



ΤΜΗΜΑ  
Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Κατασκευή μοριακών εργαλείων για την  
απενεργοποίηση lncRNA με τεχνολογία  
CRISPR-νικάση και TetR RNAi»

«Construction of molecular tools for lncRNA  
inactivation by CRISPR-nickase technology  
and TetR RNAi»

GRIGORAS IOANA

Πτυχιακή εργασία για την απόκτηση τίτλου σπουδών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής

Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

## **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

### **Επιβλέπων καθηγητής:**

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

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Μπελούκας Απόστολος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Ευχαριστίες.....	6
<b>1.Εισαγωγή.....</b>	<b>7</b>
1.1 Γαστρικός καρκίνος.....	7
1.1.1 Παράγοντες κινδύνου.....	7
1.1.2 Ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου.....	8
1.1.3 Αντιμετώπιση γαστρικού καρκίνου.....	12
1.2 Long non-coding RNA.....	14
1.2.1 Βιολογική σημασία των long non-coding RNA.....	14
1.2.2 Μηχανισμοί δράσης.....	15
1.2.3 LncRNA και καρκίνος.....	17
1.3 Τρόποι σίγησης γονιδίων.....	18
1.3.1 Σταθερή σίγηση γονιδίων.....	19
1.3.2 Επαγόμενη σίγηση γονιδίων.....	20
1.3.3 CRISPR/Cas9.....	21
<b>2. Σκοπός και ερευνητική υπόθεση.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>26</b>
3.1 Υλικά .....	26
3.1.1 Κυτταρικές σειρές.....	26
3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς για την γενετική τροποποίηση των κυττάρων.....	26
3.1.3 Συσκευές και εργαλεία.....	28
3.2 Μέθοδοι.....	29
3.2.1 Γονοτύπηση.....	29
3.2.2 Χαρακτηρισμός επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων.....	30
3.2.3 Κλωνοποίηση των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pGEM 3ZF(+). ....	32
3.2.4 Μετασχηματισμός πλασμιδίου σε βακτηριακά κύτταρα.....	34
3.2.5 Απομόνωση πλασμιδίου και διαγνωστική PCR.....	34
3.2.6 Προετοιμασία δειγμάτων προς αλληλούχηση μέσω PCR.....	35

3.2.7 Αλληλούχηση δειγμάτων.....	36
3.2.8 Γονοτύπηση με πέψη για εύρεση πολυμορφισμού νουκλεοτιδίου (SNP).....	36
3.2.9 Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (CFA).....	37
3.2.10 Δοκιμασία επούλωσης πληγών.....	37
<b>4. Αποτελέσματα.....</b>	<b>38</b>
4.1 All-in-One RECUR1 Promoter .....	38
4.1.1 Γονοτύπηση κλώνων.....	38
4.1.2 Ανάλυση επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου RECUR1 και του γονιδίου στόχου του.....	40
4.1.3 Κλωνοποίηση της γενετικά τροποποιημένης περιοχής του υποκινητή.....	43
4.1.4 Προετοιμασία δειγμάτων προς αλληλούχηση μέσω PCR.....	45
4.1.5 Αλληλούχηση της περιοχής του υποκινητή των γενετικά τροποποιημένων κλώνων.....	46
4.1.6 Αλληλούχηση της περιοχής του υποκινητή από γαστρικές κυτταρικές σειρές.....	47
4.1.7 Γονοτύπηση με πέψη για την εύρεση πολυμορφισμού νουκλεοτιδίου (SNP).....	48
4.1.8 Έκφραση του μεταγράφου RECUR1 και του γονιδίου στόχου του στις CRISPR μεταλλαγμένες σειρές.....	50
4.1.9 Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (CFA).....	53
4.1.10 Δοκιμασία επούλωσης πληγών.....	55
4.2 NUGC4-TetR: Σύστημα επαγόμενης σίγησης.....	57
4.3. AGS pTER GATA4.....	58
4.3.1 Ανάλυση επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4.....	58
4.3.2 Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (CFA).....	59
<b>5. Συζήτηση.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>63</b>

## Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στομάχου, ο οποίος πυροδοτείται μέσα από βλάβες στο γενετικό υλικό ή με τη εμπλοκή περιβαλλοντικών παραγόντων. Οδηγεί στη δημιουργία νεοπλασίας σε οποιοδήποτε μέρος του στομάχου, η οποία κατηγοριοποιείται με βάση ιστολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών, και τελικά αποκτά την ικανότητα εξάπλωσης σε άλλα όργανα του σώματος. Σήμερα, είναι ο 5<sup>ος</sup> καρκίνος σε συχνότητα εμφάνισης και ο 3<sup>ος</sup> σε ποσοστά θνησιμότητας. Αυτό οφείλεται στη μην έγκαιρη διάγνωση λόγω απουσίας συμπτωμάτων, με συνέπεια την αντιμετώπιση όγκων προχωρημένου σταδίου. Παρόλο που η συχνότητα εμφάνισης του μειώθηκε τις τελευταίες δεκαετίες, παραμένει ακόμη σε υψηλά επίπεδα κινδύνου και μάλιστα σύμφωνα με το «Globocan» αναμένεται αύξηση του επιπολασμού κατά 62,8% σε όλο τον κόσμο μέχρι το 2040, λόγω δημογραφικών αλλαγών.

Τα παραπάνω τονίζουν την ανάγκη εύρεσης πιο αποτελεσματικών και κυρίως άμεσων μεθόδων ανίχνευσης των όγκων του στομάχου. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στρέφεται προς την μελέτη βιοδεικτών, μόρια τα οποία με την ανίχνευση τους στα υγρά του σώματος των ασθενών μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για την διάγνωση, πρόγνωση και την ανταπόκριση του όγκου στη θεραπεία. Μια κατηγορία μορίων που βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας είναι τα lncRNA, των οποίων η δράση συσχετίστηκε με ποικίλους τύπους καρκίνου, μέσα στους οποίους εντάσσεται και ο γαστρικός καρκίνος. Ωστόσο, η αποσαφήνιση των πολύπλοκων μηχανισμών δράσης τους αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές. Στη παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται η κατασκευή μοριακών εργαλείων για την απενεργοποίηση των lncRNA, με τεχνολογίες CRISPR-νικάσης και TetR-RNAi, προκειμένου αυτά να αποτελέσουν θεμέλιο για μελλοντικές λειτουργικές μελέτες.

Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε σταθερή σίγηση του μεταγράφου RECUR1 σε κύτταρα AGS, με την απενεργοποίηση του υποκινητή του λόγω αποκοπής ρυθμιστικής περιοχής με τη διπλή δράση της νικάσης Cas9<sup>D10A</sup>. Βάση προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου, έχει αποδειχθεί ότι το συγκεκριμένο μετάγραφο σχετίζεται με τον καρκίνο του στομάχου, και μάλιστα έγινε ο χαρακτηρισμός του από προηγούμενες πτυχιακές εργασίες του εργαστηρίου. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για την επίδραση που έχει η απενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποκινητή στα κύτταρα, τόσο σε μοριακό όσο και σε φαινοτυπικό επίπεδο.

Παράλληλα, έγινε προσπάθεια κατασκευής σταθερών κυτταρικών σειρών NUGC4 που να εκφράζουν την πρωτεΐνη TetR στο γονιδίωμα τους, ως προαπαιτούμενο για την κατασκευή ενός εργαλείου επαγόμενης σίγησης. Ωστόσο, έπειτα από γενετική τροποποίηση, δεν ανιχνεύτηκε έκφραση της TetR πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας την ανάγκη καλύτερης προσαρμογής του πρωτοκόλλου στα συγκεκριμένα κύτταρα.

Τέλος, ένα τρίτο εργαλείο κατασκευάστηκε για την επαγόμενη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, που αποδείχθηκε μέσα από πειράματα του εργαστηρίου ότι εμπλέκεται στον καρκίνο του στομάχου ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων και τη μεταγραφή του RECUR1. Διεξάχθηκε η εισαγωγή της ρυθμιστικής κασέτας TetO-shGATA4 σε κύτταρα AGS ώστε να καταστέλλεται με επαγόμενο τρόπο η πρωτεΐνη TetR μέσω της προσθήκης δοξκυκλίνης. Μελλοντικές χρήσεις του εργαλείου στοχεύουν στην μελέτη των επιπτώσεων από την επαγόμενη καταστολή του GATA4 στην έκφραση του RECUR1 σε γαστρικά κύτταρα.

## Abstract

Gastric Cancer is characterized by uncontrolled proliferation of stomach cells, which is triggered by genome alterations or by the involvement of environmental factors. It leads to the formation of neoplasia in any part of the stomach, which is categorized based on histological and molecular characteristics, and eventually spreads to other organs of the body. Nowadays, this disease ranks as the 5<sup>th</sup> most common cancer and the 3<sup>rd</sup> in mortality rates, considering the lack of early diagnosis due to the absence of symptoms, resulting in the confrontation of advanced stage tumors. Although its incidence has decreased in recent decades, it still remains at high risk levels, and according to “Globocan”, an increase in prevalence of 62.8% is expected worldwide by 2040, due to demographic changes. This fact emphasizes the need to find more effective, and above all, direct methods of detecting stomach tumors.

The interest of the scientific community is directed towards the study of biomarkers, the detecting of which in the body fluids of patients, can provide information of the diagnosis, prognosis as well as the response to treatment. LncRNAs refer to a class of transcripts that is at the centre of cancer research, since their activity has been associated with various malignancies, including gastric adenocarcinoma. However, elucidation of their complex function is a challenge for researchers. This thesis focuses on the construction of molecular tools for direct lncRNA inactivation, based on CRISPR-nickase and TetR-RNAi technologies, in order to facilitate downstream functional analyses in gastric cancer models.

Specifically, stable silencing of the non-coding transcript RECUR1 was achieved in AGS cells, by knocking-out its promoter through the dual action of the Cas9<sup>D10A</sup> nickase. Based on previous data of the laboratory, this lncRNA transcript has been shown to be associated with gastric cancer. Analyses were performed on the effect that inactivation of the specific promoter has on the cells, both at the molecular and phenotypic level.

Also, an attempt was made to engineer stable NUGC4 cell lines to express the TetR protein in their genome, as a template for an inducible silencing tool. However, no protein expression was detected, suggesting the need to better adapt the protocol.

Finally, a third tool was constructed for inducible silencing of the pioneer transcription factor GATA4, also shown to be involved in gastric cancer and RECUR1 regulation of transcription. Inserting the TetO-shGATA4 regulatory cassette into AGS cells, led to conditional expression of the GATA4 protein upon addition of doxycycline. A future goal of this tool is to study the effect of GATA4 conditional knock-down on RECUR1 expression in gastric cancer cells.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τον θαυμασμό μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Γιακουντή Αντώνη, και να τον ευχαριστήσω για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, και κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο το χρονικό διάστημα της άψογης συνεργασίας μας. Μας δίδαξε πως να ερμηνεύουμε την επιστήμη πέρα από το τεχνικό κομμάτι, και μοιράστηκε τις γνώσεις και δεξιότητες του. Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου, και πλέον φίλες, την Ελένη Μπεγκόλι και Μυρτώ Χατζιαγγέλου, που ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα και μου έμαθαν όλα αυτά που γνωρίζω σήμερα με πολύ υπομονή, και ως δυο μοναδικές προσωπικότητες που μέσα από την αγάπη τους για την επιστήμη μας έδιναν κίνητρο κάθε μέρα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τις συμφοιτήτριες μου, τη Μαριάνθη Μαρούλη, τη Χριστίνα Σπαχίου και Τριανταφυλλία Σακκά για το φιλικό περιβάλλον που δημιουργήσαμε μαζί στο εργαστήριο και για το ομαδικό πνεύμα που ανέδειξαν όλο αυτό τον καιρό, καθώς και για την υποστήριξη τους. Τέλος, ένα θερμό ευχαριστώ στους φίλους και στην οικογένεια μου που παρέμειναν πάντα στο πλευρό μου και μου έδωσαν δύναμη και θάρρος, αλλά και που πίστεψαν σε εμένα σε κάθε στιγμή.

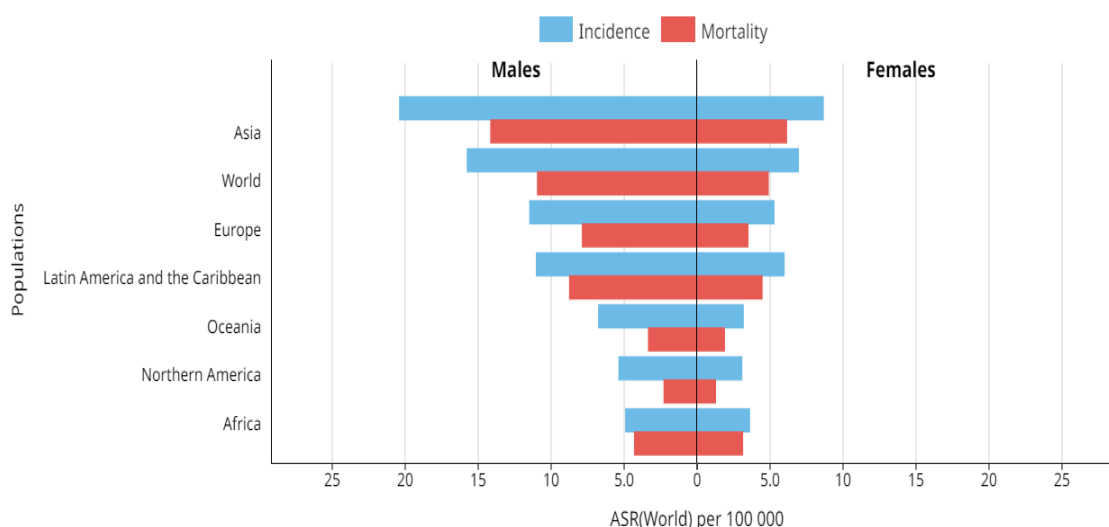
# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Γαστρικός καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος κατατάσσεται ανάμεσα στις πιο διαδεδομένες και επιθετικές μορφές κακοηθειών και ορίζεται ως μια ετερογενή και πολυπαραγοντική νόσο. Ο αριθμός των νέων κρουσμάτων κυμαίνεται στο 1 εκ. κάθε χρόνο, με μέσο όρο επιβίωσης τα 5 χρόνια στο 25-30% των περιπτώσεων, ενώ λιγότερα από 12 μήνες σε προχωρημένα στάδια [1, 2]. Μέχρι το 1980 ήταν η κύρια αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο σε όλο τον κόσμο, ωστόσο σταδιακά σημειώθηκε μείωση του επιπολασμού και θνησιμότητας σε αναπτυγμένες χώρες όπως Βόρεια Αμερική, Βόρεια Ευρώπη, Αυστραλία, Ιαπωνία και Κίνα. Παρά τη μείωση αυτή, ο γαστρικός καρκίνος παραμένει ως η 3<sup>η</sup> αιτία θανάτου σχετιζόμενη με νεοπλασίες, ενώ ο επιπολασμός του διαφοροποιείται σημαντικά ανά γεωγραφική θέση [3]. Συγκεκριμένα, το 2020, τα υψηλότερα ποσοστά νέων κρουσμάτων καταγράφηκαν στην Ανατολική Ασία, ενώ στα δυτικά της ίδιας ηπείρου σημειώθηκαν οι περισσότεροι θάνατοι. Παράλληλα, τα χαμηλότερα ποσοστά περιστατικών γαστρικού καρκίνου και θνησιμότητας παρατηρήθηκαν στην Βόρεια Αμερική και Ευρώπη, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία και σε περιοχές της Αφρικής. Οι διαφορές στην γεωγραφική κατανομή των περιστατικών οφείλονται στην διαφορετική έκθεση των ατόμων σε περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και στον διαφορετικό τρόπο ζωής που μπορούν να πυροδοτήσουν την νόσο [4], [5].

### 1.1.1 Παράγοντες Κινδύνου

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, η οποία επηρεάζεται τόσο από το γενετικό υπόβαθρο όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η συχνότητα της νόσου διαφοροποιείται ανάμεσα στα 2 φύλα, με τον ανδρικό πληθυσμό να παρουσιάζει διπλάσια ποσοστά νέων περιστατικών συγκριτικά με το γυναικείο φύλο, όπως παρουσιάζεται και στην **εικόνα 1** [3]. Ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης κυμαίνεται περίπου στα 60 έτη, με το 10% πλέον να εμφανίζεται σε μικρότερες ηλικίες μεταξύ 40-50 ετών.



**Εικόνα 1:** Επιπολασμός ( μπλε χρώμα) και θνησιμότητα (κόκκινο χρώμα) ανά το παγκόσμιο, το 2020 στα δύο φύλα, καρκίνος του στομάχου, όλες οι ηλικίες (excl. NMSC) (World Health Organization)

## Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Έρευνες έδειξαν ότι ένας από τους παράγοντες που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου είναι η διατροφή. Η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αλατιού συσχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Βρέθηκε ότι προκαλεί ερεθισμό του πεπτικού βλεννογόνου πυροδοτώντας ένα καταρράκτη όγκο-επαγωγικών αντιδράσεων. Άλλοι παράγοντες είναι το κόκκινο, καπνιστό ή επεξεργασμένο κρέας καθώς σε αυτά εμπεριέχονται καρκινογόνα συστατικά, αλλά και η μειωμένη πρόσληψη φρέσκων φρούτων και λαχανικών [6]

Ο τρόπος ζωής και οι συνήθειες των ανθρώπων τον εκθέτουν καθημερινά σε παράγοντες κινδύνου. Η Παγκόσμια Έταιρεία Έρευνας στον Καρκίνο (IACR) κατατάσσει το κάπνισμα στους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση κακοηθειών στο στομάχι. Μελέτες απέδειξαν επίσης ότι η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών αυξάνει το ρίσκο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, όπως και η απουσία σωματικής άσκησης [6]

## Γενετικό υπόβαθρο

Το γενετικό προφίλ κάθε ατόμου είναι ξεχωριστό, με ένα ποσοστό των ανθρώπων να προδιαθέτει για εμφάνιση κακοηθειών. Παράδειγμα αποτελούν οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί, που σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά ερεθίσματα καθορίζουν την ευαισθησία του ατόμου στην ανάπτυξη όγκων. Γενετικές αλλοιώσεις που βρέθηκαν να σχετίζονται με την επαγωγή όγκων στο στομάχι αφορούν την απορρύθμιση της βλαστικότητα των κυττάρων, εξαιτίας της απορρύθμισης μονοπατιών σηματοδότησης και τελεστών που φυσιολογικά διατηρούν την ομοιότητα [7]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι μεταλλάξεις στα μονοπάτια WNT/ $\beta$ -catenin [8], Hippo [9], *Hedgehog* [10] και TGF $\beta$ /SMAD4 [11].

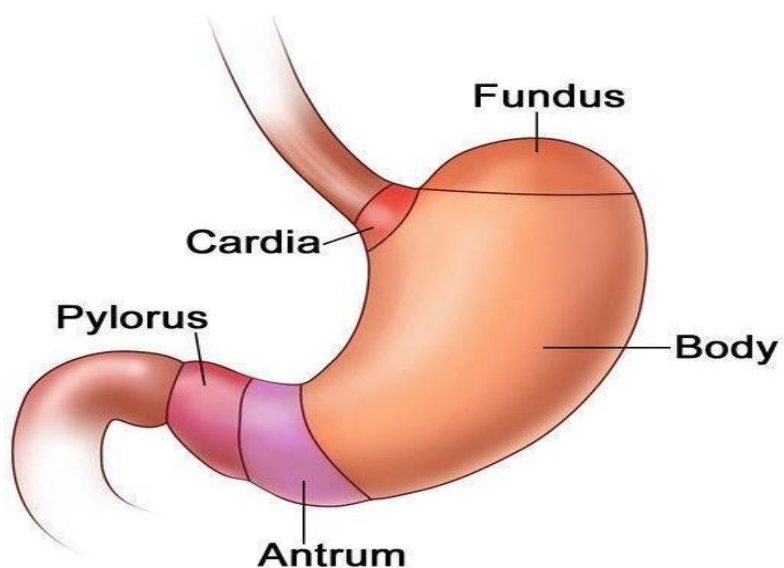
Άλλη πηγή ογκογένεσης αποτελούν οι μεταλλάξεις στους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης και αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, που έχουν ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση όγκο-κατασταλτικών γονιδίων ή την υπερέκφραση ογκογονιδίων. Αυτό έχει ως αντίκτυπο την απουσία τελεστών που εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία των κυττάρων. Συνέπειες αυτών των ανωμαλιών είναι η ελλιπής επιδιόρθωση βλαβών στο γενετικό υλικό, η μη φυσιολογική κυτταρική διαίρεση που οδηγεί σε φαινόμενα ανευπλοειδίας, καθώς και η απουσία παραγόντων που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση και διατήρηση φαινοτύπου. Τα παραπάνω οδηγούν στην αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος ευνοώντας την ανάπτυξη όγκου [1].

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο γαστρικός καρκίνος είναι μια σποραδική νόσος, με εξαίρεση το 10% των ασθενών που παρουσιάζουν οικογενειακό ιστορικό. Βάσει προηγούμενης μελέτης, [12] αποδείχθηκε ότι αν στην οικογένεια υπάρχει άτομο που φέρει την νόσο, τότε η πιθανότητα εμφάνισης για τους συγγενείς εξ αίματος αυξάνεται από 2 μέχρι και 10 φορές.

### 1.1.2 Ταξινόμηση Γαστρικού Καρκίνου

Ο πιο διαδεδομένος τύπος γαστρικού καρκίνου είναι το αδενοκαρκίνωμα, το οποίο αποτελεί το 90% των περιπτώσεων της νόσου και προέρχεται από το γαστρικό επιθήλιο. Το 10% απαρτίζεται από λιγότερο συχνούς τύπους όπως είναι το σάρκωμα, το οποίο ξεκινάει από τον συνδετικό ιστό, και το λέμφωμα από τα λεμφαγγεία.

