

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Μελέτη lncRNA που συμμετέχουν στον μεταπλαστικό μετασχηματισμό καρκινικών κυττάρων

Study of lncRNAs that participate in the metaplastic transformation of cancer cells

Τσουλούφη Δέσποινα του Κωνσταντίνου

Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος
Μέλη τριμελούς επιτροπής: Γιακουντής Αντώνιος
Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος
Σίμος Γεώργιος

Λάρισα 2021

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

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

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

Σίμος Γεώργιος: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί έναν από τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου σε όλο τον κόσμο που οδηγεί στον θάνατο χιλιάδες ανθρώπους ετησίως. Η διάγνωση του καρκίνου αυτού γίνεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο καθώς τα συμπτώματα του αργούν να εμφανιστούν. Αυτός είναι και ο λόγος της υψηλής θνησιμότητας που παρουσιάζει καθώς οι θεραπευτικές επιλογές στα στάδια αυτά είναι πολύ περιορισμένες. Είναι, λοιπόν, χρήσιμη η εύρεση κατάλληλων διαγνωστικών δεικτών αλλά και θεραπευτικών στόχων προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου στα αρχικά στάδια εμφάνισης του αλλά και η κατάλληλη θεραπευτική του στόχευση. Σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας που συμμετέχει στην ανάπτυξη των προκαρκινικών αλλοιώσεων και κατ' επέκταση στην εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου είναι ο CDX2. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας παρόλο που δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό στόμαχο παρουσιάζει εκτροπή έκφραση στον στόμαχο των ασθενών με εντερική μεταπλασία. Ακόμη, ο HNF4-α δημιουργεί σύμπλοκο με τον CDX2 και έτσι ρυθμίζουν την ανάπτυξη του εντέρου. Και αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας απουσιάζει από τον φυσιολογικό στόμαχο και παρουσιάζει έκφραση στην εντερική μεταπλασία συμβάλλοντας στην εντερική μετατροπή του γαστρικού βλεννογόνου. Οι δυο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν μεταξύ άλλων την έκφραση των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs, cRENA1 και cRENA2. Τα μη κωδικοποιητικά RNAs αποτελούν υποσχόμενους διαγνωστικούς και θεραπευτικούς στόχους καθώς η έκφραση τους παρουσιάζεται εξειδικευμένη ως προς τον τύπο του καρκίνου και έχει συσχετιστεί με την πρόοδο και την επιθετικότητα του. Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs, cRENA1 και cRENA2, τα οποία ρυθμίζονται από το σύμπλοκο CDX2/HNF4-α. Έτσι, με τη χρήση δεδομένων από RNAseq μελετήθηκε η έκφραση τους σε καρκινικούς ιστούς, σε ιστούς ασθενών με προκαρκινικές αλλοιώσεις, στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου αλλά και σε εξωσώματα. Επιπλέον, έγινε μελέτη των ιδιοτήτων των μη κωδικοποιητικών αυτών RNAs, όπως η υποκυτταρική τους τοποθέτηση και ο χρόνος ημιζωής τους. Η έκφραση τους παρατηρήθηκε να είναι αυξημένη από τα αρχικά κιάλας στάδια του γαστρικού καρκίνου καθιστώντας τα υποσχόμενους διαγνωστικούς αλλά και θεραπευτικούς δείκτες. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των cRENA1 και cRENA2 στον γαστρικό καρκίνο πρέπει να ερευνηθεί μελλοντικά. Επιπλέον, πρέπει να μελετηθεί και ο τρόπος με τον οποίο η καταστολή της έκφρασης τους θα επηρεάσει την ανάπτυξη των γαστρικών καρκινικών κυττάρων.

Abstract

Gastric cancer is one of the most frequent types of cancer all over the world that leads thousands of people to death annually. The diagnosis of this cancer is usually done at a late stage as its symptoms appear late. This is, also, the reason of high mortality that it presents because the treatment choices at these stages are very limited. So, it is useful to find the proper diagnostic markers but, also, its proper treatment targets. An important transcription factor that participates in the development of precancerous alteration and subsequently, in the appearance of gastric cancer is CDX2. This transcription factor is not expressed in the normal stomach, it presents aberrant expression in the stomach of the patients with intestinal metaplasia. Furthermore, HNF4- α creates a complex with CDX2 and, thus, they control the intestinal development. This transcription factor is absent from the normal stomach too and presents an expression in the intestinal metaplasia contributing to the intestinal transformation of the gastric mucosa. These two transcription factors can influence, among other, the expression of long non-coding RNAs, cRENA1 and cRENA2. Long non-coding RNAs are promising diagnostic and treatment targets as their expression is specialized to the type of cancer and is related to its progress and its aggression. The purpose of this specific diplomatic project was the study of long non-coding RNAs, cRENA1 and cRENA2, which are controlled by the complex CDX2/ HNF4- α . So, with the use of RNAseq data, their expression to cancer tissues, to patients' tissues with precancerous alterations was studied as well as at various stages of gastric cancer and at exosomes. Moreover, a study of the qualities of these non-coding RNAs was conducted such as their subcellular placement and their half-life. Their expression was noticed to be increased from the initial stages of the gastric cancer marking them as promising diagnostic and treatment targets. However, the exact role of cRENA1 and cRENA2 in the gastric cancer must be studied in the future. Furthermore, the way in which the repression of their expression will influence the development of gastric cancer cells must be studied, as well.

1.Εισαγωγή.....	6
1.1.Γαστρικός καρκίνος	6
1.1.1.Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου	6
1.1.2.Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου	7
1.1.3.Υπότυποι με βάση την ανατομική ταξινόμηση	7
1.1.4.Ιστολογική ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου	8
1.1.5.Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου	9
1.1.6.Πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου	11
1.2.Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2.....	12
1.2.1. Ο ρόλος του CDX2 στην καρκινογένεση.....	13
1.2.2.Το CDX2 στην εντερική μεταπλασία και στον γαστρικό καρκίνο	14
1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4-α	15
1.3.1.Ο HNF4-α στον καρκίνο.....	15
1.3.2.Ο HNF4-α στον γαστρικό καρκίνο και στην εντερική μεταπλασία	17
1.4.Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs)	18
1.4.1.Χαρακτηριστικά των lncRNAs.....	19
1.4.2.Τα lncRNAs στον καρκίνο	21
1.4.3.Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNAs	22
1.4.4.Η δράση των lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες.....	23
1.4.5.Η χρήση των lncRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι	24
1.5. Σκοπός της εργασίας	25
2.Υλικά και Μέθοδοι	26
2.1Βιοπληροφορικές αναλύσεις	26
2.1.1.Κατασκευή διαγραμμάτων box-plot και βιοστατιστική ανάλυση	26
2.1.2.Κατασκευή διαγράμματος GEPIA.....	26
2.2.Πειραματικό μέρος	26
2.2.1. Απομόνωση RNA από κυτταρικές σειρές.....	26
2.2.2. Επεξεργασία με DNAάση	27
2.2.3. Σύνθεση cDNA	27
2.2.4. qPCR.....	27
2.2.1. Πέψη πλασμιδιακού φορέα pLL3 για τη δημιουργία θέσης ενσωμάτωσης του ενθέματος.....	28
2.2.1.Υβριδισμός αντιπαράλληλων αλληλουχιών και κλωνοποίηση σε φορέα pLL3	29
2.2.2.Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων (transformation).....	30
2.2.3.Απομόνωση καλλιιεργειών	30
2.2.4.Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini preps)	30

2.2.5. PCR και ηλεκτροφόρηση	31
3. Αποτελέσματα-Σχολιασμός αποτελεσμάτων.....	32
3.1. Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης	32
3.1.1. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των cRENA1 και cRENA2	32
3.1.2. Διαγράμματα με τη χρήση της βάσης δεδομένων GEPIA.....	37
3.2. Πειραματικά αποτελέσματα	39
3.2.1. Έκφραση των cRENA1 και cRENA2 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	39
3.2.2. Κλωνοποίηση shRNA για την στόχευση των cRENA1 και cRENA2.....	42
4. Συμπεράσματα – Συζήτηση	43
5. Βιβλιογραφία.....	47

1.Εισαγωγή

1.1.Γαστρικός καρκίνος

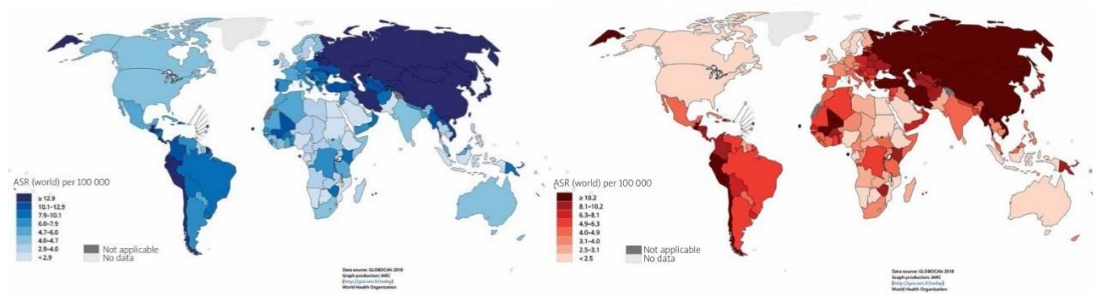
Μέχρι τα μέσα του 1990 ο γαστρικός καρκίνος αποτελούσε την πιο κοινή αιτία θανάτου λόγω καρκίνου [2]. Σήμερα, ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί τον πέμπτο πιο συχνό τύπο καρκίνου παγκοσμίως (1.000.000 νέες διαγνώσεις ανά χρόνο το 2018) και παραμένει η τρίτη πιο κοινή αιτία που προκαλεί θάνατο σχετιζόμενο με καρκίνο σε όλο τον κόσμο (738.000 θάνατοι ετησίως)[3]. Όταν διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, είναι συνήθως μη θεραπεύσιμος. Η συχνότητα διάγνωσης γαστρικού καρκίνου μειώνεται τις τελευταίες δεκαετίες. Ωστόσο πρόκειται για περιπτώσεις σποραδικού τύπου καρκίνου που εμφανίζονται κυρίως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, ενώ δεν παρατηρείται αλλαγή στη συχνότητα γαστρικού καρκίνου όσον αφορά άτομα νεαρότερης ηλικίας ή άτομα με κληρονομικό ιστορικό[4].

1.1.1.Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου

Η συχνότητα του γαστρικού καρκίνου παρουσιάζει διαφορές ως προς τη γεωγραφική της κατανομή, με περισσότερο από 50% των νέων περιπτώσεων να εντοπίζονται στις αναπτυσσόμενες χώρες [5]. Η συχνότητα είναι δυο φορές μεγαλύτερη στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες. Στους άντρες ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί τη συχνότερη αιτία καρκινικού θανάτου σε αρκετές χώρες της Δυτικής Ασίας, όπως το Ιράν, το Τουρκμενιστάν και το Κιργιστάν [3].

Στις περιοχές αυξημένης συχνότητας γαστρικού καρκίνου ανήκουν η Κεντρική και Νότια Αμερική, η Ανατολική Ευρώπη και η Ανατολική Ασία (Κίνα, Ιαπωνία, Κορέα) [6]. Ενώ μειωμένη συχνότητα της ασθένειας παρατηρείται στην Βόρεια Αμερική και στη Βόρεια Ευρώπη [3]. Η Δημοκρατία της Κορέας έχει τον μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών με σχεδόν 60 στις 100.000 νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο στους άντρες [7].

Η θνησιμότητα, λόγω αυτού του καρκίνου, είναι υψηλότερη στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες. Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι υψηλά στην Ανατολική και Κεντρική Ασία και τη Λατινική Αμερική, συμπίπτοντας με τις περιοχές που εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα της νόσου [7]. Για τους άντρες, ο γαστρικός καρκίνος είναι η κυρία αιτία θανάτου προκαλούμενου από καρκίνο σε 10 χώρες παγκοσμίως, και συγκεκριμένα σε χώρες τις Ανατολικής και Κεντρικής Ασίας [3].



Εικόνα 1. Αριστερά: Ποσοστά εκδήλωσης γαστρικού καρκίνου το 2018, σε όλες τις ηλικίες και στα δύο φύλα, παγκοσμίως. Δεξιά: Ποσοστά θνησιμότητας λόγω γαστρικού καρκίνου το 2018, σε όλες τις ηλικίες και στα δύο φύλα, παγκοσμίως. [<https://gco.iarc.fr>]

1.1.2. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου

Αρκετοί παράγοντες κινδύνου έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου. Σε αυτούς περιλαμβάνονται το κάπνισμα, το αλκοόλ, η διατροφή καθώς και η παχυσαρκία. Σύμφωνα με αναλύσεις στο European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), ο κίνδυνος εμφάνισης γαστρικού καρκίνου ήταν αυξημένος κατά 45% στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές [8]. Όσον αφορά το αλκοόλ, η αυξημένη κατανάλωσή του σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου ενώ η μέτρια δεν παρουσιάζει κάποια συσχέτιση [9]. Επιπλέον, υπάρχουν τεκμηριωμένα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακού γαστρικού καρκίνου, αλλά δεν σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου συνολικά ή μη καρδιακού τύπου ξεχωριστά [10]. Επιπλέον, η διατροφή μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο τόσο στην πρόληψη όσο και στην πρόκληση του γαστρικού καρκίνου. Αρκετά χαρακτηριστικά της μεσογειακής διατροφής, όπως η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και η χαμηλή κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος, συνδέονται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου [9].

Το *Helicobacter pylori* είναι ο πιο ισχυρός παράγοντας κινδύνου για το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Η ικανότητά του να προκαλεί γαστρίτιδα υποδεικνύει ότι εμπλέκεται στην έναρξη και την προώθηση της γαστρικής νεοπλασίας. Το *H. pylori* παρουσιάζει έναν αριθμό άμεσων επιδράσεων στους επιθηλιακούς ιστούς του ξενιστή που μπορούν να επηρεάσουν την ογκογένεση. Αυτές περιλαμβάνουν την επαγωγή πολλαπλασιασμού, την φλεγμονώδη απόκριση καθώς και την απόπτωση [11]. Ο κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας σε άτομα που έχουν μολυνθεί από το βακτήριο αυτό επηρεάζεται από τη μολυσματικότητα του στελέχους *H. pylori* και από έναν συνδυασμό παραγόντων που σχετίζονται με τον ξενιστή, όπως γενετικοί πολυμορφισμοί αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα. Το *H. pylori* παράγει πολλούς μολυσματικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του cytotoxin-associated gene A (CagA) και της vacuolating cytotoxin (VacA), οι οποίες σχετίζονται με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου [12]. Έτσι, τα στελέχη cagA+ του *H. pylori* αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου σε αντίθεση με τα στελέχη cagA-. Επιπλέον, τα στελέχη που παράγουν VacA είναι περισσότερο συχνά σε ασθενείς με γαστρική νεοπλασία [11].

Άλλοι βιοτικοί παράγοντες που επάγουν τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου περιλαμβάνουν τον ιό Epstein-Barr (EBV) που ανήκει στην οικογένεια των ανθρώπινων ερπητοϊών και παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία γαστρικού καρκίνου [5]. Οι αναλύσεις του EBV σε βιοψίες καρκινωμάτων υποδεικνύουν ότι το καρκίνωμα σχηματίζεται μέσω του πολλαπλασιασμού ενός μόνο κυττάρου που έχει μολυνθεί από τον EBV [13].

1.1.3. Υπότυποι με βάση την ανατομική ταξινόμηση

Το 95% των καρκίνων του στομάχου είναι αδενοκαρκινώματα, ακολουθούμενα από τα πρωτοπαθή γαστρικά λεμφώματα. Ανάλογα με την ανατομική τους θέση τα αδενοκαρκινώματα του γαστρικού καρκίνου εντοπίζονται στην γαστρική καρδιά και στον μη-καρδιακό γαστρικό καρκίνο [7]. Παρόλο που η συχνότητα καρκίνου του στομάχου μειώνεται σε αρκετές χώρες τα τελευταία 50 χρόνια, οι περιπτώσεις εμφάνισης του καρδιακού τύπου συνεχίζουν να αυξάνονται [14]. Ο γαστρικός καρκίνος στην καρδιά εντοπίζεται στο ανώτερο τμήμα του στομάχου που συνδέεται με τον οισοφάγο ενώ ο μη-καρδιακός στο μέσο τμήμα του στομάχου και σε πιο απομακρυσμένα τμήματα [14].

Όσον αφορά τον γαστρικό καρκίνο στην καρδία, η παθογένεσή του παραμένει ασαφής αλλά έχουν προταθεί δυο πιθανές αιτιολογίες. Η μια προτείνει τη συσχέτιση με τη γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και την ομοιότητα με το οισοφαγικό καρκίνωμα ενώ η άλλη προτείνει τη συσχέτιση με την ατροφική γαστρίτιδα που προκαλείται από το *H. pylori* και την ομοιότητα με τον μη καρδιακό γαστρικό καρκίνο [7]. Το *H. pylori* συμβάλλει στην ανάπτυξη του γαστρικού όγκου προωθώντας τη φλεγμονή του γαστρικού βλεννογόνου, φαινόμενο γνωστό ως γαστρίτιδα, η οποία με τη σειρά της προκαλεί ιστοπαθολογικές αλλαγές που μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία του γαστρικού καρκίνου [15]. Ο γαστρικός καρκίνος στην καρδία εμφανίζεται κυρίως στους Καυκάσιους. Τα αδενοκαρκινώματα αυτά είναι, επίσης, επιθετικά και συνοδεύονται από κακή πρόγνωση [16].

Ο μη-καρδιακός γαστρικός καρκίνος προκαλείται από τη χρόνια γαστρίτιδα, τη φλεγμονή δηλαδή της εσωτερικής στοιβάδας του στομάχου, η οποία μπορεί να δημιουργηθεί από ένα πλήθος περιβαλλοντικών παραγόντων [7]. Αυτός ο τύπος γαστρικού καρκίνου είναι πιο πιθανό να σχετίζεται με μόλυνση από το *H. pylori* και αποτελεί περισσότερο από το 60% όλων των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου παγκοσμίως [15].

1.1.4. Ιστολογική ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Το σύστημα ταξινόμησης κατά Lauren [17], που είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα ταξινόμησης του γαστρικού καρκίνου, διαχωρίζει τα αδενοκαρκινώματα σε εντερικό (με διακυτταρικές συνδέσεις) και διάχυτο υπότυπο (χωρίς διακυτταρικές συνδέσεις) [15]. Η ταξινόμηση αυτή έγινε με βάση τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν στους γαστρικούς όγκους [18]. Τα εντερικά αδενοκαρκινώματα επικρατούν στις περιοχές υψηλού κινδύνου ενώ τα διάχυτα σε περιοχές χαμηλού κινδύνου [18]. Ο εντερικός υπότυπος γαστρικού καρκίνου εμφανίζεται 2 φορές περισσότερο στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες και σε άτομα ηλικίας 55 έως 80 ετών. Ο διάχυτος υπότυπος αδενοκαρκινώματος είναι πιο επιθετικός, λιγότερο συχνός και έχει χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τον εντερικό. Επιπλέον, σε αντίθεση με τον εντερικό υπότυπο δεν παρουσιάζει προτίμηση ως προς το φύλο και διαγιγνώσκεται σε νεαρότερους ασθενείς, 40 έως 60 ετών [15].

Οι δυο αυτοί υπότυποι παρουσιάζουν διαφορετικά μοριακά προφίλ και διαφορετικά μονοπάτια σχηματισμού [19]. Ο εντερικός υπότυπος γαστρικού καρκίνου συνήθως προκύπτει μέσω μιας προκαρκινικής γαστρικής αλλαγής όπως η ατροφική γαστρίτιδα που ακολουθείται από εντερική μεταπλασία και δυσπλασία, που με τη σειρά της αναπτύσσεται σε ένα υπόβαθρο χρόνιας φλεγμονής που συνήθως προκαλείται από το *H. pylori* και έναν συνδυασμό περιβαλλοντικών παραγόντων [20]. Η εντερική μεταπλασία θεωρείται ως η μεταδιαφοροποίηση του βλεννογόνου σε έναν εντερικό φαινότυπο. Η διέγερση αυτής της μεταδιαφοροποίησης γίνεται μέσω της έκφρασης του CDX2, ενός εντερικού μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος συντηρεί την εντερική διαφοροποίηση τόσο στο αναπτυσσόμενο έντερο όσο και στις περιοχές όπου εκφράζεται εκτοπικά, κάνοντάς τον ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των εντερικών μεταπλασιών [21]. Αντίθετα, ο διάχυτος υπότυπος καρκίνου αναπτύσσεται συνήθως έπειτα από χρόνια φλεγμονή χωρίς τα ενδιάμεσα στάδια της ατροφικής γαστρίτιδας και της εντερικής μεταπλασίας [19].

Ο εντερικός υπότυπος αδενοκαρκινώματος χαρακτηρίζεται από κύτταρα που εμφανίζουν κυτταρική προσκόλληση και τα οποία δημιουργούν αδενικούς σχηματισμούς, ενώ στον

διάχυτο υπότυπο απουσιάζει η διακυτταρική επαφή μεταξύ των κυττάρων του όγκου και διεισδύουν στο στρώμα ως μεμονωμένα κύτταρα ή ως μικρές υποομάδες, δημιουργώντας έτσι έναν πληθυσμό μη συνεκτικών, διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων [22]. Τα γαστρικά καρκινώματα διάχυτου υπότυπου παρουσιάζουν συνήθως μικρότερη διαφοροποίηση, χαρακτηρίζονται από την απουσία αδενικών σχηματισμών και την περιστασιακή παρουσία κυττάρων του σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring cells) [23]. Ο εντερικός υπότυπος γαστρικού αδενοκαρκινώματος χαρακτηρίζεται από ιστολογία με καλή ως μέτρια διαφοροποίηση ενώ ο διάχυτος από φτωχά διαφοροποιημένη. Ωστόσο, δεν ανήκουν όλα τα φτωχά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα στον διάχυτο υπότυπο [23].

1.1.5.Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Η πιο περιεκτική μοριακή ανάλυση του καρκίνου αφορά την κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA), η οποία διακρίνει σε μοριακό επίπεδο τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα και προτείνει 4 υπότυπους [23]. Για την συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 6 γονιδιωματικές και μοριακές πλατφόρμες που παρείχαν πληροφορίες σχετικά με την αλληλούχηση του γονιδιώματος, τις μεταλλάξεις που αυτό φέρει καθώς και τις ενισχύσεις και τις απώλειες γονιδιακών αλληλουχιών υπό μορφή διπλασιασμών και ελλειμάτων. Επιπλέον, παρείχαν πληροφορίες για τις επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA, τα επίπεδα μεταγραφής σε κωδικοποιητικά και μη μετάγραφα αλλά και microRNA καθώς και για το σύνολο των πρωτεϊνών [24]. Επιπλέον, συλλέχθηκαν και κλινικές πληροφορίες για την παθολογία, την ιστολογία καθώς και άλλα χαρακτηριστικά του όγκου κάθε ασθενή. Το γεγονός ότι αυτοί οι υπότυποι διαφέρουν σε μοριακό επίπεδο υποδεικνύει ότι η μοριακή διεργασία που οδηγεί στην ογκογένεση μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ασθενών και για το λόγο αυτό η θεραπεία θα μπορούσε να καθοριστεί με βάση τον υπότυπο του γαστρικού καρκίνου που έχει ο κάθε ασθενής. [25].

Οι υπότυποι στους οποίους χωρίζονται τα αδενοκαρκινώματα με βάση αυτή την ταξινόμηση περιλαμβάνουν τους όγκους που είναι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (EBV) (9% των δειγμάτων), τους όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) (22%), τους γονιδιωματικά σταθερούς όγκους (GS) (20%) και εκείνους που παρουσιάζουν χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) (50%) [26].

α) Όγκοι θετικοί στον EBV

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) ανιχνεύεται στον ιστό περίπου του 10% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου σε ολόκληρο τον κόσμο. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν τον σημαντικό ρόλο που κατέχει ο EBV στους όγκους που είναι θετικοί σε αυτόν τον ιό [13].

Οι περισσότεροι όγκοι που είναι θετικοί στον EBV βρίσκονται στον γαστρικό θόλο ή στο σώμα (62%) και οι περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισής τους σημειώνονται σε άντρες (81%) [26]. Επιπλέον, οι γαστρικοί όγκοι που είναι θετικοί στον EBV είναι πιο συχνοί σε νεότερους ασθενείς σε σχέση με άτομα μεγαλύτερης ηλικίας [27].

Οι ασθενείς με γαστρικούς όγκους θετικούς στον EBV παρουσιάζουν περισσότερες αλλαγές στα μονοπάτια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, κάτι το οποίο μπορεί να σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση σε αυτούς τους ασθενείς. Σύμφωνα με το TCGA, το γονίδιο Programmed death-ligand 1 (PD-L1) ήταν συχνά ενισχυμένο σε όγκους θετικούς στον ιό αυτό [27]. Η ενισχυμένη έκφραση του PD-L1 αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο με το οποίο οι όγκοι που είναι θετικοί στο EBV μπορούν να ξεφεύγουν από την επίθεση του ανοσοποιητικού [28].

Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης με το συν-ανασταλτικό μόριο programmed death receptor-1 (PD-1) που εκφράζεται από τα T λεμφοκύτταρα [29].

