176 (2011).
- 283 Dupin, E. & Le Douarin, N. M. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* **22**, 3016-3023, doi:10.1038/sj.onc.1206460 (2003).
- 284 Widlund, H. R. & Fisher, D. E. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* **22**, 3035-3041, doi:10.1038/sj.onc.1206443 (2003).
- 285 Goding, C. R. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* **14**, 1712-1728 (2000).

- 286 Du, J. *et al.* Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* **6**, 565-576, doi:10.1016/j.ccr.2004.10.014 (2004).
- 287 McGill, G. G. *et al.* Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**, 707-718, doi:10.1016/s0092-8674(02)00762-6 (2002).