## Ανατομία στομάχου και γαστρικός καρκίνος

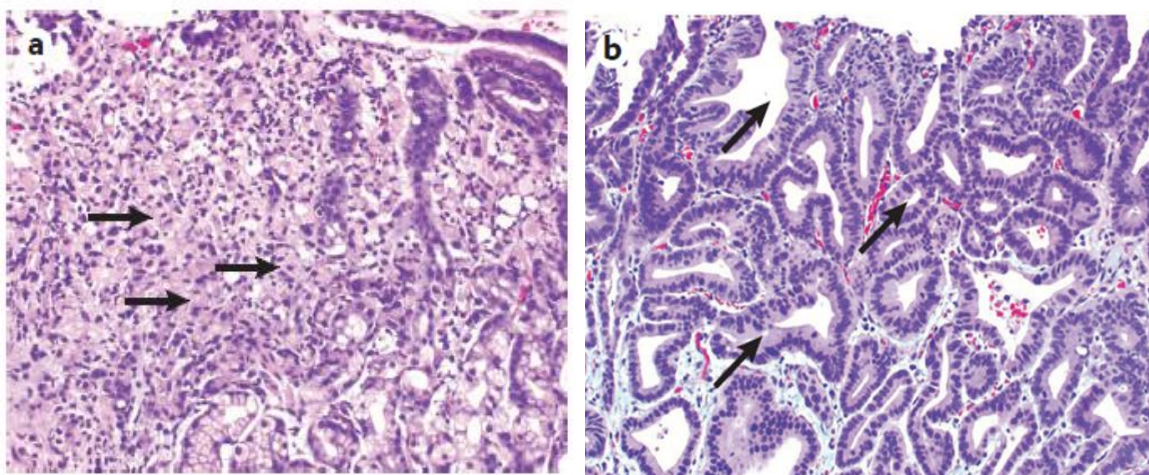


*Εικόνα 2: Ανατομία του στομάχου (National Cancer Institute, 2018)*

Ανάλογα με το σημείο εμφάνισης του όγκου, ο γαστρικός καρκίνος διαφοροποιείται σε εγγύς, όταν εντοπίζεται στην περιοχή της καρδίας (Cardia) και απομακρυσμένο, που εμφανίζεται σε περιοχές εκτός της καρδίας. Εκτός από την ανατομία, τα δύο είδη γαστρικού καρκίνου διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς την επιδημιολογία, τους παράγοντες κινδύνου, ή την συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των δύο φύλων [4].

### Ιστολογική κατάταξη

Το πιο δεδομένο σύστημα *ιστολογικής* κατηγοριοποίησης των όγκων είναι η **Κατάταξη κατά Lauren (1960)**. Σύμφωνα με αυτήν, οι γαστρικοί όγκοι διαφοροποιούνται σε 3 ιστολογικούς υπότυπους – εντερικός, διάχυτος και ενδιάμεσος τύπος, με συχνότητες εμφάνισης 54%, 32% και 15% αντίστοιχα [13].



*Εικόνα 3: (a) Διάχυτος τύπος γαστρικού καρκίνου, (b) Εντερικός τύπος γαστρικού καρκίνου [1].*

Ο διάχυτος τύπος γαστρικού καρκίνου αποτελείται στην πλειοψηφία του από διάσπαρτα, μη διαφοροποιημένα κύτταρα, με ελάχιστη ικανότητα προσκόλλησης και χαρακτηριστική διείσδυση στο γαστρικό τοίχωμα. Αυτός ο τύπος προέρχεται από το φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο και σχετίζεται με γαστρίτιδα. Οι ενδείξεις για την εμπλοκή του βακτηριδίου του πυλωρού είναι ελάχιστες, εφόσον οι αιτίες εμφάνισης του έχουν κατά βάση γενετικό υπόβαθρο. Είναι επικρατέστερος σε περιοχές χαμηλής συχνότητας εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, καθώς και σε θηλυκά άτομα μικρότερης ηλικίας. Επηρεάζει συνήθως το σώμα του στομάχου, ενώ παρουσιάζει κακή πρόγνωση για τον ασθενή λόγω αυξημένων ποσοστών αδιαφοροποίητων κακρινικών κυττάρων. Στην **εικόνα 3(a)** απεικονίζεται ο διάχυτος τύπος γαστρικού καρκίνου, με χρώση αιματοξυλίνης (μπλε πυρήνες) και ηωσίνης (ροζ κυτταρόπλασμα), όπου τα βέλη υποδεικνύουν τα κύτταρα «signet ring cells». Χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων αποτελεί η μετακίνηση του πυρήνα προς την περιφέρεια, παρουσία μεγάλων ποσοτήτων μουκινών (γλυκοπρωτεΐνες), που θεωρούνται αναστολείς κυτταρικής προσκόλλησης.

Ο εντερικός τύπος γαστρικού καρκίνου αποτελείται από πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα, και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση αδένων, όπως φαίνεται στην εικόνα 3(b) (υποδεικνύονται με τα βέλη) καθώς και την προσκόλληση των κυττάρων. Πυροδοτείται κατά βάση από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η λοίμωξη από το *H.pylori*, και υπάρχουν ενδείξεις πως αποτελεί φαινόμενο εντερικής μεταπλασίας του γαστρικού βλεννογόνου. Εμφανίζεται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (από 70 ετών και άνω), ενώ με καλύτερη πρόγνωση για τον ασθενή συγκριτικά με τον διάχυτο τύπο [14, 15].

Ο ενδιάμεσος τύπος εμφανίζεται σε μικρότερη συχνότητα, εντοπίζεται κυρίως στον ανδρικό πληθυσμό και χαρακτηρίζεται από την ικανότητα εισόδου στην κυκλοφορία του αίματος και ως εκ τούτου με μετάσταση [14].

## Μοριακή Ταξινόμηση

Για την καλύτερη κατανόηση και στοχευμένη αντιμετώπιση των όγκων, η κοινοπραξία TCGA (The Cancer Genome Atlas) κατέταξε τους όγκους του στομάχου σε τέσσερις κατηγορίες με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά τους. Αυτό το έργο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια τεχνικών όπως η αλληλούχηση εξονίων, ανάλυση αριθμού αντιγράφων του DNA, μελέτες του προτύπου μεθυλίωσης και μέτρηση επιπέδων έκφρασης mRNA και microRNA (Cancer Genome Atlas Research 2014).

### Όγκοι-θετικοί για τον ιό *Epstein-Barr*

Ο ιός *Epstein-Barr* (EBV) είναι ένας από τους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο, και συγκεκριμένα μολύνει τα Β-λεμφοκύτταρα και το επιθήλιο. Οι θετικοί σε EBV όγκοι εμφανίζονται κυρίως στο σώμα και στο θόλο του στομάχου και αντιστοιχούν περίπου στο 9% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου. Μέσα στο επιθήλιο του στομάχου, ο ιός προκαλεί υπερμεθυλίωση νησίδων CpG σε υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την σίγηση τους [16]. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι το CDKN2A, το οποίο κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p16 και p14, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση της απόπτωσης. Αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις κυκλοεξαρτώμενες κινάσες - CDK4, CDK6, και με τον μεταγραφικό παράγοντα p53 αντίστοιχα, καταστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο [17].

Περίπου το 80% των όγκων που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία εμφανίζουν μεταλλάξεις στα γονίδια PIK3CA [18] και JAK2, τελεστές σηματοδοτικών μονοπατιών, ενισχύοντας με την υπερ-έκφραση τους τα σήματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επιβίωσης καθώς και τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Άλλα γονίδια που ρυθμίζονται θετικά από την επίδραση του ιού είναι το CD274 και PDC1LG2, των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα λειτουργούν ως προσδέτες

στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Αποτελούν σήματα για την αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης, με αποτέλεσμα την επίτευξη της ανοσοδιαφυγής [19]

### **Όγκοι με Μικροδορυφορική Αστάθεια**

Αυτή η κατηγορία όγκων εμφανίζεται κυρίως σε περιπτώσεις εντερικού τύπου γαστρικού καρκίνου. Η διάγνωση πραγματοποιείται συνήθως σε προχωρημένη ηλικία και αντιστοιχεί στο 21.7% των συνολικών όγκων του στομάχου[20]. Οι μικροδορυφόροι είναι τμήματα του γενετικού υλικού που αποτελούνται από σύντομες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, και το μήκος τους ποικίλλει ανάμεσα στον πληθυσμό. Παρουσιάζουν μεγάλη αστάθεια και προδιαθέτουν για αλλοιώσεις όπως είναι η μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης και η μη σωστή ευθυγράμμιση κατά τον ανασυνδυασμό του DNA[21].

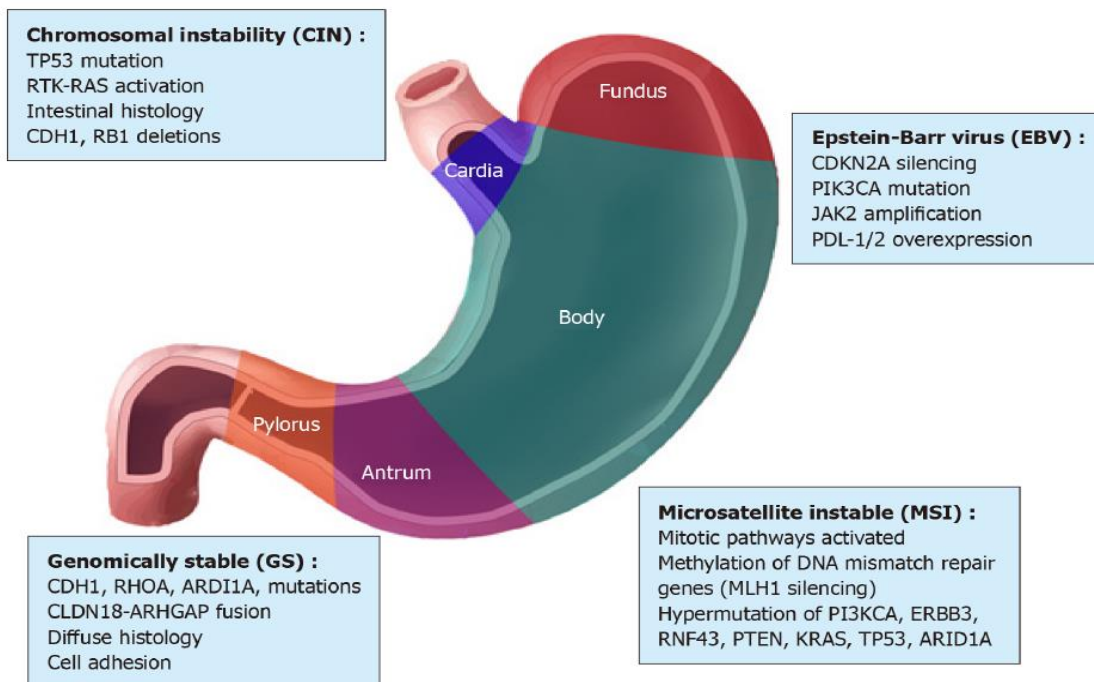
Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του DNA, το σύστημα MMR (Mismatch Repair) είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση βλαβών στο γονιδίωμα. Στην περίπτωση αυτών των όγκων, κύρια μέρη του συστήματος όπως η πρωτεΐνη MHL 1, καταστρέφονται μέσω μεθυλίωσης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό με κάθε κυτταρική διαίρεση και τη δημιουργία μικροδορυφορικής αστάθειας [21, 22]. Άλλες μεταλλάξεις που καταγράφονται σε αυτή την κατηγορία όγκων βρέθηκαν σε γονίδια όπως PIK3CA, ERBB3, RNF43, PTEN, TP53, KRAS και ARID1A [23]. Ως συνέπεια της απορρυθμισμένης λειτουργίας αυτών των γονιδίων είναι η καταστολή της απόπτωσης, η μη σωστή εκτέλεση του κυτταρικού κύκλου με τη συσσώρευση γενετικών βλαβών και τέλος, η υπερ-έκφραση τελεστών σηματοδοτικών μονοπατιών που ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.(Dedeurwaerdere, Claes et al. 2021)

### **Όγκοι με Γονιδιωματική Σταθερότητα**

Η συχνότητα εμφάνισης όγκων αυτού του τύπου είναι 19.7% στο σύνολο των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου. Ιστολογικά κατατάσσονται στην κατηγορία του διάχυτου υπότυπου και διαγιγνώσκονται σε ασθενείς μικρότερης ηλικίας (μέσος όρος στα 59 έτη). Σύμφωνα με έρευνες αποδείχθηκε ότι τα στατιστικά σημαντικά μεταλλαγμένα γονίδια σε αυτή την κατηγορία όγκων είναι το CDH1 [24], το οποίο κωδικοποιεί για την E-cadherin, με φυσιολογικό ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση. Ένα άλλο μεταλλαγμένο γονίδιο που βρέθηκε είναι το RHOA, που κωδικοποιεί για μια μικρή GTP-άση, η οποία φυσιολογικά ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, την κυτταρική ανάπτυξη και την μεταγραφή άλλων γονιδίων [25, 26].

### **Όγκοι με Χρωμοσωμική Αστάθεια**

Αποτελεί τον πιο διαδεδομένο μοριακό τύπο γαστρικού καρκίνου, με συχνότητα 49.8%, και συμπίπτει ιστολογικά με τον εντερικό υπότυπο. Η χρωμοσωμική αστάθεια προκύπτει από τη μη σωστή κατανομή των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται χρωμοσωμικές ελλείψεις και τελικά ανευπλοειδία [27, 28]. Τα γονίδια που βρέθηκαν να επηρεάζονται είναι το CDH1(E-cadherin), το CTNNA1 (Catenin Alpha 1), το RB1(retinoblastoma) και το TP53, με επακόλουθο τη μη φυσιολογική διεκπεραίωση διεργασιών όπως είναι η κυτταρική προσκόλληση και ο κυτταρικός κύκλος. Επιπρόσθετα, βρέθηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως EGFR, ERBB2, ERBB3, FGFR2, επάγοντας την κυτταρική αύξηση και επιβίωση, και τέλος, σε ογκογονίδια όπως MYC, και ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου, όπως τις κυκλοεξαρτώμενες κινάσες και κυκλίνες [20, 25, 29].



**Εικόνα 5:** Κατάταξη γαστρικού καρκίνου σε 4 κατηγορίες ανάλογα με τα μοριακά χαρακτηριστικά, σύμφωνα με το έργο 'The Cancer Genome Atlas'. **EBV:** Όγκοι-θετικοί για τον ιό Έπσταϊν Μπαρ, **MSI:** Όγκοι με Μικροδορυφορική Αστάθεια, **GS:** Όγκοι με Γονιδιωματική Σταθερότητα, **CIN:** Όγκοι με Χρωμοσωμική Αστάθεια [20]

### 1.1.3 Αντιμετώπιση Γαστρικού Καρκίνου

#### Διάγνωση

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας λόγω μη έγκαιρης διάγνωσης του και απουσίας πρώιμων συμπτωμάτων. Κατά την διάγνωση, οι ασθενείς είναι ήδη συμπτωματικοί, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο όγκος βρίσκεται σε προχωρημένο και συχνά μεταστατικό στάδιο με ενισχυμένη την κυτταρική ετερογένεια, με αποτέλεσμα την αντίσταση στην χημειοθεραπεία. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος διάγνωσης, ακόμη και πρώιμου σταδίου όγκων, είναι η ενδοσκόπηση, με την οποία μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος, το σχήμα, η ανατομική θέση και η ακαμψία του όγκου, και τέλος να παρθούν δείγματα ιστού για βιοψία. Άλλες τεχνικές εξέτασης του όγκου και των χαρακτηριστικών του, όπως είναι η διήθηση σε γειτονικούς ιστούς, είναι η ακτινογραφία βαρίου, το υπερηχογράφημα και η αξονική τομογραφία (CT) [1].

#### Πρόληψη

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η μεγαλύτερη πρόκληση είναι η έγκαιρη ανίχνευση των όγκων του στομάχου. Η μείωση του επιπολασμού που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια οφείλεται σε μεθόδους πρόληψης, που κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες: η βελτίωση της ποιότητας της διατροφής σε συνδυασμό με την εκρίζωση του *H.pylori* και η ιατρική παρακολούθηση ατόμων υψηλού ρίσκου που παρουσιάζουν γαστρεντερικές βλάβες.

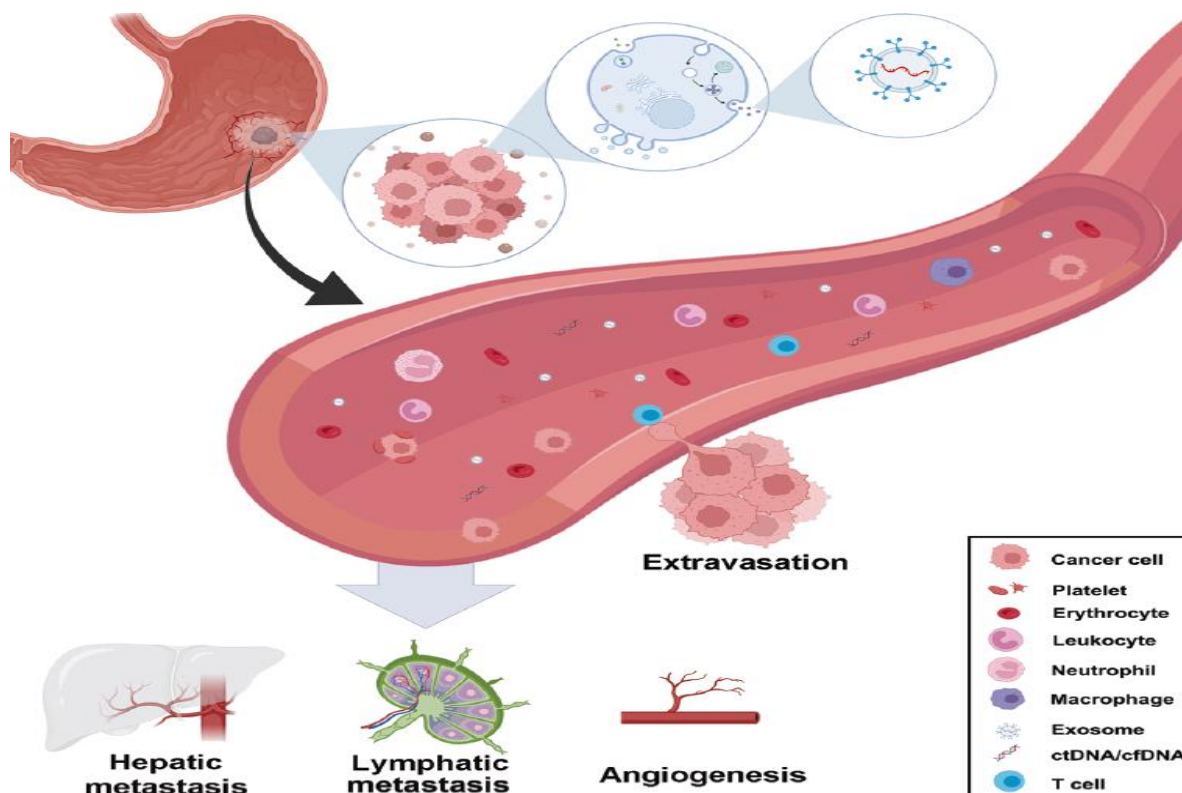
Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το σύστημα παρακολούθησης στην Ιαπωνία, όπου από το 1960 πραγματοποιούνται μαζικές εξετάσεις για την ανίχνευση όγκων μέσω τεχνικών φωτοφθορογραφίας, εξηγώντας τη σημαντική μείωση στα ποσοστά επιπολασμού και θνησιμότητας του γαστρικού καρκίνου που παρατηρήθηκε στην Ασία τα τελευταία 50 χρόνια [30].

Από το 2014 οι Αναθεωρημένες Ιαπωνικές Κατευθυντήριες Οδηγίες για την παρακολούθηση του γαστρικού καρκίνου ενέκριναν την τακτική (ανά 2-3 χρόνια) εξέταση μέσω ενδοσκοπίας, γεγονός που οδήγησε στην έγκαιρη διάγνωση του 70% των όγκων. Παρόλο που αυτό το σύστημα φαίνεται να είναι αποδοτικό, το Ιαπωνικό κράτος αντιμετωπίζει δυσκολίες στην ολική εφαρμογή της ενδοσκοπίας λόγω αυξημένου κόστους για το ασφαλιστικό σύστημα και ως εκ τούτου μελέτες αποσκοπούν στην ανάπτυξη καλύτερων και οικονομικά βιώσιμων μεθόδων παρακολούθησης.

## Βιοδείκτες

Ως βιοδείκτες χαρακτηρίζονται μόρια που με την ανίχνευση τους διευκολύνεται η διάγνωση της νόσου, καθορίζεται το κλινικό στάδιο του όγκου και εκτιμάται η πρόγνωση μαζί με το ρίσκο επανεμφάνισης ύστερα από τη θεραπεία. Διάφορα τέτοια μόρια βρέθηκαν να σχετίζονται με την εξέλιξη των όγκων στο στομάχι. Σήμερα, στην κλινική πρακτική έχουν εφαρμοστεί το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA) [31], το υδατανθρακικό αντιγόνο 19-9 (CA19-9) και 125 (CA-125) [32] και η φετοπρωτεΐνη (AFP)[33], υποδηλώνοντας το ρίσκο διήθησης και μετάστασης σε άλλα όργανα, υποτροπιασμού της νόσου και τη παρουσία όγκου προχωρημένου σταδίου (Desai and Guddati 2023). Ο εντοπισμός μεταλλάξεων σε γονίδια όπως είναι το HER2, EGFR, FGFR2, CDH1 και PI3K/AKT/mTOR, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση, αναμένεται να αποτελέσουν βιοδείκτες όχι μόνο για την διάγνωση, αλλά και ως μοριακοί στόχοι εξατομικευμένης θεραπείας [20].

Οι ανάγκες για βελτιστοποίηση της ανίχνευσης των όγκων αυξάνονται συνεχώς, με την καινούργια τάση πλέον να είναι η υγρή βιοψία, μια μη παρεμβατική μέθοδος, που βασίζεται στην ύπαρξη βιοδεικτών στα υγρά του σώματος όπως είναι η κυκλοφορία του αίματος, τα ούρα, το σάλιο κ.α. Έρευνες βασίζονται στην χρήση βιοδεικτών όπως είναι τα Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs), τα οποία απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος από την εστία του όγκου μέσω επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης, ή το ελεύθερο γενετικό υλικό (cfDNA) που προέρχεται από τα νεκρά καρκινικά κύτταρα, για την ανίχνευση είτε καρκινοειδικών μεταλλάξεων είτε του προφίλ μεθυλίωσης που χαρακτηρίζει τον όγκο, με σκοπό την διάγνωση και πρόγνωση της νόσου. Μια άλλη κατηγορία βιοδεικτών αποτελούν τα εξωσώματα, τα οποία είναι μικρά σφαιρίδια που περιβάλλονται από λιπιδική μεμβράνη. Απελευθερώνονται από τον όγκο και περιέχουν πληροφορίες για το γενετικό προφίλ [34]. Συμπερασματικά προκύπτει μια επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης νέων μη επεμβατικών μοριακών τεχνικών διάγνωσης και πρόγνωσης του γαστρικού καρκίνου που να στηρίζονται σε εξειδικευμένους βιοδείκτες. Μόρια όπως τα lncRNA (Long-non coding RNA) αποτελούν ιδανικοί βιοδείκτες αφού συνδυάζουν πολλές ιδιότητες όπως μεταξύ άλλων, ο εγκλωσμός μέσα σε καρκινικά εξωσώματα τα οποία τα προστατεύουν από αποικοδόμηση. Ως εκ τούτου, πολλές μελέτες βασίστηκαν στην συσχέτιση των lncRNA με τον γαστρικό καρκίνο, έτσι ώστε να καθοριστεί ο μηχανισμός δράσης τους στον καρκίνο και στο μέλλον να χρησιμεύουν ως βιοδείκτες διάγνωσης και πρόγνωσης [35]



**Εικόνα 6:** Συστατικά στην κυκλοφορία του αίματος που απελευθερώνονται από τον όγκο, για την υγρή βιοψία γαστρικού καρκίνου [35].