Επιπλέον υπήρχαν μεταλλάξεις της ισομορφής A της καταλυτικής υπομονάδας της Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase (PIK3CA) η οποία εμπλέκεται στο μονοπάτι σηματοδότησης PI3K-Akt [30], συνοδευόμενη από υπερμεθυλίωση του DNA και μεταλλάξεις του JAK2. Εκτός από αυτές τις μεταλλάξεις, οι όγκοι που ήταν θετικοί στον EBV είχαν συχνά μεταλλάξεις στο ARID1A (AT-Rich Interaction Domain 1A) (55%) το οποίο αποτελεί μέρος του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο [31] και στο BCOR (BCL6 Corepressor)(23%) το οποίο κωδικοποιεί μια αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη [27]. Η μεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι μια ακόμα βασική ανωμαλία που παρατηρείται στους γαστρικούς όγκους που είναι θετικοί στον EBV. Στα κύτταρα αυτών των όγκων παρατηρείται μεθυλίωση των CpG νησίδων στους υποκινητές πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την ογκογένεση, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο του γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Η μεθυλίωση αρκετών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (πχ. APC, PTEN, and RASSF1A) και γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (πχ. THBS1 and E-cadherin) ήταν συχνότερη στους όγκους που είναι θετικοί στον EBV σε σχέση με όγκους αρνητικούς σε αυτόν τον ιό [32].

β) Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI)

Οι όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια διαγιγνώσκονται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, με μέσο όρο εμφάνισής τους τα 72 έτη. Η συχνότητα εμφάνισής τους είναι μεγαλύτερη στις γυναίκες (56%) σε σχέση με τους άντρες [26]. Οι γαστρικοί όγκοι που παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια συνήθως σχετίζονται με τον εντερικό ιστολογικό τύπο και συναντώνται στο απομακρυσμένο τμήμα του στομάχου [27].

Η μικροδορυφορική αστάθεια στον καρκίνο σχετίζεται με επέκταση ή σμίκρυνση των μικροδορυφόρων και οφείλεται στη δυσλειτουργία των ενζύμων DNA mismatch repair (MMR) που προκαλείται από μεταλλάξεις (μεταλλάξεις στην κωδική αλληλουχία, μεθυλίωση του υποκινητή, χρωμοσωμικές ανακατατάξεις). Το σύστημα MMR (hMLH1, hMSH2, hMSH6, και hPMS2), είναι υπεύθυνο για την διασφάλιση της σωστής αντιγραφής του DNA. Τα ετεροδιμερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα hMSH2/hMSH6 και hMSH2/hMSH3 είναι υπεύθυνα για την αρχική ανίχνευση των λαθών της αντιγραφής και το σύμπλοκο hMLH1/hPMS2 αφαιρεί το αταίριαστο νουκλεοτίδιο και επιτρέπει την επανασύνθεση του DNA. [33, 34]. Μεταλλάξεις των γονιδίων hMLH1 και hMSH2 είναι σχετικά σπάνιες και παρατηρούνται στο 15% και 12% αντίστοιχα στους MSI γαστρικούς όγκους. Ωστόσο, η σίγηση του hMLH1, λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του, είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη της πλειονότητας, περισσότερων από 50%, των γαστρικών καρκίνων που εμφανίζουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Επιπλέον, όγκοι MSI παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης hMLH1 και/ή της hMSH2, η οποία μπορεί να συμβαίνει μέσω εναλλακτικών γενετικών ή επιγενετικών τροποποιήσεων [35].

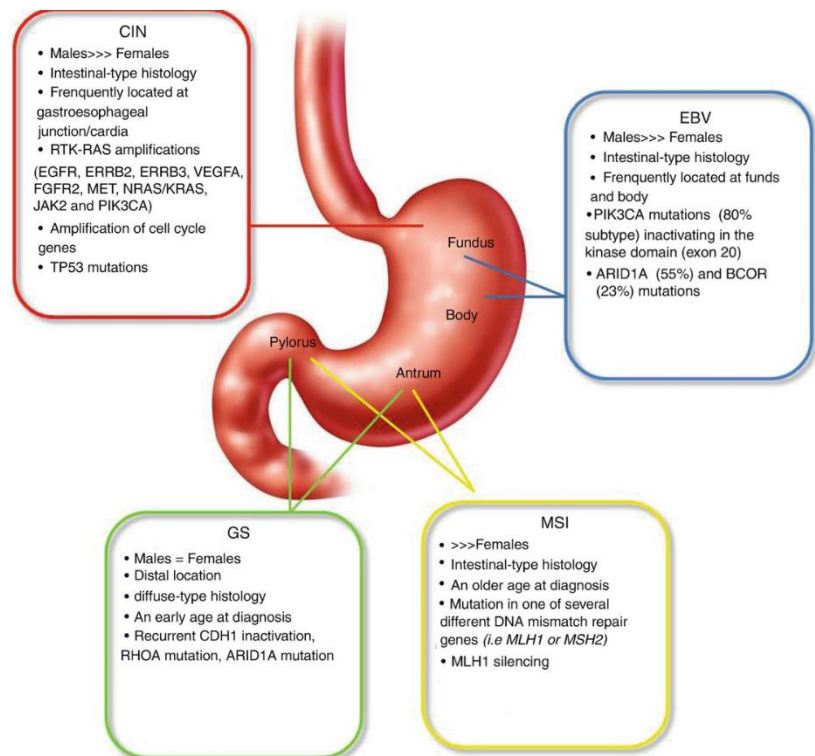
Η απώλεια λειτουργίας των πρωτεϊνών του MMR συμπλόκου οδηγεί σε έναν υπερ-μεταλλαγμένο φαινότυπο με μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια-κλειδιά. Μεταλλάξεις σε γονίδια υπεύθυνα για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (πχ. TGFβ RII, IGFIR, TCF4, RIZ, BAX, CASPASE5, FAS, BCL10 και APAF1) ή για τη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας (πχ hMSH6, hMSH3, MED1, RAD50, BLM, ATR, and MRE11) έχουν επίσης συσχετιστεί με τον γαστρικό καρκίνο με μικροδορυφορική αστάθεια [36].

γ) Γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι GS

Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι διαγιγνώσκονται σε νεαρότερες ηλικίες, με μέσο όρο τα 59 έτη και παρατηρούνται με την ίδια συχνότητα και στους άντρες και στις γυναίκες [26]. Οι όγκοι αυτού του υπότυπου ανήκουν κυρίως ιστολογικά στον διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου. Το 25% των καρκίνων αυτών εμφανίζεται στο άντρο, περίπου το 20% στη γαστροοισοφαγική σύνδεση/ καρδία και περίπου το 15% στο γαστρικό σώμα/ θόλο. Οι πρωταρχικές σωματικές γονιδιωματικές αλλαγές που παρατηρούνται σε αυτόν τον υπότυπο όγκων σχετίζονται με το γονίδιο που κωδικοποιεί την Ε-καδερίνη (CDH1), το ARID1A και την Ras Homolog Family Member A (RHOA)[27, 37].

δ) Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN)

Οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια συνήθως εμφανίζονται στην γαστροοισοφαγική σύνδεση/ καρδία (65%) και παρουσιάζουν εντερική ιστολογία [27]. Σε αυτόν τον υπότυπο γαστρικού καρκίνου παρατηρούνται μεταλλάξεις του TP53 στο 71% των όγκων [26]. Επιπλέον, παρατηρείται ενίσχυση του ERBB2 (24%), του KRAS/NRAS (18%), του EGFR (10%), του ERBB3 (8%), του FGFR2 (8%), και του MET (8%). Επίσης, παρατηρείται αυξημένη συχνότητα ενίσχυσης των γονιδίων που κωδικοποιούν μεσολαβητές του κυτταρικού κύκλου όπως οι κυκλίνες E1, D1 (CCNE1, CCND1) και η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 6 (CDK6) [38]. Οι γαστρικοί όγκοι που παρουσιάζουν χρωμοσωμική αστάθεια χαρακτηρίζονται από σωματικές μεταλλάξεις, ιδιαίτερα σε περιοχές που ρυθμίζουν σημεία ελέγχου της μίτωσης και παρουσιάζουν τροποποίηση του αριθμού αντιγράφων του DNA καθώς και δομικές ανωμαλίες σε μερικές χρωμοσωμικές περιοχές [27].



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων υποτύπων γαστρικού καρκίνου με βάση τη μοριακή ταξινόμηση της κοινοπραξίας TCGA και των βασικών χαρακτηριστικών τους. [1]

1.1.6. Πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου

Τα τελευταία 50 χρόνια, ο βαθμός εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου μειώνεται σταθερά σε πολλά μέρη του πλανήτη. Αυτή η μείωση οφείλεται σε παράγοντες που σχετίζονται με τη χρήση τροφίμων που διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα φρέσκων φρούτων και λαχανικών και τη μείωση της χρήσης αλατιού ως μέσο διατήρησης του φαγητού. Άλλοι παράγοντες που πιθανώς σχετίζονται με τη μείωση της συχνότητας αυτού του τύπου καρκίνου είναι η ελάττωση της παρουσίας μολύνσεων από *H. pylori* σε πολλές χώρες παγκοσμίως και η απαγόρευση του καπνίσματος [39].

Η πρόληψη έναντι της νόσου στοχεύει στο να προλάβει την ασθένεια πριν αυτή συμβεί, μειώνοντας την έκθεση σε κινδύνους, αλλάζοντας τις ανθυγιεινές ή μη ασφαλείς συμπεριφορές και αυξάνοντας την ανθεκτικότητα στην ασθένεια. Συνιστώμενες αλλαγές του τρόπου ζωής περιλαμβάνουν τη μείωση της έκθεσης στον καπνό και τη διατήρηση ενός υγιούς σωματικού βάρους. [15]. Όσον αφορά τη διατροφή, η πρόσληψη φρέσκων φρούτων και λαχανικών μια ή περισσότερες μέρες την εβδομάδα μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου [40].

Τα κλινικά συμπτώματα του γαστρικού καρκίνου εμφανίζονται αργά κατά την εξέλιξη της ασθένειας και έτσι οι επιλογές για θεραπεία συχνά είναι περιορισμένες [19]. Ο κύριος τρόπος διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου είναι η ενδοσκόπηση. Το πρώτο βήμα της διάγνωσης του καρκίνου του στομάχου ενδοσκοπικά είναι η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός ύποπτων βλαβών. Η ανίχνευση τέτοιων βλαβών του γαστρικού βλεννογόνου κατά την εξέταση απαιτεί τη χρήση ανώτερων ενδοσκοπικών τεχνικών, οι οποίες έχουν μεγάλη εξειδίκευση και ακρίβεια [15]. Επίσης, είναι δυνατή η χρήση ειδικών βιοδεικτών οι οποίοι μπορούν να παρέχουν χρήσιμες προγνωστικές πληροφορίες σχετικά με το βάθος της διείσδυσης του όγκου και την παρουσία μεταστάσεων. Ωστόσο, οι βιοδείκτες αυτοί δεν αποτελούν σημαντικό εργαλείο για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου σε αρχικά επίπεδα καθώς δεν παρουσιάζουν αρκετή ευαισθησία και εξειδίκευση [41].

Η χειρουργική επέμβαση παίζει έναν βασικό ρόλο στη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου, με τον καταλληλότερο χρόνο εφαρμογής της όταν ο όγκος είναι πιο ευαίσθητος στη χημειοθεραπεία. Οι λαπαροσκοπικές και υποβοηθούμενες από ρομπότ γαστρεκτομές θεωρείται ότι παρέχουν θετικά κλινικά αποτελέσματα, ισοδύναμα με αυτά των περιπτώσεων ανοιχτής επέμβασης. Ο γαστρικός καρκίνος στα αρχικά του στάδια έχει μια επιθυμητή μακροχρόνια επιβίωση όταν αντιμετωπίζεται με χειρουργική εκτομή [42]. Τέλος, έχουν μελετηθεί και αρκετές στοχευμένες θεραπείες του γαστρικού καρκίνου. Το Trastuzumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (human epidermal growth factor receptor 2 – HER2) που αναστέλλει τη σηματοδότηση που μεσολαβείται από τον υποδοχέα αυτόν και έτσι προλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των HER2+ όγκων [43]. Το Ramucirumab, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον Υποδοχέα 2 του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), ο οποίος αποτελεί μέρος ενός σημαντικού μονοπατιού στον γαστρικό καρκίνο [15]. Αναστολή της ενεργοποίησης του υποδοχέα αυτού εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό που διεγείρεται από τον VEGF-A και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, και οδηγεί στη μειωμένη παρουσία αγγείων στον όγκο και σε μειωμένη ανάπτυξη [44].

1.2.Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2

Το CDX2 είναι ένα ομοιοτικό γονίδιο που παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του λεπτού και του παχέος εντέρου στα θηλαστικά και στη διαφοροποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, ενώ δεν εκφράζεται φυσιολογικά στο στόμαχο [45, 46]. Η CDX2 πρωτεΐνη δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος αυξάνει την έκφραση αρκετών γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με τα ώριμα εντερικά, επιθηλιακά κύτταρα [47].

Το CDX2 εμπλέκεται στις διεργασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της προσκόλλησης καθώς και της απόπτωσης, στο έντερο. Μέσα στο κύτταρο δρα επάγοντας τη διαφοροποίηση και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό, σε επίπεδο μεταγραφής. Διεγείρει τη διαφοροποίηση του εντερικού επιθηλίου μέσω της

ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων εξειδικευμένων για το έντερο όπως το MUC2, η σουκράση, η ισομαλτάση και η καρβονική ανυδράση [48]. Επίσης, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων αυξάνοντας την έκφραση του p21/WAF1/CIP1, ενός αναστολέα κυκλινεξεαρτώμενων κινασών (cdks), ο οποίος μπορεί να προσδεθεί και να αναστείλει το σύμπλοκο κυκλίνη G1/Cdk. Το αποτέλεσμα αυτής της πρόσδεσης είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 ως απόκριση σε βλάβη του DNA [49].

Τα ομοιοτικά γονίδια είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση της φυσιολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στον ποντικό το Cdx1 και το Cdx2 ομόλογα αποτελούν μέλη της οικογένειας ομοιοτικών γονιδίων που σχετίζονται με το caudal, με βάση την ομολογία που παρουσιάζει η αλληλουχία τους με το γονίδιο caudal της *Drosophila melanogaster*. *In vitro* και *in vivo* μελέτες του Cdx1 και του Cdx2 υποδεικνύουν ότι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι σημαντικοί για την αρχική διαφοροποίηση και την διατήρηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. [50]. Στον ποντικό το γονίδιο Cdx2 εκφράζεται εξωεμβρυϊκά 3,5 μέρες μετά τη γονιμοποίηση στο τροφοεξώδερμα και αργότερα εκφράζεται σε κάποιους ιστούς του πλακούντα με τροφοεξωδερμική προέλευση. Η εμβρυϊκή έκφραση αρχίζει 8,5 μέρες έπειτα από τη γονιμοποίηση στο οπίσθιο έντερο, την ουρά, το οπίσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα και στο παραξονικό μεσόδερμα προτού σχηματιστούν οι σωμίτες [51]. Στα μετέπειτα στάδια του εμβρύου και στον ενήλικο ποντικό, η έκφραση του Cdx2 περιορίζεται στο εντερικό επιθήλιο, όπου τα επίπεδα μεταγραφής διαφέρουν κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, με την έκφραση να είναι υψηλότερη στο εγγύς κόλον. [45]. Επιπλέον, αφού η έκφραση του είναι ιστοειδική και παρούσα από τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης μέχρι την ενηλικίωση του ποντικού, είναι πιθανό ότι ο Cdx2 παίζει ρόλο και στον καθορισμό αλλά και στη διατήρηση του φαινότυπου του εντερικού επιθελίου [52].

Το ομοιοπλαίσιο (homeobox) είναι μια υψηλά συντηρημένη αλληλουχία 180 bp, η οποία κωδικοποιεί ένα μοτίβο 60 αμινοξέων που ονομάζεται ομοιοτική-επικράτεια (homeodomain). Η επικράτεια αυτή έχει δομή έλικα-στροφή-έλικα και αποτελεί περιοχή πρόσδεσης σε συγκεκριμένη περιοχή του DNA μιας οικογένειας πρωτεϊνών που δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής [53]. Τα ομοιοτικά γονίδια είναι κύριοι ρυθμιστές (master regulator genes) της ανάπτυξης και λειτουργούν στην κορυφή των γενετικών ιεραρχιών που ρυθμίζουν τη μορφογένεση και την κυτταρική διαφοροποίηση στα ζώα. Η οικογένεια των ομοιοτικών γονιδίων των χορδωτών υποδιαιρείται σε δυο υποοικογένειες: α) Τα ομαδοποιημένα ομοιοτικά γονίδια που είναι γνωστά ως γονίδια Hox ή τάξη I των ομοιοτικών γονιδίων και β) Τα μη ομαδοποιημένα ή αποκλίνοντα ομοιοτικά γονίδια (τάξη II). Τα γονίδια της δεύτερης τάξης είναι διάσπαρτα στο γονιδίωμα και κατηγοριοποιούνται σε ομάδες με βάση τις ομοιότητες των αλληλουχιών τους [54].

1.2.1. Ο ρόλος του CDX2 στην καρκινογένεση

Τα ομοιοτικά γονίδια έχουν είτε ογκοκατασταλτικό ρόλο είτε προωθούν την ογκογένεση όταν εκφράζονται με ανώμαλο τρόπο σε ορισμένα όργανα. Τα ομοιοτικά γονίδια με ογκοεπαγωγικές ιδιότητες εκφράζονται φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή περίοδο και επανενεργοποιούνται στους όγκους, ενώ δεν εκφράζονται σε φυσιολογικούς, διαφοροποιημένους, ενήλικους ιστούς. Αντίθετα, ορισμένα ομοιοτικά γονίδια εκφράζονται σε φυσιολογικούς, διαφοροποιημένους ενήλικους ιστούς, αλλά απουσιάζουν από τους όγκους. Τα γονίδια που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία έχουν ογκοκατασταλτικές ιδιότητες [55]. Αυτή η έκτοπη μείωση ή αύξηση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων ρυθμίζεται από

αρκετούς μηχανισμούς, όπως η απώλεια ετεροζυγωτίας, η γονιδιακή ενίσχυση, η υπερμεθυλίωση των νησιδίων CpG των υποκινητών ή η αποακετυλίωση των ιστονών. Το αποτέλεσμα αυτής της απορρύθμισης συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου [56].

α) Το CDX2 στον καρκίνο του οισοφάγου

Η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (GERD), είναι μια χρόνια κατάσταση που προκαλεί φλεγμονή του οισοφαγικού πλακώδους επιθήλιου. Στους περισσότερους ασθενείς το επιθήλιο που έχει υποστεί βλάβη θεραπεύεται μέσω της αναγέννησης των πλακωδών κυττάρων. Σε κάποιες όμως περιπτώσεις, η αναγέννηση αυτή συνοδεύεται από μια μεταπλαστική διαδικασία στην οποία εντερικού τύπου κυλινδρικά κύτταρα αντικαθιστούν τα πλακώδη. Αυτή η κατάσταση είναι γνωστή ως οισοφάγος του Barrett και είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για το οισοφαγικό αδενοκαρκίνωμα [57, 58]. Το CDX2 παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στον σχηματισμό του οισοφάγου του Barrett. Η έκθεση του οισοφαγικού πλακώδους επιθήλιου σε οξέα ή χολή επάγει την έκφραση του CDX2 καθώς και άλλων εντερικών σημάτων [56]. Αυτό υποδηλώνει ότι το CDX2 είναι ένας κύριος ρυθμιστής της εντερικής μεταπλασίας των οισοφαγικών πλακωδών κυττάρων σε απόκριση σε οξύ ή χολή. Η έκθεση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε απομεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου CDX2 και με τον τρόπο αυτό να ενεργοποιήσει την έκφραση του [59].

β) Το CDX2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Το CDX2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου ρυθμίζει την έκφραση των κυτταρικών συνδετικών πρωτεϊνών, που περιλαμβάνουν την ηπατική-εντερική καδερίνη (LI- cadherin) ή την πρωτοκαδερίνη Mucdhl. Απώλεια του CDX2 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μειώνει την έκφραση της Mucdhl [56]. Οι πρωτοκαδερίνες αποτελούν μια ομάδα λιγότερο συντηρημένων μελών της υπερικογένειας των καδερινών που μεσολαβούν την Ca²⁺ εξαρτώμενη κυτταρική προσκόλληση [60]. Το CDX2 δρα ως ογκοκαταστολέας στο έντερο καθώς η μειωμένη έκφραση του συνδέεται με αυξημένη ενεργοποίηση της σηματοδότησης Wnt αφού η παρουσία πυρηνικής β-κατενίνης είναι αντίστροφα συνδεδεμένη με την απώλεια έκφρασης του CDX2 [61]. Σε επίπεδο ιστού, η μείωση της έκφρασης του CDX2 στο αδένωμα ή στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου έχει συσχετιστεί σημαντικά με φτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα, προχωρημένο στάδιο καρκίνου και κακή πρόγνωση [56].

1.2.2. Το CDX2 στην εντερική μεταπλασία και στον γαστρικό καρκίνο

Στην γαστρική εντερική μεταπλασία, τα κύτταρα του φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου αντικαθίστανται από κύτταρα εντερικού τύπου [62]. Η προέλευση των κυττάρων που σχηματίζουν την εντερική μεταπλασία είναι τα βασικά βλαστοκύτταρα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα βασικά βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Το γονίδιο CDX2 παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη διαφοροποίηση αυτών των βλαστοκυττάρων. Στον φυσιολογικό βλεννογόνο του στομάχου δεν παρατηρείται έκφραση του CDX2, ενώ αντίθετα η έκφραση αυτού το ομοιοτικού γονιδίου είναι υψηλή στην εντερική μεταπλασία, η οποία αποτελεί προκαρκινική αλλοίωση του εντερικού υπότυπου γαστρικού καρκίνου. [63-66]. Η έκφραση του CDX2 είναι συχνά περιορισμένη στα πρώιμα στάδια του εντερικού γαστρικού καρκίνου και μειώνεται σημαντικά καθώς ο όγκος αναπτύσσεται σε πιο προχωρημένα στάδια γαστρικού καρκίνου. Συνοψίζοντας, οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν ότι το ομοιοτικό γονίδιο CDX2 προδιαθέτει για γαστρικό καρκίνο αφού αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης προκαρκινικής εντερικής μεταπλασίας που προδιαθέτει για την νόσο [67].

1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4-α

Ο Hepatocyte-nuclear-factor 4-alpha (HNF4-α) είναι μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ρυθμιζόμενων από προσδέτες. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται από λιποδιαλυτά σήματα. Τέτοια σήματα είναι οι στεροειδείς ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, αλλά και το ρετινοϊκό οξύ, οι οξυστερόλες και η θυρεοειδική ορμόνη [68]. Ο HNF-4, όπως και άλλα μέλη αυτής της υπερικογένειας, περιέχει μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA τύπου C4 δακτύλου ψευδαργύρου [69].

Ο HNF4-α έχει συσχετιστεί με τη μεταγραφική ρύθμιση των ηπατοκυτταρικών γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων της γλυκόζης, τη διαφοροποίηση και τη μορφογένεση. Ωστόσο, έκφραση του παρατηρείται επίσης στο επιθήλιο του παγκρέατος, των νεφρών, του στομάχου και του εντέρου, στα οποία εκτελεί λειτουργικούς ρόλους στη ρύθμιση των επιθηλιακών συνδέσεων και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [70]. Ο HNF4-α κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο που βρίσκεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 20 στον άνθρωπο [70]. Η περιοχή HNF4A ρυθμίζεται μεταγραφικά μέσω δυο διακριτών υποκινητών που είναι διαχωρισμένοι από περισσότερες από 45 kb [71].

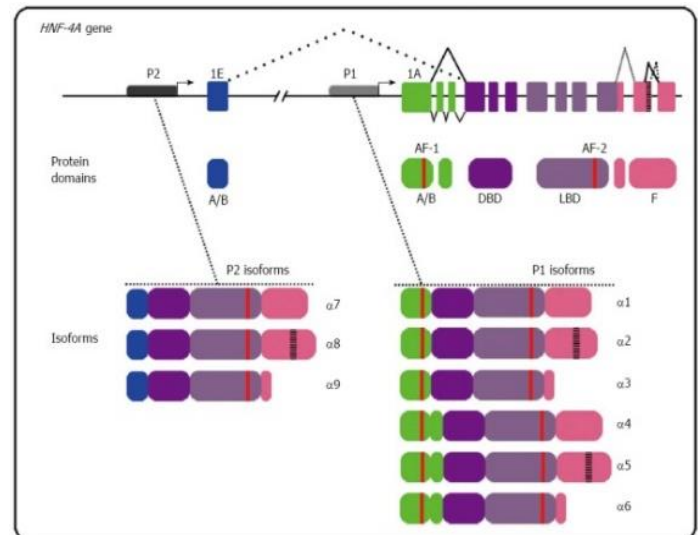
Οι ισομορφές που παράγονται από τη δράση του εγγύτερου υποκινητή επισημαίνονται ως P1 ενώ οι ισομορφές που παράγονται από τον δεύτερο και πιο μακρινό υποκινητή επισημαίνονται ως P2. Οι διάφορες ισομορφές παράγονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος του HNF4-α pre-mRNA, με την τάξη των ισομορφών P1 να περιλαμβάνει έξι διακριτές ισομορφές (α1-α6) και την τάξη P2 ισομορφών περιέχει τρεις ισομορφές (α7-α9) [72]. Παρόλο που αυτές οι τάξεις ισομορφών μοιράζονται 90% ομολογία στις συνολικές πρωτεϊνικές δομές τους, μια σημαντική διαφορά παρατηρείται στις αμινοτελικές τους περιοχές που κάνει τις ισομορφές P2 να είναι κοντύτερες από τις P1 και να μην έχουν την περιοχή αλληλεπίδρασης με συμπαραγόντες activating function (AF)-1. Αυτές οι δομικές διαφορές υποδεικνύουν ότι οι δυο τάξεις ισομορφών μπορούν να έχουν ξεχωριστούς ρόλους αλληλεπιδρώντας διαφορετικά με συμπαραγόντες και ρυθμίζοντας διαφορετικά γονίδια-στόχους [73].

1.3.1. Ο HNF4-α στον καρκίνο

Ο HNF4-α εμπλέκεται στην δημιουργία και την ανάπτυξη του καρκίνου. Ωστόσο, παραμένει αντιφατικό εάν οι ρόλοι που ασκεί είναι ογκοκατασταλτικοί ή ογκοεπαγωγικοί στους διάφορους καρκινικούς ιστούς. Η τροποποιημένη έκφραση των ισομορφών που δημιουργείται από τη διαφορετική χρήση των υποκινητών ή από το εναλλακτικό μάτισμα, παρατηρείται σε πολλά αδενοκαρκινώματα αλλά και μεταστάσεις τους [74].