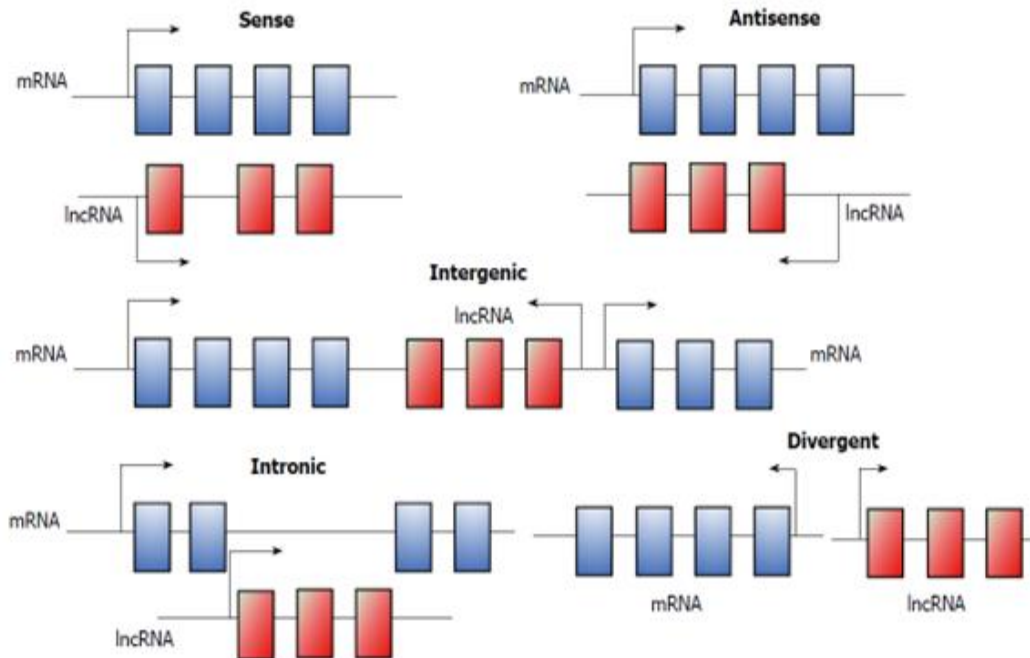
## 1.2 Long non-coding RNA

### 1.2.1 Βιολογική σημασία των lncRNAs

Το ανθρώπινο γονιδίωμα μεταγράφεται στο σύνολο του τουλάχιστον στο 76%, και μόνο το 1,2% από αυτά τα μετάγραφα μεταφράζονται τελικά σε πρωτεΐνες [36]. Σύμφωνα με τις τελευταίες εξελίξεις στην μεταγραφωματική ανάλυση, βρέθηκε ότι το υπόλοιπο ποσοστό του γενετικού υλικού που μεταγράφεται, δεν περιέχει κωδικοποιητική πληροφορία. Μέσα σε αυτήν την κατηγορία μη-κωδικοποιητικών μεταγραφών ανήκουν και τα lncRNAs, μόρια μήκους μεγαλύτερο των 200 nt [37]. Μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II / III, και τα περισσότερα από αυτά διακρίνονται από μεθυλιωμένο 5' άκρο, και πολυαδενυλιωμένο 3' άκρο (polyA ουρά). Μελέτες έδειξαν ότι όπως και τα mRNA, τα lncRNA υφίστανται εναλλακτική συρραφή, ενώ εμφανίζουν δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές, που διευκολύνουν την αλληλεπίδραση τους με άλλα μόρια RNA, DNA ή πρωτεΐνες [38]. Τα lncRNA παρουσιάζουν χαμηλότερη συντήρηση μεταξύ ειδών συγκριτικά με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, και εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα εμφανίζοντας ιστοειδικότητα [38]. Ανάλογα με την θέση τους στο γονιδίωμα ως προς γειτονικά κωδικοποιητικά μετάγραφα, όπως απεικονίζονται στην **εικόνα 7**, τα lncRNA κατηγοριοποιούνται σε:

- **Νοηματικά** (Sense) μεταγράφονται από την ίδια αλυσίδα με τα κωδικοποιητικά μετάγραφα
- **Αντί-νοηματικά** (Antisense) μεταγράφονται από την αντινοηματική αλυσίδα κωδικοποιητικών γονιδίων (αντίθετη κατεύθυνση ως προς το κωδικοποιητικό μετάγραφο)

- **Μεσογονιδιακά** (Intergenic) μεταγράφονται από περιοχές ενδιάμεσα από 2 γονίδια
- **Ιντρονικά** (Intronic) μεταγράφονται εξ ολοκλήρου από τα ιντρόνια άλλων γονιδίων
- **Αποκλίνοντα** (Divergent) μεταγράφονται σε μικρή απόσταση από κωδικοποιητικά γονίδια και σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτά, εκκινώντας από τον ίδιο υποκινητή



*Εικόνα 7: Κατηγορίες lncRNAs ανάλογα με την θέση τους στο γονιδίωμα [39].*

### 1.2.2 Μηχανισμοί δράσης

Η πλειοψηφία των κυττάρων εκφράζει lncRNA μετάγραφα (βλαστοκύτταρα, επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, καρκινικά, κ.α.), ωστόσο αυτά εμφανίζουν εξειδικευμένο προφίλ κυτταρικής έκφρασης [40]. Με βάση τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό, τα lncRNA διαφοροποιούνται περαιτέρω σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά.

#### Πυρηνικά lncRNAs

Τα lncRNAs που εντοπίζονται στον πυρήνα κατατάσσονται σε 3 κύριες λειτουργικές κατηγορίες:

##### Δ)Τροποποιητές της δομής της χρωματίνης

Το γενετικό υλικό μαζί με τις ιστόνες είναι οργανωμένο σε χρωματίνη, της οποίας η δομή καθορίζει την έκφραση γονιδίων. Μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα lncRNAs έχουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με σύμπλοκα τροποποιητών της χρωματίνης, στρατολογώντας τα στις κατάλληλες θέσεις πάνω στο γονιδίωμα [41], ή επιφέροντας μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε αυτά που καθορίζουν τη σταθερότητα τους [42]. Αποτέλεσμα τέτοιας ρύθμισης είναι η επιγενετική τροποποίηση της χρωματίνης που οδηγεί είτε στην σίγηση γονιδίων (π.χ στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο Polycomb), ή στην μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω στρατολόγησης πρωτεϊνικών συμπλόκων όπως είναι το TrxG [43] ή H3K4 μεθυλοτρανσφεράσες [44]. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων lncRNA είναι το XIST, το οποίο εμπλέκεται στην σίγηση γονιδίων του χρωμοσώματος X στα θηλυκά άτομα [2]. Άλλο παράδειγμα είναι το HOTAIR [45], ένα μη-κωδικοποιητικό μετάγραφο το οποίο έμμεσα προκαλεί καταστολή της έκφρασης της οικογένεια γονιδίων

HOXD μέσω αλληλεπίδρασης του με το PRC2 (Polycomb Repressive Complex), ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου με δράση μεθυλοτρανσφεράσης [39, 40]

### II) Ρυθμιστές της μεταγραφής

Τα lncRNA έχουν επίσης την δυνατότητα μέσω αλληλεπιδράσεων με μεταγραφικούς παράγοντες, να ρυθμίζουν αρνητικά ή θετικά την μεταγραφή γονιδίων. Για παράδειγμα σε περίπτωση στρες του κυττάρου από θερμικό σοκ, το lncRNA-heat shock RNA 1 αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες θερμικού σοκ, επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων ανταπόκρισης σε αυτό [46]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα lncRNA Alu [47], B2 [48] και 7SK [49], τα οποία παρεμποδίζουν την έναρξη και επιμήκυνση της μεταγραφής αντίστοιχα, παρεμβαίνοντας στην δράση της RNA Pol II [38].

### III) Επεξεργασία των mRNA/miRNA

Εκτός από την ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων, τα lncRNA επηρεάζουν και τα ίδια τα μετάγραφα. Βρέθηκε ότι μπορούν να καθοδηγήσουν την επεξεργασία των mRNA, μέσω της στρατολόγησης παραγόντων συρραφής, όπως στην περίπτωση του μη κωδικοποιητικού μεταγράφου MALAT1, του οποίου η έκφραση είναι απορρυθμισμένη σε διάφορους τύπους καρκίνου [50]. Επίσης, ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί το lncRNA-FGFR2, το οποίο φάνηκε να κατευθύνει την εναλλακτική συρραφή του μεταγράφου FGFR2 στα επιθηλιακά κύτταρα [51]. Τέλος, τα lncRNA είναι δυνατό να επιφέρουν ακόμη και την καταστολή της συρραφής [52].

Επιπρόσθετα, τα lncRNA έχουν την ικανότητα να συρραφθούν σε primiRNA, όπως για παράδειγμα το μη κωδικοποιητικό μετάγραφο H19 [53], και να δώσουν μικρά miRNA μήκους 1014-1036nt [39].

## **Κυτταροπλασματικά lncRNA**

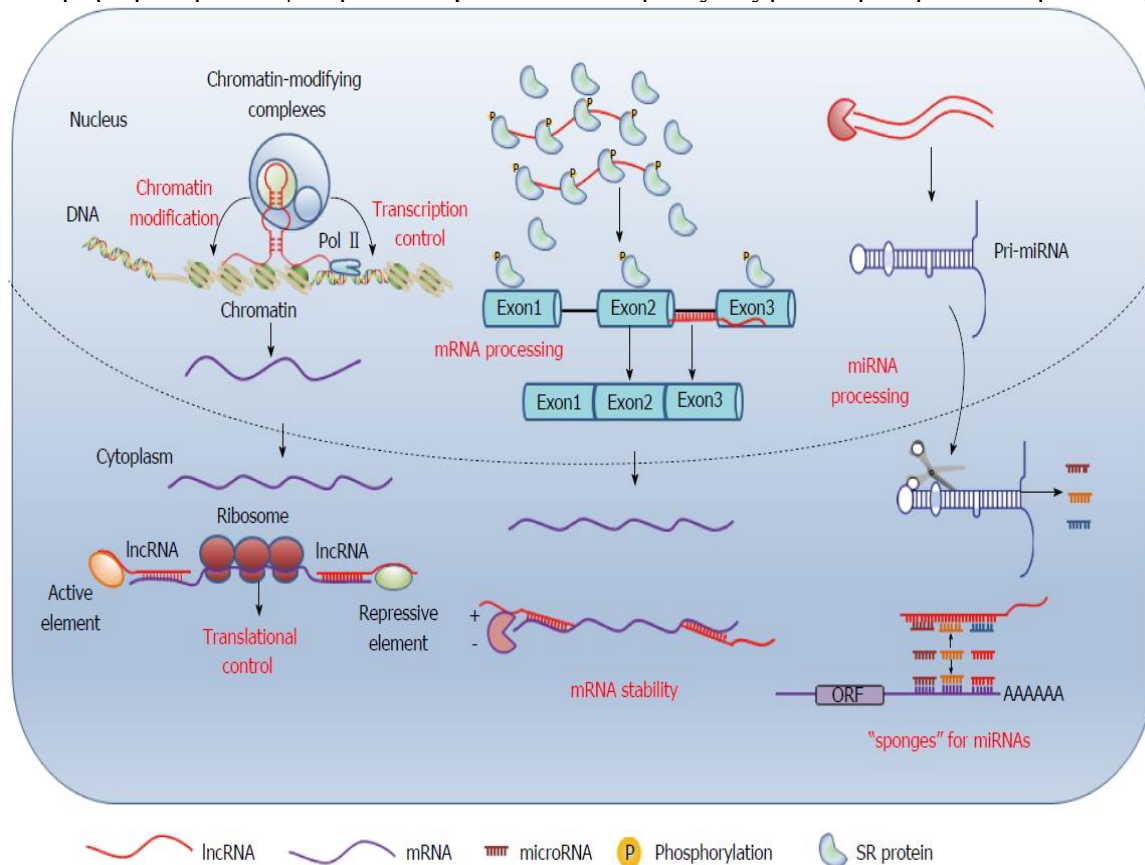
### I) Ρύθμιση της μετάφρασης και σταθερότητας των mRNA

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Uchl1-AS1 μη-κωδικοποιητικό μετάγραφο, το οποίο προσδένεται πάνω στο συμπληρωματικό του Uchl1 mRNA (C-τελική υδρολάση της ουβικιτίνης), ενισχύοντας την μετάφραση του [54]. Στον αντίποδα συναντάται το μετάγραφο lincRNA-p21, αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού p53, που βρέθηκε να παρεμποδίζει την μετάφραση πρωτεϊνών στο ανθρώπινο καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας [55]. Αναφορικά για την σταθερότητα των μεταγράφων, τα lncRNA μπορούν να την επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά οδηγώντας στην αποικοδόμηση τους [39, 56, 57].

### II) Δράση ως δόλωμα

για την ρύθμιση επιπέδων miRNA. Συγκεκριμένα, το μη-κωδικοποιητικό μετάγραφο HOTAIR ανταγωνίζεται το ενδογενές mRNA, αποτελώντας δόλωμα για τα miRNA που το στοχεύουν με αποτέλεσμα την θετική ρύθμιση του μεταγράφου HER2 [58].

Αυτή η δράση του φάνηκε να εμπλέκεται στην εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου [39].

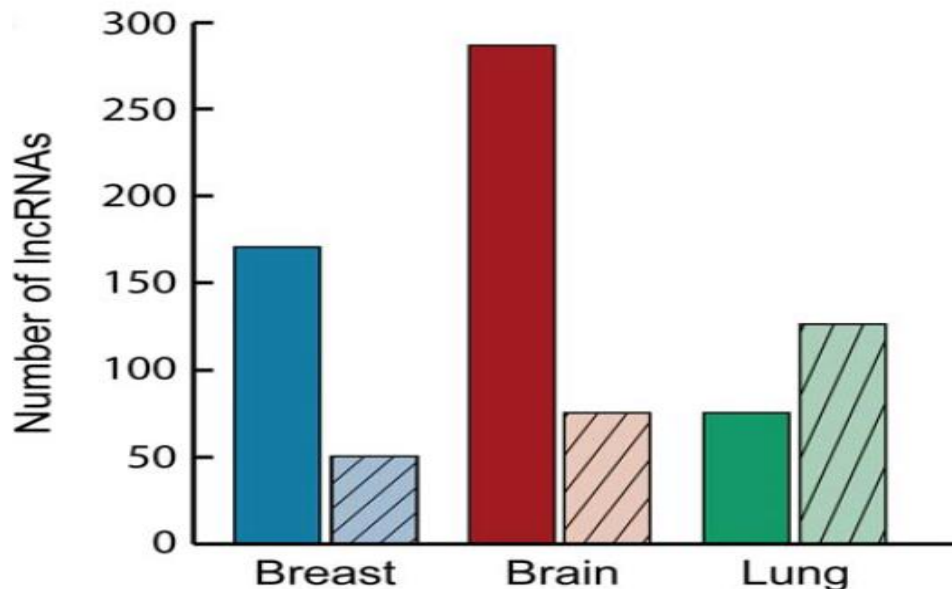


**Εικόνα 8:** Δράση των lncRNA ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό, διάκριση μεταξύ πυρηνικών και κυτταροπλασματικών μεταγράφων (Zhang, Luo et al. 2016)

### 1.2.3 LncRNA και καρκίνος

Η εμπλοκή των lncRNA στον καρκίνο εκδηλώνεται με πολλούς τρόπους, και χαρακτηριστικά όταν τα αντί-νοσηματικά lncRNA μετάγραφα ρυθμίζουν την έκφραση των κωδικοποιητικών γονιδίων από τα οποία προέκυψαν λόγω διπλασιασμού. Στην προκειμένη περίπτωση, το γονίδιο στόχος δρα είτε ως όγκο-καταστολέας είτε ως ογκογονίδιο, η έκφραση του οποίου απορρυθμίζεται λόγω του lncRNA. Παράδειγμα αποτελεί το αντί-νοσηματικό μετάγραφο του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου p15, το οποίο επάγει τη μεθυλίωση σε επίπεδο DNA και τελικά την αποσιώπηση του κωδικού μεταγράφου [59, 60]. Βρέθηκαν επίσης lncRNA τα οποία λειτουργούν ως όγκο-επαγωγικά ή όγκο κατασταλτικά, όπως το μετάγραφο HOTAIR του οποίου η αυξημένη έκφραση σχετίζεται με καρκίνους όπως του μαστού και ήπατος, και μάλιστα έγινε η αποσαφήνιση του μηχανισμού από την ομάδα ερευνών [61] που μελέτησαν την αλληλεπίδραση του μεταγράφου με σύμπλοκα γονιδιακής σίγησης. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί το μη-κωδικό μετάγραφο ANRIL, το οποίο λειτουργεί ως αντί-νοσηματικό ρυθμιστικό στοιχείο για τη σίγηση των όγκο-κατασταλτικών γονιδίων INK4b-ARF-INK4a και p15/CDKN2B στο 30%-40% των ανθρώπινων όγκων [62]. Στην κατηγορία των όγκο-κατασταλτικών lncRNA ανήκει το μετάγραφο CCND1, το οποίο μεταγράφεται από τον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης D1, και προσδένει πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη σίγηση

του πιο πάνω γονιδίου με αποτέλεσμα τη καταστολή του κυτταρικού κύκλου σε πληθώρα τύποι καρκίνων [63]. Στην έρευνα τους ο [64] σύγκριναν τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών, τα οποία διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο του ιστού. Βρέθηκε ότι σε διάφορους τύπους καρκίνου η έκφραση αρκετών lncRNA ανιχνεύεται σε εξαιρετικά μεγάλα επίπεδα.



*Εικόνα 10: Αριθμός των lncRNAs που βρέθηκαν να έχουν διαφορετική έκφραση στους 3 αναγραφόμενους τύπους καρκίνου. Στήλη στα αριστερά: αυξορρυθμιζόμενα γονίδια, Στήλη δεξιά: μειορρυθμιζόμενα γονίδια (Gibb, Vucic et al. 2011)*

Μελετώντας τα χαρακτηριστικά, την λειτουργία και τους μοριακούς μηχανισμούς των lncRNA, οι επιστήμονες συνεχίζουν να συσχετίζουν τα μετάγραφα αυτά με την εξέλιξη διάφορων τύπων καρκίνου, ανάμεσα στους οποίους βρίσκεται και ο γαστρικός καρκίνος [65]. Για την εύρεση και χαρακτηρισμό μορίων lncRNA που έχουν εμπλοκή στην νόσο και άρα για αξιοποίηση τους ως πιθανούς διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες, είναι απαραίτητη η κατασκευή εργαλείων που επιτρέπουν την απορρύθμιση των αντίστοιχων μεταγράφων σε καρκινικά κύτταρα.

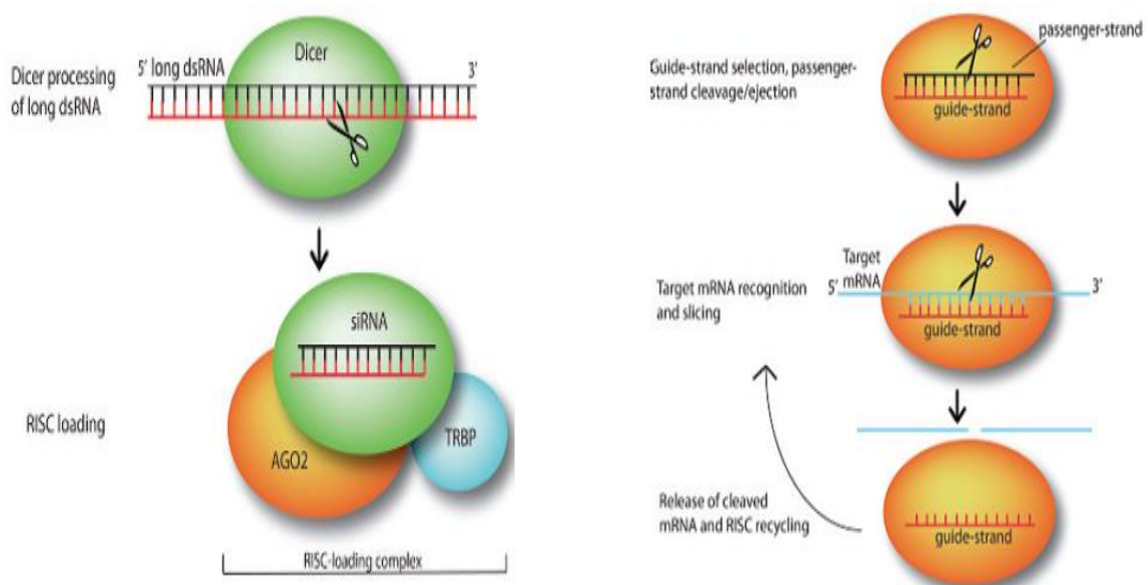
## 1.3 Τρόποι σίγησης γονιδίων

Για την μελέτη της δράσης γονιδίων, κωδικοποιητικών ή μη, αναπτύχθηκαν εργαλεία και τεχνικές με σκοπό την σταθερή ή επαγόμενη σίγηση τους, ώστε να εξάγονται συμπεράσματα με βάση τις αλλαγές που προκύπτουν στον φαινότυπο.

### 1.3.1 Σταθερή σίγηση γονιδίων

#### RNA interference

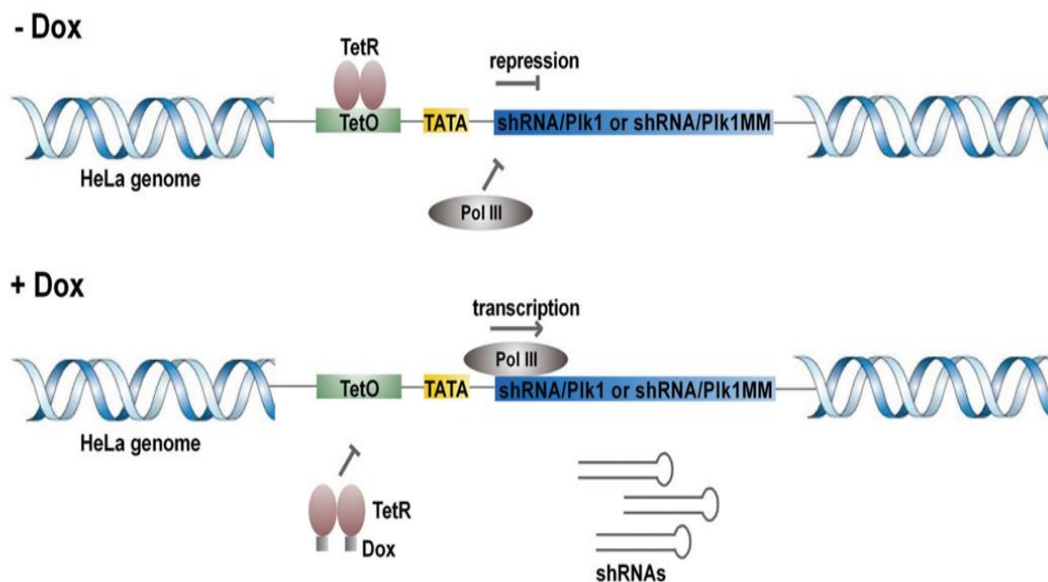
Η παρεμβολή RNA είναι ένας μηχανισμός μετα-μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων, που αρχικά ανακαλύφθηκε τέλη του 20<sup>ου</sup> αιώνα στον νηματώδη *C. elegans* και ύστερα επιβεβαιώθηκε στην πλειοψηφία των ευκαρυωτικών κυττάρων [66]. Η αρχή δράσης του μηχανισμού βασίζεται στην συμπληρωματικότητα μικρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA έναντι του μεταγράφου-στόχου. Συγκεκριμένα οι 2 κατηγορίες μορίων που συμμετέχουν στην παρεμβολή RNA είναι τα miRNA (microRNA) και τα siRNA (small interfering RNA), τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την βιογένεση, τη δομή και τον τρόπο δράσης. Τα miRNA είναι μικρά ενδογενή μόρια μήκους ~18–25 νουκλεοτιδίων, ενώ τα siRNAs συντίθενται εξωγενώς ως ολιγονουκλεοτίδια μήκους ~21 νουκλεοτιδίων [67], ή δημιουργούνται από μικρά RNA φουρκέτες (short hairpin – shRNA) μήκους 25–27 νουκλεοτιδίων, που εκφράζονται από κάποιο φορέα DNA [68, 69]. Τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή μόρια, υπόκεινται στο ίδιο μονοπάτι επεξεργασίας μέσα στο κύτταρο. Αρχικά, ως dsRNA, αναγνωρίζονται από την Dicer, μια ριβονουκλεάση που ανήκει στην οικογένεια των RNAsών III, η οποία κόβει τα μόρια αυτά σε μικρότερα siRNAs, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 11**. Στη συνέχεια, αυτά δεσμεύονται από το σύμπλοκο νουκλεασών RISC (RNA-induced silencing complex), όπου με τη μεσολάβηση της AGO2, τα siRNAs μετατρέπονται σε μονόκλινα, ενεργοποιώντας έτσι το σύμπλοκο RISC, το οποίο θα οδηγηθεί τελικά στο mRNA στόχο με αποτέλεσμα τη αποδόμηση του [70]. Σήμερα η τεχνολογία RNAi έχει εφαρμογή τόσο στην έρευνα όσο και στην αντιμετώπιση ασθενειών, ως μέθοδος καταστολής γονιδίων στόχο που σχετίζονται με τη νόσο [71].



**Εικόνα 11:** Επεξεργασία και δράση των siRNA [72].

### 1.3.2 Επαγόμενη σίγηση γονιδίων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το σύστημα παρεμβολής RNA μπορεί να λειτουργήσει και με την *in vivo* σύνθεση των siRNA από κάποιο φορέα ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, η σταθερή σίγηση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση και επιβίωση δεν είναι εφικτή, λόγω επαγωγής ενός θνησιγόνου φαινότυπου που θα μειώσει σταδιακά τα κύτταρα αποτρέποντας την μελέτη τους. Είναι αναγκαία λοιπόν, η χρήση ενός συστήματος επαγόμενης ρύθμισης της έκφρασης των siRNAs, χρονικά και ποσοτικά, επιτρέποντας την μελέτη του φαινοτύπου σε συνθήκες ελεγχόμενης σίγησης. Ένα τέτοιο σύστημα που χρησιμοποιείται για την παροδική και επαγόμενη σίγηση γονιδίων, είναι η ελεγχόμενη έκφραση μέσω συστήματος TetR. Αποτελείται από τον ρυθμιστικό καταστολέα τετρακυκλίνης (tetR), που προσδένεται πάνω στον χειριστή τετρακυκλίνης (tetO), καταστέλλοντας την μεταγραφική ενεργότητα ενός υποκινητή στόχου που τον περιέχει. Φυσιολογικά η πρωτεΐνη TetR εμπλέκεται στην αντίσταση των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, γι' αυτό και απουσία τετρακυκλίνης, η πρωτεΐνη TetR προσδένεται πάνω στον χειριστή καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων tet που φέρουν τον χειριστή στους υποκινητές τους, ενώ παρουσία τετρακυκλίνης επάγεται η έκφραση τους, αφού η τετρακυκλίνη προσδένεται στην TetR αλλάζοντας την διαμόρφωση της και εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με το DNA [73]. Η βιολογική δράση των γονιδίων tet αφορά την ενεργή εκροή του αντιβιοτικού, την προστασία του ριβοσώματος ή την ενζυμική τροποποίηση του αντιβιοτικού [74, 75]. Στη γενετική τροποποίηση, αυτό το σύστημα χρησιμοποιείται ως 'διακόπτης' για την επαγόμενη έκφραση των siRNA, με τη βοήθεια της δοξικυκλίνης (Dox), ένα ανάλογο της τετρακυκλίνης που δεσμεύει την TetR. Για παράδειγμα, μια ομάδα ερευνητών σχεδίασαν επαγόμενες κασέτες RNAi για την σίγηση της πρωτεΐνης PIK1 σε κύτταρα HeLa, με σκοπό την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [76]. Αρχικά η γενετική τροποποίηση πραγματοποιείται με σκοπό την ενσωμάτωση μιας κασέτας υπερέκφρασης της πρωτεΐνης TetR στο γονιδίωμα των κυττάρων, έτσι ώστε αυτή να εκφράζεται σταθερά σε υψηλά επίπεδα. Σε επόμενη φάση, εισάγεται ο φορέας που περιέχει την κασέτα με τα shRNA/PIk1, μαζί με τον υποκινητή H1 και τον χειριστή TetO, το οποίο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 14**, και ελέγχεται η δράση του συστήματος με τη μείωση των επιπέδων των μεταγράφων της πρωτεΐνης PIK1.



**Εικόνα 14:** Σύστημα TetR για την επαγόμενη σίγηση της πρωτεΐνης Plk1 σε κύτταρα HeLa [76] - **DOX:** απουσία δοξυκυκλίνης, η πρωτεΐνη καταστολέας TetR προσδένεται στον χειριστή TetO παρεμποδίζοντας την μεταγραφή των *shPIK1*, με αποτέλεσμα την φυσιολογική δράση της πρωτεΐνης Plk1

+ **DOX:** η δοξυκυκλίνη προσδένει την πρωτεΐνη καταστολέα TetR, επιτρέπεται η μεταγραφή των *shPIK1* και επέρχεται επαγόμενη σίγηση της πρωτεΐνης Plk1.

### 1.3.3 CRISPR/Cas

(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

3Η τεχνολογία CRISPR/Cas αποτελεί ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία της μοριακής βιολογίας, του οποίου η δράση σε αντίθεση με την τεχνολογία RNAi, έχει μόνιμο αντίκτυπο στο γονιδίωμα καθιστώντας το κατάλληλο για σταθερή γενετική τροποποίηση. Παρόλο που η εφαρμογή του απαιτεί πιο περίπλοκους χειρισμούς, χαρακτηρίζεται από ακριβή στόχευση της αλληλουχίας στόχο με μειωμένα επίπεδα «off-target», ενώ η RNAi συνοδεύεται από το ρίσκο στόχευσης πολλαπλών μεταγράφων ταυτόχρονα. Καθώς η τεχνολογία RNAi είναι λειτουργική κυρίως στο κυτταρόπλασμα, μη-κωδικά μόρια όπως lncRNA είναι δύσκολο να αποτελέσουν στόχοι, και επιπρόσθετα η σίγηση των μεταγράφων τους δεν οδηγεί πάντα στην εμφάνιση φαινοτύπου λόγω πιθανής δράσης *in cis* [77].

Η τεχνολογία CRISPR/Cas ανακαλύφθηκε το 1987 στην *Escherichia coli* [78], με δράση στην επίκτητη ανοσία των βακτηρίων ενάντια σε βακτηριοφάγους, και σήμερα είναι γνωστό ότι είναι παρόν σε πολλά είδη βακτηρίων αλλά και αρχαίων [79]. Μάλιστα το 2020, η Jennifer Doudna και η Emmanuelle Charpentier τιμήθηκαν με βραβείο Νόμπελ χημείας για την ανακάλυψη της χρήσης της τεχνολογίας αυτής στην γενετική τροποποίηση [80].

Από τις 3 κατηγορίες των CRISPR/Cas που ανακαλύφθηκαν, η πιο απλή η οποία έχει εφαρμογή στις μέρες μας είναι το σύστημα CRISPR/Cas τύπου II, στο οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη Cas9. Απαρτίζεται από 2 επικράτειες ενδονουκλεασών, την HNH και RuvC, που τεμαχίζουν την συμπληρωματική με το crRNA και την μη συμπληρωματική αλυσίδα DNA στόχο αντίστοιχα. Δημιουργεί δίκλωνες ρήξεις σε απόσταση τριών ζευγών βάσεων από το μοτίβο PAM, μια αλληλουχία που επιτρέπει την αναγνώριση της αλληλουχίας στόχο από την Cas9 [81, 82].

#### Η ενδογενής του δράση πραγματοποιείται σε 3 στάδια

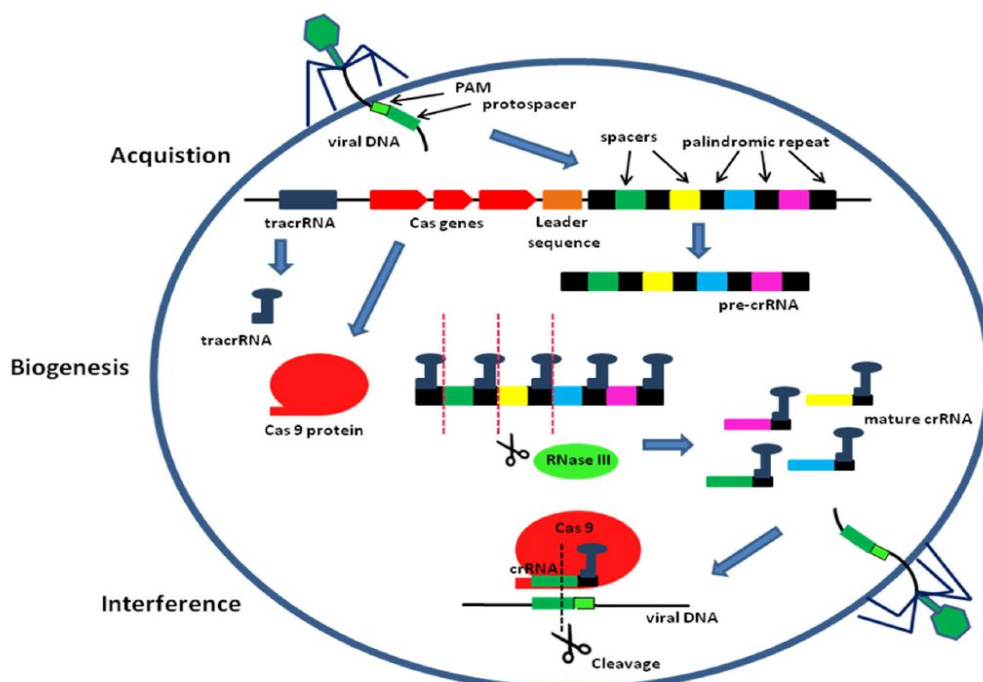
- i) Ο γενετικός τόπος CRISPR αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ανάμεσα στις οποίες εμπεριέχονται και αλληλουχίες επικαλούμενες «spacers», οι οποίες προέρχονται από προηγούμενους ιούς εισβολείς. Ανοδικά βρίσκεται ο γενετικός τόπος των πρωτεϊνών Cas, και το γονίδιο των tracrRNA, τα οποία απεικονίζονται στην **εικόνα 12**.

Με την εισαγωγή του γενετικού υλικού ενός βακτηριοφάγου στο εσωτερικό του βακτηρίου, επάγεται το πρώτο βήμα της ανοσολογικής απόκρισης, το στάδιο της προσαρμογής. Κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου, οι νουκλεάσες Cas1, Cas2 και Csn2 δημιουργούν ένα σύμπλοκο με την Cas9, η οποία βρέθηκε να είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του μοτίβου PAM (Protospacer Adjacent Motif) (2-5 νουκλεοτίδια) της άγνωστης αλληλουχίας του βακτηριοφάγου [83]. Το γενετικό υλικό του βακτηριοφάγου που θα κοπεί ονομάζεται «protospacer», και βρίσκεται δίπλα στο μοτίβο PAM. Στη συνέχεια, το κομμάτι αυτό θα ενσωματωθεί στον γενετικό τόπο CRISPR ανάμεσα σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και στο προϊόν του διπλασιασμού της, με τη μεσολάβηση των Cas1 και Cas2 [84]. Η

εισαγωγή μιας νέας αλληλουχίας «protospacer» πραγματοποιείται στο 5' άκρο της συστοιχίας CRISPR, και πάντοτε αμέσως καθοδικά από μια αλληλουχία οδηγός η οποία συμπεριλαμβάνει τον υποκινητή για την διεξαγωγή της μεταγραφής, και την αλληλουχία αναγνώρισης για την εισαγωγή του protospacer [85] [86]. Με κάθε αντιγραφή του γενετικού υλικού, το βακτήριο κληροδοτεί στους απογόνους του τις νέες αλληλουχίες «spacer», ενισχύοντας έτσι την ανοσολογική μνήμη μέσα στον πληθυσμό [87, 88].

ii) Το επόμενο βήμα αφορά την μεταγραφή της συστοιχίας CRISPR σε ένα μακρύ πρόδρομο μόριο pre-crRNA. Στη συνέχεια το μόριο αυτό προσεγγίζεται από άλλα μη-κωδικοποιητικά μόρια RNA, τα tracrRNA (trans-activation CRISPR RNA), τα οποία αποδείχθηκαν να εμφανίζουν μεγάλη συμπληρωματικότητα με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των pre-crRNA. Έπειτα τον υβριδισμό τους όπως διακρίνεται και στην **εικόνα 12**, ακολουθεί η στρατολόγηση της πρωτεΐνης Cas9, η οποία λειτουργεί ως μεσολαβητής για την αναγνώριση των υβριδίων tracrRNA με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του pre-crRNA από την βακτηριακή RNάση III. Η δράση αυτού του ενζύμου συμβάλλει στην ωρίμανση των crRNA [89]. Μάλιστα, η σημαντικότητα των tracrRNA σε αυτό το βήμα αποδείχθηκε με πειράματα όπου μεταλλάγματα με απώλεια των tracrRNA είχαν ως αποτέλεσμα την μη εντόπιση ώριμων crRNA στο βακτηριακό κύτταρο [90].

iii) Στο τελευταίο στάδιο της παρεμβολής, το σύμπλοκο που δημιουργήθηκε αποτελούμενο από το ώριμο crRNA μαζί με το tracrRNA και την νουκλεάση Cas9, εντοπίζει και αναγνωρίζει τις αλληλουχίες των βακτηριοφάγων στο εσωτερικό του βακτηρίου με τη βοήθεια της αλληλουχίας PAM. Με αυτόν τον τρόπο το σύστημα είναι ικανό να κάνει τη διάκριση μεταξύ εαυτού και μη εαυτού [91]. Στη συνέχεια η νουκλεάση Cas9, καθοδηγούμενη από το μόριο crRNA οδηγό, προκαλεί δίκλωνες ρήξεις ανοδικά της PAM στην αλληλουχία DNA στόχο, όπως φαίνεται στην **εικόνα 12**. Συγκεκριμένα, κόβει την συμπληρωματική ως προς το crRNA αλυσίδα με την επικράτεια νουκλεάσης HNH, ενώ την απέναντι αλυσίδα με την επικράτεια RuvC [92-94].



**Εικόνα 12:** Ενδογενής δράση του συστήματος CRISPR/Cas9 στην επίκτητη ανοσία στα βακτήρια και αρχαία ενάντια βακτηριοφάγων [94]

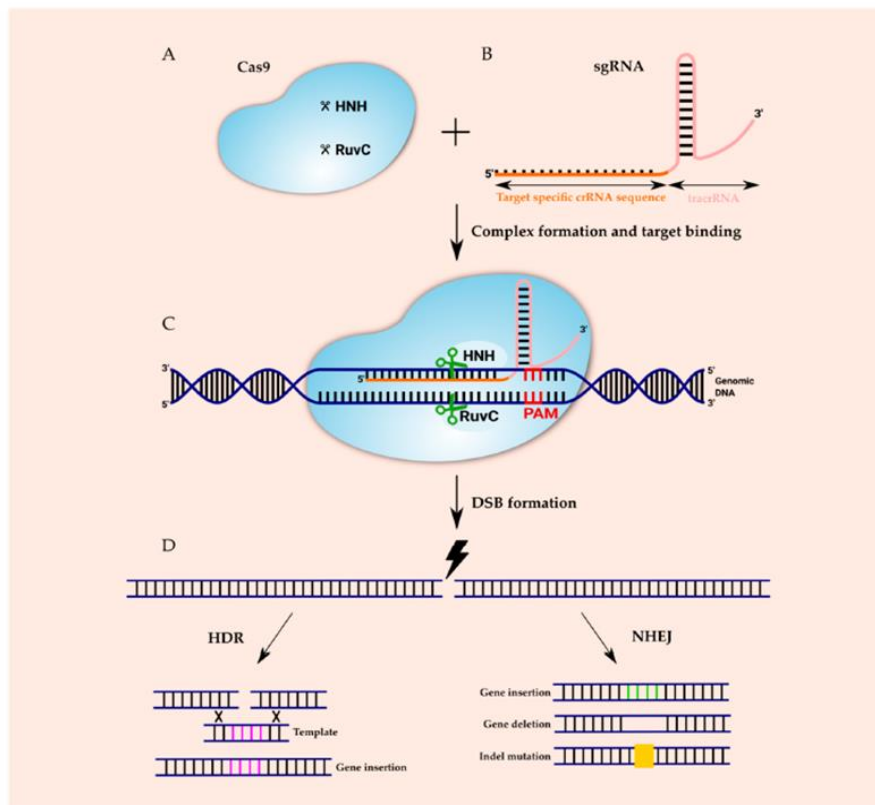
Acquisition: πρώτο στάδιο – απόκτηση αλληλουχιών protospacers

Biogenesis: δεύτερο στάδιο – βιογένεση του pre-crRNA

Interference: τρίτο στάδιο – παρεμβολή και αποδόμηση του γενετικού υλικού του ιού

### **CRISPR/Cas9 στην γενετική τροποποίηση**

Το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται ως εργαλείο για την γενετική τροποποίηση οργανισμών και στην βασική του μορφή αποτελείται από την πρωτεΐνη Cas9, η οποία προέρχεται από το *Streptococcus thermophilus* ή *Streptococcus pyogenes*, καθώς και από ένα χμαιρικό συνθετικό μονόκλωνο μόριο RNA (sgRNA), το οποίο οδηγεί την Cas9 στην αλληλουχία στόχο [95]. Οι στρατηγικές μεταφοράς του συστήματος στα κύτταρα περιλαμβάνουν την χρήση ιικών φορέων, όπως λεντιϊών και αδενο-σχετιζόμενων ιοίων και αξιοποιούνται ως μέσο για την εισαγωγή πλασμιδίων που εκφράζουν την πρωτεΐνη Cas9 και το sgRNA, ή και την απευθείας μεταφορά μορίων RNA και πρωτεϊνών στον οργανισμό ενδιαφέροντος [96, 97]. Η αποτελεσματικότητα της γενετικής τροποποίησης βασίζεται στην ενεργοποίηση των ενδογενών κυτταρικών μηχανισμών επιδιόρθωσης δίκλωνων ρήξεων. Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει μια ομόλογη αλληλουχία ως προς την αλληλουχία στόχο για την επιδιόρθωση των επαγόμενων από την Cas9 δίκλωνων ρήξεων, το κύτταρο επιλέγει το μονοπάτι επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR). Με αυτό τον τρόπο είναι εφικτή η τροποποίηση των βάσεων μιας αλληλουχίας στόχο, ή η δημιουργία διαγονιδίων με την ενσωμάτωση νέων αλληλουχιών. Σε αντίθετη περίπτωση, ενεργοποιείται το μονοπάτι μη ομόλογης επιδιόρθωσης των άκρων (NHEJ), κατά το οποίο γίνεται αποκοπή της αλληλουχίας στόχου ή εισαγωγή ενθεματικών βάσεων, οδηγώντας στην καταστολή γονιδίων στόχων [94].

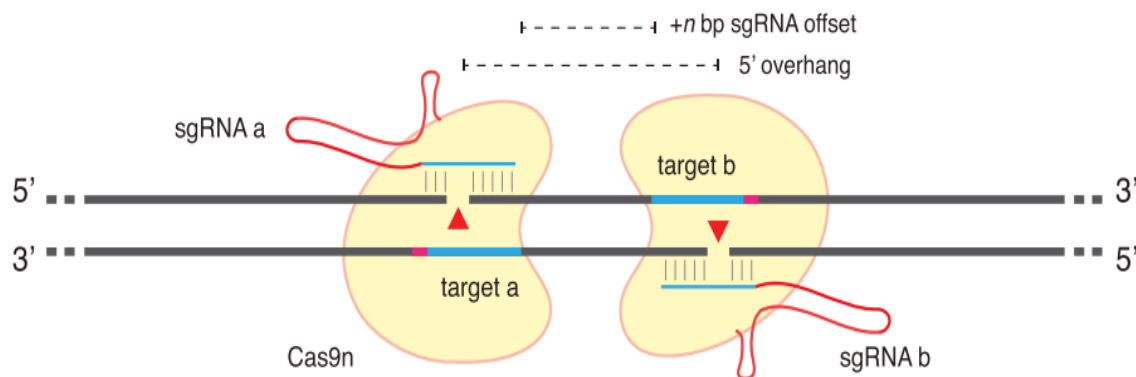


**Εικόνα 13:** Γενετική τροποποίηση με τη δημιουργία δίκλων ρήξεων από το σύστημα Cas9/sgRNA, και ενεργοποίηση των κυτταρικών μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA [98].

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις κατά την εφαρμογή του συστήματος, είναι η αποφυγή μη ειδικής τροποποίησης του γονιδιώματος (off target). Η μη ειδική στόχευση προκύπτει από μερική αντιστοίχιση βάσεων μεταξύ του sgRNA και άλλων αλληλουχιών με μερική ομολογία με την αλληλουχία στόχο και κατ' επέκταση δράση της νουκλεάσης Cas και σε αυτές [99, 100].