α) Ο ρόλος του HNF4-α στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ο πιο συχνός καρκίνος που προέρχεται από τα ηπατοκύτταρα. Η απώλεια της έκφρασης του HNF4-α είναι ένας σημαντικός καθοριστής της



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των ισομορφών του γονιδίου HNF4-α. Οι ισομορφές αυτές δημιουργούνται τόσο μέσω της χρήσης διαφορετικού υποκινητή όσο και μέσω εναλλακτικού ματίσματος. [71]

προόδου του όγκου, αντικατοπτρίζοντας την κατάσταση διαφοροποίησης και την μεταστατική δυναμική των κυττάρων του όγκου. Η μειωμένη έκφραση του γονιδίου αυτού σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση της ασθένειας [75]. Η απώλεια του HNF4-α οδηγεί σε αποδιαφοροποίηση και άρα μετάβαση από αργά αναπτυσσόμενο σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενο επιθετικό ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Ο HNF4-α έχει ταυτοποιηθεί για τον κεντρικό του ρόλο σε έναν φλεγμονώδη βρόχο ανατροφοδότησης, στον οποίο εμπλέκονται η IL-6 αλλά και miRNAs, που οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του HNF4-α και αύξηση της εμφάνισης HCC [76]. Ειδικότερα, η έκφραση των ισομορφών P1 του HNF4-α είναι μειωμένη στους ιστούς του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος του ανθρώπου [77]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τον ρόλο των ισομορφών P1-HNF4-α ως ογκοκαταστολείς στα ηπατοκύτταρα [78].

β) Ο ρόλος του HNF4-α στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο HNF4-α είναι κρίσιμος για τη διατήρηση της λειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου αλλά και την κανονική φυσιολογία του. Αυτό συμβαίνει μέσω της ρύθμισης της ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, της μεταφοράς ιόντων, της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού αλλά και του οξειδωτικού στρες [78]. Επιπλέον, ο HNF4-α φαίνεται να παίζει έναν προστατευτικό ρόλο ενάντια στην φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC). Η έκφραση του μειώνεται σε άτομα με ασθένεια του Crohn και ελκώδη κολίτιδα [79].

Η έκφραση του γονιδίου HNF4-α φαίνεται να ενισχύεται στους όγκους του παχέος εντέρου, προτείνοντας έναν ογκοεπαγωγικό ρολό για τον παράγοντα αυτό [80, 81]. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό προκύπτει καθώς δεν εξετάζονται ξεχωριστά οι διαφορετικές ισομορφές του. Έτσι, παρόλο που η συνολική έκφραση του φαίνεται να αυξάνεται σε αυτόν τον τύπο καρκίνου, η έκφραση της ισομορφής P1 φαίνεται να είναι μειωμένη [77, 78]. Οι P1-, αλλά όχι οι P2-HNF4-α ισομορφές, χάνονται στους CRC στους ανθρώπους. Η έκφραση των P1 ισομορφών μειώνεται, σε επίπεδο μεταγραφής, μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων από την β-κατενίνη. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού WNT/β-κατενίνης είναι συχνοί στους όγκους του παχέος εντέρου, συμβαίνουν περίπου στο 90% των περιπτώσεων και θεωρούνται ως ένα από τα αρχικά βήματα της ογκογένεσης [82]. Μετά την ενεργοποίησή του, το μονοπάτι αυτό οδηγεί σε σταθεροποίηση της β-κατενίνης, η οποία με τη σειρά της μεταφέρεται στον πυρήνα και επηρεάζει την έκφραση γονιδίων αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες [83], ρυθμίζοντας τη σταθερότητα των mRNA [84] ή αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικά σύμπλοκα [82]. Τέλος, η ισομορφή P1 σχετίζεται με την εντερική διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και τη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, ενώ η P2 σχετίζεται με την ογκοεπαγωγική σηματοδότηση, προωθώντας την επιβίωση και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [85].

γ) Ο ρόλος του HNF4-α στον καρκίνο του οισοφάγου

Το αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου (EAC) αναπτύσσεται από μια προϋπάρχουσα κατάσταση γνωστή ως οισοφάγος του Barrett [86]. Μορφολογικά, ο φυσιολογικός οισοφάγος αποτελείται από ένα στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο, αλλά ο οισοφάγος Barrett διαφέρει σημαντικά και παρουσιάζει κυλινδρικό επιθήλιο [87]. Ο HNF4-α μπορεί να ξεκινά την ανάπτυξη του οισοφάγου Barrett. Συγκεκριμένα, ο HNF4-α είναι ικανός να επάγει το σχηματισμό ευχρωματίνης σε φυσιολογικά κύτταρα του οισοφάγου και έτσι είναι ικανός να προωθήσει την πρόσβαση γονιδιωματικών περιοχών που φαίνονται να εκφράζονται

διαφορετικά στον οισοφάγο του Barrett και στο EAC [88]. Ο HNF4-α έχει την δυναμική να προωθήσει το πρωταρχικό εναρκτήριο γεγονός στο σχηματισμό του οισοφάγου του Barrett. Ο HNF4-α και ο GATA6 ρυθμίζουν απευθείας ένα σύνολο γονιδίων, τα οποία εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στους ιστούς με οισοφάγο του Barrett και EAC[89]. Οι δυο αυτοί παράγοντες συνυπάρχουν σε πολλές γονιδιακές περιοχές και δρουν μαζί προκειμένου να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση [88].

1.3.2.Ο HNF4-α στον γαστρικό καρκίνο και στην εντερική μεταπλασία

Ο HNF4-α είναι ένας αναπτυξιακός ρυθμιστής του σπλαχνικού ενδοδέρματος [90]. Ο παράγοντας αυτός λειτουργεί ως ογκογονίδιο στον γαστρικό καρκίνο και μόνο οι ισομορφές P2 εκφράζονται στον στόμαχο [91]. Αντίθετα, η έκφραση των ισομορφών P1 δεν μπορούν να ανιχνευτούν στον φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο [90]. Έκφραση των ισομορφών που προκύπτουν από τον P1 υποκινητή παρατηρείται στην εντερική μεταπλασία του ενήλικου γαστρικού βλεννογόνου και στο 57.1% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων. Τα αδενοκαρκινώματα στα οποία παρατηρήθηκε έκφραση της ισομορφής P1 του HNF4-α ήταν εντερικού τύπου και όχι διάχυτου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο HNF4-α συμβάλλει στην εντερική μετατροπή ή τη διατήρηση του εντερικού φαινοτύπου στον γαστρικό βλεννογόνο [77].

Η αύξηση της έκφρασης του HNF4-α είναι ένα κύριο σηματοδοτικό γεγονός που παρατηρείται στον γαστρικό καρκίνο. Η δράση του παράγοντα αυτού στο γαστρικό καρκίνο είναι ογκοεπαγωγική. Ο HNF4-α αναστέλλεται από τη σηματοδότηση του AMPKα [92]. Η σηματοδότηση αυτή οδηγεί σε φωσφορυλίωση του HNF4-α στη σερίνη 304 οδηγώντας σε μείωση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας του παράγοντα αυτού και κατά συνέπεια μειώνει και την έκφραση των γονιδίων στόχων του HNF4-α [93]. Η αναστολή της δράσης του HNF4-α οδηγεί σε αναστολή των κυκλινών και γενικότερα του κυτταρικού κύκλου και με τον τρόπο αυτό αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον, ο HNF4-α ρυθμίζει τη σηματοδότηση WNT, μέσω του γονιδίου-στόχου του WNT5A. Το WNT5A περιέχει πολλές υψηλά συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης του HNF4α στην περιοχή του υποκινητή του [94]. Συνολικά, η δράση της AMPK οδηγεί σε αναστολή του WNT5A [92], μιας πρωτεΐνης που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε προχωρημένα στάδια γαστρικού καρκίνου και σχετίζεται με κακή πρόγνωση [95]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο HNF4-α, είναι ένας μεσολαβητής κλειδί στη σηματοδότηση του γαστρικού καρκίνου και αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο [92].

Ο HNF4-α ρυθμίζει πολλά γονίδια που εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια, δημιουργώντας έναν προογκογονικό μεταβολικό περιβάλλον που είναι απαραίτητο για την επιβίωση των γαστρικών καρκινικών κυττάρων. Η ισοκιτρική αφυδρογονάση 1 (IDH1) αποτελεί στόχο του HNF4-α και απαιτείται για την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [96]. Η IDH1 αποτελεί ένα βασικό ένζυμο που συμμετέχει στη γλυκόλυση και τον κύκλο TCA και μετατρέπει το ισοκιτρικό σε α-KG μέσω οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης [97]. Η έκφραση της είναι σημαντικά αυξημένη στους όγκους που παρουσιάζουν μεγάλη έκφραση του HNF4-α σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό [96].

Επιπλέον, ο HNF4-α έχει προταθεί ως εξειδικευμένος βιοδείκτης για τον διαχωρισμό των ιστών με γαστρικό καρκίνο από άλλους τύπους ιστών [91]. Ειδικότερα, ο διαχωρισμός ανάμεσα στο πρωταρχικό γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και της γαστρικής μετάστασης του καρκινώματος του μαστού μπορεί να είναι δύσκολη. Ωστόσο, η έκφραση του HNF4-α έχει

περιγραφεί ως εξειδικευμένη για τη διάκριση νεοπλαστικών γαστρικών και μαστικών επιθηλιακών κυττάρων. Η μετάσταση του γαστρικού καρκίνου στον μαστό παρουσιάζει αυξημένη έκφραση του παράγοντα αυτού. Αντίθετα, οι μεταστάσεις των καρκινωμάτων του μαστού στον στόμαχο δεν παρουσιάζουν έκφραση του HNF4-α [98].

Η συγκέντρωση των χολικών οξέων στον γαστρικό χυμό σχετίζεται θετικά με τον βαθμό της εντερικής μεταπλασίας [99]. Η επανενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της εντερικής ανάπτυξης εμπλέκεται στον μεταπλαστικό φαινότυπο έπειτα από έκθεση σε παθογόνους παράγοντες. Ο παράγοντας KLF4 και ο Cdx2 είναι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των εντεροκυττάρων [21, 100]. Στην εντερική μεταπλασία παρατηρείται απώλεια του στομαχικού χαρακτήρα και εμφάνιση εντερικών χαρακτηριστικών. Η έκθεση σε χολικά οξέα μπορεί να αυξήσει σημαντικά την έκφραση των KLF4 και Cdx2. Ο G-protein-coupled BA receptor 1 (GPBAR1), επίσης γνωστός ως TGR5, είναι ένας υποδοχέας-κλειδί που μεσολαβεί τα φυσιολογικά και παθολογικά αποτελέσματα των χολικών οξέων. Ο υποδοχέας αυτός εμπλέκεται στην επαγόμενη από χολικά οξέα μεταπλασία μέσω της ενεργοποίησης του HNF4-α. Ο HNF4-α συνεισφέρει σημαντικά στην επαγόμενη από χολικά οξέα έκφραση γονιδίων δεικτών της μεταπλασίας μέσω απευθείας ρύθμισης της δραστηριότητας των υποκινητών των KLF4 και Cdx2 [101]. Τέλος, ο HNF4-α έχει ένα συγκεκριμένο ρόλο στην εντερική έκφραση, που διαφέρει από την ηπατοκυτταρική και την παγκρεατική. Η έκφραση των γονιδίων στόχων του HNF4-α εμπλέκεται εξειδικευμένα στην εντερική ανάπτυξη. [102].

1.4. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs)

Το αγγελιαφόρο RNAs (mRNA) αποτελεί τη μήτρα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και για τον λόγο αυτό αποτελούσε το επίκεντρο των ερευνών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αντίθετα τα μη-κωδικά ποιητικά RNAs (ncRNAs) θεωρούνταν μέχρι πρόσφατα παραπροϊόντα της μεταγραφής με λιγότερη βιολογική σημασία [103]. Η κοινοπραξία ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) που ξεκίνησε το 2005 και οι πρόσφατες αναφορές της αποκάλυψαν ότι μέχρι και το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει την ικανότητα να μεταγράφεται σε ncRNAs [104, 105]. Σε γενικές γραμμές, τα λειτουργικά ncRNAs βρέθηκε ότι συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες, μπορούν να ρυθμίσουν φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες ή ακόμα και ασθένειες. Επιπλέον, τα ncRNAs έχουν ταυτοποιηθεί για την ογκοκατασταλτική ή την ογκοεπαγωγική δράση τους σε διάφορους καρκινικούς τύπους [106].

Ανάλογα με το μέσο μήκος τους, τα ρυθμιστικά ncRNAs διακρίνονται περαιτέρω σε μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs (snRNAs) και μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs). [103]. Τα snRNAs αποτελούνται από μετάγραφα με μήκος μικρότερο από 200 nt, ενώ τα lncRNAs αποτελούνται από μετάγραφα μήκους μεγαλύτερου των 200 nt. Οι κύριες τάξεις των μικρών ncRNAs είναι τα microRNA (miRNA), τα μικρά-παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), piwi-αλληλεπιδρώντα RNAs (piRNAs) [107].

Τα lncRNAs μπορούν να διαχωριστούν με βάση την τοποθεσία τους σχετικά με τα ενεργά γειτονικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μπορούν να προέρχονται από ιντρόνια, εξόνια, διαγονιδιακές, ενδογονιδιακές περιοχές, περιοχές υποκινητών, 3'- και 5'-UTR. Υπάρχουν 3 βασικοί τύποι lncRNAs: αντινοσηματικά (antisense), ιντρονικά (intronic), διαγονιδιακά (intergenic), αμφίδρομα (bidirectional) και νοηματικά (sense) [108].

Τα αντινοσηματικά lncRNAs μεταγράφονται από την αντινοσηματική αλυσίδα με αντίθετη κατεύθυνση από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, η αλληλουχία τους μπορεί να επικαλύπτει τουλάχιστον ένα εξόνιο και μπορεί να μεταγράφεται από το εσωτερικό ή το 3'-άκρο ενός γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνες [109].

Τα ιντρονικά lncRNAs προέρχονται από τις ιντρονικές περιοχές γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Παράγονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος του pre-mRNA και δεν επικαλύπτονται με εξόνια των γονιδίων αυτών. Τα ιντρονικά lncRNAs μπορούν να δημιουργούνται τόσο από την κωδική όσο και από την μη κωδική αλυσίδα των ιντρονικών περιοχών των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες [103, 110].

Τα μεσογονιδιακά lncRNAs (lincRNAs) είναι μακρά ncRNAs με διαφορετικές μεταγραφικές μονάδες σε σχέση με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τα lincRNAs μεταγράφονται από μεσογονιδιακούς γενετικούς τόπους που απέχουν μέχρι 10 kb από το κοντινότερο γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνες. Επιπλέον μπορούν να μεταγραφούν και από τις δύο αλυσίδες [103, 110-112].

Τα αμφίδρομα lncRNAs είναι μετάγραφα των οποίων η μετάφραση ξεκινάει με διαφορετικό τρόπο από τον υποκινητή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τα lncRNAs αυτά μεταγράφονται από την συμπληρωματική αλυσίδα και την αντίθετη κατεύθυνση σε σχέση με τα κωδικοποιητικά γονίδια και βρίσκονται στην κοντινή απόσταση, περίπου 1kb από τον υποκινητή των γονιδίων αυτών [103, 110, 113].

Τα νοσηματικά lncRNAs βρίσκονται μέσα στους γενετικούς τόπους των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και μεταγράφονται από την κωδική αλυσίδα. Αυτά τα lncRNAs είναι μεταγραφικές παραλλαγές των mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μερικά κωδικά lncRNAs δεν παρουσιάζουν λειτουργικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για την μετάφραση σε πρωτεΐνες, ενώ άλλα μοιράζονται το ίδιο κωδικόνιο έναρξης με τα μετάγραφα τους που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ωστόσο δεν παράγουν πρωτεΐνες καθώς η μετάφραση τους τερματίζεται πρόωρα λόγω κωδικονίων λήξης. Επιπλέον, μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης που αποτρέπει τη μετάφραση του προβλεπόμενου ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου [103, 108, 114].

Ένας μεγάλος αριθμός lncRNAs εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων και κατά συνέπεια στην ρυθμιστική πολυπλοκότητα των ανώτερων οργανισμών. Ανάλογα με τα ρυθμιστικά τους αποτελέσματα στο DNA, τα lncRNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε σε *cis-acting* lncRNAs είτε σε *trans-acting* lncRNAs, και μπορούν να ρυθμίσουν θετικά ή αρνητικά την έκφραση γονιδίων. Τα *cis-acting* lncRNAs δρουν σε κοντινή απόσταση και επηρεάζουν την έκφραση γειτονικών γονιδίων που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα. Αντίθετα, τα *trans-acting* lncRNAs μπορούν να ρυθμίσουν γονίδια που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση, όπως για παράδειγμα σε άλλα χρωμοσώματα [103, 115].

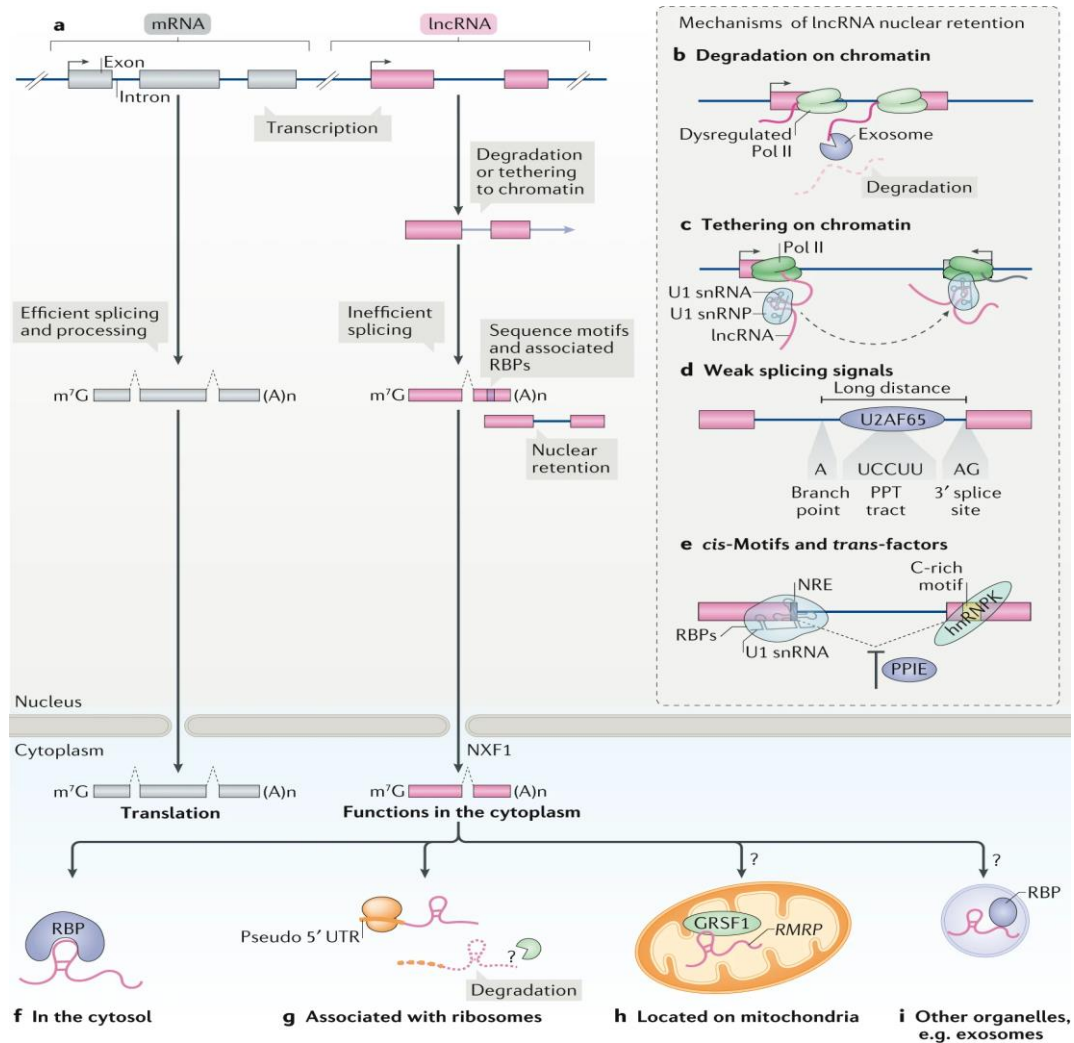
1.4.1. Χαρακτηριστικά των lncRNAs

Τα μακρά ncRNAs αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των μη κωδικοποιητικών RNAs, με περίπου 10,000 γονίδια lncRNA να έχουν βρεθεί στον άνθρωπο [116]. Αποτελούν μετάγραφα κυρίως της RNA πολυμεράσης II (RNAPII) [115, 117]. Τα lncRNAs μπορούν να δράσουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες και βιολογικές διεργασίες [118].

Σε σχέση με τα mRNAs, ένα μεγαλύτερο ποσοστό των lncRNAs βρίσκονται στον πυρήνα. Επίσης, έχουν μικρή διαφορά μήκους με τα mRNAs, παρόλο που περιέχουν λιγότερα και μεγαλύτερα εξόνια [117]. Η πυρηνική τοποθέτηση και μοίρα των lncRNAs ρυθμίζεται συντονισμένα σε πολλά επίπεδα, από τη μεταγραφή και επεξεργασία έως την πυρηνική έξοδο μέσω πολλαπλών μοτίβων αλληλουχιών με *cis* τρόπο και παραγόντων με *trans* [119]. Η χαμηλή έκφραση των lncRNAs σχετίζεται με την παρουσία κατασταλτικών ιστονικών τροποποιήσεων στους υποκινητές των γονιδίων τους [119]. Ωστόσο, ο τρόπος μεταγραφής τους εξηγεί κάποια από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους. Η κατάσταση φωσφορυλίωσης της καρβοξυτελικής περιοχής της RNAPII συνδέεται με διαφορετικά στάδια μεταγραφής και με μια σημαντική τάξη lncRNAs που μεταγράφεται από την απορυθμισμένη λόγω φωσφορυλίωσης RNAPII. Ο τερματισμός της μεταγραφής αυτών των γονιδίων είναι ανεξάρτητος από την παρουσία σημάτων πολυαδενυλίωσης, οδηγώντας σε προσωρινή συσσώρευση των lncRNAs στη χρωματίνη και ακολούθως ταχεία αποικοδόμηση τους από εξώσωμα του RNA [120] (**Εικόνα 3.b**). Κάποια lncRNAs που βρίσκονται στην χρωματίνη περιέχουν υψηλά επίπεδα θέσεων πρόσδεσης του U1 μικρού πυρηνικού RNA, οι οποίες στρατολογούν την μικρή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη U1 (U1 snRNP) στην μεταγραφικά δεσμευμένη RNAPII, οδηγώντας σε δέσμευση πολλών ncRNAs στην χρωματίνη [121]. (**Εικόνα 3.c**). Γενικά, τα lncRNAs είναι ματισμένα λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τα mRNAs [119]. Έχουν ασθενέστερα εσωτερικά σήματα ματίσματος και μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ του σημείου ματίσματος 3' και του σημείου διακλάδωσης, γεγονός που σχετίζεται με αυξημένη πυρηνική διατήρηση [117, 122] (**Εικόνα 3.d**). Και άλλοι παράγοντες, όπως η διαφορετική έκφραση συγκεκριμένων ρυθμιστών του ματίσματος, επίσης, συμβάλλουν στη συσσώρευση των lncRNAs στον πυρήνα. Τα lncRNAs περιέχουν συχνά ενσωματωμένες περιοχές αλληλουχιών που μπορούν να στρατολογήσουν συγκεκριμένους πυρηνικούς παράγοντες που προωθούν την πυρηνική τοποθέτηση και λειτουργία των lncRNA. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι επίσης πιθανό να έχουν ρόλους στην πυρηνική συγκράτηση των lncRNA [117]. (**Εικόνα 3.e**)

Ωστόσο, ένα σημαντικό μέρος των lncRNAs εξάγεται στο κυτταρόλιο. Αυτά τα lncRNAs πιθανώς μοιράζονται τις ίδιες διεργασίες και μονοπάτια εξόδου με τα mRNAs. Τα μεγάλα και πλούσια σε A/U μετάγραφα με ένα ή λίγα μόνο εξόνια εξαρτώνται από το μονοπάτι του RNA export factor 1 (NXF1) για την έξοδο τους [123]. Έτσι, καθώς τα lncRNAs τείνουν να έχουν λιγότερα εξόνια σε σχέση με τα mRNAs εκμεταλλεύονται κατά προτίμηση αυτό το μονοπάτι εξόδου από τον πυρήνα. Με την άφιξη τους στο κυτταρόπλασμα, τα lncRNAs πιθανώς υπόκεινται σε συγκεκριμένες διεργασίες ταξινόμησης που κατανέμουν διαφορετικά lncRNAs σε συγκεκριμένα οργανίδια ή κατανέμονται στο κυτταρόπλασμα και συνδέονται με διαφορετικές πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης RNA (RNA-binding proteins-RBPs)[117] (**Εικόνα 3.f**). Το 54% των lncRNAs που εκφράζονται ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα. Τα περισσότερα από αυτά (70%) έχουν >50% των κυτταροπλασματικών αντιγράφων τους συνδεδεμένα στα κλάσματα των πολυσωμάτων. Ορισμένα *cis* στοιχεία συμβάλλουν στην τοποθέτηση των lncRNAs μαζί με τα ριβοσώματα, όπως οι μεγάλες «ψευδό» 5' αμετάφραστες περιοχές, οι οποίες ονομάζονται έτσι καθώς παρουσιάζουν «ψευδο-ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης» στα lncRNAs. Η αποικοδόμηση των ριβοσωμικά-συνδεδεμένων lncRNAs πιθανώς διεγείρεται από έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από τη μετάφραση [124]. (**Εικόνα 3.g**) Τα lncRNAs που εξάγονται από τον πυρήνα μπορούν επίσης να κατανεμηθούν στα μιτοχόνδρια [125] (**Εικόνα 3.h**). Τέλος, τα εξωσώματα περιέχουν πολλά lncRNAs [126], όμως ο τρόπος με τον οποίο αυτά κατανέμονται στα εξωσώματα είναι άγνωστος αλλά ο