Ένας τρόπος για την μείωση της μη ειδικής στόχευσης του συστήματος, είναι η χρήση μιας μεταλλαγμένης μορφής της Cas9 με δράση νικάσης αντί νουκλεάσης [101]. Συγκεκριμένα, απενεργοποιείται η μια από τις δύο επικράτειες νουκλεασών, η RuvC ή HNH, επάγοντας τελικά μονόκλωνες ρήξεις στο DNA από την μεταλλαγμένη nCas9. Έτσι, για την πιο αποτελεσματική γενετική τροποποίηση, χρησιμοποιείται ένα ζεύγος μορίων sgRNA σε συμπληρωματικότητα στον ένα και στον άλλο κλώνο του DNA, ώστε να επαχθεί η δημιουργία δύο μονόκλωνων ρήξεων στις αντίθετες αλυσίδες του DNA στόχου, που επάγουν τελικά την δημιουργία μιας δίκλωνής τομής μόνο σε αυτό το σημείο του γονιδιώματος [94, 102]. Η πιθανότητα τα δύο sgRNAs να στοχεύσουν ταυτόχρονα και άλλες μη ειδικές περιοχές του γονιδιώματος είναι εξαιρετικά μικρή (σε αντίθεση με το κλασικό σύστημα CRISPR όπου η επαγωγή δίκλωνων ρήξεων γίνεται από ένα μόριο sgRNA), ενώ μεμονωμένη μη ειδική στόχευση από ένα sgRNA θα επάγει μονόκλωνή ρήξη που θα επιδιορθωθεί γρήγορα και χωρίς μεταλλάξεις από το κύτταρο.

Στη πράξη έχει αποδειχθεί ότι η χρήση ενός συστήματος νικάσης Cas9<sup>D10A</sup> All-in-One με δύο sgRNAs, παρουσιάζει καλύτερη μεταλλαξιγόνο δράση, συγκριτικά με την Cas9 αγρίου τύπου, με σημαντική μείωση στην στόχευση αλληλουχιών μη-στόχων [103].



**Εικόνα 14:** Σύστημα νικάσης Cas9, όπου δύο μεταλλάγματα της πρωτεΐνης Cas9 με μόνο μια ενεργή επικράτεια νουκλεάσης δημιουργούν δύο μονόκλωνες ρήξεις που ισοδυναμούν με μια δίκλωνη ρήξη [104].

## 2.Σκοπός και ερευνητική υπόθεση

Οι εξελίξεις στις μεθόδους αλληλούχισης του γενετικού υλικού έφεραν στο φως τη σημασία των μη-κωδικοποιητικών μεταγράφων στην ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών. Μια κατηγορία μορίων που σήμερα αποτελούν στόχοι για πληθώρα μελέτες είναι τα lncRNA, των οποίων η δράση δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή. Αποδείχθηκε ότι η απορρύθμιση της λειτουργίας τους σχετίζεται με ασθένειες, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και ο καρκίνος. Ο ευρύτερος στόχος του εργαστηρίου είναι η αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης των lncRNA που βρέθηκαν να έχουν απορυθμισμένη έκφραση στον γαστρικό καρκίνο. Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην κατασκευή μοριακών εργαλείων με τεχνολογίες CRISPR- νικάση και TetR-RNAi και την ανάλυση της επιτυχίας τους, με στόχο την απενεργοποίηση lncRNA.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε γενετική τροποποίηση κυττάρων AGS και NUGC4, με σκοπό την κατασκευή τριών μοριακών εργαλείων. Το πρώτο εργαλείο αφορά την σταθερή σίγηση του μεταγράφου RECUR1 σε κύτταρα AGS με την απενεργοποίηση του υποκινητή του από τη νικάση Cas9<sup>D10A</sup>. Στην προκειμένη περίπτωση εξετάστηκε η επιτυχία του εργαλείου όσο αφορά την επίδραση του στο γονότυπο των κυττάρων μέσω γονοτύπησης και αλληλούχισης της περιοχής-στόχου. Πραγματοποιήθηκαν επιπροσθέτως αναλύσεις χαρακτηρισμού των επιπέδων έκφρασης του RECUR1 και του καθοδικού mRNA γονιδίου στόχου του έπειτα από την απενεργοποίηση της ρυθμιστικής περιοχής του υποκινητή του. Τέλος, διεξάχθηκαν και φαινοτυπικές αναλύσεις προκειμένου να διερευνηθεί ο φαινότυπος των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων ως προς την ικανότητα δημιουργίας αποικιών μέσω πολλαπλασιασμού, καθώς και του ρυθμού κυτταρικής μετανάστευσης. Όσον αφορά το δεύτερο εργαλείο, έγινε γενετική τροποποίηση κυττάρων NUGC4 ώστε να εκφράζουν την πρωτεΐνη καταστολέα TetR, τα επίπεδα της οποίας χαρακτηρίστηκαν μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο. Τέλος, για το τρίτο εργαλείο, χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα κύτταρα AGS του εργαστηρίου που εκφράζουν την πρωτεΐνη TetR, με σκοπό να εισαχθεί σε αυτά ρυθμιστική κασέτα TetO-RNAi. Στόχος ήταν η επαγόμενη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 ύστερα από προσθήκη δοξκυκλίνης. Για τη εξέταση της επιτυχίας κατασκευής του μοριακού εργαλείου έγινε χαρακτηρισμός των επιπέδων έκφρασης του GATA4.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Υλικά

##### 3.1.1 Κυτταρικές Σειρές

Για την κατασκευή μοριακών εργαλείων χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κύτταρα AGS και NUGC4, των οποίων τα χαρακτηριστικά περιγράφονται στον παρακάτω **πίνακα 1**

*Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν για την γενετική τροποποίηση*

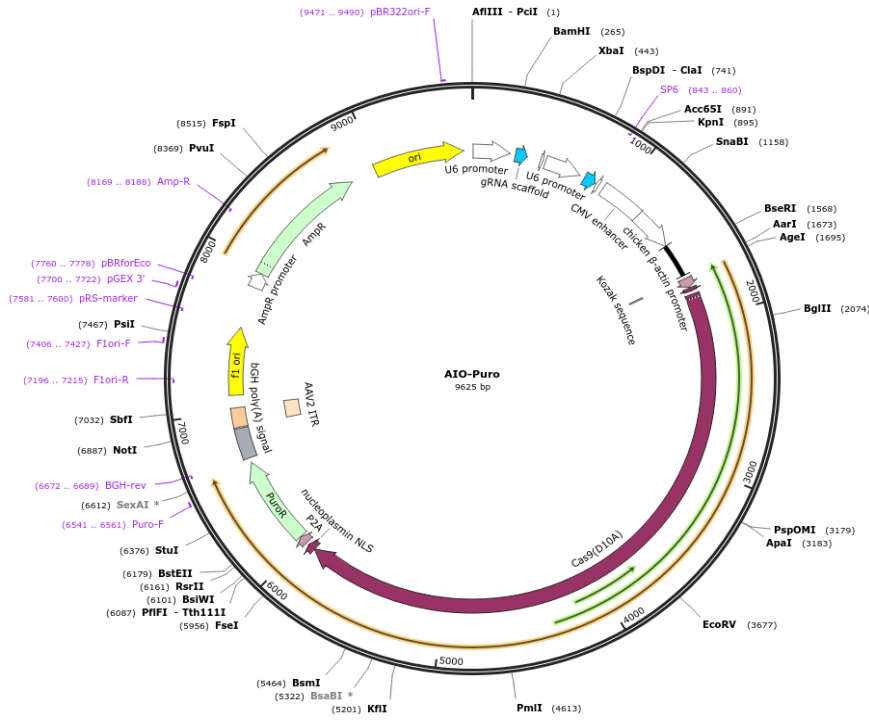
AGS	NUGC4
<ul style="list-style-type: none"><li>• Επιθηλιακά κύτταρα</li><li>• Προέρχονται από ασθενή 54 ετών με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα</li><li>• Εμφανίζουν υπερδιπλοειδία με το μέγιστο αριθμό χρωμοσωμάτων να είναι 49 στο 60% των κυττάρων</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Επιθηλιακά κύτταρα</li><li>• Προέρχονται από ασθενή 35 ετών με γαστρικό μεταστατικό καρκίνο στους λεμφαδένες</li><li>• Πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα</li></ul>

##### 3.1.2 Πλασμιδιακοί Φορείς για την γενετική τροποποίηση των κυττάρων

Για την γενετική τροποποίηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί πλασμιδιακοί φορείς για το κάθε πείραμα.

###### **All-in-One\_RECUR1\_Prom**

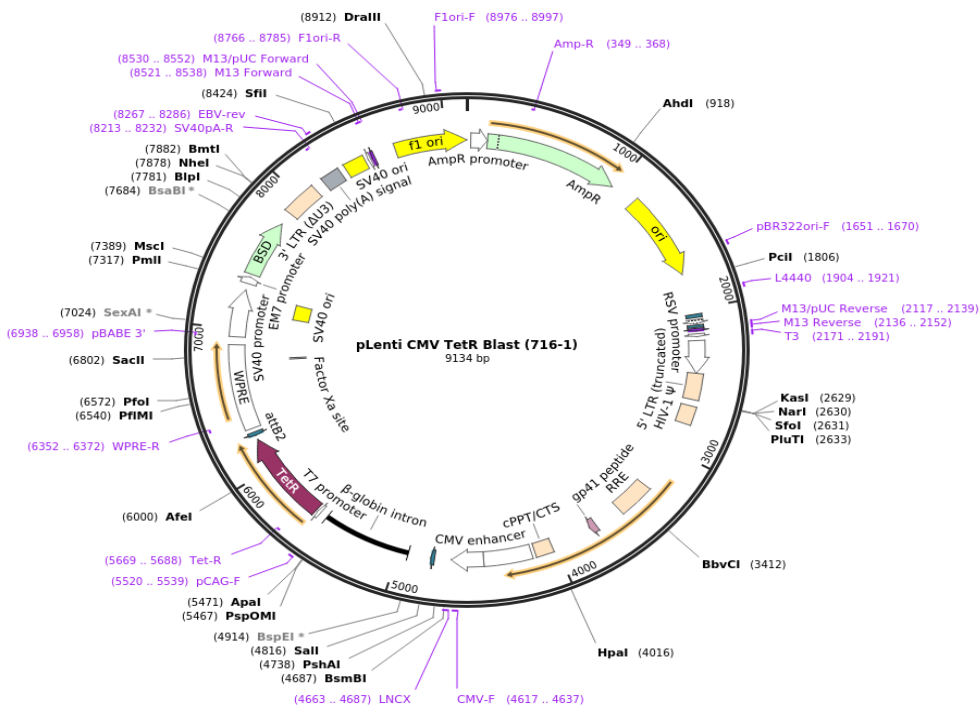
Για την κατασκευή μοριακού εργαλείου με σκοπό την απενεργοποίηση του υποκινητή του μη-κωδικού μεταγράφου RECUR1, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας **AIO-Puro**, μήκους 9625 bp. Περιέχει το γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη Cas9 (D10A) υπό την ρύθμιση του συνθετικού υποκινητή CAG, που αποτελείται από τον ενισχυτή κυτταρομεγαλοϊού (CMV) συγχωνευμένος με τον υποκινητή της βήτα-ακτίνης, και χρησιμοποιείται για την υπερέκφραση γονιδίων. Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των δύο αλληλουχιών sgRNA στον φορέα καθοδικά των υποκινητών U6, έπειτα από πέψη με ένζυμα περιορισμού, τα οποία σχεδιάστηκαν ειδικά για την στόχευση του υποκινητή προς μελέτη. Η διαμόλυνση των κυττάρων AGS πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λιποφιλικού παράγοντα JetPrime, με πρωτόκολλο γενετικής τροποποίησης που περιγράφεται σε άλλες διπλωματικές εργασίες του εργαστηρίου. Η έκφραση του πλασμιδίου επιβεβαιώνεται μέσω της φάσης επιλογής των κλώνων έπειτα από τη γενετική τροποποίηση, στην οποία επιβιώνουν οι κλώνοι που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη.



Εικόνα 3.1: Χάρτης του πλασμιδίου AIO-Puro (<https://www.addgene.org/>)

### TetR – NUGC4

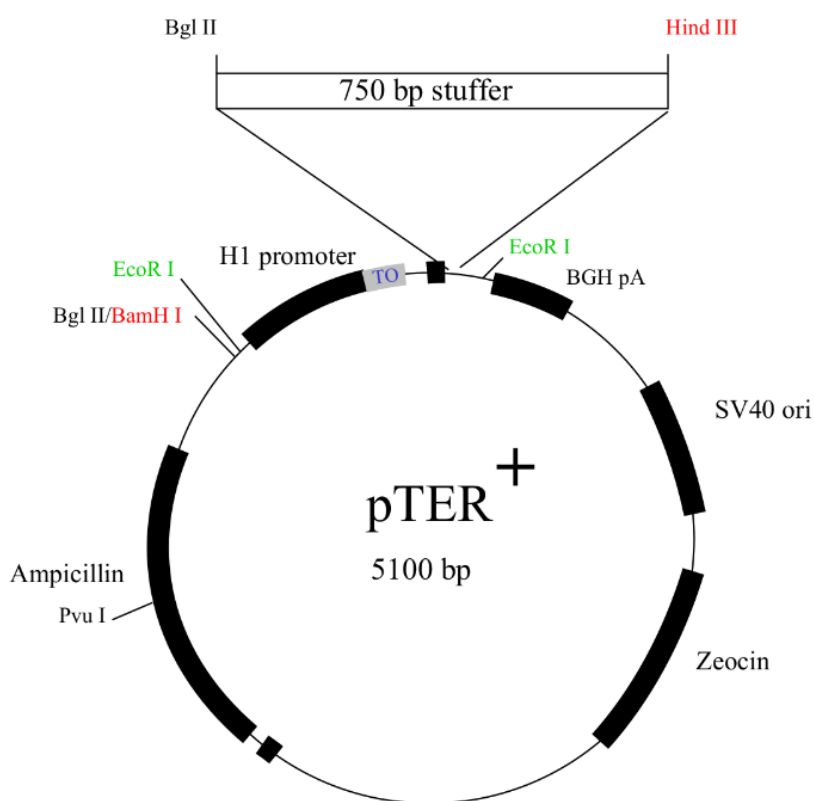
Για την γενετική τροποποίηση των κυττάρων NUGC4 χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας **pLenti CMV TetR Blast**, μήκους 9134bp. Η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λεντιών, και σκοπός ήταν η ενσωμάτωση του φορέα στο γονιδίωμα των κυττάρων έτσι ώστε να εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη καταστολέα TetR κάτω από τη ρύθμιση του υποκινητή CAG. Και σε αυτήν την περίπτωση η έκφραση του συστήματος επιβεβαιώνεται μέσω της φάσης επιλογής των κλώνων έπειτα από τη γενετική τροποποίηση, στην οποία επιβιώνουν οι κλώνοι που παρουσιάζουν αντίσταση στο αντιβιοτικό μπλαστισιδίνη.



Εικόνα 3.2: Χάρτης του πλασμιδίου pLenti CMV TetR Blast (<https://www.addgene.org/>)

## PTER GATA4

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή του ρυθμιστικού συστήματος «υποκινητής-TetO-shGATA4» στα κύτταρα είναι ο **pTER+** μήκους 5100bp. Αυτός ο φορέας κατασκευάστηκε στο εργαστήριο, και περιέχει την αλληλουχία του υποκινητή H1 και του χειριστή TetO, καθώς και τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Για το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των ειδικά σχεδιασμένων shRNA για την στόχευση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, έπειτα από πέψη του φορέα με ένζυμα περιορισμού. Η διαμόλυνση της σταθερής κυτταρικής σειράς AGS - TetR στην οποία εκφράζεται ήδη η πρωτεΐνη καταστολέα TetR, διεξάχθηκε με τη χρήση λιποφιλικού παράγοντα PPEI, και η επιλογή των κλώνων έγινε βάσει ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά βλαστισιδίνη και ζεοσίνη.



*Εικόνα 3.3: Χάρτης του πλασμιδίου pTER+*

### 3.1.3. Συσκευές και εργαλεία

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Για τις αντιδράσεις ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System. Τέλος, η μέτρηση συγκεντρώσεων των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 (micro-volume UV spectrophotometer).

## 3.2. Μέθοδοι

### 3.2.1. Γονοτύπηση

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της αποκοπής της περιοχής στόχο του υποκινητή μέσω CRISPR, οι κλώνοι που επιλέχθηκαν μέσω της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό μεταφέρθηκαν σε πιάτα συντήρησης ώστε να μεγαλώσουν. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε πιάτα 6 well με σκοπό να προοριστούν για απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τρόπο Home Made.

Βήματα:

1. Απομάκρυνση θρεπτικού από τα πιάτα 6 well
2. Προσθήκη 1ml 1X PBS σε κάθε well
3. Μεταφορά δειγμάτων σε 1,5ml tube τύπου Eppendorf
4. Φυγοκέντρωση
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 400μl Lysis Buffer (0.1M Tris pH8, 0.2M NaCl, 5mM EDTA, 0.4% SDS) + 4μl πρωτεΐνάσης K (συγκέντρωσης 20mg/ml)
6. Ολονύχτια επώαση στους 55°C στο υδατόλουτρο
7. Προσθήκη 400μl ισοπροπανόλης για κατακρήμνιση γενετικού υλικού
8. Επαναδιάλυση σε 100μl Elution Buffer: 5mM Tris, HCl, pH8
9. Heat block στους 65° C, για 5 λεπτά
10. Ολονύχτια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου
11. Heat block στους 65° C, για 5 λεπτά
12. Vortex-Spin
13. Μέτρηση συγκέντρωσης των δειγμάτων

Με την ολοκλήρωση της απομόνωσης του γενετικού υλικού από τα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σκοπό την ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή με εκκινητές που υβριδίζουν εκατέρωθεν της περιοχής στόχο των sgRNA. Η σύσταση και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR περιγράφονται στους **πίνακες 2 και 3**.

*Πίνακας 2: Σύσταση της αντίδρασης PCR για την γονοτύπηση .*

Συστατικά
Γονιδιωματικό DNA: 2,9 μl
dNTPs (10mM): 0,5 μl
Πρόσθιος εκκινητής (10μM): 1μl
Ανάστροφος εκκινητής ( 10μM): 1μl
Taq polymerase (5u/μl), Kapa Biosystem: 0,15 μl
Taq Buffer (10X), Kapa Biosystem: 5 μl
ddH <sub>2</sub> O: 39,5 μl
V <sub>τελικό</sub> = 50 μl

*Πίνακας 3: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την γονοτύπηση*

Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη: 95°C/5 λεπτά
Αποδιάταξη: 95°C/45 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση: 60°C/20 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση: 72°C/30 δευτερόλεπτα

Κύκλοι: 35

Τελική επιμήκυνση: 72°C/5 λεπτά

Σε δεύτερη φάση της γονοτύπησης, απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA με βάση του πρωτοκόλλου του NucleoSpin Tissue, Mini kit for Genomic DNA from tissue της εταιρίας Macherey-Nagel, και πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR ίδιας σύστασης και συνθηκών με την προηγούμενη, με διαφορά στην ποσότητα του gDNA που σε αυτήν την περίπτωση ήταν 2μl. Επιπρόσθετα, έγινε ταυτόχρονα και η ενίσχυση του ιδιοσύστατου γονιδίου της ακτίνης, με σκοπό να ελεγχθεί η ποιότητα του απομονωμένου γενετικού υλικού και η ποσότητα που φορτώθηκε για το κάθε δείγμα.

Έπειτα από κάθε αντίδραση PCR, προστίθενται 10μl Loading Dye 6X στα δείγματα, τα οποία στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πύκτωμα αραρόζης 2% ώστε να διαχωριστούν τα προϊόντα ενίσχυσης.

### 3.2.2. Χαρακτηρισμός επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων

Για τη μελέτη των τριών διαφορετικών μοριακών εργαλείων καθιστάται σημαντικός ο χαρακτηρισμός των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου προς εξέταση. Για αυτό τον σκοπό απαραίτητο πρώτο βήμα είναι η απομόνωση RNA από τα κύτταρα, τα οποία συλλέγονται αρχικά από το πιάτο εργασίας με τη βοήθεια του αντιδραστήριου TRI reagent, MRC. Με την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου απομόνωσης RNA ακολουθεί η ανάλυση μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου.

#### Απομόνωση RNA

1. Επώαση των κυττάρων σε πιάτο εργασία (well plate) με το αντιδραστήριο TRI για ένα λεπτό, και συλλογή τους σε tube τύπου Eppendorf
2. Μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο
3. Προσθήκη 200μl χλωροφόρμιου μέσα στον απαγωγό
4. Vortex για 30 sec
5. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm, 5 min
6. Αφαίρεση υπερκείμενου μέσα στον απαγωγό με πολύ προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η μεσόφαση και μεταφορά του σε δεύτερο σετ 1,5ml tube
7. Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, ήπια ανακίνηση 1-2 φορές και αναμονή σε πάγο για 10 λεπτά ώστε να κατακρημνιστεί το γενετικό υλικό
8. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm, 15 min, 4°C
9. Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 500μl ice cold 70% αιθανόλη
10. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm, 5 min, 4°C
11. Απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος για 15-20 λεπτά στον πάγο ώστε να εξατμιστεί το υπόλειμμα αιθανόλης
12. Επαναδιάλυση σε ddH<sub>2</sub>O
13. Heat block για 3 λεπτά, Vortex
14. Πάγο και μέτρηση συγκέντρωσης ή αποθήκευση στους -80°C

## Κατεργασία με DNAάση

Αυτό το στάδιο πραγματοποιείται με σκοπό την καταστροφή μορίων DNA που τυχόν να υπάρχουν στο δείγμα, με τη παρουσία της DNAάσης που ανοικοδομεί το DNA αλλά όχι το RNA. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα συστατικά και οι ποσότητες της αντίδρασης, η οποία πραγματοποιείται με επώαση για 1 ώρα, στους 37°C.