μηχανισμός πιθανώς εμπλέκει την πρόσδεση RBPs σε συγκεκριμένα μοτίβα αλληλουχιών [127]. (Εικόνα 3.i)



Εικόνα 4. Βιογένεση και κυτταρική μοίρα των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs. α) βιογένεση lncRNAs, β) παραμονή των lncRNAs που παράγονται από την απορρυθμισμένη RNAPol II στη χρωματίνη και αποικοδόμηση τους από το εξώσωμα, γ) στρατολόγηση U1 snRNP στα lncRNAs και σύνδεσής τους με την RNAPol II, δ) αναποτελεσματικό μάτισμα ορισμένων lncRNAs, ε) στοιχεία αλληλουχιών και παράγοντες συμβάλλουν στην πυρηνική τοποθέτηση κάποιων lncRNAs, ς) στο κυτταρόπλασμα τα lncRNAs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με RBPs, ζ) πολλά lncRNAs συνδέονται με ριβοσώματα, η) lncRNAs συνδέονται και με τα μιτοχόνδρια, θ) τέλος, lncRNAs συναντώνται και σε άλλα οργανίδια όπως εξωσώματα. [124]

1.4.2. Τα lncRNAs στον καρκίνο

Τα lncRNAs εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως η μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, η διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, η απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος, η κυτταρική διαφοροποίηση και η ανάπτυξη [108, 128]. Επιπλέον, εμπλέκονται στην μεταμεταγραφική ρύθμιση, το μάτισμα αλλά και τη μεταφραστική ρύθμιση ποικίλων κωδικοποιητικών γονιδίων [108]. Δεδομένων των κρίσιμων ρυθμιστικών λειτουργιών των lncRNAs στο κύτταρο, η απορρύθμιση τους μπορεί να

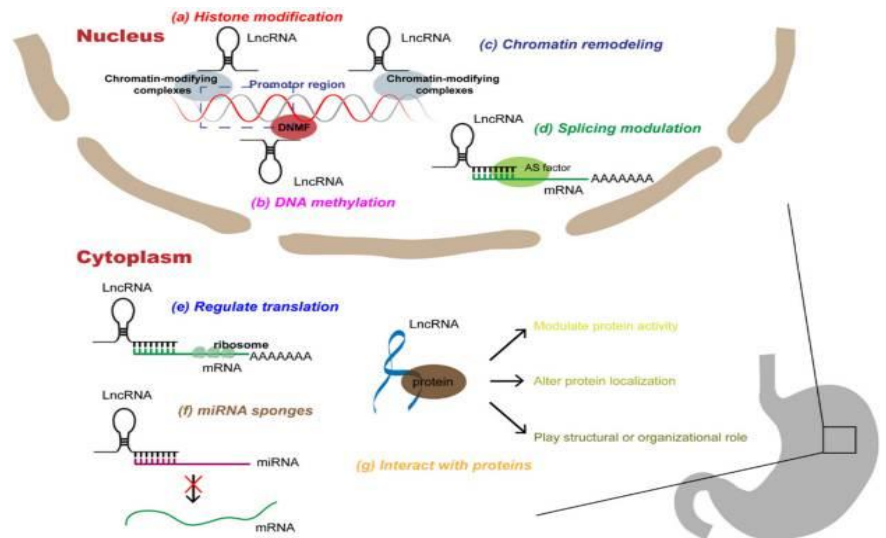
συμβάλει στην παθοφυσιολογία. Έτσι, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν περισσότερες από 200 ασθένειες που σχετίζονται με τα lncRNAs [129]. Η τροποποίηση της έκφρασης των lncRNA έχει συχνά συσχετιστεί με την επιθετικότητα και την πρόοδο του καρκίνου, στον οποίο παρουσιάζουν ιστοειδική και εξειδικευμένη, ανάλογα με τον τύπο και υπότυπο, έκφραση. Επίσης, τα lncRNAs εκφράζονται σε συνεργασία με αρκετά γονίδια που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο, την επιβίωση και τη μετάσταση, διεργασιών δηλαδή που συμβάλλουν στον καθορισμό του φαινότυπου των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, πολλά lncRNAs ρυθμίζονται μεταγραφικά από ογκοεπαγωγικές πρωτεΐνες ή από ογκοκαταστολείς [130].

Τα lncRNAs αποτελούν μια νέα ομάδα λειτουργικών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ογκογένεση αλλά και την ανάπτυξη του καρκίνου. Κάποια από αυτά τα lncRNAs δρουν ως ογκογονίδια με αυξημένη συσχέτιση με τα σημεία ελέγχου του καρκίνου [131] ελέγχοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω της ρυθμιστικής επίδρασής τους στους ρυθμιστές του όπως οι κυκλίνες, οι CDKs, οι αναστολείς των CDKs, η pRB και το p53. Τα lncRNAs επηρεάζουν τα κυτταρικά επίπεδα των ρυθμιστών αυτών μέσω ποικίλων μηχανισμών [132]. Επίσης, ασκούν αντιαποπτωτική ή προαποπτωτική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου [133] αλλά παίζουν ρόλο και στην αγγειογένεση, καθώς έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με σημαντικούς ρυθμιστές της αγγειογένεσης όπως το μονοπάτι του VEGF, αλλά και με άλλους αρνητικούς ρυθμιστές της αγγειογένεσης όπως η phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) [134]. Επιπλέον, παίζουν ρόλο στη μετάσταση, ρυθμίζοντας τα προγράμματα έκφρασης των μεταστατικών γονιδίων και τη λεμφική διήθηση, καθώς είναι πιθανό να εμπλέκονται στην πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του όγκου και του στρώματος και μπορούν να επηρεάσουν, επίσης, και την φλεγμονώδη συμπεριφορά των κυττάρων (inflammatory cell behavior) [135, 136]. Τέλος, τα lncRNA έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν και την επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά. Η EMT χαρακτηρίζεται από απώλεια της διακυτταρικής επαφής και πολικότητας και απόκτηση κινητικότητας αλλά και διηθητικού χαρακτήρα. Τα lncRNA αποτελούν ρυθμιστές της έκφρασης και της λειτουργίας των EMT-TFs σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις [137].

1.4.3. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNAs

Σε μοριακό επίπεδο, τα lncRNAs μπορούν να επηρεάσουν ποικίλους επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως η τροποποίηση των ιστονών, η μεθυλίωση του DNA, η υδροξυμεθυλίωση και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Με τον τρόπο αυτό ελέγχουν την έκφραση ρυθμιστικών παραγόντων που εμπλέκονται στην εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου. Τέτοιοι ρυθμιστικοί παράγοντες είναι γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, την απόπτωση, την αυτοφαγία, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη μεταγραφή αλλά και πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών [138]. Επιπλέον, τα lncRNAs μπορούν να υβριδοποιηθούν με pre-mRNAs προκειμένου να ρυθμίσουν το εναλλακτικό τους μάτισμα μπλοκάροντας την αναγνώριση των σημείων μάτισματος από τα ματισματοσώματα (spliceosomes), παράγοντας έτσι εναλλακτικά μετάγραφα [139].

Όσον αφορά τα lncRNAs που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, αυτά μπορούν να επηρεάσουν την μετάφραση των RNAs μέσω πρόσδεσης και σταθεροποίησης των mRNAs [140]. Επίσης μπορούν να δράσουν ως μοριακά δολώματα για τα miRNAs, ρυθμίζοντας έτσι την έκφρασή τους και με τον τρόπο αυτό μπορούν να αναστείλουν τις λειτουργίες που μεσολαβούνται από τα ίδια miRNAs [141]. Επιπλέον, μπορούν να συνδεθούν άμεσα σε πρωτεΐνες, επηρεάζοντας τη δράση τους, τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών στα κύτταρα [142].



Εικόνα 5. Οι ποικίλοι ρόλοι των lncRNAs στον γαστρικό καρκίνο. Συγκεκριμένα τα lncRNAs που βρίσκονται στον πυρήνα εμπλέκονται α) στην τροποποίηση των ιστονών, β) στη μεθυλίωση του DNA, γ) στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, δ) στη ρύθμιση του ματίσματος. Τα lncRNAs στο κυτταρόπλασμα μπορούν ε) να ρυθμίζουν την μετάφραση των mRNAs, f) να δρουν ως σφουγγάρια miRNAs μειώνοντας την αναστολή που αυτά μπορούν να προκαλέσουν σε γονίδια στόχους, και τέλος μπορούν να γ) αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες. [137]

1.4.4. Η δράση των lncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες

Οι μοριακοί δείκτες των όγκων είναι σημαντικά διαγνωστικά και προγνωστικά εργαλεία που μπορούν να βοηθήσουν στη διαχείριση των ασθενών με κακοήθειες [136]. Η χρήση των lncRNAs στη διάγνωση παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη χρήση RNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτό συμβαίνει καθώς ο προσδιορισμός της έκφρασής τους δείχνει άμεσα τα επίπεδα των ενεργών μορίων σε αντίθεση με τα επίπεδα των mRNA που εκφράζουν μόνο έμμεσα τα επίπεδα του λειτουργικού προϊόντος, δηλαδή της πρωτεΐνης [143]. Επιπλέον, τα επίπεδα των lncRNA έχουν μεγαλύτερη εξειδίκευση σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου και έτσι μπορεί να αποτελέσουν πιο ειδικά διαγνωστικά εργαλεία [133].

Ένα από τα πλεονεκτήματα των lncRNAs που τα καθιστά κατάλληλα ως καρκινικούς διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες είναι η υψηλή τους σταθερότητα όταν κυκλοφορούν στα υγρά του σώματος και ειδικότερα όταν βρίσκονται σε εξωσώματα ή αποπτωτικά σώματα [144, 145]. Παρά την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων ριβονουκλεασών στα διαφορετικά υγρά του σώματος, τα lncRNAs μπορούν να ανιχνευθούν σε αυτά τα δείγματα και είναι ανθεκτικά στη δραστηριότητα αποικοδόμησης των ριβονουκλεασών [146]. Επιπλέον, η απορρύθμιση των lncRNA στους ιστούς τους όγκου αντικατοπτρίζεται σε πλήθος σωματικών υγρών, όπως το αίμα, το πλάσμα, τα ούρα, το σάλιο και ο γαστρικός χυμός [147]. Τα χαρακτηριστικά αυτά που φέρουν τα lncRNA παρέχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης βιοδεικτών βασισμένων σε αυτά. Η παρουσία τους στα σωματικά υγρά τους καθιστά εύκολα προσβάσιμους δείκτες με ελάχιστη επεμβατικότητα, μια διαδικασία η οποία μπορεί να είναι περισσότερο ανεκτή από τους ασθενείς σε σχέση με τις συμβατικές βιοψίες των ιστών [148]. Η ανίχνευση των lncRNA στα σωματικά υγρά μπορεί να γίνει εύκολα με τη χρήση μιας ποικιλίας τεχνικών της μοριακής βιολογίας, όπως η qRT-PCR, η υβριδοποίηση σε μικροσυστοιχίες και η αλληλούχηση RNA [145].

Συνολικά, η ανίχνευση των κυκλοφορούντων lncRNAs στα υγρά του σώματος αποτελεί μια νέα μη επεμβατική μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση των καρκίνων ως προς τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- 1) διάκριση των ασθενών με καρκίνο από τους υγιείς ανθρώπους σε αρχικά στάδια και με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία
- 2) εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών με καρκίνο
- 3) πρόβλεψη του κινδύνου της μετάστασης του όγκου αλλά και της υποτροπής έπειτα από χειρουργική επέμβαση
- 4) δημιουργία ενός συντελεστή εκτίμησης για την αξιολόγηση του εάν η επέμβαση ήταν επιτυχής ή όχι. [146].

Έτσι, τα lncRNAs κατέχουν μια μεγάλη δυναμική για τη χρήση τους ως καρκινικοί βιοδείκτες είτε μόνα τους είτε μαζί με άλλους δείκτες. Το γεγονός αυτό συμβάλλει σημαντικά στην πιο ακριβή διάγνωση και πρόγνωση της εξέλιξης της ασθένειας [145].

Χρήση lncRNAs ως βιοδείκτες στον γαστρικό καρκίνο

Ένας σημαντικός λόγος της χαμηλής πρόγνωσης του γαστρικού καρκίνου είναι η έλλειψη αποτελεσματικών προγνωστικών δεικτών. Τα τελευταία χρόνια, αυξημένα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα lncRNAs μπορούν να γίνουν δυναμικοί προγνωστικοί βιοδείκτες του γαστρικού καρκίνου [149]. Τα αποτελέσματα ερευνών υποδεικνύουν ότι η ανώμαλη έκφραση των lncRNAs σχετίζεται με τον γαστρικό καρκίνο και ορισμένα από αυτά μπορούν να χρησιμεύσουν στην διάγνωση αλλά και την πρόγνωση του [150-152]. Η παρουσία κυκλοφορούντων lncRNAs στα υγρά του σώματος των ασθενών με γαστρικό καρκίνο έχει μελετηθεί με έναν αριθμό μελετών να έχουν δείξει ότι ανώμαλη έκφραση των lncRNAs είναι μια από τις κύριες αιτίες πρόκλησης της ανοχής στα φάρμακα [153]. Επιπλέον, ένας αυξανόμενος αριθμός lncRNAs έχει προταθεί για την προγνωστική του αξία στην πρόβλεψη της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του στομάχου [154, 155]. Τέλος, η απορρύθμιση των lncRNAs σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών με αυτόν τον τύπο καρκίνου [149].

1.4.5. Η χρήση των lncRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι

Τα lncRNAs έχουν σημαντικούς ρόλους στην ασθένεια και μπορούν να λειτουργήσουν ως θεραπευτικοί στόχοι. Η υψηλή ιστοειδικότητα και ρύθμιση πολλών διακριτών κυτταρικών δικτύων υποδεικνύει ότι τα μη κωδικοποιητικά αυτά RNAs είναι ανώτερα των πρωτεϊνών όσον αφορά τη δυναμική και τα μη επιθυμητά αποτελέσματα που σχετίζονται με τη στόχευση τους. Επιπλέον, η απουσία μετάφρασης, η γρήγορη ανακύκλωση και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης μπορούν να συμβάλουν σε γρηγορότερα αποτελέσματα ακόμα και με χαμηλότερες δόσεις [117]. Η ανακάλυψη της απορρύθμισης των lncRNA στον καρκίνο μαζί με το αυξημένο ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης τους, τα καθιστά δυνατούς στόχους για την ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπειών [148].

Μια από τις πιο ερευνημένες μεθόδους για την αναστολή των ογκοεπαγωγικών lncRNAs των οποίων η έκφραση έχει αυξηθεί είναι η εισαγωγή μικρών παρεμβαλλόμενων RNAs (siRNAs) στα κύτταρα στόχους. Αυτά τα siRNAs είναι συμπληρωματικά με τα lncRNAs στόχους τους, που επάγουν την αποικοδόμηση τους στο σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing). Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η δραστηριότητα αυτών των μεταγραφών μειώνοντας τα επίπεδα τους [148]. Μια άλλη παρόμοια προσέγγιση βασίζεται στη χρήση μεγαλύτερων

αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων (ASOs). Αυτά τα μόρια είναι ολιγονουκλεοτίδια μιας μόνο αλυσίδας DNA που μπορούν να σχεδιαστούν γρήγορα με βάση την συμπληρωματικότητα τους με το RNA. Τα ASOs είναι ικανά να μειώνουν την έκφραση των lncRNAs που παραμένουν στον πυρήνα. Προσδένονται στον RNA στόχο τους λόγω συμπληρωματικότητας και επάγουν την τομή στο σημείο πρόσδεσης των αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων που μεσολαβείται από την RNάση H. Έτσι, οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής και μειωμένα επίπεδα lncRNA [156, 157]. Αντίθετα, η επαγωγή της έκφρασης των lncRNA μπορεί να γίνει μέσω των στρατηγικών της κοινής γονιδιακής θεραπείας [148].

Λιγότερο ανεπτυγμένη είναι η χρήση μικρών μορίων για τη στόχευση των lncRNAs. Η ανάπτυξη επιτυχημένων μορίων που προσδένονται στα lncRNAs με μεγάλη συγγένεια και ακρίβεια προϋποθέτει την ταυτοποίηση των σχετικών μοτίβων RNA με επαρκή δομική πολυπλοκότητα [158]. Η αναστολή των λειτουργικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των lncRNAs και των πρωτεϊνών αποτελεί μια επιθυμητή μορφή θεραπευτικής προοπτικής. Εναλλακτικά, συνθετικά μόρια που μιμούνται τη δομή και τις ικανότητες πρόσδεσης των lncRNAs μπορούν να δράσουν ως δολώματα συναγωνιζόμενα με τα lncRNAs για την πρόσδεση στις πρωτεΐνες και έτσι να παρεμβάλλονται στη λειτουργία τους [117].

Επιπλέον, εργαλεία που βασίζονται σε συστήματα CRISPR–Cas βρίσκονται ανάμεσα στα πλέον υποσχόμενα για την ακριβή ρύθμιση των lncRNAs. Οι διαφορετικές μορφές των τροποποιημένων μορίων CRISPR–Cas επιτρέπει την απώλεια (μέσω της χρήσης του CRISPR–Cas9)[159], την αναστολή (μέσω της χρήσης του CRISPRi) [22] ή την ενεργοποίηση (μέσω της χρήσης του CRISPRa) των γονιδίων που κωδικοποιούν lncRNA [160].

Τέλος, η αναστολή της ελεύθερης ανταλλαγής ncRNAs μεταξύ των καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής της παραγωγής εξωσωμάτων ή της παράδοσης των ncRNAs μπορεί να παρέχει μια θεραπευτική προοπτική για τους ασθενείς με καρκίνο. Κωδικοποιητικά RNAs που είναι παρόντα στα κύτταρα του όγκου εκφράζονται, επίσης, και στους φυσιολογικούς ιστούς. Έτσι αυτή η στρατηγική προϋποθέτει επιλεκτική στόχευση των καρκινικών κυττάρων, κάτι το οποίο μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χρήσης κατάλληλων συστημάτων παράδοσης, όπως νανοσωματίδια που περιέχουν τους παράγοντες στόχευσης των ncRNA και παρουσιάζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες στην επιφάνεια που αναγνωρίζουν αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο [147]. Ένα πλεονέκτημα της στόχευσης των lncRNAs είναι η αυξημένη καρκινοειδική τους έκφραση, ενώ η λειτουργική απομάκρυνση ενός lncRNA με ρυθμιστικό ρόλο μπορεί να έχει πλειοτροπικά αποτελέσματα, οδηγώντας σε ταυτόχρονη βλάβη πολλά μονοπάτια που σχετίζονται με τον όγκο [140]. Τέλος, ορισμένες προκλήσεις, όπως τα αποτυχημένα αποτελέσματα στον στόχο, ο τρόπος της στοχευμένης παράδοσης και η ενεργοποίηση ανοσολογικής απόκρισης (μέσω πρόσδεσης σε miRNAs και πρωτεΐνες) πρέπει να επιλυθούν προτού τα lncRNAs αυτά αξιοποιηθούν ευρέως στην κλινική πρακτική [140, 161].

1.5. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs, cRENA1 και cRENA2, τα οποία έχει βρεθεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ότι αποτελούν στόχους του μεταγραφικού παράγοντα CDX2. Απώτερος σκοπός της μελέτης αυτής είναι η ανίχνευση της επίδρασης των μεταγράφων αυτών στον γαστρικό καρκίνο αλλά και η μελέτη της προοπτικής χρήσης τους ως διαγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων. Η βιοπληροφορική ανάλυση

περιλάμβανε τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων αυτών σε δεδομένα προερχόμενα από βιοψίες ασθενών ενώ το πειραματικό μέρος την ανάλυση της έκφρασης τους στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου, τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους και τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής τους.

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1Βιοπληροφορικές αναλύσεις

2.1.1.Κατασκευή διαγραμμάτων box-plot και βιοστατιστική ανάλυση

Δημιουργήθηκαν διαγράμματα box-plot προκειμένου να συγκριθεί η έκφραση των cRENA1 (CDX2 regulated long non-coding RNA1) και cRENA2 σε δεδομένα μεταγραφομικής κυτταρικών σειρών, προκαρκινικών αλλοιώσεων και απομονωμένων εξωσωμάτων. Τα διαγράμματα αυτά κατασκευάστηκαν με τη βοήθεια του excel και τα δεδομένα απεικονίζονται σε λογαριθμική κλίμακα (log2). Στα δεδομένα αυτά πραγματοποιήθηκε επιπλέον βιοστατιστική ανάλυση για τη σύγκριση των δεδομένων και τον εντοπισμό των στατιστικά σημαντικών διαφορών με τη βοήθεια t-test. Η ανάλυση αυτή στόχευε στη σύγκριση της έκφρασης των cRENA1 και cRENA2 σε δεδομένα ασθενών με διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου, σε δεδομένα προκαρκινικών αλλοιώσεων και σε δεδομένα που αφορούν τα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου.

2.1.2.Κατασκευή διαγράμματος GEPIA

Η βάση δεδομένων GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, <http://gepia.cancer-pku.cn/>) χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των cRENA1 και cRENA2 σε επιλεγμένους τύπους καρκίνου έναντι του φυσιολογικού ιστού. Όλα τα δεδομένα που απεικονίζονται προέρχονται από την κοινοπραξία TCGA.

2.2.Πειραματικό μέρος

2.2.1. Απομόνωση RNA από κυτταρικές σειρές

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν διαλυμένα σε 1000μl τριζόλης (MRC) και παρέμειναν για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο, έγινε ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4°C και στις 14.000 rpm έτσι ώστε να διαχωριστεί η οργανική και η υδατική φάση. Έπειτα, έγινε λήψη του υπερκείμενου, στο οποίο περιέχεται το RNA, και μεταφορά του σε νέο Eppendorf tube. Ακολούθησε προσθήκη ισοπροπανόλης (σε αναλογία 1:1) και 3μl γλυκογόνου, παραμονή σε πάγο για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C και στις 14.000 rpm για να επιτευχθεί η καθίζηση του RNA. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, και έγινε πλύση με 500μl αιθανόλης 70% η οποία ακολουθήθηκε από φυγοκέντρηση στους 4°C και στις 14.000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και, τέλος, έγινε επαναδιάλυση σε 50μl νερού, θέρμανση για 5 λεπτά στους 65°C και ανάδευση με τη βοήθεια του vortex.

2.2.2. Επεξεργασία με DNAάση

Τα δείγματα με το RNA που απομονώθηκε στο προηγούμενο στάδιο επεξεργάστηκαν με DNAάση έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα πιθανά υπολείμματα γονιδιωματικού DNA. Η επεξεργασία με DNAάση πραγματοποιήθηκε σε 25μl δείγματος με απομονωμένα νουκλεϊκά οξέα. Σε κάθε ένα από τα δείγματα προστέθηκαν 3μl buffer, 1μl DNAάσης I (1U), 0,5μl RNaseout και 0,5μl H₂O και έγινε ανάδευση τους με vortex. Έπειτα έγινε επώαση τους για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37°C. Ακολούθησε προσθήκη 40μl sodium acetate και 330μl H₂O. Έπειτα προστέθηκαν 400μl φαινόλης/ χλωροφόρμιου/ ισομηλικής αλκοόλης (σε αναλογία 25:24:1, από την AppliCem) πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4°C και στις 14000rpm. Το βήμα αυτό στόχευε στον διαχωρισμό των φάσεων και την παραμονή του RNA στην υδατική φάση. Έτσι, το υπερκείμενο με το περιεχόμενο RNA παραλήφθηκε και μεταφέρθηκε σε νέο Eppendorf tube. Ακολούθησε προσθήκη 1000μl αιθανόλης, απαλή ανακίνηση, παραμονή των δειγμάτων για 1 ώρα στους -80°C και φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στους 4°C και στις 14000rpm, για να επιτευχθεί η καθίζηση του RNA. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70%. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στους 4°C και στις 14000rpm. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε πλήρως, οι πελέτες επαναδιαλύθηκαν σε 25μl H₂O. Τέλος, τα δείγματα θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 65°C και αναδεύτηκαν με τη βοήθεια vortex.

2.2.3. Σύνθεση cDNA

Αρχικά έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος στη συσκευή Quawell προκειμένου να γίνει κατάλληλη συμπλήρωση με H₂O ώστε κάθε δείγμα να περιέχει συνολικά 100ng απομονωμένου RNA. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 1μl oligodT primers και 1μl dNTPs και ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5 λεπτά. Μετά την επώαση τα δείγματα αναδεύτηκαν και προστέθηκαν 4μl buffer, 2μl DTT, 0,5μl RNaseout και 0,5μl MMLV (200 U/μl). Έπειτα έγινε ξανά ανάδευση και επώαση για 2 ώρες στους 37°C. Τέλος, προστέθηκαν 380μl H₂O και τα δείγματα μπορούσαν να αποθηκευτούν στους -20°.

2.2.4. qPCR

Στις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση με τη χρήση της qPCR. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η προέλευση της καθεμίας φαίνεται στον πίνακα.