*Πίνακας 4: Σύσταση- αντιδραστήρια της κατεργασίας με DNAάση*

Συστατικά
Δείγμα RNA: 25 $\mu$ l
DNAase (1u/ $\mu$ l), Thermo: 1 $\mu$ l
Buffer 10X, Thermo: 3 $\mu$ l
RNAase Out (40 u/ $\mu$ l), Invitrogen: 0,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O: 0,5 $\mu$ l
V <sub>Τελικό</sub> = 30 $\mu$ l

Ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού των δειγμάτων από τα συστατικά της αντίδρασης:

1. Προσθήκη 40 $\mu$ l οξικού νατρίου 3M, pH 5.2
2. Προσθήκη 330 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
3. Προσθήκη 400 $\mu$ l Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισομυλική (25:24:1)
4. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm, 5 λεπτά, 4°C
5. Συλλογή της υδατικής (πάνω) φάσης και μεταφορά σε ένα άλλο σετ tubes στα οποία αναγράφονται αναλυτικά τα δεδομένα του δείγματος
6. Προσθήκη 1000 $\mu$ l 100% ice cold αιθανόλης, και επώαση στους -80 για μια ώρα
7. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm, για μισή ώρα, 4°C
8. Προσθήκη 500 $\mu$ l 70% ice cold αιθανόλης
9. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm, 5min, 4°C
10. Απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος για 15-20 λεπτά στον πάγκο ώστε να εξατμιστεί το υπόλειμμα αιθανόλης
11. Επαναδιάλυση σε ddH<sub>2</sub>O
12. Heat block για 3 λεπτά, Vortex
13. Πάγο και μέτρηση συγκέντρωσης ή αποθήκευση στους -80°C

## Σύνθεση cDNA

Σε αυτό το βήμα, είναι απαραίτητη η ύπαρξη υποστρώματος 100ng RNA σε συνολικό όγκο που να μη ξεπερνάει τα 10 $\mu$ l. Αρχικά γίνεται προσθήκη 1 $\mu$ l Random Hexamers (100 mM), Takara και 1 $\mu$ l dNTPs (10 mM). Τα δείγματα μαζί με αυτά τα δυο αντιδραστήρια επωάζονται για 5 λεπτά στους 65 °C στο heat block. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη των υπολοίπων συστατικών της αντίδρασης, σύμφωνα με τον **πίνακα 5**, και τα δείγματα επωάζονται τελικά για 2 ώρες στους 37 °C στο υδατόλουτρο.

*Πίνακας 5: Συστατικά αντίδρασης σύνθεσης cDNA*

Συστατικά
DTT 0.1 M (500 u/ $\mu$ l), Invitrogen: 2 $\mu$ l
Buffer P5 5X, Invitrogen: 2 $\mu$ l
M-MLV (200 u/ $\mu$ l), Invitrogen: 1 $\mu$ l

RNAase Out (40 u/ μl), Invitrogen: 0.5 μl
ddH <sub>2</sub> O: 0.5 μl

Τέλος, προστίθενται 380μl ddH<sub>2</sub>O, και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C.

### qPCR

Το τελικό βήμα για τον χαρακτηρισμό επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων είναι η ενίσχυση τους μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real time Quantitative PCR – qPCR). Η θεωρία της τεχνικής βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής SYBR Green να φθορίζει όταν προσδεθεί πάνω σε δίκλωνο DNA. Το πρόγραμμα CFX manager που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ανήκει στην εταιρία Bio Rad, ενώ τα διαγράμματα κατασκευάζονται με στο φύλλο Microsoft Excel. Η ενίσχυση ιδιοσύστατων γονιδίων όπως είναι το GAPDH είναι απαραίτητη για την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου προς μελέτη. Τα συστατικά και οι συνθήκες της αντίδρασης αναγράφονται στους πιο κάτω πίνακες 6 και 7.

*Πίνακας 6: Σύσταση αντίδρασης qPCR*

Συστατικά
Δείγμα: 4 μl
Μείγμα Πρόσθιου/Ανάστροφου εκκινήτων: 2 μl
SYBR MIX, KAPA: 10 μl
ddH <sub>2</sub> O: 4 μl
V <sub>Τελικό</sub> = 20 μl

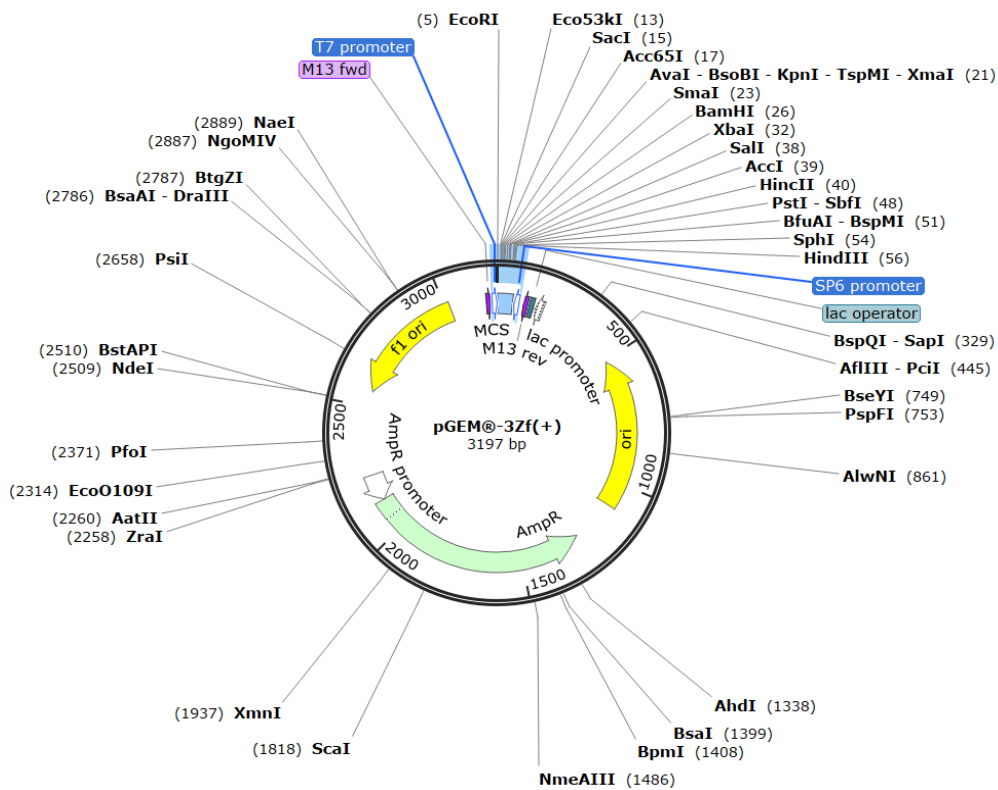
*Πίνακας 7: Συνθήκες αντίδρασης qPCR*

Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη: 95 °C/ 5 λεπτά
Αποδιάταξη: : 95 °C/ 20 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση: : 58 °C/ 2 λεπτά
Επιμήκυνση: 72 °C/ 15 δευτερόλεπτα
Κύκλοι: 45

### 3.2.3 Κλωνοποίηση των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pGEM 3ZF(+)

Για να προσδιοριστεί η επίδραση της δίκλωνης ρήξης στην αλληλουχία του υποκινητή του RECUR1 σε νουκλεϊκό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε συμβατική αντίδραση PCR στους θετικούς κλώνους ίδιας σύστασης και συνθηκών με αυτή της γονοτύπησης. Οι ζώνες που προέκυψαν από την ενίσχυση κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM 3ZF(+) προκειμένου να σταλθούν για αλληλούχηση. Αρχικά, έγινε η ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή με εκκινήτες εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχο των sgRNA, παρομοίως με την αρχική γονοτύπηση, και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πύκτωμα αγαρόζης 1% ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των προϊόντων. Έπειτα, κόπηκαν οι επιθυμητές ζώνες από τον κάθε κλώνο και με βάση το πρωτόκολλο του NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit της εταιρίας Macherey-Nagel έγινε ο καθαρισμός του γενετικού υλικού από την αγαρόζη. Στη συνέχεια αυτές οι ζώνες κλωνοποιήθηκαν η κάθε μια σε ξεχωριστή αντίδραση στον πλασμιδιακό φορέα της **εικόνας**

**3.4.** Εδώ να σημειωθεί ότι η κλωνοποίηση βασίζεται στην ύπαρξη προεξοχόντων άκρων A λόγω της Ταq πολυμεράσης στο ένθεμα και των άκρων T του γραμμοποιημένου φορέα (TA Cloning).



**Εικόνα 3.5:** Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEM 3ZF(+). (<https://www.addgene.org/>)

### Αντίδραση λιγάσης

Έπειτα τον καθαρισμό του γενετικού υλικού από την αгарόζη και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής του, πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης μεταξύ του ενθέματος και του πλασμιδιακού φορέα. Στον **πίνακα 8** αναγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης, η οποία διεξάγεται στους 16 °C για 16 ώρες. Λόγω μη επαρκούς ποσότητας του φορέα δεν πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης χωρίς το ένθεμα ώστε να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας (self-ligation), δεδομένου ότι η αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης στον συγκεκριμένο φορέα είχε ήδη ελεγχθεί σε προγενέστερο χρόνο.

**Πίνακας 8:** Σύσταση αντίδρασης λιγάσης (ligation) φορέα pGEM 3ZF(+).

Συστατικά
Ένθεμα - DNA απομονωμένο από τζελ αгарόζης: 10 µl
Πλασμίδιο: 1 µl
T4 ligase (400 u/µl), EnzyQuest: 0,5 µl
T4 ligase buffer (10X), NEB: 1,5 µl
ddH <sub>2</sub> O: 2 µl
V <sub>Τελικό</sub> : 15 µl

### 3.2.4. Μετασχηματισμός πλασμιδίου σε βακτηριακά κύτταρα

Το επόμενο βήμα που ακολουθήθηκε με σκοπό την εισαγωγή των πλασμιδίων σε βακτήρια ήταν ο μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5α, το οποίο υφίσταται αρχικά χημική επεξεργασία ώστε να είναι δεκτικά, και μετασχηματίζονται με θερμικό σοκ (heat shock). Μετά το στάδιο επιλογής των βακτηριακών κυττάρων που έλαβαν το πλασμίδιο βάσει ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, επιλέγονται απομονωμένες αποικίες ώστε να μεγαλώσουν σε 2ml θρεπτικού LB με αμπικιλίνη, δημιουργώντας μια υγρή καλλιέργεια. Ακολουθεί ολονύχτια ανάδευση στους 210rpm στους 37 °C. Τέλος, η υγρή καλλιέργεια υποβάλλεται για απομόνωση πλασμιδίου με βάση πρωτοκόλλου του εργαστηρίου.

### 3.2.5. Απομόνωση πλασμιδίου και διαγνωστική PCR

Για τον έλεγχο της ένθεσης των ζωνών από PCR στον πλασμιδιακό φορέα, απαραίτητο πρώτο βήμα είναι η απομόνωση πλασμιδίων από τα βακτηριακά κύτταρα. Στη συνέχεια, αυτά τα πλασμίδια θα χρησιμοποιηθούν ως καλούπι για την διαγνωστική αντίδραση PCR με τους κατάλληλους εκκινητές ώστε να επιβεβαιωθεί η ένθεση.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται παρασκευάζονται στο εργαστήριο, και η σύστασή τους περιγράφεται στον **πίνακα 9**.

**Πίνακας 9:** Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων (*Lysis Buffer*) για την απομόνωση πλασμιδίου από βακτηριακά κύτταρα

Συστατικά		
Lysis Buffer I	Lysis Buffer II	Lysis Buffer III
<ul style="list-style-type: none"><li>• 50mM Tris: 2,5 ml από 1M stock (για 50 ml buffer)</li><li>• 10mM EDTA: 1 ml από 0,5 M stock (για 50 ml buffer)</li><li>• ddH<sub>2</sub>O: 46,5 ml</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1% SDS: 1 ml από 10 % SDS stock (για 10 ml buffer)</li><li>• 0,2M NaOH: 400 μl</li><li>• 5M NaCl (για 10 ml buffer)</li><li>• ddH<sub>2</sub>O: 8,6 ml</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 60ml 5M οξικό κάλιο (49,07g οξικού καλίου σε 100ml H<sub>2</sub>O)</li><li>• 11,5ml άνυδρου οξικού οξέως</li><li>• 28,5ml ddH<sub>2</sub>O</li></ul>

1. Μεταφορά υγρής καλλιέργειας σε 1,5 ml tube τύπου Eppendorf
2. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά, μέγιστα rpm
3. Απομάκρυνση υπερκείμενου
4. Προσθήκη 100 μl Lysis Buffer I + RNάση A ( συγκέντρωση 100 μg/ml)
5. Ανάδευση σε vortex
6. Προσθήκη 200 μl Lysis Buffer II (θερμοκρασία δωματίου) – παρασκευάζεται πάντοτε φρέσκο διάλυμα
7. Ήπια ανάδευση
8. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά, ώστε να γίνει η λύση των βακτηρίων
9. Προσθήκη 150 μl Lysis Buffer III
10. Ήπια ανάδευση
11. Επώαση 5 λεπτά σε πάγο
12. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4 °C 13.000rpm

13. Μεταφορά υπερκειμένου σε άλλο tube τύπου Eppendorf 1,5ml με πολύ προσοχή ώστε να μη διαταραχθεί το ιζήμα, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται
14. Προσθήκη 1000  $\mu$ l 100% EtOH
15. Ανάδευση σε vortex
16. Παραμονή για 20 λεπτά τους  $-80^{\circ}\text{C}$
17. Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ , 13.000rpm
18. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 600  $\mu$ l 70% EtOH.
19. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ , 13.000rpm
20. Αφαίρεση υπερκειμένου προσεκτικά με πιπέτα και στέγνωμα του tube στον πάγκο
21. Επαναδιάλυση ιζήματος σε 70  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Ακολουθεί διαγνωστική αντίδραση PCR με εκκινητές που υβριδίζουν πάνω στον πλασμιδιακό φορέα εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης. Η σύσταση και οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται στο **πίνακες 10** και **11**. Τα πλασμιδια που βρέθηκαν θετικά για την ένθεση στάλθηκαν για αλληλούχηση ύστερα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης τους. Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθενται 10  $\mu$ l 6X Loading dye.

**Πίνακας 10:** Σύσταση διαγνωστικής αντίδρασης PCR

Συστατικά
Πλασμίδιο: 1 $\mu$ l ( $V_{\text{τελικό}}=100 \mu\text{l}$ )
dNTPs (10mM): 0,5 $\mu$ l
Πρόσθιος εκκινητής T7 (10 $\mu$ M): 1 $\mu$ l
Ανάστροφος εκκινητής SP6 (10 $\mu$ M): 1 $\mu$ l
Taq polymerase (5u/ $\mu$ l), Kapa Biosystem: 0,15 $\mu$ l
Taq Buffer (10X), Kapa Biosystem: 5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O: 41,35 $\mu$ l
$V_{\text{τελικό}} = 50 \mu\text{l}$

**Πίνακας 11:** Συνθήκες διαγνωστικής αντίδρασης PCR

Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη: $95^{\circ}\text{C}/3$ λεπτά
Αποδιάταξη: $95^{\circ}\text{C}/10$ δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση: $55^{\circ}\text{C}/10$ δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση: $72^{\circ}\text{C}/45$ δευτερόλεπτα
Κύκλοι: 30
Τελική επιμήκυνση: $72^{\circ}\text{C}/2$ λεπτά

### 3.2.6 Προετοιμασία δειγμάτων προς αλληλούχηση μέσω PCR

Σε μεταγενέστερη φάση, δείγματα τα οποία απομονώθηκαν από τζελ αγαρόζης ύστερα από την αντίδραση PCR, στάλθηκαν κατευθείαν προς αλληλούχηση χωρίς την μεσολάβηση της κλωνοποίησης τους σε πλασμιδιακό φορέα. Η διαδικασία αφορά την ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του υποκινητή προς μελέτη με ειδικούς εκκινητές, την αποκοπή της ζώνης από το πύκτωμα αγαρόζης έπειτα από ηλεκτροφόρηση, και τον καθαρισμό της με τη βοήθεια NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Στο τέλος γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού. Η σύσταση και οι συνθήκες τις

αντίδρασης παραμένουν ίδια με αυτά της γονοτύπησης. Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων γίνεται προσθήκη 6X Loading dye. Εδώ να σημειωθεί ότι αρχικά ηλεκτροφορείται το 10% της συνολικής αντίδρασης PCR ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της ενίσχυσης, και έπειτα ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση της υπόλοιπης ποσότητας η οποία και θα αποκοπεί από το τζελ.

### 3.2.7 Αλληλούχηση δειγμάτων

Όλα τα δείγματα αλληλουχήθηκαν κατά Sanger από την εταιρία CeMia Λάρισας.

Με την απόκτηση του γενετικού υλικού προς μελέτη, είτε ως ένθεμα σε πλασμιδιακό φορέα ή ως καθαρό προϊόν PCR, γίνεται προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων και τοποθετούνται οι απαραίτητες ποσότητες σε σωλήνες τύπου Eppendorf. Οι συγκεντρώσεις τους δεν ήταν αρκετά υψηλές και επομένως χρειάστηκε περισσότερη ποσότητα δείγματος ανά αντίδραση. Στην περίπτωση των δειγμάτων όπου το DNA προς μελέτη βρισκόταν σε μορφή ενθέματος σε πλασμιδιακό φορέα, η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με τον πρόσθιο εκκινητή T7, ενώ στα προϊόντα PCR χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος πρόσθιος εκκινητής με αυτό της ενίσχυσης.

### 3.2.8 Γονοτύπηση με πέψη για εύρεση πολυμορφισμού νουκλεοτιδίου (SNP)

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για την ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή προς μελέτη με εκκινητές που στοχεύουν εκατέρωθεν της θέσης του SNP σε κύτταρα AGS και KATO III. Ως αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε δείγμα πλασμιδίου που περιέχει την ζώνη του υποκινητή του RECUR1 χωρίς το SNP προς μελέτη, ενώ ως θετικό κοντρόλ πλασμίδιο στο οποίο υπάρχει κλωνοποιημένη η ζώνη του υποκινητή η οποία μέσω μεταλλαξιγένεσης φέρει το SNP. Η αντίδραση ήταν ίδιας σύστασης με τις προηγούμενες PCR που περιγράφηκαν σε αυτή την ενότητα με διαφορετικό σετ εκκινητών και 100ng δείγματος. Οι συνθήκες περιγράφονται στον πιο κάτω **πίνακα 12**. Σε πρώτη φάση τρέξαμε το 10% της συνολικής αντίδρασης σε πύκτωμα αγαρόζης με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, αφού προστέθηκε Loading Dye 6X, με σκοπό την επιβεβαίωση της ενίσχυσης της επιθυμητής περιοχής.

*Πίνακας 12: Συνθήκες αντίδρασης PCR για την γονοτύπηση SNP*

Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη: 95°C/5 λεπτά
Αποδιάταξη: 95°C/30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση: 60°C/20 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση: 72°C/20 δευτερόλεπτα
Κύκλοι: 40
Τελική επιμήκυνση: 72°C/2 λεπτά

Σε επόμενη φάση, η υπόλοιπη ποσότητα της αντίδρασης (90%) χρησιμοποιήθηκε για καθαρισμό από τα συστατικά της αντίδρασης PCR με βάση πρωτοκόλλου του NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Η επαναδιάλυση του γενετικού υλικού έγινε σε 30μl elution buffer, τα οποία μοιράστηκαν ισόποσα σε 15μl και 15μl, σε 1,5ml tube τύπου Eppendorf. Σε αυτά προστέθηκαν τα ίδια αντιδραστήρια (**πίνακας 13**) για την πέψη με

εξαίρεση του ενζύμου περιορισμού το οποίο προστέθηκε μόνο σε ένα δείγμα. Έτσι, το δείγμα χωρίς το ένζυμο δεν θα υποστεί πέψη και θα αποτελεί αρνητικό κοντρόλ (undigested). Τέλος, τα δείγματα έτρεξαν σε πύκτωμα αγαρόζης 2% με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, αφού προστέθηκε Loading Dye 6X.

**Πίνακας 13:** Συστατικά αντίδρασης πέψης

Συστατικά
Δείγμα: 15 $\mu$ l
Buffer (10X) NEB: 2 $\mu$ l
Acil NEB: 1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O: 2 $\mu$ l
V <sub>Τελικό</sub> = 20 $\mu$ l

### 3.2.9 Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών / Colony Formation Assay (CFA)

Τα δυο μοριακά εργαλεία που κατασκευάστηκαν είχαν ως σκοπό την απενεργοποίηση ενός ρυθμιστικού στοιχείου μεταγραφής και τη επαγόμενη σίγηση ενός μεταγραφικού παράγοντα. Προκειμένου να μελετηθούν τα φαινοτυπικά αποτελέσματα αυτών των γενετικών τροποποιήσεων, εφαρμόστηκε η *in vitro* διαδικασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay), κατά την οποία εξετάζεται η ικανότητα των κυττάρων να επιβιώσουν και να σχηματίζουν αποικίες έπειτα από συνεχή διαιρέσεις. Αρχικά, επιστρώνονται 500 κύτταρα από κάθε κλώνο σε τριβλίο ανάπτυξης 6 well, και αυτό το σημείο αποτελεί αφετηρία ημέρα 0. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν φυσιολογικά σε θρεπτικό μέσο στους 37 °C, και συλλέγονται φωτογραφίες κάτω από το μικροσκόπιο για τη παρατήρηση της συμπεριφοράς των κυττάρων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση λήφθηκαν φωτογραφίες την 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα, και την 7<sup>η</sup> έγινε χρώση των κυττάρων με το μπλε του Μεθυλενίου. Παράλληλα με τους κλώνους προς μελέτη, υποβάλλονται στην δοκιμασία και κύτταρα AGS αγρίου τύπου ως αρνητικοί μάρτυρες.

### 3.2.10 Δοκιμασία επούλωσης πληγών ( Wound Healing Assay)

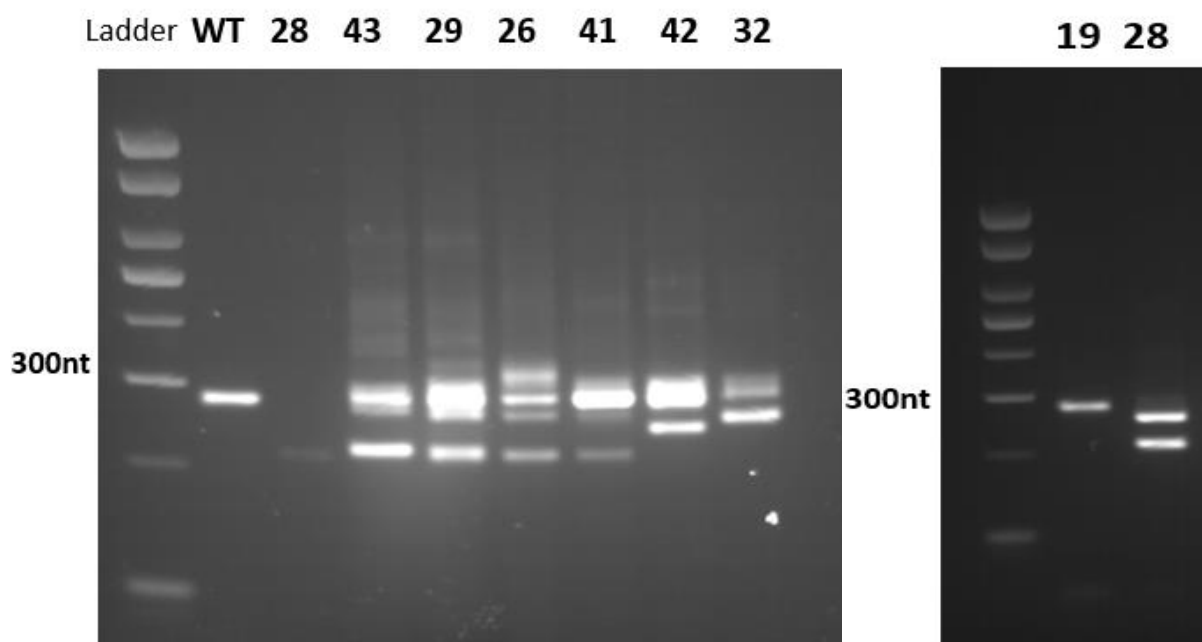
Μια περαιτέρω μελέτη του φαινοτύπου των τροποποιημένων κυττάρων είναι η δοκιμασία επούλωσης πληγών, που έχει ως σκοπό την διερεύνηση της κατευθυνόμενης μετανάστευσης των κυττάρων. Συγκεκριμένα, χαράζεται μια γραμμή στο τριβλίο ανάπτυξης των κυττάρων 6 well, και παρατηρείται ο ρυθμός με τον οποίο τα κύτταρα μεταναστεύουν, ώστε να κλείσουν την «πληγή» που προκλήθηκε *in vitro*, παρομοιάζοντας το με την διαδικασία επούλωσης *in vivo*. Συλλέγονται φωτογραφίες των κλώνων κάτω από το μικροσκόπιο την στιγμή της χάραξης (ώρα 0), έπειτα 24 και 72 ώρες μετά. Στο τέλος γίνεται χρώση των κυττάρων με το μπλε του Μεθυλενίου ώστε να συγκρίνεται η διάκριση της χαραγμένης γραμμής μεταξύ των προς μελέτη κλώνων και των κυττάρων ελέγχου (αγρίου τύπου).

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. All-in-One\_RECUR1\_Prom

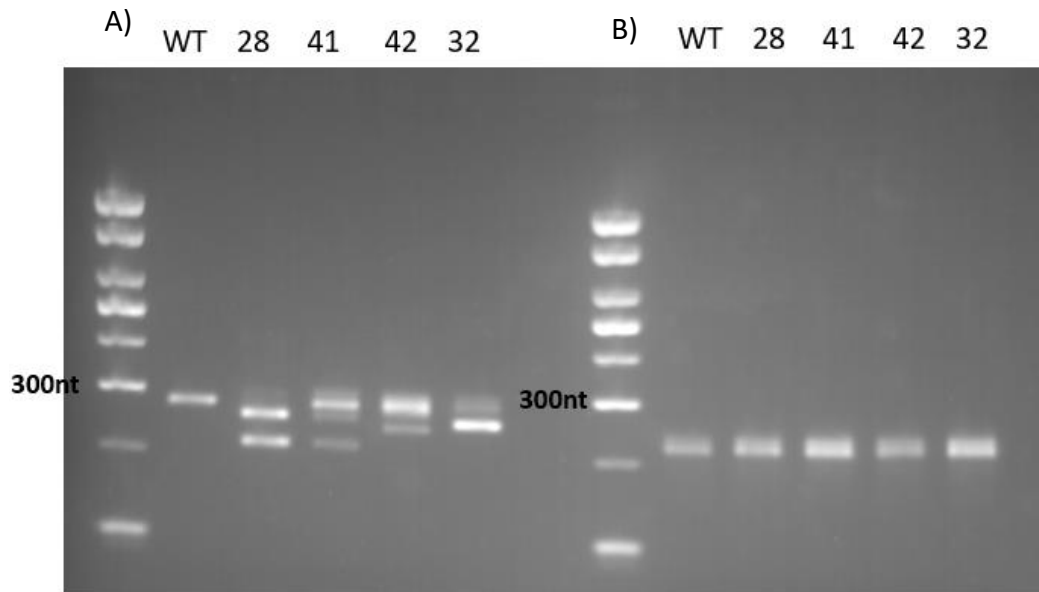
#### 4.1.1 Γονοτύπηση κλώνων

Έπειτα από την πραγματοποίηση της γενετικής τροποποίησης, οι κλώνοι που επιλέχθηκαν βάσει της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη, επανα καλλιεργήθηκαν σε 6 well plates, και στη συνέχεια προορίστηκαν για απομόνωση του γονιδιωματικού DNA. Ο σκοπός ήταν η γονοτύπηση και ο εντοπισμός των κλώνων που φέρουν τη γενετική τροποποίηση, δηλαδή έλλειψη βάσεων στον υποκινητή του μη-κωδικού μεταγράφου RECUR1. Ύστερα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή με εκκινητές εκατέρωθεν της περιοχής στόχο των sgRNA, τα δείγματα έτρεξαν σε πυκτή αγαρόζης 2%, στους 120 V ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των ζωνών. Συνολικά εξετάστηκαν 59 κλώνοι από τους οποίους θετικοί ήταν οι 7, με ποσοστό επιτυχίας της γενετικής τροποποίησης ~12%. Παρατηρώντας τις **Εικόνες 4.1 και 4.2**, φαίνεται η ύπαρξη 2 ζωνών για κάθε κλώνο. Η πάνω ζώνη των 279nt αντιστοιχεί στην ζώνη αγρίου τύπου, ενώ η κάτω ζώνη ~247nt φανερώνει την ύπαρξη ετεροζυγωτίας ως προς την γενετικά τροποποιημένη περιοχή του υποκινητή. Με εξαίρεση τον κλώνο 19, που χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας, προκύπτει ότι όλοι αυτοί οι κλώνοι είναι ετερόζυγοι ως προς την τροποποίηση. Αντίθετα, στα κύτταρα AGS (WT) παρατηρείται μόνο μια ζώνη η οποία αντιστοιχεί στην ακέραια περιοχή του υποκινητή.



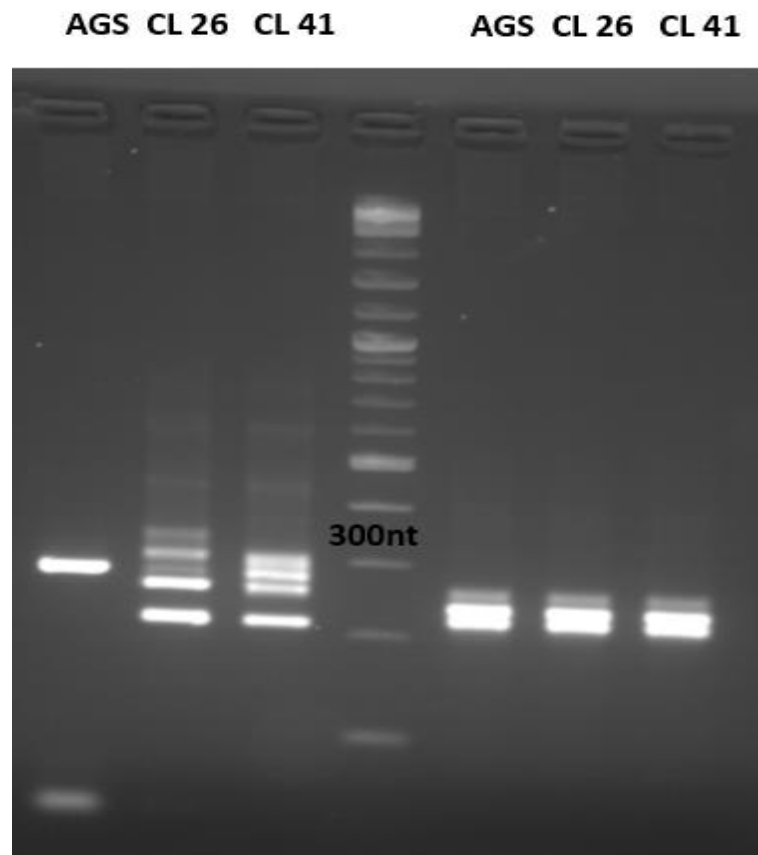
**Εικόνα 4.1 και 4.2:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του υποκινητή του RECUR1 με εκκινητές εκατέρωθεν της γενετικά τροποποιημένης περιοχής, τζελ αγαρόζης 2%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5x TBE, ladder 100bp plus EnzyQuest. WT= κύτταρα AGS, και οι αριθμοί εκπροσωπούν τους κλώνους.

Ακολούθησε απομόνωση γονιδιωματικού DNA με εμπορικές μεθόδους, από τους καλύτερους υποψήφιους ετερόζυγους κλώνους, για τη λήψη εικόνας μεγαλύτερης καθαρότητας και ποιότητας του γενετικού υλικού. Από την **Εικόνα 4.3** προκύπτουν συμπεράσματα ίδια με την προηγούμενη ανάλυση.



**Εικόνα 4.3:** A) Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίδρασης PCR της ενίσχυσης του υποκινητή του *RECURI* με εκκινητές εκατέρωθεν της γενετικά τροποποιημένης περιοχής, B) ιδιοσύστατο γονίδιο της ακτίνης, ύστερα από απομόνωση γονιδιωματικού DNA με *KIT*, τζελ αγαρόζης 2%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 x TBE, ladder 100bp plus EnzyQuest.

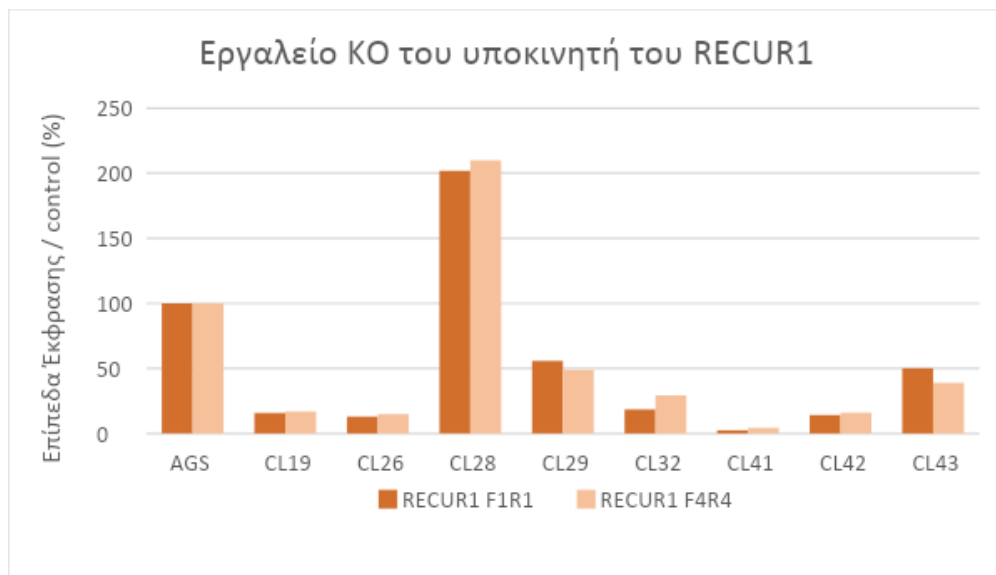
Στη συνέχεια, με σκοπό να παρατηρηθεί αν η συνεχής καλλιέργεια των κυττάρων επηρεάζει το προφίλ της γενετικής τροποποίησης, πραγματοποιήθηκε απομόνωση gDNA. Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν ήταν ο 26 και 41, 2 μήνες μετά την πρώτη γονοτύπηση. Βάσει της **Εικόνας 4.4** το πρότυπο των ζωνών παραμένει ίδιο με το αρχικό.



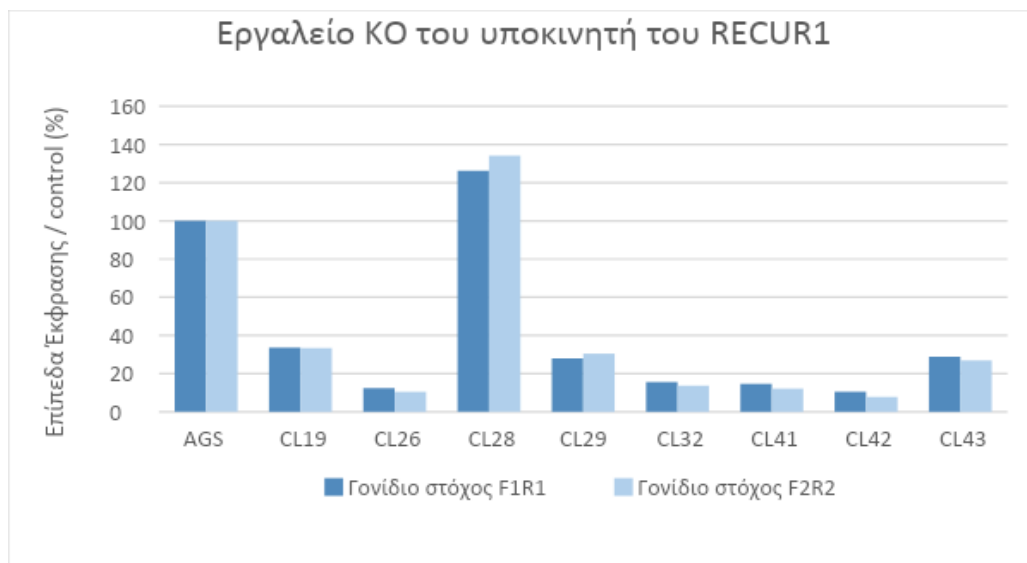
**Εικόνα 4.4:** Α) Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση μέρους του υποκινητή του *RECUR1* με εκκινητές εκατέρωθεν της γενετικά τροποποιημένης περιοχής, Β) ιδιοσύστατο γονίδιο της ακτίνης, ύστερα από απομόνωση γονιδιωματικού DNA 2 μήνες μετά την αρχική γονοτύπηση, σε τζελ αγαρόζης 2% και ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 x TBE, ladder 100bp plus EnzyQuest.

#### 4.1.2 Ανάλυση επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου *RECUR1* και γονιδίου στόχου του

Ύστερα τη γονοτύπηση, επιλέχθηκαν οι θετικοί κλώνοι από τους οποίους έγινε αποκοπή των βάσεων στην περιοχή στόχο του υποκινητή του *RECUR1* και το επόμενο στάδιο εξέτασης του μοριακού εργαλείου είναι η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου *RECUR1*. Θεωρητικά το εργαλείο αποσκοπεί στην αποκοπή της λειτουργικής περιοχής του υποκινητή που δεσμεύει μεταγραφικούς παράγοντες, απαραίτητους για την διεξαγωγή της μεταγραφής. Λόγω αυτού, αναμένεται να παρατηρηθεί μείωση στα επίπεδα έκφρασης του *RECUR1*, αλλά και του γονιδίου στόχου του. Για την επαλήθευση της υπόθεσης απομονώθηκε RNA από τους υπό μελέτη κλώνους, και ακολούθησε ανάλυση μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR). Ως ετερόζυγοι κλώνοι, με βάση την εικόνα της γονοτύπησης, επιλέχθηκαν οι 26, 28, 29, 32, 41, 42, 43, ενώ ο κλώνος 19 ως αρνητικός μάρτυρας. Από το **Διάγραμμα 1**, σημειώνεται μείωση στα επίπεδα έκφρασης του *RECUR1*, σε σχέση με τα κύτταρα AGS και στις δυο ισομορφές του. Συγκεκριμένα οι κλώνοι 41 και 26 παρουσιάζουν τα χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης του μεταγράφου, με ποσοστό σίγησης 97.5% και 87% αντίστοιχα στην πρώτη ισομορφή. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου στον κλώνο 19, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας με βάση την εικόνα της γονοτύπησης του. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου του *RECUR1*, εξετάστηκαν 2 ισομορφές του με τη χρήση 2 διαφορετικών σετ εκκινητών. Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 2**, το γονίδιο αυτό παρουσιάζει μειωμένη έκφραση σε όλους τους κλώνους, με εξαίρεση τον 28. Επίσης, και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται μείωση στα επίπεδα έκφρασης στον κλώνο 19, ο οποίος λειτουργεί ως αρνητικό κόντρολ βάσει της γονοτύπησης του. Και στα δυο διαγράμματα η έκφραση των μεταγράφων είναι κανονικοποιημένη ως προς το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH.



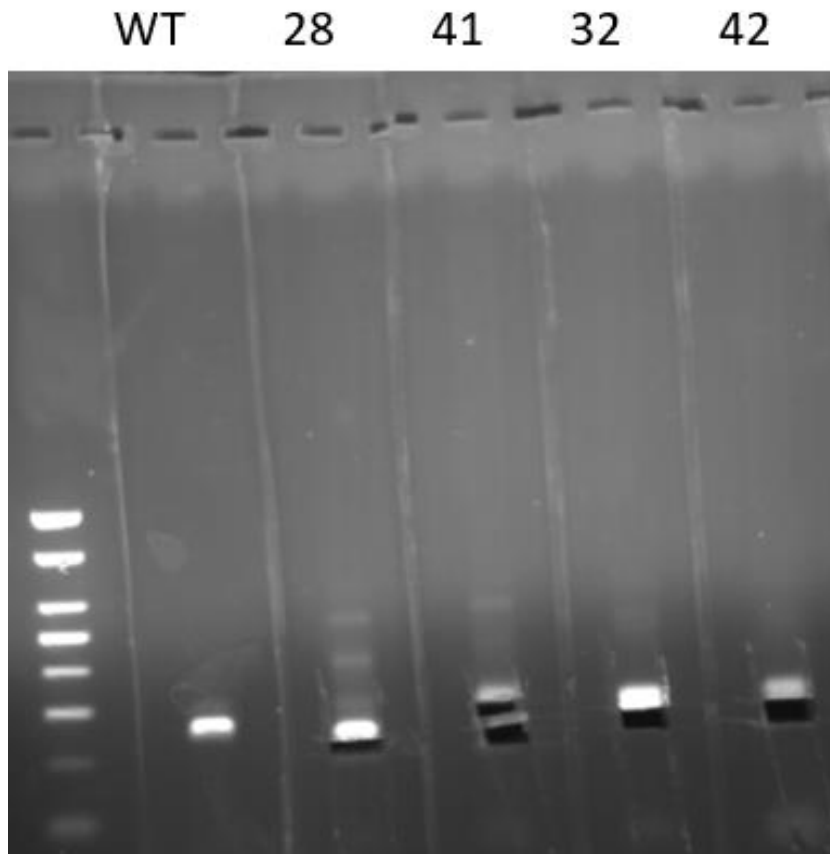
**Διάγραμμα 1:** Επίπεδα έκφρασης του *RECURI* στους κλώνους που εντοπίστηκαν θετικοί για την γενετική τροποποίηση του υποκινητή μέσω της γονοτύπησης. Κλώνος 19 = αρνητικό κοντρόλ σύμφωνα με τη γονοτύπηση.



**Διάγραμμα 2:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου του *RECURI* στους κλώνους που εντοπίστηκαν θετικοί για την γενετική τροποποίηση του υποκινητή μέσω της γονοτύπησης. Κλώνος 19 = αρνητικό κοντρόλ σύμφωνα με τη γονοτύπηση.

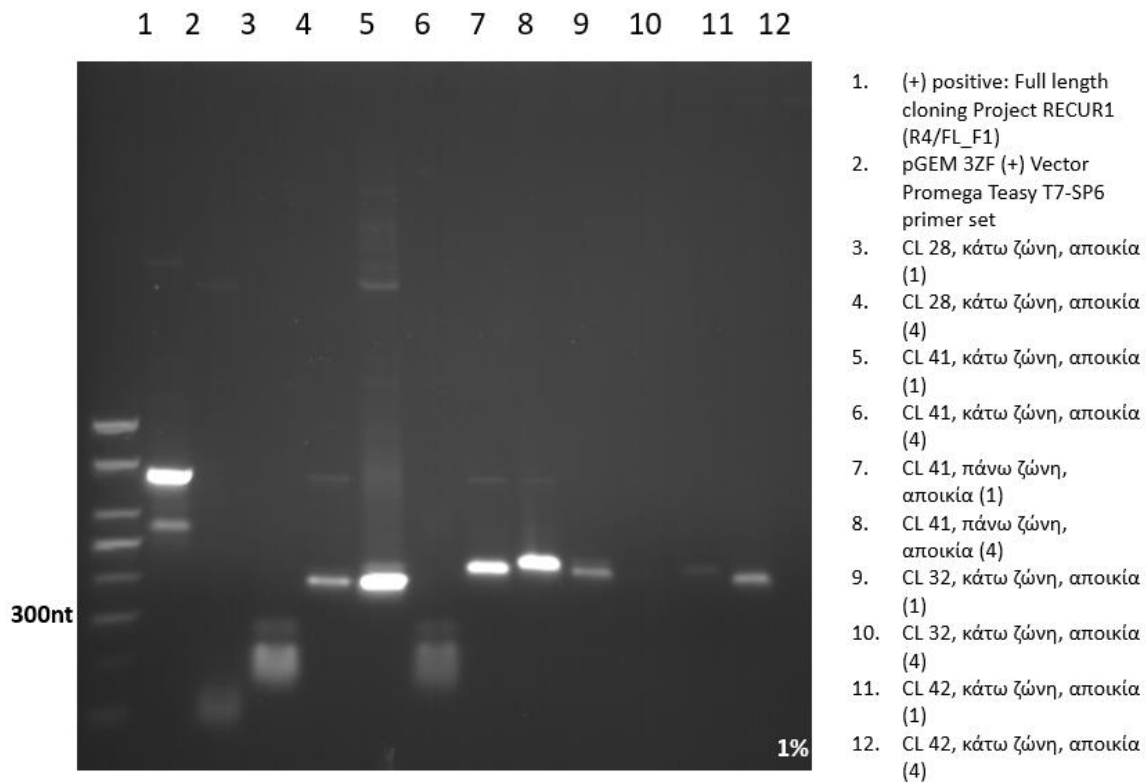
### 4.1.3 Κλωνοποίηση της γενετικά τροποποιημένης περιοχής του υποκινητή στον πλασμιδιακό φορέα pGEM ZF(+)

Με σκοπό να εντοπιστεί η αποκοπή της περιοχής στόχο του υποκινητή του RECUR1 σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, οι ζώνες που προέκυψαν από την ενίσχυση μέσω PCR κλωνοποιήθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση. Στην **Εικόνα 4.5** διακρίνονται οι ζώνες του υποκινητή που κόπηκαν από κάθε κλώνο. Συγκεκριμένα, κόπηκαν οι κάτω ζώνες, άρα θεωρητικά οι ζώνες που φέρουν την γενετική τροποποίηση στον υποκινητή από τους κλώνους 28,32 και 42, ενώ από τον κλώνο 41 απομονώθηκαν και οι δυο ζώνες.