Όνομα κυτταρικής σειράς	Τύπος καρκινικής σειράς
HFE	αθανατοποιημένα φυσιολογικά γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα
AGS	γαστρικά καρκινικά από πρωτεύοντα όγκο
KATO II	γαστρικά καρκινικά κύτταρα από παραγαστρικούς λεμφαδένες
NUGC4	γαστρικά καρκινικά κύτταρα από απομακρυσμένους λεμφαδένες

MKN45	γαστρικά μεταστατικά καρκινικά κύτταρα στο ήπαρ
HT29	καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου
HCT116	καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου
LS174	καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου
HEPG2	καρκινικά κύτταρα ήπατος
MCF7	καρκινικά κύτταρα μαστού
SKBR3	καρκινικά κύτταρα μαστού
HELA	καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας

Πίνακας 1. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR και η προέλευση της κάθε μίας.

2.2.1. Πέψη πλασμιδιακού φορέα pLL3 για τη δημιουργία θέσης ενσωμάτωσης του ενθέματος

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαδοχική πέψη του πλασμιδιακού φορέα pLL3 με τα ένζυμα περιορισμού HpaI και SmaI έτσι ώστε να δημιουργηθεί θέση ενσωμάτωσης των επιθυμητών ενθεμάτων. Ως πρώτο βήμα έγιναν δύο αντιδράσεις πέψης που περιείχαν τα παρακάτω συστατικά όπως αναγράφονται στον **πίνακα 1**. Η αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν για χρονικό διάστημα 3,5 ωρών στους 37°C

	Αντίδραση 1 (συστατικά σε μl)	Αντίδραση 2 (συστατικά σε μl)
Buffer (EQ) (enzyquest)	5	5
HpaI (10 U/μl)	1	-
SmaI (10 U/μl)	-	1
Template (pLL3) (1000ng)	0,5	0,5
WFI	43,5	43,5

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια πρώτης εκ των δύο αντιδράσεων της σταυρωτής πέψης με τα ένζυμα περιορισμού HpaI και SmaI.

Στη συνέχεια, οι παραπάνω αντιδράσεις ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης συγκέντρωσης 1% στα 130V. Ακολούθησε τομή του τμήματος του gel που περιείχε τον φορέα και απομόνωσή του με τη χρήση του kit PureLink της Invitrogen. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε δεύτερη αντίδραση πέψης με τη χρήση του 2^{ου} ενζύμου περιορισμού. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον **πίνακα 2** και η διάρκεια της ήταν 3,5 ώρες στους 37°C.

	Αντίδραση 1 (συστατικά σε μl)	Αντίδραση 2 (συστατικά σε μl)
Buffer (EQ) (enzquest)	6	6
HpaI (10 U/μl)	-	1
SlaI (10 U/μl)	1	-
Template (pLL3) (αυτό που πήρα από το βήμα 4) (1000ng)	50	50
WFI	3	3

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια δεύτερης αντίδρασης της σταυρωτής πέψης με τα ένζυμα περιορισμού HpaI και SlaI.

Το τελευταίο βήμα της κατασκευής του φορέα κατάλληλου για την ένθεση ήταν ο καθαρισμός του με φαινόλη, χλωροφόρμιο όπως περιγράφηκε και παραπάνω.

2.2.1. Υβριδισμός αντιπαράλληλων αλληλουχιών και κλωνοποίηση σε φορέα pLL3

Τα shRNA σχεδιάστηκαν με βάση τον αλγόριθμο της Dharmacon σαν νοηματικά και μη νοηματικά ολιγονουκλεοτίδια (ssDNA). Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά αντιστοιχούν στα cRENA1 και cRENA2 καθώς και σε ένα που αναγνωρίζει και τα δύο μετάγραφα. Τα ssDNA υβριδοποιήθηκαν προκειμένου να παράγουν dsDNA που αντιστοιχεί στα shRNA που στοχεύουν τα παραπάνω μετάγραφα. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε με ανάμιξη των νοηματικών και αντινοηματικών ολιγονουκλεοτιδίων (2μl από το καθένα) και παρουσία 96μl annealing buffer (100mM KOAc, 30mM HEPES, 2mM MgAc). Αρχικά έγινε επώαση τους σε θερμοκρασία βρασμού για 5 λεπτά προκειμένου να αποδιαταχθούν οι δίκλωνες διαμορφώσεις και έπειτα αφέθηκαν να κρυώσουν για περίπου 1 ώρα έτσι ώστε να ενωθούν οι νοηματικοί με τους αντινοηματικούς κλώνους. Μετά τον υβριδισμό τα δίκλινα μόρια DNA χρησιμοποιήθηκαν ως ένθεμα στον μη τροποποιημένο φορέα pLL3 σε αντίδραση λιγάσης. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε είχε άκρα κομμένα με HpaI και SlaI. Η αντίδραση λιγάσης (T4 DNA λιγάση) πραγματοποιήθηκε στους 16°C για χρονικό διάστημα 16 ωρών με βάση τις οδηγίες του παρόχου (New England Biolabs) και είχε σύσταση:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
10X T4 DNA ligase buffer (NEB)	2
T4 DNA ligase (NEB) (40 U/μl)	1
Ένθεμα (4μM annealed oligos)	10
Φορέας pLL3(58,3 ng/μl)	1
ddH ₂ O	6

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της ενσωμάτωσης του επιθυμητού ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα με αντίδραση λιγάσης.

2.2.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (transformation)

Βακτήρια του στελέχους DH5a τα οποία έχουν γίνει δεκτικά σε χημικό μετασχηματισμό (φυλάσσονται στους -80°C, παρουσία transformation buffer) χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό με το επιθυμητό πλασμίδιο. Συγκεκριμένα, 20μl πλασμιδίου με ένθεμα από την αντίδραση λιγάσης προστέθηκαν σε 200μl δεκτικών βακτηρίων. Τα βακτήρια παρέμειναν για χρονικό διάστημα 20 λεπτών στον πάγο. Σε αυτό το χρονικό διάστημα παρέχεται η ευκαιρία ώστε τα πλασμίδια να έρθουν κοντά με τις πλασματικές μεμβράνες (με τη βοήθεια του transformation buffer). Ακολούθησε θέρμανση τους στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα προκειμένου να δημιουργηθούν οπές που θα επιτρέψουν την είσοδο του πλασμιδίου στο εσωτερικό της μεμβράνης. Έπειτα τα βακτήρια παρέμειναν για 2 λεπτά στον πάγο για να κλείσουν οι οπές της μεμβράνης. Προστέθηκε θρεπτικό υλικό (LB) μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 800μl και τα βακτήρια μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα ώστε να γίνει επώαση τους στους 37°C για 50 λεπτά. Μετά την επώαση τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τριβλίο παρουσία αμπικιλίνης 100μg/ml, το οποίο είχε τοποθετηθεί σε θάλαμο επώασης στους 30°C, και ακολούθησε επώαση τους στους 30°C για 16 ώρες.

2.2.3. Απομόνωση καλλιιεργειών

Από τα τριβλία απομονώθηκαν μοναδιαίες αποικίες οι οποίες μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υλικό με κατάλληλο αντιβιοτικό (υγρό θρεπτικό υλικό LB με αμπικιλίνη). Η επώασή τους έγινε στους 30°C και στις 210 στροφές για 16 ώρες.

2.2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini preps)

Αρχικά, 1-1,5ml της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε erpendorf tubes και φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στους 4°C και στις 11.000 στροφές. Το υποκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 100μl buffer I (50mM Tris, 10mM EDTA, 100μg/ml RNAάση A) για επαναδιάλυση του ιζήματος. Ακολούθησε ανάδευση, προστέθηκε buffer II (1% SDS, 0,2M NaOH), έγινε απαλή ανακίνηση έτσι ώστε να επιτευχθεί αλκαλική λύση των κυττάρων και δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Έπειτα προστέθηκε buffer III (3M potassium Asc, pH 5,5) και έγινε απαλή ανακίνηση. Η προσθήκη αυτού του διαλύματος οδηγεί στην παύση της λύσης

των κυττάρων και σε επαναφορά του ουδέτερου pH. Στη συνέχεια ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων σε πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C και στις 11.000 στροφές ώστε να καθιζάνουν τα κυτταρικά υπολείμματα και να παραμείνει το πλασμίδιο στο υπερκείμενο. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο ανακτήθηκε σε ξεχωριστό ependorf tube στο οποίο στη συνέχεια προστέθηκε αιθανόλη (100%) ώστε να προκληθεί καθίζηση του DNA. Ακολούθως, τα δείγματα παρέμειναν για 20 λεπτά στους -80°C και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C και στις 11.000 στροφές για 20 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύση με 70% αιθανόλης προκειμένου να μπορέσει να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη και να μην καταστείλει τις αντιδράσεις που ακολούθησαν. Έγινε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4°C και στις 11.000 στροφές και διατηρήθηκε το ίζημα με το πλασμίδιο. Στη συνέχεια έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος σε νερό και θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά ώστε να διαλυθεί το ίζημα.

2.2.5. PCR και ηλεκτροφόρηση

Τα shcRENA1, shcRENA2, shcRENA1/2 αλλά και οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύθηκαν με PCR. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φορέας που αφέθηκε να κλείσει χωρίς να λάβει ένθεμα και ως θετικός μάρτυρας φορέας που περιείχε shRNA για το KLF5. Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 50μl και περιείχε:

	Όγκος (μl)
Kappa taq (Kappa biosystems)	0,25
Kappa taq buffer	5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
Template	1
dNTPs	1
ddH ₂ O	40,75

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος με PCR.

Το template DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν αραιωμένο σε αναλογία 1:30 και οι primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι PLB unmod screen F1 και R1.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR είναι οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη	95° C	3:00
Αποδιάταξη	95° C	0:10
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	0:15

Επιμήκυνση προϊόντος	72°C	0:30
Τελική επιμήκυνση	72°C	2:00

Πίνακας 6. Συνθήκες της PCR.

Για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων διενεργήθηκαν 25 κύκλοι.

Τέλος, η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που ενισχύθηκαν με PCR πραγματοποιήθηκε σε gel αγαρόζης συγκέντρωσης 2% στα 130V. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε self-ligation του πλασμιδίου pLL3 και ως θετικός μάρτυρας pLL3 με ένθεμα KLF5. Η εμφάνιση του ηλεκτώματος αγαρόζης έγινε με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου και UV.

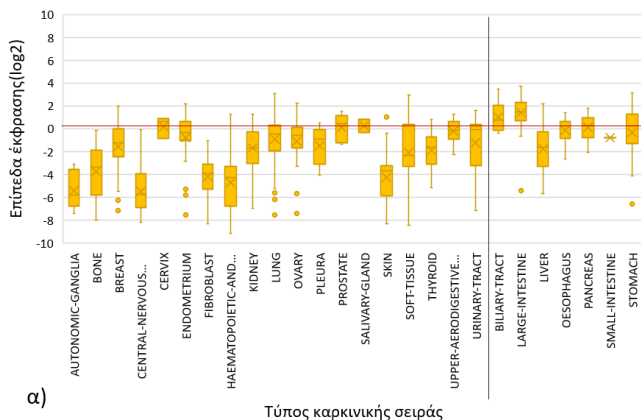
3. Αποτελέσματα-Σχολιασμός αποτελεσμάτων

3.1. Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης

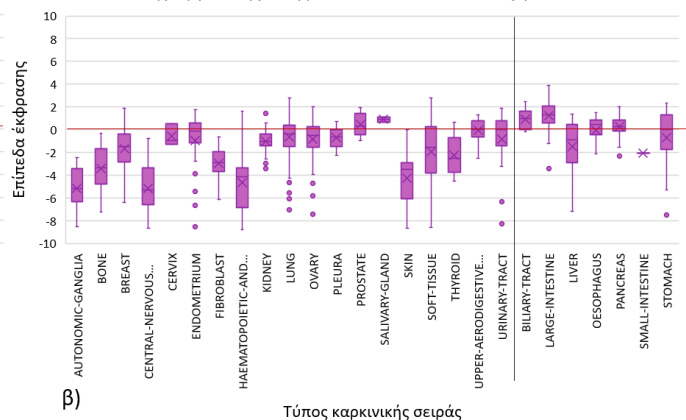
3.1.1. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των cRENA1 και cRENA2

Το πρώτο στάδιο της βιοπληροφορικής ανάλυσης αποτέλεσε η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των cRENA1 και cRENA2 σε ένα πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η μελέτη αυτή έγινε για τη σύγκριση της έκφρασης των μη κωδικοποιητικών RNA cRENA1 και cRENA2 προκειμένου να εξακριβωθεί αν η έκφραση τους μεταβάλλεται στους διάφορους τύπους καρκίνου, και ειδικότερα στον γαστρικό καρκίνο, συγκριτικά με τους υπόλοιπους τύπους καρκίνου. Έτσι, αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση των δύο αυτών lncRNAs σε ένα πλήθος κυτταρικών σειρών που αφορούσαν τόσο γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου όσο και καρκίνους διαφορετικού τύπου. Τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν με τη μορφή διαγραμμάτων box plot και παρουσιάζονται στην **εικόνα 6**.

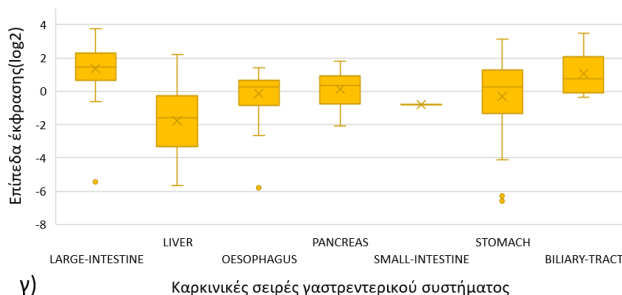
Διάγραμμα έκφρασης του cRENA1 ανά ιστό/όργανο



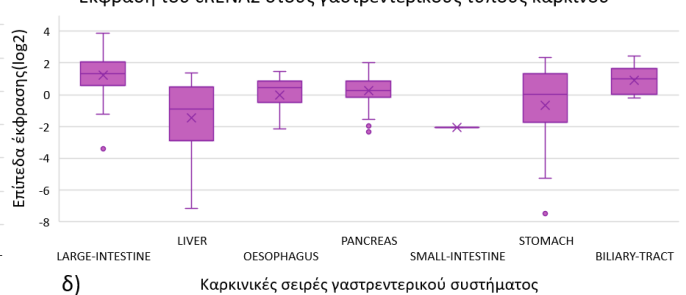
Διάγραμμα έκφρασης του cRENA2 ανά ιστό/όργανο



Έκφραση του cRENA1 στους γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου



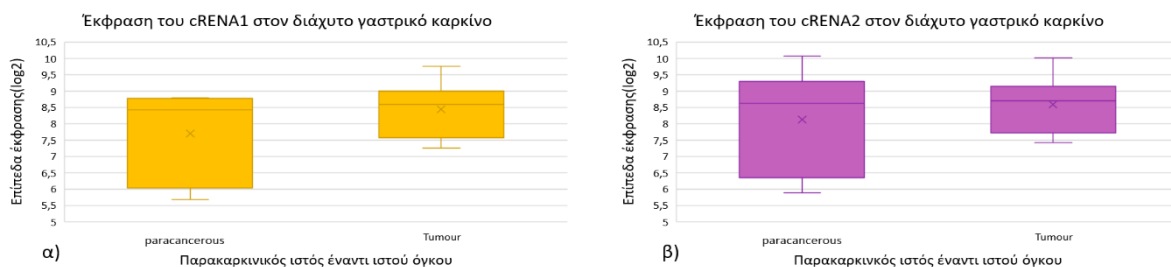
Έκφραση του cRENA2 στους γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου



Εικόνα 6. Διαγράμματα έκφρασης (box plot) των cRENA1 και cRENA2 σε πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών (α,β) και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που αφορούν τύπους γαστρεντερικού καρκίνου(γ,δ). Σε όλα τα διαγράμματα στον άξονα x παρουσιάζονται οι τύποι των κυτταρικών σειρών και στον άξονα y φαίνονται τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης (\log_2) των αντίστοιχων lncRNAs. Στο box plot (α) φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του cRENA1 ανά καρκινική κυτταρική σειρά και στο (γ) τα επίπεδα έκφρασης του στις καρκινικές κυτταρικές σειρές γαστρεντερικού τύπου. Αντίστοιχα, στο box plot (β) φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του cRENA2 ανά καρκινική κυτταρική σειρά και στο (δ) τα επίπεδα έκφρασης του στις γαστρεντερικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η οριζόντια κόκκινη γραμμή ταυτίζεται με το επίπεδο της μέσης έκφρασης του αντίστοιχου lncRNA στις κυτταρικές σειρές του γαστρικού καρκίνου ενώ η κάθετη μαύρη γραμμή διαχωρίζει τις κυτταρικές σειρές που αφορούν γαστρεντερικού τύπου καρκίνου από τις υπόλοιπες.

Σύμφωνα με το διάγραμμα (α) της **εικόνας 6**, η έκφραση του cRENA1 φαίνεται μειωμένη στις περισσότερες καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με την μέση έκφραση του στην κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τον γαστρικό καρκίνο. Μια αυξημένη έκφραση σε σχέση με το σύνολο των ιστών παρατηρείται στις καρκινικές σειρές που σχετίζονται με τους γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου, με σημαντικότερη αύξηση στην καρκινική κυτταρική σειρά της χολικής οδού και του παχέος εντέρου. Αντίστοιχη εικόνα παρατηρείται και για το cRENA2, για το οποίο η έκφραση του φαίνεται επίσης να είναι αυξημένη στις κυτταρικές σειρές των γαστρεντερικών τύπων καρκίνου σε σχέση με τις υπόλοιπες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το cRENA1 και το cRENA2 μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στους καρκίνους γαστρεντερικού τύπου.

Το επόμενο στάδιο ήταν η μελέτη της έκφρασης των cRENA1 και cRENA2 στον διάχυτο υπότυπο γαστρικού καρκίνου, καθώς ο συγκεκριμένος υπότυπος εμφανίζεται σε νεαρότερες ηλικίες και χαρακτηρίζεται από σημαντική επιθετικότητα. Τα διαγράμματα στα οποία απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης των δύο αυτών κωδικοποιητικών RNA τόσο στον παρακαρκινικό όσο και στον καρκινικό ιστό φαίνονται στην **εικόνα 7**. Στην ίδια εικόνα, φαίνονται και τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από τη σύγκριση της έκφρασης του καθενός lncRNA στον παρακαρκινικό ιστό και στον ιστό που προερχόταν από τον διάχυτο γαστρικό υπότυπο. Η σύγκριση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του t-test και τα αποτελέσματα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν αντιστοιχισμένα δεδομένα καρκινικού-παρακαρκινικού ιστού από τους ίδιους ασθενείς.



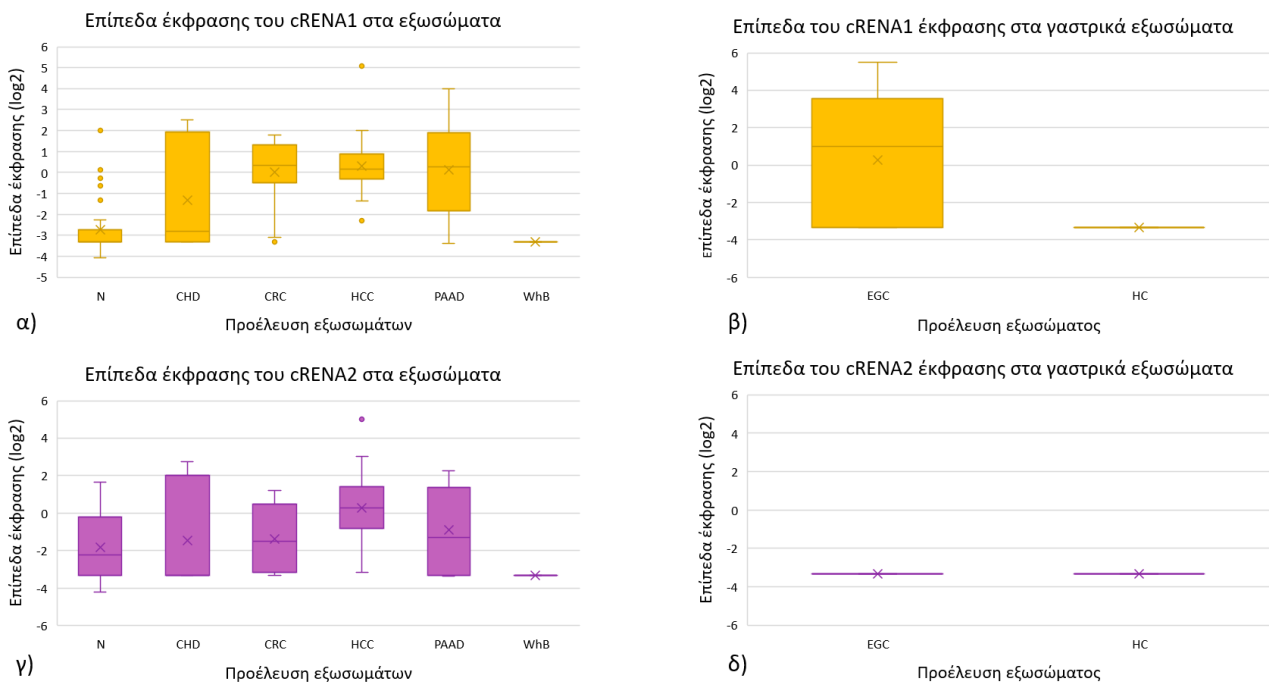
γ)

Σύγκριση (t-test) έκφρασης στον παρακαρκινικό ιστό έναντι του καρκινικού	
cRENA1	0,30750698
cRENA2	0,5487981

Εικόνα 7. Διαγράμματα έκφρασης με μορφή box plot των επιπέδων έκφρασης των cRENA1 (α) και cRENA2 (β) σε παρακαρκινικό έναντι καρκινικού ιστού διάχυτου υπότυπου. Στον άξονα x φαίνεται ο τύπος του ιστού ενώ στον άξονα y τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης του αντίστοιχου lncRNA (\log_2). Επιπλέον παρουσιάζεται με τη μορφή πίνακα (γ) η σύγκριση της έκφρασης του καθενός lncRNA στον παρακαρκινικό ιστό έναντι του ιστού του όγκου. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν σε δείγματα παρακαρκινικών και καρκινικών ιστών από τους ίδιους ασθενείς.

Η σύγκριση αυτή της έκφρασης των cRENA1 και cRENA2 δεν έδειξε διαφορά στατιστικώς σημαντική μεταξύ των δύο καταστάσεων για κανένα από τα δύο αυτά lncRNAs. Έτσι, η χρήση των δύο αυτών μη κωδικοποιητικών RNA για διαγνωστικούς σκοπούς καθίσταται δύσκολη όσον αφορά τον διάχυτο τύπο καρκίνου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά της σύγκρισης επηρεάζονται από την μεγάλη ετερογένεια των προκαρκινικών δειγμάτων. Η ετερογένεια αυτή μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση των δειγμάτων με καρκινικό ιστό ή σε παρουσία των μη κωδικοποιητικών αυτών μεταγράφων στο μικροπεριβάλλον του όγκου.

Έπειτα, ακολούθησε η μελέτη της έκφρασης των cRENA1 και cRENA2 στα εξωσώματα φυσιολογικών ατόμων, ασθενών με στεφανιαία νόσο (μη καρκινικός μάρτυρας) και ασθενών με γαστρεντερικό τύπο καρκίνου, καθώς τα εξωσώματα μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στη διάγνωση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση τους και στα εξωσώματα ασθενών με εκτεταμένη εντερική μεταπλασία έναντι των εξωσωμάτων που προέρχονταν από φυσιολογικά άτομα. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων φαίνονται στην **εικόνα 8**.

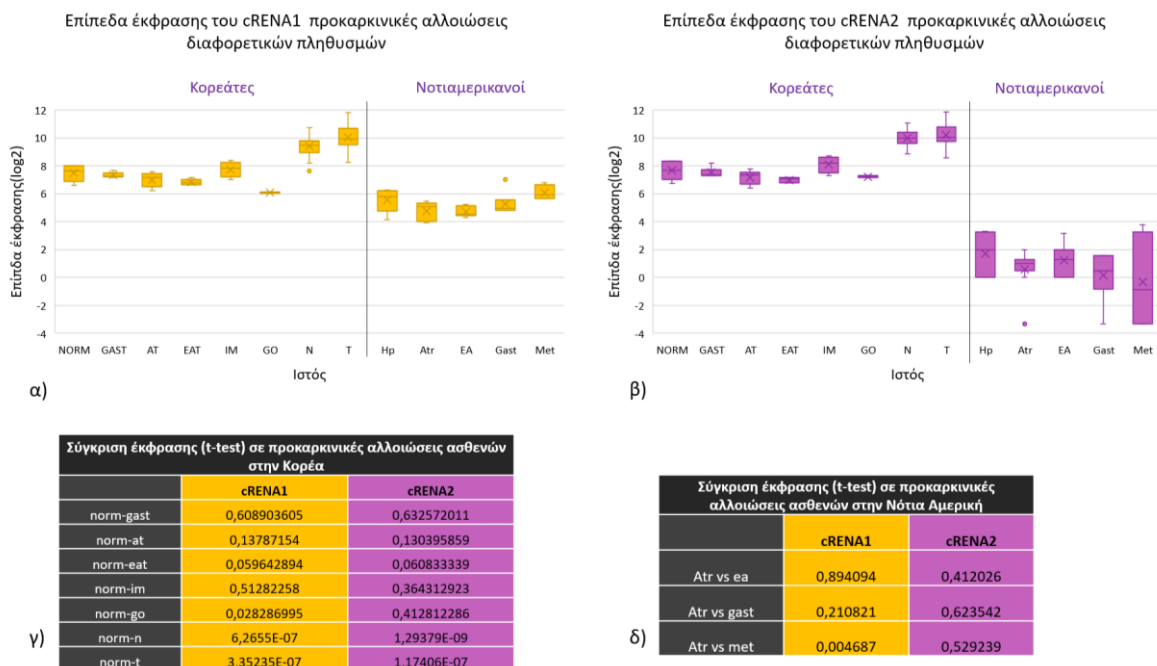


Εικόνα 8. Διαγράμματα box plot που παρουσιάζονται τα επίπεδα των cRENA1 (α, β) και cRENA2 (γ, δ) σε εξωσώματα απομονωμένα από ασθενείς και σε συνολικό δείγμα αίματος (αριστερά) και σε γαστρικά εξωσώματα (δεξιά). Στον άξονα x όλων των διαγραμμάτων φαίνεται η προέλευση των εξωσωμάτων και στον άξονα y τα λογαριθμημένα (\log_2) επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων lncRNAs σε αυτά. Για τα (α) και (γ): N=φυσιολογικά εξωσώματα, CHD= εξωσώματα ασθενών με στεφανιαία νόσο, CRC= εξωσώματα ασθενών με γαστρεντερικό τύπο καρκίνου, HCC=εξωσώματα αθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο, PAAD=εξωσώματα ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, WhB=ολικό δείγμα

αίματος. Για τα (β) και (δ): EGC=εξωσώματα υψηλού βαθμού εντερικής νεοπλασίας, HC=φυσιολογικά εξωσώματα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα (α) η έκφραση του cRENA1 φαίνεται να είναι αυξημένη στα εξωσώματα που προέρχονται από ασθενείς με γαστρεντερικό τύπο καρκίνου σε σχέση με τα εξωσώματα που απομονώθηκαν από υγιείς ανθρώπους. Η έκφραση του απουσιάζει από το ολικό δείγμα αίματος. Επιπλέον, σύμφωνα με το διάγραμμα (β) η έκφραση του cRENA1 παρουσιάζεται εμφανώς αυξημένη στα εξωσώματα που απομονώθηκαν από ασθενείς με υψηλού βαθμού εντερική νεοπλασία σχετικά με τα φυσιολογικά εξωσώματα. Όσον αφορά το cRENA2, η έκφραση του παρουσιάζεται ελαφρώς αυξημένη στα εξωσώματα των ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο σε σχέση με τα υπόλοιπα εξωσώματα που μελετήθηκαν. Η έκφραση και αυτού του μη κωδικοποιητικού μεταγράφου απουσιάζει από το ολικό δείγμα αίματος. Η έκφραση του, σε αντίθεση με το cRENA1, απουσιάζει και από τα εξωσώματα που απομονώθηκαν από ασθενείς με υψηλού βαθμού εντερική νεοπλασία.

Έπειτα μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των δυο αυτών μη κωδικοποιητικών RNA στις προκαρκινικές αλλοιώσεις που εκδηλώνονται πριν την εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου. Η μελέτη των προκαρκινικών αλλοιώσεων πραγματοποιήθηκε με δεδομένα που αφορούσαν δύο διαφορετικούς πληθυσμούς, του Κορεάτες και τους Νοτιοαμερικανούς με αυξημένα ποσοστά εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Για τους Κορεάτες η έκφραση των cRENA1 και cRENA2 ελέγχθηκε και στα γαστρικά οργανοειδή. Όσον αφορά τους Κορεάτες, τα επίπεδα έκφρασης και των δύο μη κωδικοποιητικών RNAs συγκρίθηκαν με τη χρήση του t-test στο φυσιολογικό ιστό έναντι των διάφορων προκαρκινικών αλλοιώσεων που μελετήθηκαν. Για τους Νοτιοαμερικανούς, η αντίστοιχη σύγκριση έγινε για την ατροφία έναντι των υπόλοιπων προκαρκινικών αλλοιώσεων. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων παρουσιάζονται στην **εικόνα 9**.



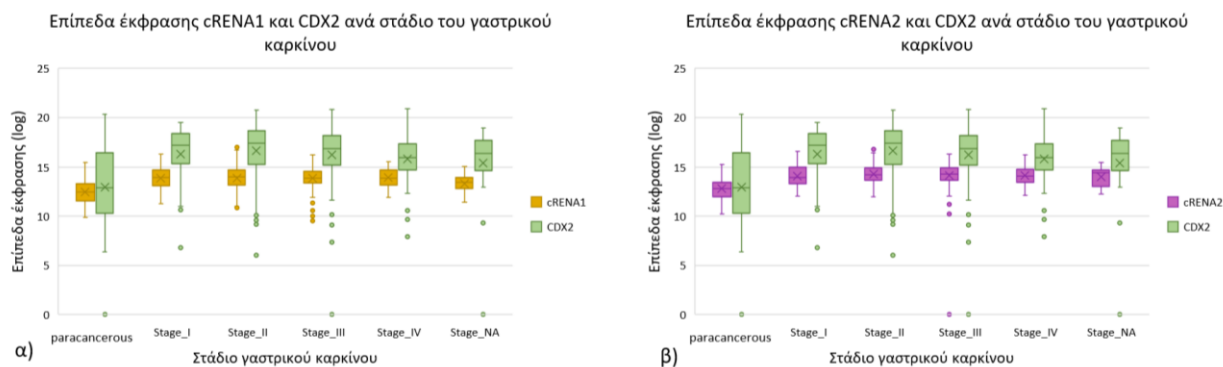
Εικόνα 9. Διαγράμματα box plot που παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης των cRENA1 (α) και cRENA2 (β) σε προκαρκινικές αλλοιώσεις του γαστρικού καρκίνου σε πληθυσμούς της Κορέας και της

Νότιας Αμερικής (SA). Στον άξονα x φαίνεται οι τύποι των προκαρκινικών αλλοιώσεων χωρισμένοι για τους δύο πληθυσμούς και στον άξονα y τα λογαριθμημένα (\log_2) επίπεδα έκφρασης του αντίστοιχου lncRNA. Η μαύρη κάθετη γραμμή διαχωρίζει τις προκαρκινικές αλλοιώσεις που μελετήθηκαν στους Κορεάτες(αριστερά) από αυτές που μελετήθηκαν στο Νοτιοαμερικανούς (δεξιά). Επιπλέον, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης της έκφρασης του κάθε μη κωδικοποιητικού RNA στις προκαρκινικές αλλοιώσεις σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς ατόμων που διενεργήθηκε με τη βοήθεια t-test. Ο πίνακας (γ) αφορά τους Κορεάτες και η σύγκριση γίνεται για τα επίπεδα έκφρασης του κάθε lncRNA στο φυσιολογικό ιστό έναντι των διάφορων προκαρκινικών αλλοιώσεων και ο πίνακας (δ) τους Νοτιοαμερικανούς και η σύγκριση πραγματοποιείται για τα επίπεδα έκφρασης στην ατροφία έναντι των υπόλοιπων προκαρκινικών αλλοιώσεων. Για τους Κορεάτες: NORM=φυσιολογικός ιστός, GAST=γαστρίτιδα, AT=ατροφία, EAT=εκτεταμένη ατροφία, IM=εντερική μεταπλασία, GO=γαστρικά οργανοειδή, N=γαστρικός παρακαρκινικός ιστός, T=γαστρικός όγκος. Για τους Νοτιοαμερικανούς: Hr=φυσιολογικός ιστός, Atr=ατροφία, EA=εκτεταμένη ατροφία, Gast=γαστρίτιδα, Met=εντερική μεταπλασία.

Η έκφραση του cRENA1 παρουσιάζεται αυξημένη στις προκαρκινικές αλλοιώσεις αλλά και στον φυσιολογικό ιστό των Κορεατών. Η διαφορά της έκφρασής του μεταξύ του φυσιολογικού ιστού και των προκαρκινικών αλλοιώσεων δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Ωστόσο, μια μεγαλύτερη αύξηση, στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την έκφραση στον φυσιολογικό ιστό, παρατηρείται στον γαστρικό παρακαρκινικό ιστό και στους γαστρικούς όγκους των Κορεατών. Αντίστοιχη εικόνα με το cRENA1 παρουσιάζει και το cRENA2, του οποίου η έκφραση παρουσιάζεται αυξημένη στατιστικώς σημαντικά στον γαστρικό παρακαρκινικό και καρκινικό ιστό των Κορεατών συγκριτικά με την έκφραση του στον φυσιολογικό ιστό. Όσον αφορά τους Νοτιοαμερικανούς, η έκφραση του cRENA1 παρουσιάζει μια αυξητική τάση κατά την πρόοδο της ασθένειας με την κορύφωση της στην εντερική μεταπλασία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύγκριση της έκφρασης στην ατροφία έναντι των υπόλοιπων προκαρκινικών αλλοιώσεων έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά έκφρασης μόνο στην εντερική μεταπλασία. Διαφορετική όμως είναι η έκφραση του cRENA2 στους Νοτιοαμερικανούς, όπου παρατηρείται μεγάλη παραλλακτικότητα στην έκφρασή του ενώ λείπει η αυξητική τάση που ανιχνεύεται στο cRENA1. Ακόμη, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του στην ατροφία έναντι των υπόλοιπων προκαρκινικών αλλοιώσεων δεν έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα επίπεδα έκφρασης του cRENA2 παρουσιάζονται σημαντικά χαμηλότερα στους Νοτιοαμερικανούς σε σχέση με τους Κορεάτες σε όλους τους τύπους προκαρκινικών αλλοιώσεων, ενώ η διαφορά αυτή είναι μικρότερη όσον αφορά το cRENA1. Συνολικά, η έκφραση και του cRENA1 και του cRENA2 παρατηρείται πιο αυξημένη στους Κορεάτες σε σχέση με τους Νοτιοαμερικανούς.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση των μη κωδικοποιητικών αυτών RNAs στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου. Το στάδιο I αναφέρεται στον πρωτεύοντα όγκο ο οποίος δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη σε μεγάλο βαθμό, το στάδιο II αναφέρεται σε μεγαλύτερο πρωτεύοντα όγκο ο οποίος όμως δεν έχει εξαπλωθεί, το στάδιο III αναφέρεται σε πιο ανεπτυγμένο όγκο ο οποίος μπορεί να έχει διεισδύσει στους γειτονικούς ιστούς και λεμφαδένες, το στάδιο IV αναφέρεται στον καρκινικό όγκο που έχει παρουσιάσει μετάσταση σε τουλάχιστον ένα ακόμη όργανο του σώματος και, τέλος, το στάδιο NA αναφέρεται στους όγκους που δεν μπορούν να ταξινομηθούν ιστολογικά. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από RNA-seq και τα διαγράμματα που απεικονίζουν τα επίπεδα έκφρασης των cRENA1 και cRENA2 καθώς και τα αποτελέσματα του t-test που εφαρμόστηκε για τη σύγκριση

της έκφρασης στον παρακαρκινικό ιστό έναντι των διάφορων σταδίων του γαστρικού καρκίνου φαίνονται στην **εικόνα 10**. Επιπλέον, στα διαγράμματα απεικονίζονται και τα επίπεδα του CDX2 σε κάθε στάδιο της νόσου.



γ)

Σύγκριση έκφρασης των δύο lncRNAs στον παρακαρκινικό ιστό έναντι των διαφόρων σταδίων του γαστρικού καρκίνου		
	cRNA1	cRNA2
Paracancerous vs stage I	5,27315E-07	7,10153E-06
Paracancerous vs stage II	3,2455E-08	7,33783E-11
Paracancerous vs stage III	1,42954E-10	6,50593E-06
Paracancerous vs stage IV	4,49544E-07	7,09533E-06
Paracancerous vs stage NA	0,009001654	0,000374855

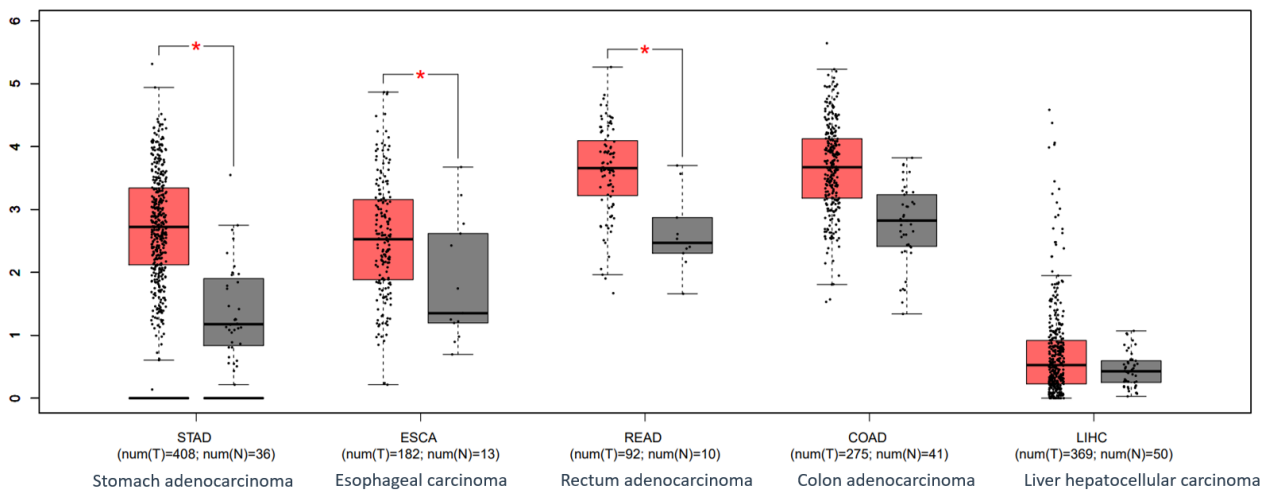
Εικόνα 10. Διαγράμματα box plot που παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης των cRNA1 (α) και cRNA2 (β) καθώς και των αντίστοιχων επιπέδων του CDX2 στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου και στον παρακαρκινικό ιστό. Στον άξονα x φαίνεται το στάδιο της ασθένειας ενώ στον άξονα γ τα λογαριθμημένα (log₂) επίπεδα έκφρασης του αντίστοιχου lncRNA. Στον πίνακα (γ) γίνεται σύγκριση, με τη χρήση του t-test, της έκφρασης του κάθε μη κωδικοποιητικού RNA στον παρακαρκινικό ιστό έναντι του κάθε σταδίου του γαστρικού καρκίνου.

Σύμφωνα με τα box-plots της **εικόνας 10**, η έκφραση του CDX2 φαίνεται να εμφανίζει μεγάλη παραλλακτικότητα στον παρακαρκινικό ιστό. Η έκφραση τόσο του cRNA1 όσο και του cRNA2 φαίνεται αυξημένη στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου σε σχέση με τον παρακαρκινικό ιστό. Επιπλέον, η έκφραση των μη κωδικοποιητικών αυτών RNAs φαίνεται να αυξάνεται από το πρώτο στάδιο του καρκίνου και να διατηρείται αυξημένη και για τα επόμενα στάδια. Το γεγονός αυτό καθιστά τα δύο αυτά lncRNAs υποσχόμενους βιοδείκτες για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου από τα αρχικά του ακόμα στάδια. Ωστόσο, λόγω των ομοιόμορφα υψηλών επιπέδων έκφρασης στα διάφορα στάδια της ασθένειας η χρήση τους για τη σταδιοποίηση της ασθένειας καθίσταται μη δυνατή.

3.1.2. Διαγράμματα με τη χρήση της βάσης δεδομένων GEPIA

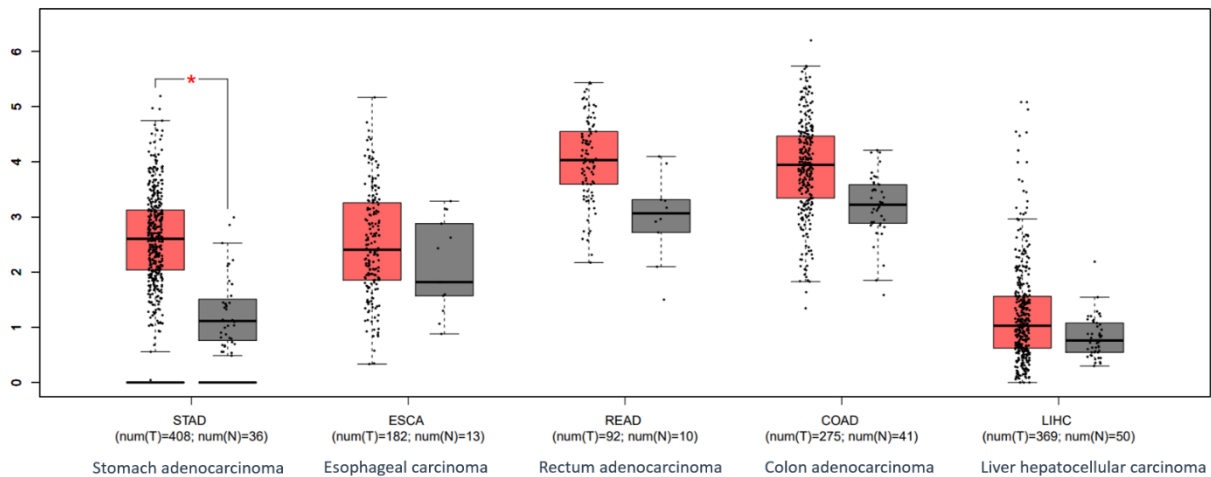
Τέλος, έγινε ανάλυση της έκφρασης τόσο του cRNA1 όσο και του cRNA2 στη βάση δεδομένων GEPIA. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη βάση

δεδομένων TCGA και αφορούν το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, τον καρκίνο του οισοφάγου, τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, το αδενοκαρκίνωμα του ορθού και το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Τα διαγράμματα box plots στα οποία απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του cRENA1 και του cRENA2 τόσο στον κάθε τύπο καρκίνου όσο και στον αντίστοιχο παρακαρκινικό ιστό φαίνονται στην **εικόνα 11.** και **εικόνα 12.** αντίστοιχα.



Εικόνα 11. Διαγράμματα box plot που παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του cRENA1 σε πέντε γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου. Στον άξονα x φαίνεται ο τύπος του καρκίνου και στον άξονα y τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA αυτού. Συγκεκριμένα, η έκφραση στον καρκινικό ιστό φαίνεται με κόκκινο και η έκφραση στον αντίστοιχο παρακαρκινικό ιστό με γκρι (TCGA). STAD=γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, ESCA=καρκίνος του οισοφάγου, READ=αδενοκαρκίνωμα του ορθού, COAD=αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, LIHC=ηπατοκυτταρικός καρκίνος.

Όπως φαίνεται, η έκφραση του cRENA1 είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στον καρκίνο του οισοφάγου, στο αδενοκαρκίνωμα του ορθού αλλά και στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Αντιθέτως η έκφρασή του δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο σε σχέση με τους αντίστοιχους παρακαρκινικούς ιστούς.



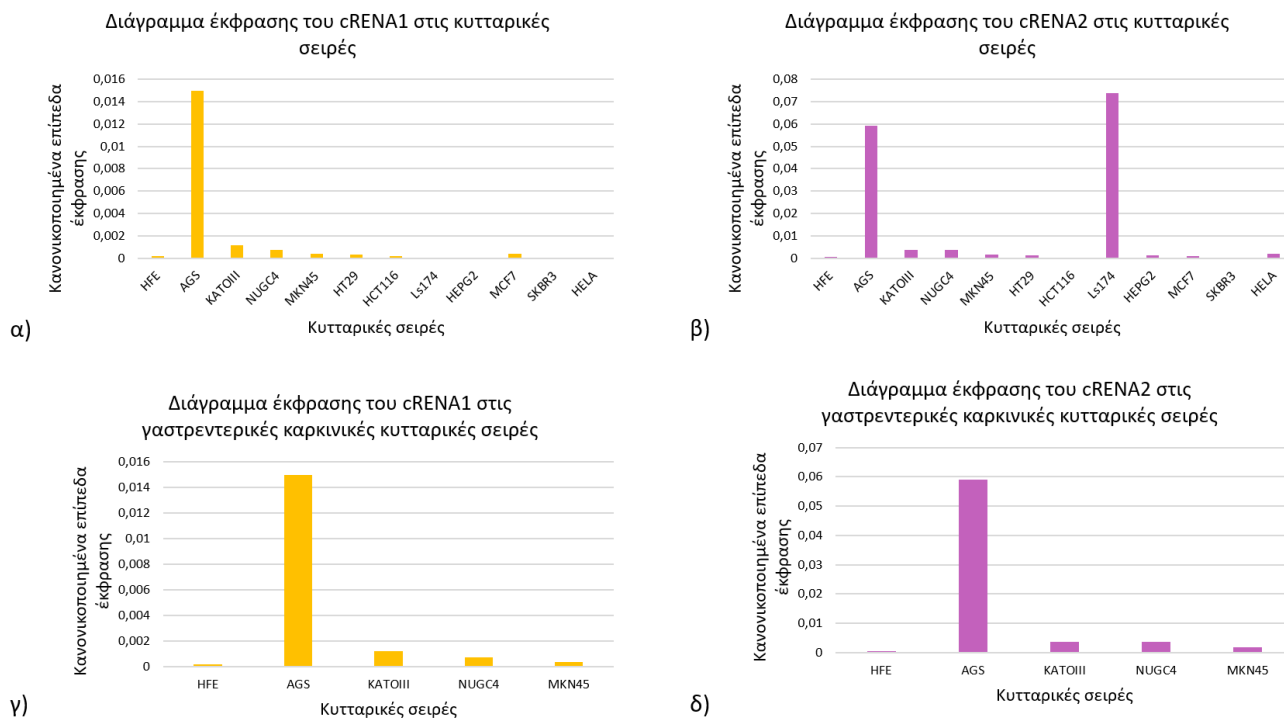
Εικόνα 12. Διαγράμματα box plot που παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του cRENA2 σε πέντε γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου. Στον άξονα x φαίνεται ο τύπος του καρκίνου και στον άξονα y τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA αυτού. Συγκεκριμένα, η έκφραση στον καρκινικό ιστό φαίνεται με κόκκινο και η έκφραση στον αντίστοιχο παρακαρκινικό ιστό με γκρι (TCGA). STAD=γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, ESCA=καρκίνος του οισοφάγου, READ=αδενοκαρκίνωμα του ορθού, COAD=αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, LIHC=ηπατοκυτταρικός καρκίνος.

Όσον αφορά το cRENA2, η έκφρασή του φαίνεται να εμφανίζεται αυξημένη σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μόνο στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα ενώ η έκφραση του δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στους υπόλοιπους τύπους καρκίνου που μελετήθηκαν με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων GEPIA.

3.2. Πειραματικά αποτελέσματα

3.2.1. Έκφραση των cRENA1 και cRENA2 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Τα επίπεδα έκφρασης και των δύο αυτών μη κωδικοποιητικών RNAs παρουσιάζουν ετερογένεια μεταξύ των ασθενών ακόμα και για τον ίδιο τύπο καρκίνου επομένως, προκειμένου να γίνει η μελέτη τους θα πρέπει να εντοπισθεί σε ποιες από τις κυτταρικές σειρές που έχουμε στη διάθεση μας εκφράζονται. Έτσι, μετά την παρατήρηση, μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης, της αυξημένης έκφρασης των lncRNAs cRENA1 και cRENA2 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές γαστρεντερικού τύπου κρίθηκε σκόπιμη η εξακρίβωση των επιπέδων έκφρασης των δύο αυτών μη κωδικοποιητικών RNAs με τη βοήθεια της qPCR στις διαθέσιμες αθανατοποιημένες καρκινικές κυτταρικές σειρές (βλ. Υ&Μ).

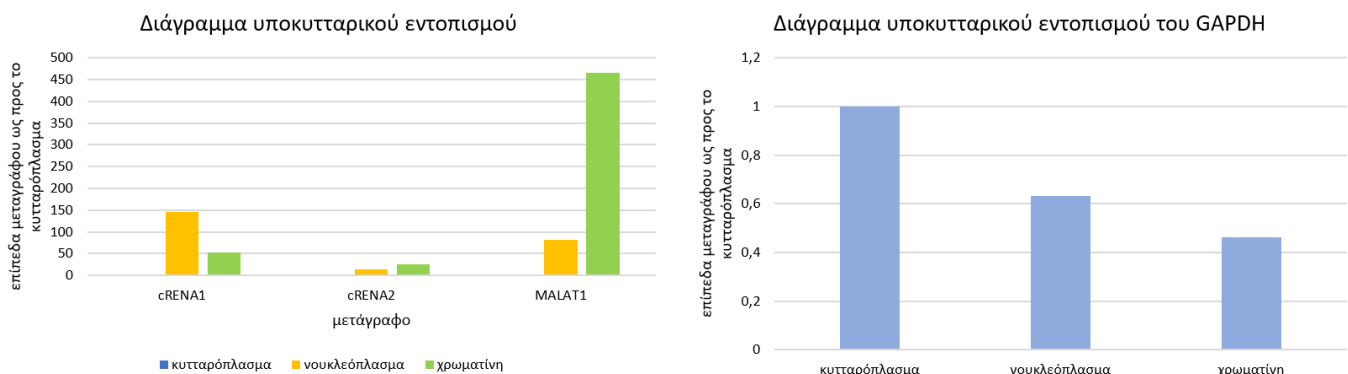


Εικόνα 13. Διαγράμματα που παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης του cRENA1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (α), τα επίπεδα έκφρασης του CRENA2 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (β), τα επίπεδα έκφρασης του cRENA1 στις γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (γ) και τα επίπεδα έκφρασης του cRENA2 στις γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (δ). Στον άξονα x φαίνονται οι καρκινικές κυτταρικές σειρές και στον άξονα y τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιημένα ως προς το ιδιοσυστατικό γονίδιο RPLP1. HFE=αθανατοποιημένα φυσιολογικά γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, AGS=γαστρικά καρκινικά από πρωτεύοντα όγκο, KATO II=γαστρικά καρκινικά κύτταρα από παραγαστρικούς λεμφαδένες, NUGC4=γαστρικά καρκινικά κύτταρα από απομακρυσμένους λεμφαδένες, MKN45=γαστρικά μεταστατικά καρκινικά κύτταρα στο ήπαρ, HT29=καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, HCT116=καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, LS174=καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, HEPG2=καρκινικά κύτταρα ήπατος, MCF7=καρκινικά κύτταρα μαστού, SKBR3=καρκινικά κύτταρα μαστού και HELA=καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας.

Στο διάγραμμα (α) της **εικόνας 13.** παρατηρείται ότι η έκφραση του cRENA1 είναι ιδιαίτερα αυξημένη στην καρκινική κυτταρική σειρά AGS. Μικρή έκφραση παρουσιάζεται και στις κυτταρικές σειρές που σχετίζονται με γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου με εξαίρεση τη σειρά LS174 που αντιστοιχεί σε καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, η έκφραση απουσιάζει ή είναι χαμηλή στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού και απουσιάζει και στα κύτταρα HELA. Σύμφωνα με το διάγραμμα (γ) της **εικόνας 13.** το cRENA1 εκφράζεται σε όλες τις γαστρικές κυτταρικές σειρές σε χαμηλότερα, όμως, επίπεδα σε σχέση με την κυτταρική σειρά AGS.

Όσον αφορά το cRENA2, σύμφωνα με το διάγραμμα (β) της **εικόνας 13.**, η έκφρασή του φαίνεται ιδιαίτερα αυξημένη στις κυτταρικές σειρές AGS και LS174. Χαμηλή έκφραση παρατηρείται και στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές που σχετίζονται με γαστρεντερικό τύπο καρκίνου. Επίσης, χαμηλή έκφραση παρατηρείται και στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές που δεν σχετίζονται με καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος. Στο διάγραμμα (δ) της **εικόνας 13.**, παρατηρείται ότι υπάρχει έκφραση σε όλες τις κυτταρικές σειρές που σχετίζονται με γαστρικό καρκίνο. Επίσης η έκφραση στη σειρά HFE φαίνεται χαμηλότερη σε σχέση με αυτές τις καρκινικές κυτταρικές σειρές.

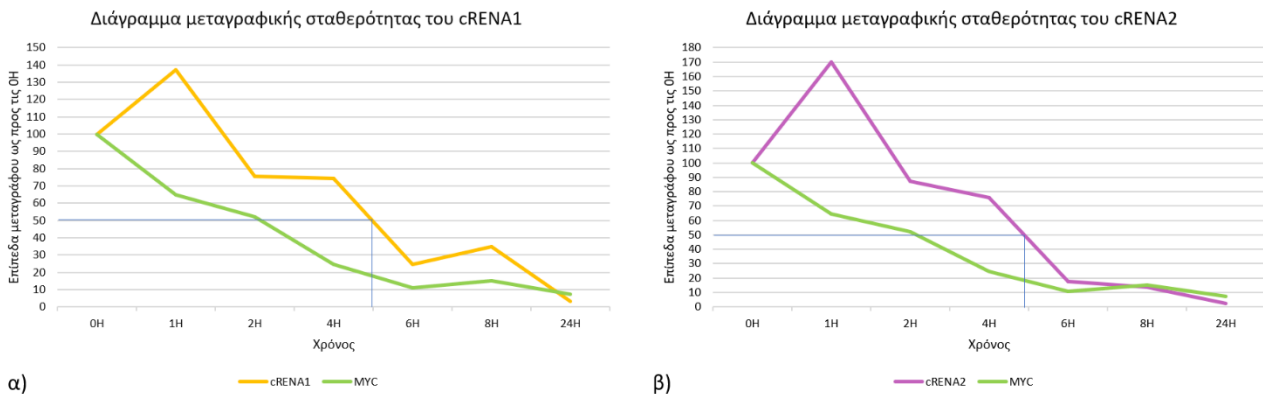
Στη συνέχεια, διενεργήθηκε ανάλυση με τη χρήση της qPCR προκειμένου να βρεθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των δύο μη κωδικοποιητικών RNA. Η ανάλυση αυτή διενεργήθηκε στα κύτταρα της σειράς AGS, καθώς σε αυτά παρατηρήθηκε μεγάλη έκφραση και των δύο αυτών lncRNAs, και τα μετάγραφα που μελετήθηκαν είναι τα cRENA1 και cRENA2 καθώς και τα MALAT1 και GAPDH τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Το MALAT1 αποτελεί ένα μετάγραφο το οποίο είναι γνωστό ότι συσσωρεύεται στη χρωματίνη, ενώ το GAPDH ως κωδικοποιητικό μετάγραφο βρίσκεται ως επί το πλείστον στο κυτταρόπλασμα. Στο διάγραμμα της **εικόνας 14**, παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης κάθε μεταγράφου ως προς τα επίπεδα έκφρασης του ίδιου μεταγράφου στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 14. Διαγράμματα υποκυτταρικού εντοπισμού των cRENA1, cRENA2, MALAT1 (α) και του GAPDH (β). Στον άξονα x φαίνεται το όνομα του μεταγράφου και στον άξονα y τα επίπεδα έκφρασης του σε σχέση με το κυτταρόπλασμα. Η έκφραση κάθε γονιδίου σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα εμφανίζεται ως λόγος έναντι του κυτταροπλάσματος που έχει οριστεί στην τιμή «1».

Σύμφωνα με το διάγραμμα της **εικόνας 14**, φαίνεται πως το cRENA1 συγκεντρώνεται κατά κύριο λόγο στο νουκλεόπλασμα με μια μεγάλη ποσότητα του να εντοπίζεται και στη χρωματίνη. Όσον αφορά το cRENA2 η μεγαλύτερη ποσότητα του εντοπίζεται στην χρωματίνη με σημαντικό ποσοστό της έκφρασης του να εντοπίζεται και στο νουκλεόπλασμα. Ωστόσο, η έκφρασή του τόσο στη χρωματίνη όσο και στο νουκλεόπλασμα είναι λιγότερο από 50 φορές μεγαλύτερη από την έκφρασή του στο κυτταρόπλασμα.

Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της μεταγραφικής σταθερότητας του cRENA1 και cRENA2. Αυτή πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της qPCR επίσης στην κυτταρική σειρά AGS και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε επιπλέον το μετάγραφο του MYC. Στα κύτταρα είχε προστεθεί ακτινομυκίνη η οποία οδηγεί σε διακοπή της μεταγραφής και η έκφραση μελετήθηκε σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την προσθήκη της. Στα διαγράμματα της **εικόνας 15**, φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του κάθε μεταγράφου με την πάροδο του χρόνου.



α)

β)

Εικόνα 15. Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης στον χρόνο μηδέν των (α) cRENA1 και (β) cRENA2. Ο χρόνος αναφέρεται στον χρόνο που έχει περάσει έπειτα από την προσθήκη ακτινομυκίνης, η οποία αναστέλλει τη μεταγραφή. Στον άξονα x φαίνεται ο χρόνος και στον άξονα y τα επίπεδα έκφρασης του κάθε μετάγραφου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης του αμέσως μετά την προσθήκη της ακτινομυκίνης.

Σύμφωνα με το διάγραμμα (α) της **εικόνας 15**, η έκφραση του cRENA1 φαίνεται να είναι μέγιστη μία ώρα μετά την διακοπή της μεταγραφής και να μειώνεται σταδιακά. Τα μετάγραφα του μη κωδικοποιητικού αυτού RNA είναι παρόντα, σε χαμηλότερα, βέβαια, επίπεδα για αρκετές ώρες μετά την προσθήκη της ακτινομυκίνης και χάνονται εντελώς 24 ώρες μετά. Στο διάγραμμα (β) της **εικόνας 15**, παρατηρείται ότι η έκφραση του cRENA2 είναι, επίσης, μέγιστη 1 ώρα μετά την διακοπή της μεταγραφής. Τα μετάγραφα του cRENA2 φαίνεται πως μειώνονται σε μεγάλο βαθμό μέχρι τις 6 ώρες μετά την προσθήκη της ακτινομυκίνης. Ο χρόνος ημιζωής ή ημιδιπλασιασμού, δηλαδή ο χρόνος στον οποίο υπάρχει μόνο το 50% των αρχικών μεταγράφων φαίνεται να είναι ανάμεσα στις 4-6 ώρες και για το cRENA1 και για το cRENA2.

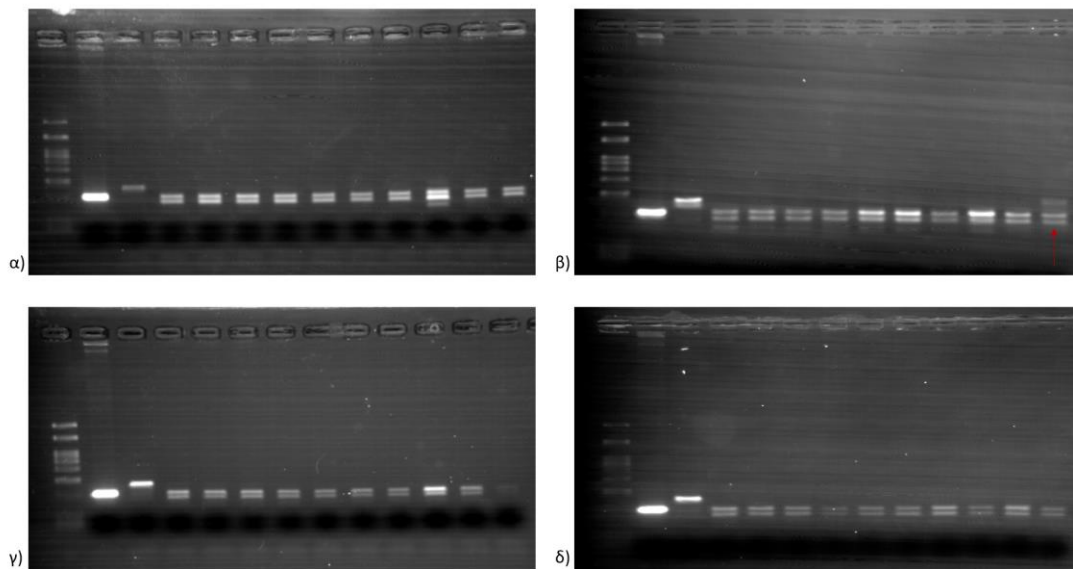
3.2.2. Κλωνοποίηση shRNA για την στόχευση των cRENA1 και cRENA2

Ως τελικό βήμα, επιχειρήθηκε η κλωνοποίηση των shRNA που σχεδιάστηκαν ειδικά για την στόχευση των cRENA1 και cRENA2 σε πλασμιδιακό φορέα και ο μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων. Το πείραμα αυτό είχε ως στόχο τη δημιουργία των κατάλληλων εργαλείων τα οποία θα μπορούσαν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για τη σίγηση των μη κωδικοποιητικών αυτών μεταγράφων στα κύτταρα των σειρών στα οποία εξακριβώθηκε η υψηλή τους έκφραση.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φορέας ο οποίος αφέθηκε να κλείσει χωρίς να προσλάβει το ένθεμα ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φορέας ο οποίος ήταν θετικός στο shRNA που στοχεύει το γονίδιο KLF5.

Όπως γίνεται φανερό και από την παρακάτω εικόνα (**εικόνα 16.**), οι κλωνοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν πολύ δύσκολες και μη αποδοτικές. Έτσι, θετικό αποτέλεσμα ως προς την ένθεση υπήρχε μόνο για το shRNA του cRENA2. Το προϊόν της κλωνοποίησης που ήταν επιτυχής φαίνεται στη δωδέκατη διαδρομή μετά τον ladder, στην εικόνα (β) της εικόνας. Ωστόσο, ο θετικός κλώνος έπρεπε να ελεγχθεί περαιτέρω με αλληλούχηση προκειμένου να εξακριβωθεί αν ήταν όντως θετικός ως προς την ένθεση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν πως και αυτή η κλωνοποίηση δεν ήταν αποτελεσματική πιθανότατα λόγω

δευτεροταγούς δομής του κλωνοποιημένου shRNA και για τον λόγο αυτό θα πρέπει να επιχειρηθεί ξανά. Όσον αφορά, τις υπόλοιπες κλωνοποιήσεις, αυτές ήταν ανεπιτυχείς και πρέπει να επαναληφθούν.



Εικόνα 16. Ενδεικτικές εικόνες των ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων που ενισχύθηκαν με PCR μετά την κλωνοποίηση των επιθυμητών shRNAs. Στο (α) φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων στα οποία έγινε προσπάθεια ένθεσης του shRNA που στοχεύει το cRENA1, στο (β) των προϊόντων με ένθεση του cRENA2 και στα (γ) και (δ) των προϊόντων που έγινε προσπάθεια ένθεσης του shRNA που στοχεύει ταυτόχρονα και τα δύο μεταγέγραφα. Στο πρώτο πηγάδι μετά τον ladder υπάρχει ο αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή ο φορέας που δεν έχει λάβει ένθεμα, στο δεύτερο πηγάδι φαίνεται ο θετικός μάρτυρας, δηλαδή ο φορέας που περιέχει shRNA για το KLF5. Στα επόμενα πηγάδια υπάρχουν τα προϊόντα των οποίων ήταν επιθυμητός ο έλεγχος. Με το κόκκινο βέλος φαίνεται το προϊόν που θεωρήθηκε ως θετικό. Το πρότυπο των ζωνών που θα αναμενόταν προκειμένου το προϊόν να είναι θετικό στο ένθεμα είναι ανάλογο με εκείνο του θετικού μάρτυρα.

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής ήταν η μελέτη των μη κωδικοποιητικών RNAs, cRENA1 και cRENA2 καθώς και του τρόπου με τον οποίο αυτά εκφράζονται στον γαστρικό καρκίνο. Με τη χρήση δεδομένων από πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών βρέθηκε ότι τα δύο αυτά μη κωδικοποιητικά RNAs εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στον γαστρικό καρκίνο, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση των δεδομένων του TCGA μέσω της βάσης δεδομένων GEPIA. Η έκφραση τους μελετήθηκε περαιτέρω και σε διαθέσιμες καρκινικές κυτταρικές σειρές με τη βοήθεια της qPCR. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μέσω και αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν επίσης την αυξημένη έκφραση των cRENA1 και cRENA2 στην καρκινική κυτταρική σειρά AGS, η οποία προέρχεται από πρωτεύοντα γαστρικό όγκο. Επιπλέον, η αυξημένη τους έκφραση μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι ρυθμίζονται θετικά από το CDX2 το οποίο παρουσιάζει έκτοπη έκφραση στον γαστρικό καρκίνο σε αντίθεση με τον φυσιολογικό ιστό [64]. Επιπλέον, η απουσία έκφρασης των δύο μη κωδικοποιητικών αυτών μεταγράφων στην κυτταρική σειρά HFE εξηγείται από το γεγονός ότι ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2, ο οποίος με τη σειρά του ρυθμίζει τα cRENA1 και cRENA2, δεν εκφράζεται φυσιολογικά στον γαστρικό βλεννογόνο. Το αποτέλεσμα αυτό

συμπίπτει και με τα δεδομένα των βιοπληροφορικών αναλύσεων, στις οποίες φαίνεται ότι η αύξηση της έκφρασης και του cRENA1 και του cRENA2 είναι σημαντική στον γαστρικό καρκίνο έναντι του φυσιολογικού ιστού.

Επιπλέον, η έκφραση των cRENA1 και cRENA2 παρατηρείται από τα αρχικά στάδια εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου γεγονός που τα καθιστά υποσχόμενους διαγνωστικούς δείκτες αλλά και θεραπευτικούς στόχους. Η έκφρασή τους παραμένει σταθερά σε υψηλά επίπεδα κατά την πρόοδο της ασθένειας παρόλο που παρατηρείται πτώση στα επίπεδα των μεταγράφων του CDX2. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι τα επίπεδα του CDX2 μειώνονται κατά την πρόοδο της ασθένειας σε πιο ανεπτυγμένα στάδια [67]. Ωστόσο, η ρύθμιση του CDX2, το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει τα cRENA1 και cRENA2, γίνεται κυρίως σε επίπεδο πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού ρύθμισης που διατηρεί τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα σε υψηλά επίπεδα παρά την πτώση των επιπέδων του CDX2 από τον οποίο κυρίως επάγονται. Ο τρόπος με τον οποίο αυτός ο μηχανισμός διατηρεί την υψηλή αυτή έκφραση καθώς και τα γονίδια που μπορεί να εμπλέκονται σε αυτόν πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Σημαντικός αλλά σπανιότερος υπότυπος γαστρικού καρκίνου είναι ο διάχυτος υπότυπος, καθώς ο υπότυπος αυτός διαγιγνώσκεται σε ασθενείς νεαρότερης ηλικίας και χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη επιθετικότητα συγκριτικά με τον εντερικό. Έτσι, είναι σημαντικό να βρεθούν τόσο κατάλληλοι διαγνωστικοί δείκτες όσο και θεραπευτικοί στόχοι προκειμένου να μπορέσει να αντιμετωπιστεί ο συγκεκριμένος υπότυπος γαστρικού καρκίνου. Για τον λόγο αυτό η έκφραση των cRENA1 και cRENA2 μελετήθηκε και σε δείγματα παρακαρκινικών και καρκινικών ιστών ασθενών με αυτόν τον υπότυπο καρκίνου. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, που προέκυψαν δεν έδειξαν σημαντική διαφορά έκφρασης για κανένα από τα δύο μη κωδικοποιητικά αυτά μετάγραφα ανάμεσα σε αυτούς τους δύο ιστούς. Το αποτέλεσμα αυτό δεν προκαλεί έκπληξη καθώς τα cRENA1 και cRENA2 ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2, ο οποίος δεν παίζει σημαντικό ρόλο στον διάχυτο υπότυπο γαστρικού καρκίνου [162]. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η χρήση των cRENA1 και cRENA2 είτε για τη διάγνωση είτε για τη στόχευση αυτού του υποτύπου δεν είναι δυνατή.

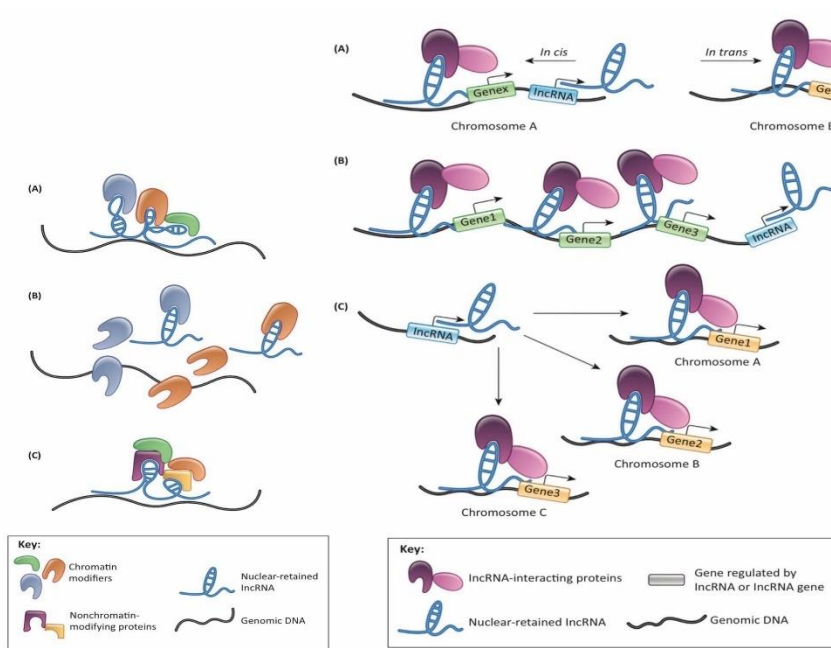
Σημαντικές για την εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου, και ιδιαίτερα του εντερικού υπότυπου του, είναι οι προκαρκινικές αλλοιώσεις που προδιαθέτουν για τη νόσο προτού αυτή εμφανιστεί. Η σημαντικότητα αυτών των αλλοιώσεων είναι τεράστια καθώς η ύπαρξη τους αποτελεί σημάδι για την μετέπειτα ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου και ο έγκαιρος εντοπισμός και αντιμετώπιση τους μπορεί να οδηγήσει σε μια καλύτερη έκβαση του ασθενή. Έτσι, η εύρεση ειδικών δεικτών για την ανίχνευση και τη στόχευση των προκαρκινικών αλλοιώσεων θα μπορούσε να αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για την πρόληψη της εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου. Για τον λόγο αυτό η έκφραση των δύο αυτών μεταγράφων μελετήθηκε και σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς, αυτούς των Κορεατών και των Νοτιοαμερικανών. Οι πληθυσμοί αυτοί επιλέχθηκαν καθώς η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου σε αυτές τις περιοχές παρουσιάζεται ιδιαίτερα αυξημένη. Έτσι, η μείωση της συχνότητας εμφάνισης αυτού του τύπου καρκίνου θα ήταν ιδιαίτερα επωφελής σε αυτές τις χώρες που θρηνούν σημαντικές απώλειες ανθρώπινων ζωών από αυτή την ασθένεια. Η έκφραση του cRENA1, ιδιαίτερα στους Νοτιοαμερικανούς, παρουσιάζει μια αυξητική τάση και κορυφώνεται στην εντερική μεταπλασία. Η αυξητική αυτή τάση μπορεί να εξηγηθεί από τη ρύθμιση του συγκεκριμένου μεταγράφου από τον μεταγραφικό παράγοντα CDX2 ο οποίος έχει συσχετιστεί ήδη με την εντερική μεταπλασία και την μεταδιαφοροποίηση των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων σε εντερικά [162]. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης

έδωσαν έναν διαφορετικό τρόπο έκφρασης ανάμεσα στους πληθυσμούς για το cRENA2. Έτσι, ενώ στους Κορεάτες εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα με αυξητική τάση, στους Νοτιοαμερικανούς παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί μέσω διαφορών στη διατροφή, την έκθεση σε βιοτικούς παράγοντες που προδιαθέτουν για τη νόσο ή στην αναλογία διάχυτου/εντερικού υπότυπου ή στη συχνότητα εμφάνισης του τελευταίου μεταξύ των δύο πληθυσμών.

Μελέτη για την ύπαρξη των cRENA1 και cRENA2 έγινε και στα εξωσώματα. Τα εξωσώματα αποτελούν εξωκυτταρικά κυστίδια που περιέχουν συστατικά όπως DNA, RNA αλλά και πρωτεΐνες από τα κύτταρα τα οποία τα απελευθερώνουν. Αυτά παραλαμβάνονται από άλλα κύτταρα των οποίων μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία και τη συμπεριφορά. Η ανταλλαγή των εξωσωμάτων μεταξύ των κυττάρων έχει βρεθεί πως εμπλέκεται στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών μεταξύ των οποίων βρίσκεται και ο καρκίνος [163]. Τα εξωσώματα συμμετέχουν στην πρόοδο του καρκίνου αλλά και στη μετάσταση μεταφέροντας βιοενεργά μόρια ανάμεσα στα καρκινικά και σε ποικίλα άλλα κύτταρα σε κοντινές και απομακρυσμένες αποστάσεις [164]. Η χρήση των εξωσωμάτων που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα είναι υποσχόμενη ως βιοδείκτες για τον εντοπισμό της ασθένειας από τα αρχικά της κιάλας στάδια καθώς το περιεχόμενο τους αντικατοπτρίζει τις γενετικές ή σηματοδοτικές μεταβολές των καρκινικών κυττάρων από τα οποία προέρχονται [165]. Επιπλέον, τα εξωσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως θεραπευτικοί στόχοι για τον καρκίνο. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω της αναστολής της σύνθεσης, της απελευθέρωσης και της πρόσληψης τους από άλλα κύτταρα [166]. Τα αποτελέσματα της μελέτης των εξωσωμάτων έδειξαν ότι η έκφραση ειδικά του cRENA1 είναι ελαφρώς αυξημένη στα εξωσώματα που απομονώθηκαν τόσο από ασθενείς με γαστρεντερικούς τύπους καρκίνου όσο και σε εξωσώματα από ασθενείς με υψηλού βαθμού εντερική νεοπλασία. Τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν υποσχόμενη τη χρήση του συγκεκριμένου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου για διαγνωστικούς αλλά και θεραπευτικούς σκοπούς όσον αφορά τον γαστρικό καρκίνο. Η εικόνα της έκφρασης του cRENA2 στα εξωσώματα είναι διαφορετική. Η έκφραση του cRENA2 παρουσιάζεται ελαφρώς αυξημένη στα εξωσώματα που απομονώθηκαν από ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο ενώ παραμένει μη ανιχνεύσιμη στα εξωσώματα ασθενών με υψηλού βαθμού εντερική νεοπλασία. Έτσι, η χρήση του συγκεκριμένου μεταγράφου στον γαστρικό καρκίνο καθίσταται δύσκολη.

Όσον αφορά την υποκυτταρική τοποθέτησή τους, η παρουσία των cRENA1 και cRENA2 είναι πιο έντονη στον πυρήνα, με το cRENA1 να εντοπίζεται κυρίως στο νουκλεόπλασμα και το cRENA2 στη χρωματίνη. Στη χρωματίνη, τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα μπορούν να επηρεάζουν την αρχιτεκτονική της, αλληλεπιδρώντας με ένζυμα τροποποίησης της χρωματίνης αλλά και την έκφραση γονιδίων, αποτρέποντας την πρόσδεση χρωματινικών παραγόντων σε συγκεκριμένες περιοχές στόχους τους στο DNA (**εικόνα 17.αριστερά**). Τα lncRNAs που βρίσκονται εκεί μπορούν να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, διευκολύνοντας ή αναστέλλοντας την πρόσδεσή τους στις θέσεις στόχους τους στο DNA [117, 167]. Επιπλέον, τα lncRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την μεταγραφή γονιδίων επηρεάζοντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων ή συμπαραγόντων στη χρωματίνη (**εικόνα 17.δεξιά**) [167]. Στον πυρήνα, τα lncRNAs μπορούν να βρίσκονται και στα paraspeckles, σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά δηλαδή σωματίδια που βρίσκονται στην ετεροχρωματίνη. Εκεί παίζουν ρόλο στην πυρηνική συγκράτηση των mRNAs [168, 169]. Επίσης, τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα που βρίσκονται στον πυρήνα μπορούν να εμπλέκονται σε μετα-μεταγραφικές διεργασίες όπως είναι το μάτισμα των pre-mRNA, η προσθήκη καλύπτρας στα mRNA, η πολυαδενυλίωση τους

και η έξοδος τους στο κυτταρόπλασμα [170]. Συνεπώς, ο ρόλος των cRENA1 και cRENA2 θα μπορούσε να είναι ένας από τους παραπάνω αλλά ο ακριβής τους ρόλος μένει να ερευνηθεί μελλοντικά.



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση των ρόλων που μπορούν να επιτελέσουν τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα πάνω στη χρωματίνη. Δεξιά, στο (A) φαίνεται ο ρόλος τους στην τροποποίηση της χρωματίνης στρατολογώντας τα κατάλληλα ένζυμα, στο (B) ο ρόλος τους ως δολώματα που απομακρύνουν τα ίδια ένζυμα από τη χρωματίνη και στο (C) ο ρόλος τους στην έμμεση δημιουργία αλληλεπιδράσεων της χρωματίνης με τα ένζυμα τροποποιητές της μέσω άλλων πρωτεϊνών. Αριστερά, στο (A) φαίνεται η δράση τους ως μεταγραφικοί ρυθμιστές in cis αλλά και in trans, στο (B) φαίνεται η ικανότητα τους να ρυθμίζουν την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που βρίσκονται κοντά μεταξύ τους και στο (C) η ικανότητα τους να ρυθμίζουν πολλαπλά γονίδια που βρίσκονται σε μακρινή απόσταση μεταξύ τους. [170]

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο χρόνος ημιζωής των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs σχετίζεται με τη λειτουργία που αυτά επιτελούν [171-173]. Έτσι, το επόμενο βήμα αποτέλεσε η μελέτη του χρόνου ημιζωής των cRENA1 και cRENA2. Βρέθηκε ότι ο χρόνος ημιζωής των δύο αυτών μη κωδικοποιητικών RNAs είναι ανάμεσα στις 4 με 6 ώρες και συγκεκριμένα φαίνεται να είναι μικρότερος των 5 ωρών. Τα μετάγραφα αυτά θεωρούνται μέτριας σταθερότητας. Ακόμη, τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα με χρόνο ημιζωής μικρότερο των 5 ωρών είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση βιοσυνθετικών διεργασιών, κυτταρικών βιοσυνθετικών διεργασιών και μεταβολικών κυτταρικών λειτουργιών [174]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα lncRNAs που βρίσκονται στον πυρήνα έχουν γενικά μικρότερο χρόνο ημιζωής σε σχέση με εκείνα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα [174], γεγονός που δεν αντιτίθεται με την σταθερότητα των παρόντων lncRNAs. Έτσι, τα δύο αυτά μη κωδικοποιητικά RNAs θα μπορούσαν να σχετίζονται με κάποια από τις λειτουργίες που αναφέρθηκαν, κάτι που συμπίπτει και με την υποκυτταρική τους τοποθέτηση. Ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε ο ακριβής τους ρόλος χρειάζεται επιπλέον μελέτη.

Το τελευταίο στάδιο της διπλωματικής αυτής εργασίας αποτέλεσε η κλωνοποίηση των shRNAs, που θα οδηγήσουν στην παραγωγή siRNAs που θα στοχεύουν τα cRENA1 και cRENA2, σε πλασμιδιακό φορέα. Με τον τρόπο αυτό θα ήταν δυνατή η εισαγωγή των πλασμιδίων αυτών στα κύτταρα της σειράς AGS και η μελέτη του τρόπου με τον οποίο η σίγηση των μεταγράφων αυτών θα επηρέαζε την ανάπτυξη αλλά και τη συμπεριφορά των κυττάρων αυτών. Ωστόσο η κλωνοποίηση των shRNA για το cRENA1 ήταν αναποτελεσματική και για τον λόγο αυτό η πραγματοποίηση αυτού του πειράματος ήταν αδύνατη. Έτσι, η μελέτη αυτή θα πρέπει να επαναληφθεί προκειμένου να γίνει πιο σαφής ο ρόλος αυτών των μεταγράφων στον γαστρικό καρκίνο.

5. Βιβλιογραφία

1. Alessandrini, L., et al., *From Molecular Classification to Targeted Therapy for Gastric Cancer in the Precision Medicine Era*, in *Gastric Cancer In The Precision Medicine Era: Diagnosis and Therapy*, V. Canzonieri and A. Giordano, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 155-172.
2. Bertuccio, P., et al., *Recent patterns in gastric cancer: a global overview*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(3): p. 666-73.
3. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
4. Stock, M. and F. Otto, *Gene deregulation in gastric cancer*. *Gene*, 2005. **360**(1): p. 1-19.
5. Sitarz, R., et al., *Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment*. *Cancer Manag Res*, 2018. **10**: p. 239-248.
6. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(11).
7. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. *Prz Gastroenterol*, 2019. **14**(1): p. 26-38.
8. Gonzalez, C.A., et al., *Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC)*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(4): p. 629-34.
9. Buckland, G., et al., *Healthy lifestyle index and risk of gastric adenocarcinoma in the EPIC cohort study*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(3): p. 598-606.
10. Chen, Y., et al., *Body mass index and risk of gastric cancer: a meta-analysis of a population with more than ten million from 24 prospective studies*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(8): p. 1395-408.
11. Peek, R.M., Jr. and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(1): p. 28-37.
12. Winter, J.A., et al., *A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and Helicobacter pylori-induced metaplasia in the stomach*. *J Infect Dis*, 2014. **210**(6): p. 954-63.
13. Takada, K., *Epstein-Barr virus and gastric carcinoma*. *Mol Pathol*, 2000. **53**(5): p. 255-61.
14. Mukaisho, K., et al., *Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: interactions among pH, Helicobacter pylori, and bile acids*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 412.
15. Marques-Lespier, J.M., M. Gonzalez-Pons, and M. Cruz-Correa, *Current Perspectives on Gastric Cancer*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2016. **45**(3): p. 413-28.
16. Amini, N., et al., *Clinicopathological features and prognosis of gastric cardia adenocarcinoma: a multi-institutional US study*. *J Surg Oncol*, 2015. **111**(3): p. 285-92.
17. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1965. **64**: p. 31-49.
18. Tan, I.B., et al., *Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(2): p. 476-85, 485 e1-11.
19. McLean, M.H. and E.M. El-Omar, *Genetics of gastric cancer*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(11): p. 664-74.
20. Correa, P., *Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis*. *Am J Surg Pathol*, 1995. **19 Suppl 1**: p. S37-43.

21. Barros, R., et al., *Gastric intestinal metaplasia revisited: function and regulation of CDX2*. Trends Mol Med, 2012. **18**(9): p. 555-63.
22. Qiu, M.Z., et al., *Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 58.
23. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17036.
24. Zhang, W., *TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics*. Chin J Cancer, 2014. **33**(10): p. 469-70.
25. Shmulevich, I., *Large-scale molecular characterization and analysis of gastric cancer*. Chin J Cancer, 2014. **33**(8): p. 369-70.
26. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
27. Garattini, S.K., et al., *Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications*. World J Gastrointest Oncol, 2017. **9**(5): p. 194-208.
28. Derks, S., et al., *Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 32925-32.
29. Cho, J., M.S. Kang, and K.M. Kim, *Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response*. J Gastric Cancer, 2016. **16**(1): p. 1-7.
30. Sukawa, Y., et al., *Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(45): p. 6577-86.
31. Inada, R., et al., *ARID1A expression in gastric adenocarcinoma: clinicopathological significance and correlation with DNA mismatch repair status*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(7): p. 2159-68.
32. Nishikawa, J., et al., *The Role of Epigenetic Regulation in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(8).
33. Ratti, M., et al., *Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(22): p. 4151-4162.
34. Yuza, K., et al., *Hypermethylation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers*. Oncotarget, 2017. **8**(67): p. 112103-112115.
35. Ottini, L., et al., *Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives*. Ann Oncol, 2006. **17 Suppl 7**: p. vii97-102.
36. Falchetti, M., et al., *Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival*. Hum Pathol, 2008. **39**(6): p. 925-32.
37. Choi, J.H., et al., *Identification of genomic aberrations associated with lymph node metastasis in diffuse-type gastric cancer*. Exp Mol Med, 2018. **50**(4): p. 1-11.
38. Wang, Q., G. Liu, and C. Hu, *Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma*. Gastroenterology Res, 2019. **12**(6): p. 275-282.
39. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
40. Kobayashi, M., et al., *Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: a 10-year follow-up of the JPHC Study Cohort I*. Int J Cancer, 2002. **102**(1): p. 39-44.
41. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
42. Son, T. and W.J. Hyung, *Laparoscopic gastric cancer surgery: Current evidence and future perspectives*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(2): p. 727-35.
43. Boekhout, A.H., J.H. Beijnen, and J.H. Schellens, *Trastuzumab*. Oncologist, 2011. **16**(6): p. 800-10.
44. Singh, A.D. and S. Parmar, *Ramucirumab (Cyramza): A Breakthrough Treatment for Gastric Cancer*. P T, 2015. **40**(7): p. 430-68.

45. James, R., T. Erler, and J. Kazenwadel, *Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium.* J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 15229-37.
46. Mizoshita, T., et al., *Expression of Cdx1 and Cdx2 mRNAs and relevance of this expression to differentiation in human gastrointestinal mucosa--with special emphasis on participation in intestinal metaplasia of the human stomach.* Gastric Cancer, 2001. **4**(4): p. 185-91.
47. Moskaluk, C.A., et al., *Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays.* Mod Pathol, 2003. **16**(9): p. 913-9.
48. Saad, R.S., et al., *CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations.* World J Gastrointest Surg, 2011. **3**(11): p. 159-66.
49. Bai, Y.Q., et al., *CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene.* Oncogene, 2003. **22**(39): p. 7942-9.
50. Silberg, D.G., et al., *Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development.* Gastroenterology, 2000. **119**(4): p. 961-71.
51. Beck, F., et al., *Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes.* Dev Dyn, 1995. **204**(3): p. 219-27.
52. Yagi, O.K., Y. Akiyama, and Y. Yuasa, *Genomic structure and alterations of homeobox gene CDX2 in colorectal carcinomas.* Br J Cancer, 1999. **79**(3-4): p. 440-4.
53. McGinnis, W. and R. Krumlauf, *Homeobox genes and axial patterning.* Cell, 1992. **68**(2): p. 283-302.
54. Mark, M., F.M. Rijli, and P. Chambon, *Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis.* Pediatr Res, 1997. **42**(4): p. 421-9.
55. Haria, D. and H. Naora, *Homeobox Gene Deregulation: Impact on the Hallmarks of Cancer.* Cancer Hallm, 2013. **1**(2-3): p. 67-76.
56. Joo, M.K., J.J. Park, and H.J. Chun, *Impact of homeobox genes in gastrointestinal cancer.* World J Gastroenterol, 2016. **22**(37): p. 8247-8256.
57. Souza, R.F., K. Krishnan, and S.J. Spechler, *Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **295**(2): p. G211-8.
58. Spechler, S.J., *Clinical practice. Barrett's Esophagus.* N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 836-42.
59. Liu, T., et al., *Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells.* Carcinogenesis, 2007. **28**(2): p. 488-96.
60. Hinkel, I., et al., *Cdx2 controls expression of the protocadherin Mucdhl, an inhibitor of growth and beta-catenin activity in colon cancer cells.* Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 875-885 e3.
61. Coskun, M., et al., *Involvement of CDX2 in the cross talk between TNF-alpha and Wnt signaling pathway in the colon cancer cell line Caco-2.* Carcinogenesis, 2014. **35**(5): p. 1185-92.
62. Lee, B.H., et al., *The Role of CDX2 in Intestinal Metaplasia Evaluated Using Immunohistochemistry.* Gut Liver, 2012. **6**(1): p. 71-7.
63. Chen, B.J., et al., *hTERT promotes gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 via NF-kappaB signaling pathway.* Oncotarget, 2017. **8**(16): p. 26969-26978.
64. Kang, J.M., et al., *CDX1 and CDX2 expression in intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer.* J Korean Med Sci, 2011. **26**(5): p. 647-53.
65. Kim, H.J., et al., *Methylation of the CDX2 promoter in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa increases with age and its rapid demethylation in gastric tumors is*

- associated with upregulated gene expression. Carcinogenesis, 2020. 41(10): p. 1341-1352.*
66. Liu, Q., et al., *CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. Mod Pathol, 2007. 20(12): p. 1286-97.*
 67. Park, D.Y., et al., *CDX2 expression in the intestinal-type gastric epithelial neoplasia: frequency and significance. Mod Pathol, 2010. 23(1): p. 54-61.*
 68. Sever, R. and C.K. Glass, *Signaling by nuclear receptors. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. 5(3): p. a016709.*
 69. Taraviras, S., et al., *Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. Mech Dev, 1994. 48(2): p. 67-79.*
 70. Kritis, A.A., et al., *Isolation and characterization of a third isoform of human hepatocyte nuclear factor 4. Gene, 1996. 173(2): p. 275-80.*
 71. Thomas, H., et al., *A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. Hum Mol Genet, 2001. 10(19): p. 2089-97.*
 72. Eeckhoutte, J., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. Endocrinology, 2003. 144(5): p. 1686-94.*
 73. Babeu, J.P. and F. Boudreau, *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. World J Gastroenterol, 2014. 20(1): p. 22-30.*
 74. Wang, Z., et al., *Nuclear receptor HNF4alpha performs a tumor suppressor function in prostate cancer via its induction of p21-driven cellular senescence. Oncogene, 2020. 39(7): p. 1572-1589.*
 75. Lazarevich, N.L., et al., *Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression. Exp Oncol, 2010. 32(3): p. 167-71.*
 76. Hatzia Apostolou, M., et al., *An HNF4alpha-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. Cell, 2011. 147(6): p. 1233-47.*
 77. Tanaka, T., et al., *Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer. J Pathol, 2006. 208(5): p. 662-72.*
 78. Chellappa, K., G.R. Robertson, and F.M. Sladek, *HNF4alpha: a new biomarker in colon cancer? Biomark Med, 2012. 6(3): p. 297-300.*
 79. Ahn, S.H., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis, 2008. 14(7): p. 908-20.*
 80. Schwartz, B., et al., *Inhibition of colorectal cancer by targeting hepatocyte nuclear factor-4alpha. Int J Cancer, 2009. 124(5): p. 1081-9.*
 81. Zhang, B., et al., *Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. Nature, 2014. 513(7518): p. 382-7.*
 82. Nishiyama, M., A.I. Skoultschi, and K.I. Nakayama, *Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt-beta-catenin signaling pathway. Mol Cell Biol, 2012. 32(2): p. 501-12.*
 83. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease. Cell, 2012. 149(6): p. 1192-205.*
 84. Kim, I., et al., *beta-Catenin recognizes a specific RNA motif in the cyclooxygenase-2 mRNA 3'-UTR and interacts with HuR in colon cancer cells. Nucleic Acids Res, 2012. 40(14): p. 6863-72.*
 85. Babeu, J.P., et al., *P1 promoter-driven HNF4alpha isoforms are specifically repressed by beta-catenin signaling in colorectal cancer cells. J Cell Sci, 2018. 131(13).*

86. Desai, T.K., et al., *The incidence of oesophageal adenocarcinoma in non-dysplastic Barrett's oesophagus: a meta-analysis*. Gut, 2012. **61**(7): p. 970-6.
87. Spechler, S.J. and R.F. Souza, *Barrett's esophagus*. N Engl J Med, 2014. **371**(9): p. 836-45.
88. Rogerson, C., et al., *Identification of a primitive intestinal transcription factor network shared between esophageal adenocarcinoma and its precancerous precursor state*. Genome Res, 2019. **29**(5): p. 723-736.
89. Owen, R.P., et al., *Single cell RNA-seq reveals profound transcriptional similarity between Barrett's oesophagus and oesophageal submucosal glands*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4261.
90. Kojima, K., et al., *The expression of hepatocyte nuclear factor-4alpha, a developmental regulator of visceral endoderm, correlates with the intestinal phenotype of gastric adenocarcinomas*. Pathology, 2006. **38**(6): p. 548-54.
91. Lv, D.D., L.Y. Zhou, and H. Tang, *Hepatocyte nuclear factor 4alpha and cancer-related cell signaling pathways: a promising insight into cancer treatment*. Exp Mol Med, 2021. **53**(1): p. 8-18.
92. Chang, H.R., et al., *HNF4alpha is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer*. Gut, 2016. **65**(1): p. 19-32.
93. Hong, Y.H., et al., *AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27495-501.
94. Nam, S., et al., *PATHOME: an algorithm for accurately detecting differentially expressed subpathways*. Oncogene, 2014. **33**(41): p. 4941-51.
95. Kurayoshi, M., et al., *Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion*. Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10439-48.
96. Xu, C., et al., *HNF4alpha pathway mapping identifies wild-type IDH1 as a targetable metabolic node in gastric cancer*. Gut, 2020. **69**(2): p. 231-242.
97. Yang, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5562-71.
98. van der Post, R.S., et al., *HNF4A immunohistochemistry facilitates distinction between primary and metastatic breast and gastric carcinoma*. Virchows Arch, 2014. **464**(6): p. 673-9.
99. Matsuhisa, T., et al., *Relation between bile acid reflux into the stomach and the risk of atrophic gastritis and intestinal metaplasia: a multicenter study of 2283 cases*. Dig Endosc, 2013. **25**(5): p. 519-25.
100. Flandez, M., et al., *KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation*. Exp Cell Res, 2008. **314**(20): p. 3712-23.
101. Ni, Z., et al., *TGR5-HNF4alpha axis contributes to bile acid-induced gastric intestinal metaplasia markers expression*. Cell Death Discov, 2020. **6**: p. 56.
102. Boyd, M., et al., *Mapping of HNF4alpha target genes in intestinal epithelial cells*. BMC Gastroenterol, 2009. **9**: p. 68.
103. Zhang, P., et al., *Non-Coding RNAs and their Integrated Networks*. J Integr Bioinform, 2019. **16**(3).
104. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 57-74.
105. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 101-8.
106. Pavet, V., et al., *Towards novel paradigms for cancer therapy*. Oncogene, 2011. **30**(1): p. 1-20.

107. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
108. Bhan, A. and S.S. Mandal, *Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease*. ChemMedChem, 2014. **9**(9): p. 1932-56.
109. He, Y., et al., *The antisense transcriptomes of human cells*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1855-7.
110. Batagov, A.O., et al., *Role of genomic architecture in the expression dynamics of long noncoding RNAs during differentiation of human neuroblastoma cells*. BMC Syst Biol, 2013. **7 Suppl 3**: p. S11.
111. Khalil, A.M., et al., *Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11667-72.
112. Lanzafame, M., et al., *The Role of Long Non-Coding RNAs in Hepatocarcinogenesis*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
113. Mercer, T.R., et al., *Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 716-21.
114. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
115. Kornienko, A.E., et al., *Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription*. BMC Biol, 2013. **11**: p. 59.
116. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
117. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 96-118.
118. Wu, H., L. Yang, and L.L. Chen, *The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation*. Trends Genet, 2017. **33**(8): p. 540-552.
119. Mele, M., et al., *Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs*. Genome Res, 2017. **27**(1): p. 27-37.
120. Schlackow, M., et al., *Distinctive Patterns of Transcription and RNA Processing for Human lincRNAs*. Mol Cell, 2017. **65**(1): p. 25-38.
121. Yin, Y., et al., *U1 snRNP regulates chromatin retention of noncoding RNAs*. Nature, 2020. **580**(7801): p. 147-150.
122. Zuckerman, B. and I. Ulitsky, *Predictive models of subcellular localization of long RNAs*. RNA, 2019. **25**(5): p. 557-572.
123. Zuckerman, B., et al., *Gene Architecture and Sequence Composition Underpin Selective Dependency of Nuclear Export of Long RNAs on NXF1 and the TREX Complex*. Mol Cell, 2020. **79**(2): p. 251-267 e6.
124. Carlevaro-Fita, J., et al., *Cytoplasmic long noncoding RNAs are frequently bound to and degraded at ribosomes in human cells*. RNA, 2016. **22**(6): p. 867-82.
125. Mercer, T.R., et al., *The human mitochondrial transcriptome*. Cell, 2011. **146**(4): p. 645-58.
126. Li, S., et al., *exoRBase: a database of circRNA, lincRNA and mRNA in human blood exosomes*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D106-D112.
127. Statello, L., et al., *Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes*. PLoS One, 2018. **13**(4): p. e0195969.
128. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(12): p. 861-74.
129. DiStefano, J.K., *The Emerging Role of Long Noncoding RNAs in Human Disease*. Methods Mol Biol, 2018. **1706**: p. 91-110.

130. Taniue, K. and N. Akimitsu, *The Functions and Unique Features of LncRNAs in Cancer Development and Tumorigenesis*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
131. Do, H. and W. Kim, *Roles of Oncogenic Long Non-coding RNAs in Cancer Development*. Genomics Inform, 2018. **16**(4): p. e18.
132. Kitagawa, M., et al., *Cell cycle regulation by long non-coding RNAs*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(24): p. 4785-94.
133. Rossi, M.N. and F. Antonangeli, *LncRNAs: New Players in Apoptosis Control*. Int J Cell Biol, 2014. **2014**: p. 473857.
134. Khorshidi, A., P. Dhaliwal, and B.B. Yang, *Noncoding RNAs in Tumor Angiogenesis*. Adv Exp Med Biol, 2016. **927**: p. 217-41.
135. Huang, Q., J. Yan, and R. Agami, *Long non-coding RNAs in metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(1): p. 75-81.
136. Shen, X.H., P. Qi, and X. Du, *Long non-coding RNAs in cancer invasion and metastasis*. Mod Pathol, 2015. **28**(1): p. 4-13.
137. Li, C., *New Functions of Long Noncoding RNAs during EMT and Tumor Progression*. Cancer Res, 2019. **79**(14): p. 3536-3538.
138. Li, T., et al., *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(8): p. 8601-12.
139. Tripathi, V., et al., *The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation*. Mol Cell, 2010. **39**(6): p. 925-38.
140. Tan, H., et al., *Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications*. Theranostics, 2020. **10**(19): p. 8880-8902.
141. Bayoumi, A.S., et al., *Crosstalk between Long Noncoding RNAs and MicroRNAs in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(3): p. 356.
142. Schmitt, A.M. and H.Y. Chang, *Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways*. Cancer Cell, 2016. **29**(4): p. 452-463.
143. Du, Z., et al., *Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(7): p. 908-13.
144. Akers, J.C., et al., *Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies*. J Neurooncol, 2013. **113**(1): p. 1-11.
145. Bolha, L., M. Ravnik-Glavac, and D. Glavac, *Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer*. Dis Markers, 2017. **2017**: p. 7243968.
146. Shi, T., G. Gao, and Y. Cao, *Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics*. Dis Markers, 2016. **2016**: p. 9085195.
147. Anfossi, S., et al., *Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(9): p. 541-563.
148. Silva, A., M. Bullock, and G. Calin, *The Clinical Relevance of Long Non-Coding RNAs in Cancer*. Cancers (Basel), 2015. **7**(4): p. 2169-82.
149. Gao, Y., et al., *Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(24): p. 3401-3412.
150. Cao, C., et al., *LINC01303 functions as a competing endogenous RNA to regulate EZH2 expression by sponging miR-101-3p in gastric cancer*. J Cell Mol Med, 2019. **23**(11): p. 7342-7348.
151. Xuan, Y. and Y. Wang, *Long non-coding RNA SNHG3 promotes progression of gastric cancer by regulating neighboring MED18 gene methylation*. Cell Death Dis, 2019. **10**(10): p. 694.
152. Zhu, X., et al., *A long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of gastric cancer*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 60.
153. Wang, Y., et al., *Systematic identification of non-coding pharmacogenomic landscape in cancer*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3192.

154. Wang, C.J., et al., *The lncRNA UCA1 promotes proliferation, migration, immune escape and inhibits apoptosis in gastric cancer by sponging anti-tumor miRNAs*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 115.
155. Zhang, E., et al., *Increased expression of long noncoding RNA TUG1 predicts a poor prognosis of gastric cancer and regulates cell proliferation by epigenetically silencing of p57*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2109.
156. Lai, F., et al., *Directed RNase H Cleavage of Nascent Transcripts Causes Transcription Termination*. Mol Cell, 2020. **77**(5): p. 1032-1043 e4.
157. Lee, J.S. and J.T. Mendell, *Antisense-Mediated Transcript Knockdown Triggers Premature Transcription Termination*. Mol Cell, 2020. **77**(5): p. 1044-1054 e3.
158. Warner, K.D., C.E. Hajdin, and K.M. Weeks, *Principles for targeting RNA with drug-like small molecules*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(8): p. 547-558.
159. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
160. Perez-Pinera, P., et al., *RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors*. Nat Methods, 2013. **10**(10): p. 973-6.
161. Lavorgna, G., et al., *Long non-coding RNAs as novel therapeutic targets in cancer*. Pharmacol Res, 2016. **110**: p. 131-138.
162. Qin, R., et al., *Expression and significance of homeodomain protein Cdx2 in gastric carcinoma and precancerous lesions*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(25): p. 3296-302.
163. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes*. Science, 2020. **367**(6478).
164. Tai, Y.L., et al., *Exosomes in cancer development and clinical applications*. Cancer Sci, 2018. **109**(8): p. 2364-2374.
165. Soung, Y.H., et al., *Exosomes in Cancer Diagnostics*. Cancers (Basel), 2017. **9**(1).
166. Von Schulze, A. and F. Deng, *A review on exosome-based cancer therapy*. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 2020. **6**: p. 42.
167. Sun, Q., Q. Hao, and K.V. Prasanth, *Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression*. Trends Genet, 2018. **34**(2): p. 142-157.
168. Bond, C.S. and A.H. Fox, *Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA*. J Cell Biol, 2009. **186**(5): p. 637-44.
169. Carlevaro-Fita, J. and R. Johnson, *Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization*. Mol Cell, 2019. **73**(5): p. 869-883.
170. Yoon, J.H., K. Abdelmohsen, and M. Gorospe, *Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA*. J Mol Biol, 2013. **425**(19): p. 3723-30.
171. Rabani, M., et al., *Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(5): p. 436-42.
172. Schwanhausser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-42.
173. Sharova, L.V., et al., *Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells*. DNA Res, 2009. **16**(1): p. 45-58.
174. Shi, K., et al., *Genome-wide analysis of lncRNA stability in human*. PLoS Comput Biol, 2021. **17**(4): p. e1008918.