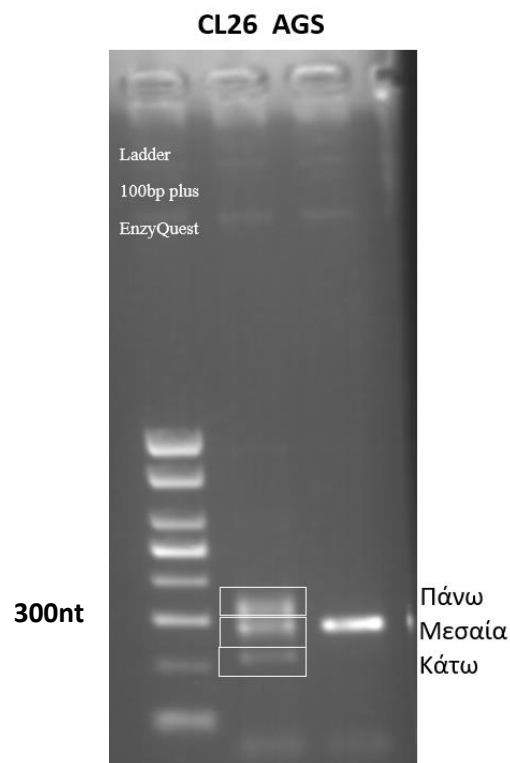
**Εικόνα 4.5:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης (PCR) του υποκινητή του RECUR1 με εκκινητές εκατέρωθεν της περιοχής στόχο των sgRNA, και οι ζώνες που κόπηκαν από κάθε κλώνο, σε τζελ 1%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, ladder 100 bp plus EnzyQuest.

Σε συνέχεια της απομόνωσης των ζωνών από την πηκτή αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης της κάθε ζώνης και του πλασμιδιακού φορέα, και μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων ώστε να λάβουν το πλασμίδιο στο εσωτερικό τους. Στην **Εικόνα 4.6** διακρίνονται οι αποικίες των βακτηρίων που εξετάστηκαν ως προς την ύπαρξη του πλασμιδιακού φορέα μαζί με το ένθεμα, ύστερα από την απομόνωση των πλασμιδίων και διαγνωστική PCR. Το μήκος των αναμενόμενων προϊόντων είναι 738nt για τον θετικό μάρτυρα (1), 103nt για τον αρνητικό μάρτυρα (2), που αποτελείται από τον άκοπο πλασμιδιακό φορέα, και 382nt και 350nt για την πάνω και κάτω ζώνη αντίστοιχα. Αναλύθηκαν 2 αποικίες από κάθε τρυβλίο, και βρέθηκε τουλάχιστον από μια θετική για κάθε ένθεμα. Τελικά, επιλέχθηκαν μόνο οι κλώνοι 28 και 41 ώστε να σταλθούν για αλληλούχηση.



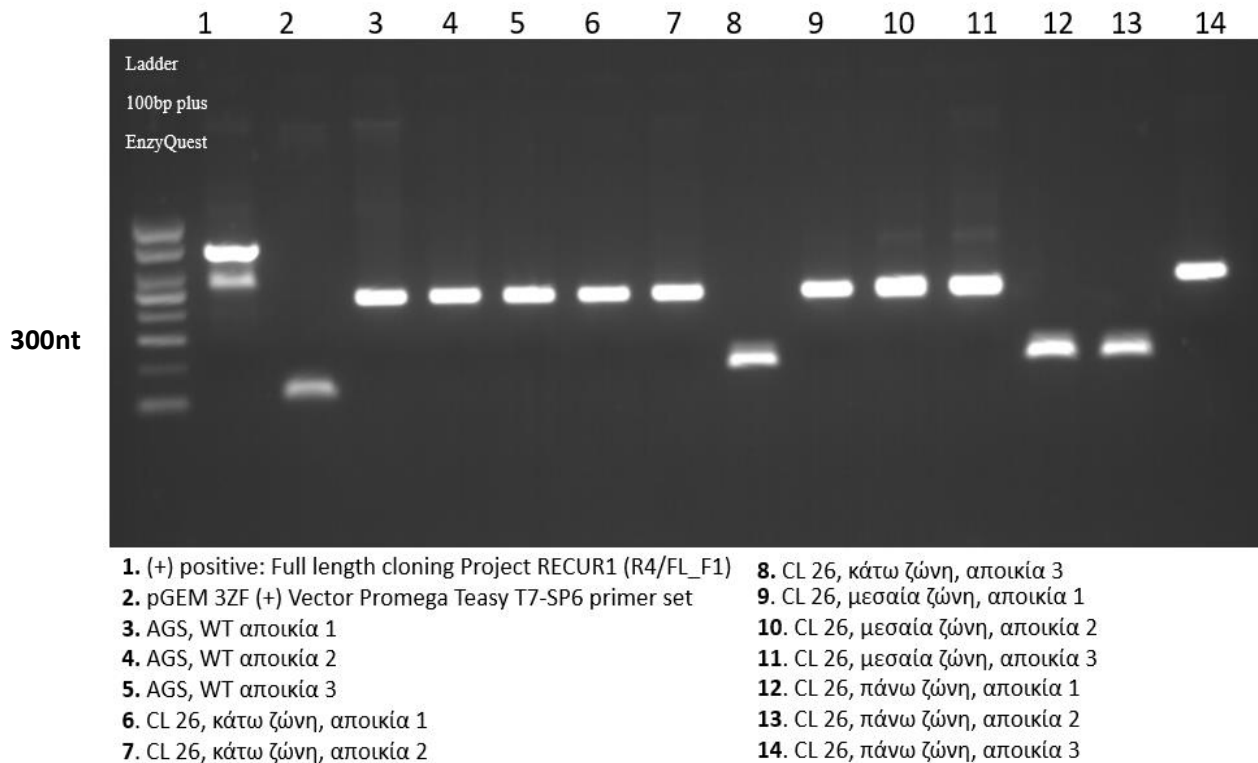
**Εικόνα 4.6:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR με σκοπό να βρεθούν οι βακτηριακές αποικίες θετικές για το πλασμίδιο με το ένθεμα. Τζελ αгарόζης 1%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, Ladder 100bp plus EnzyQuest.

Σε δεύτερο χρόνο, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση των ζωνών του κλώνου 26, αλλά και της ζώνης αγρίου τύπου από κύτταρα AGS. Στην **Εικόνα 4.7** φαίνονται οι ζώνες πριν την απομόνωση τους από το τζελ αгарόζης. Συγκεκριμένα, για τον κλώνο 26 κόπηκαν οι εξής ζώνες: η κάτω, η μεσαία και η πάνω.



**Εικόνα 4.7:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης PCR του υποκινητή του RECUR1 με εκκινητές εκατέρωθεν της περιοχής στόχο των sgRNA, σε τζελ 1%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, ladder 100bp plus EnzyQuest

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη προηγούμενη κλωνοποίηση, με τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα. Μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων για την απομόνωση του πλασμιδιακού γενετικού υλικού και τη διαγνωστική PCR, προέκυψαν τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην **Εικόνα 4.8**, σύμφωνα με τα οποία εντοπίστηκαν θετικές αποικίες που φέρουν το πλασμίδιο με το ένθεμα. Σε αυτή την περίπτωση εξετάστηκαν 3 αποικίες από κάθε τρυβλίο, και τελικά στάλθηκαν για αλληλούχηση πλασμίδια από μόνο μια θετική αποικία για κάθε ένθεμα.

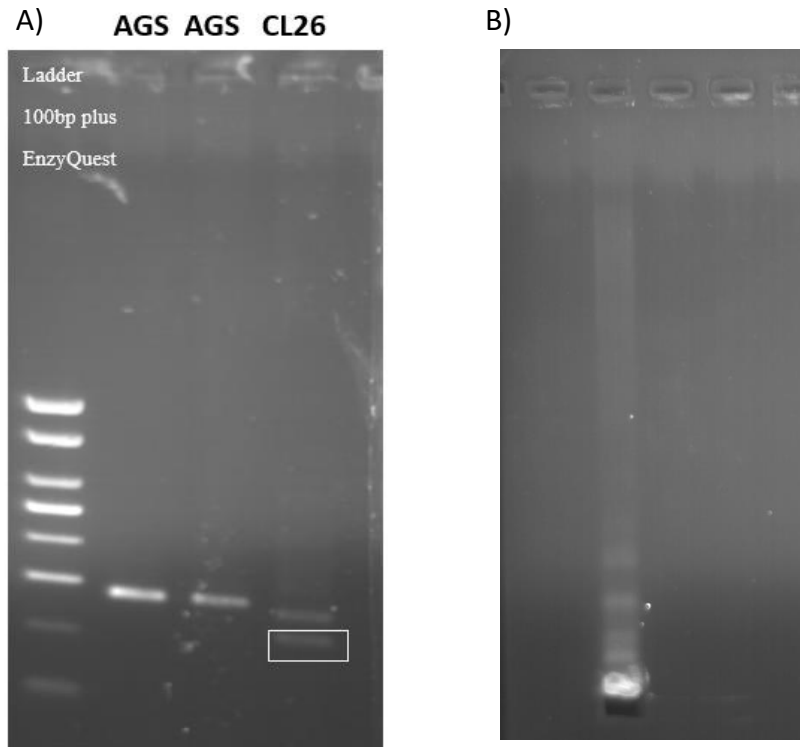


**Εικόνα 4.8:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR με σκοπό να βρεθούν οι βακτηριακές αποικίες θετικές για το πλασμίδιο με το ένθεμα. Τζελ αгарόζης 1%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE.

#### 4.1.4 Προετοιμασία δειγμάτων προς αλληλούχηση μέσω PCR

Με την αλληλούχηση των ζωνών του κλώνου 26, παρατηρήθηκε ότι η κάτω ζώνη δεν έδωσε αξιόπιστα αποτελέσματα. Μάλιστα, φάνηκε να έγινε ανάμιξη του γενετικού υλικού, πιθανότατα κατά τη διάρκεια της απομόνωσης από το τζελ αгарόζης. Έγινε λοιπόν, μια ακόμη προσπάθεια, για την αλληλούχηση της κάτω ζώνης του κλώνου 26 απευθείας στο PCR προϊόν.

Έπειτα από την τελευταία αντίδραση PCR για την ενίσχυση της γενετικά τροποποιημένης περιοχής του υποκινητή του RECUR1 του κλώνου 26, η **Εικόνα 4.9 (Α)** υποδεικνύει την επιτυχία της ενίσχυσης και του διαχωρισμού των ζωνών, ύστερα από την ηλεκτροφόρηση του 10% του συνολικού όγκου αντίδρασης. Τα αναμενόμενα προϊόντα έχουν μήκος 279nt: οι ζώνες αγρίου τύπου των κυττάρων AGS, και 247nt: η γενετικά τροποποιημένη ζώνη. Στην **Εικόνα 4.9 (Β)** απεικονίζεται το τζελ με το υπόλοιπο 90% του όγκου αντίδρασης και η απομόνωση της κάτω ζώνης του κλώνου 26.



**Εικόνα 4.9:** Α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του υποκινητή του *RECUR1* με εκκινητές εκατέρωθεν της περιοχής στόχο των *sgRNA*, Β) η απομόνωση της κάτω ζώνης του κλώνου 26 από τζελ αγαρόζης 1%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE

#### 4.1.5 Αλληλούχηση της περιοχής του υποκινητή των γενετικά τροποποιημένων κλώνων



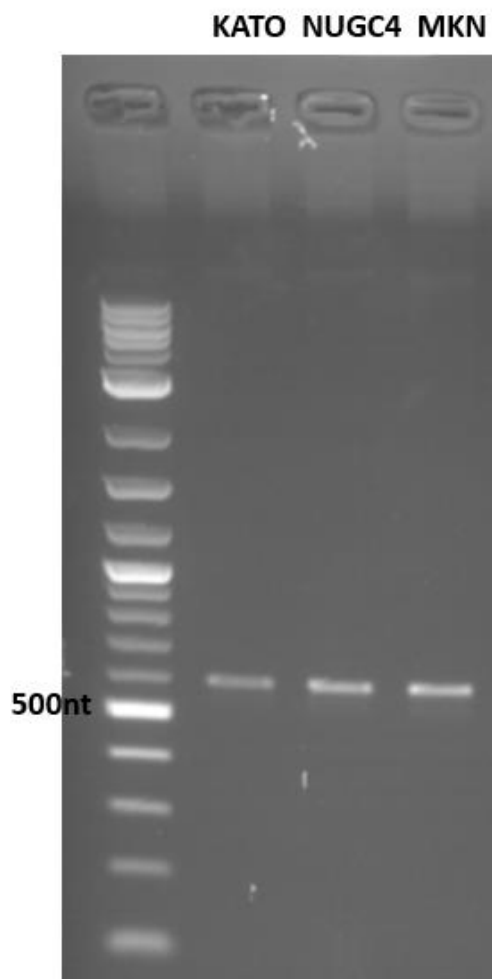
**Εικόνα 4.10:** Ανάλυση Blat των αποτελεσμάτων από την αλληλούχηση των περιοχών του υποκινητή του *RECUR1*, (*UCSC Genome Browser*). High = πάνω ζώνη, Middle = μεσαία ζώνη, Low = κάτω ζώνη. Οι διαφορές στο μήκος των ζωνών οφείλονται στη χρήση διαφορετικών εκκινητών για την αλληλούχηση. Οι ενθέσεις εμφανίζονται με πορτοκαλί χρώμα.

Με βάση την **Εικόνα 4.10**, επαληθεύεται η επιτυχία του εργαλείου ως προς την στόχευση και την αποκοπή συγκεκριμένης περιοχής του υποκινητή του *RECUR1*. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται η ζώνη του υποκινητή των κυττάρων AGS αγρίου τύπου (*AGS\_RECURI\_Prom*). Παρατηρείται λοιπόν, συγκριτικά με αυτήν, ότι οι κάτω ζώνες των

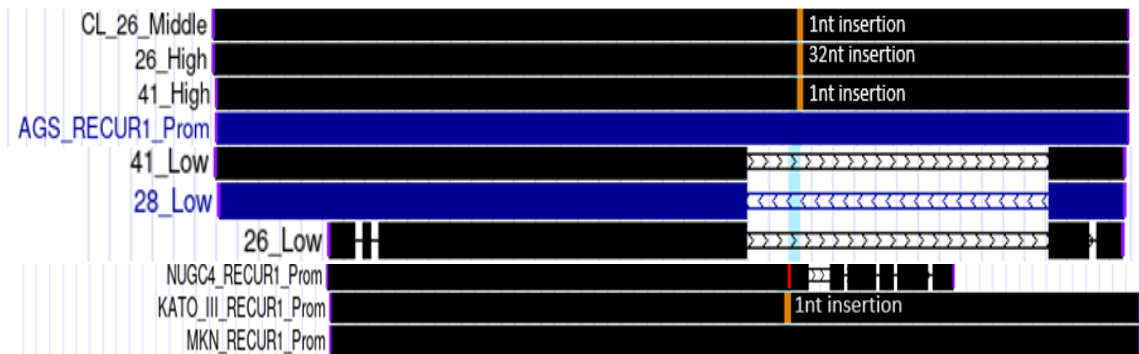
κλώνων παρουσιάζουν το ίδιο μοτίβο έλλειψης νουκλεοτιδίων, γεγονός που συμφωνεί με την **Εικόνα 4.1** της αρχικής γονοτύπησης. Αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι και η ένθεση νουκλεοτιδίου στην πάνω ζώνη του κλώνου 41, αλλά και στην πάνω και μεσαία ζώνη του κλώνου 26, κάτι που προβλέπεται από τον NHEJ μηχανισμό επιδιόρθωσης έπειτα από CRISPR KO.

#### 4.1.6 Αλληλούχηση της περιοχής του υποκινητή από γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές

Παράλληλα με την αλληλούχηση των γενετικά τροποποιημένων κλώνων, στάλθηκαν προς αλληλούχηση και αλληλουχίες του υποκινητή από άλλες γαστρικές καρκινικές-κυτταρικές σειρές που υπάρχουν διαθέσιμες στο εργαστήριο, όπως NUGC4, KATO-III και MKN45. Έχει αποδειχθεί ότι η συγκεκριμένη περιοχή περιέχει και έναν πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP) με πιθανή ρυθμιστική αξία για το RECUR1. Έτσι, ο σκοπός ήταν η γονοτύπηση του στον υποκινητή του RECUR1 σε άλλες κυτταρικές σειρές και σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που προέκυψαν από τους γενετικά τροποποιημένους κλώνους. Το μήκος των προϊόντων αναμένεται στα 590nt και για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της ενίσχυσης της περιοχής του υποκινητή, από τα προϊόντα της PCR, φορτώθηκε αρχικά το 10% της συνολικής αντίδρασης, όπως διακρίνεται στην **Εικόνα 4.11**, ενώ το υπόλοιπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό από τα αντιδραστήρια της PCR, και τελικά στάλθηκε για αλληλούχηση με τον ίδιο εκκινητή, όπως η κάτω ζώνη του κλώνου 26.



**Εικόνα 4.11:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση μέρους του υποκινητή του *RECUR1* από διαφορετικές γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, τζελ αγαρόζης 1%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, Ladder 100bp EnzyQuest.

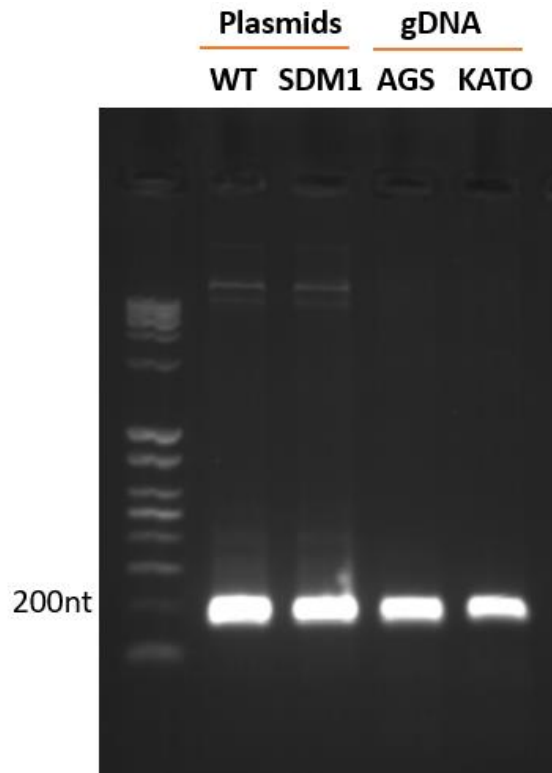


**Εικόνα 4.12:** Ανάλυση Blat (UCSC Genome Browser) των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης της περιοχής του υποκινητή του *RECUR1* από γαστρικές καρκινικές σειρές, και αντιπαράθεση τους με τα προηγούμενα αποτελέσματα.

Με βάση την **Εικόνα 4.12**, από την αλληλούχιση της περιοχής του υποκινητή του *RECUR1* προς μελέτη, προκύπτει ότι στις κυτταρικές σειρές παρατηρείται η παρουσία του νουκλεοτιδίου μόνο στην σειρά KATO III, σε αντίθεση με τα κύτταρα AGS τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του εργαλείου. Εδώ να σημειωθεί ότι σε αυτά τα κύτταρα δεν έγινε κάποια γενετική παρέμβαση, άρα τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν το γενετικό προφίλ των κυττάρων αγρίου τύπου. Επίσης, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης από τη σειρά NUGC4 δεν είναι καλής ποιότητας, πιθανότατα λόγω μη επαρκούς ποσότητας γενετικού υλικού ή κάποιου σφάλματος στη διαδικασία αλληλούχισης.

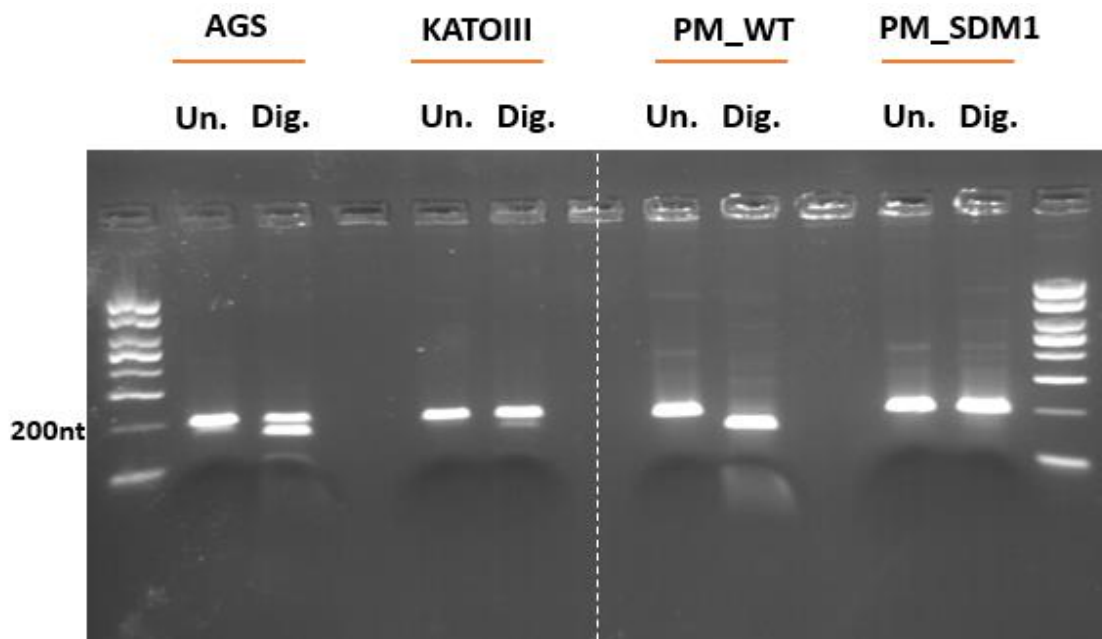
#### 4.1.7 Γονοτύπηση με πέψη για την εύρεση πολυμορφισμού νουκλεοτιδίου

Προκειμένου να γίνει η επαλήθευση της παρουσίας του συγκεκριμένου SNP στον υποκινητή του *RECUR1*, υποβλήθηκαν σε πέψη κύτταρα KATO III. Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκαν και κύτταρα AGS ώστε να υπάρχει πιο καθαρή εικόνα για το αν η ένθεση παρατηρείται και σε κύτταρα αγρίου τύπου, συγκριτικά με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των γενετικά τροποποιημένων κλώνων. Στην **Εικόνα 4.13** απεικονίζεται η ηλεκτροφόρηση του 10% της συνολικής αντίδρασης, στην οποία επιβεβαιώνεται η ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του υποκινητή προς μελέτη. Το προϊόν αναμένεται στα 200nt. Ως WT ορίζεται το πλασμίδιο το οποίο εμπεριέχει ως ένθεμα την ζώνη του υποκινητή απουσία του SNP (αρνητικός μάρτυρας), ενώ ως SDM1 ορίζεται το πλασμίδιο που περιέχει την μεταλλαγμένη περιοχή του υποκινητή παρουσία του SNP προς μελέτη (θετικός μάρτυρας).



**Εικόνα 4.13:** Ηλεκτροφόρηση του 10% της συνολικής αντίδρασης PCR έπειτα από την ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή του *RECURI* με εκκινητές εκατέρωθεν του SNP προς μελέτη, σε πύκτωμα αγαρόζης 1%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, Ladder 100bp EnzyQuest

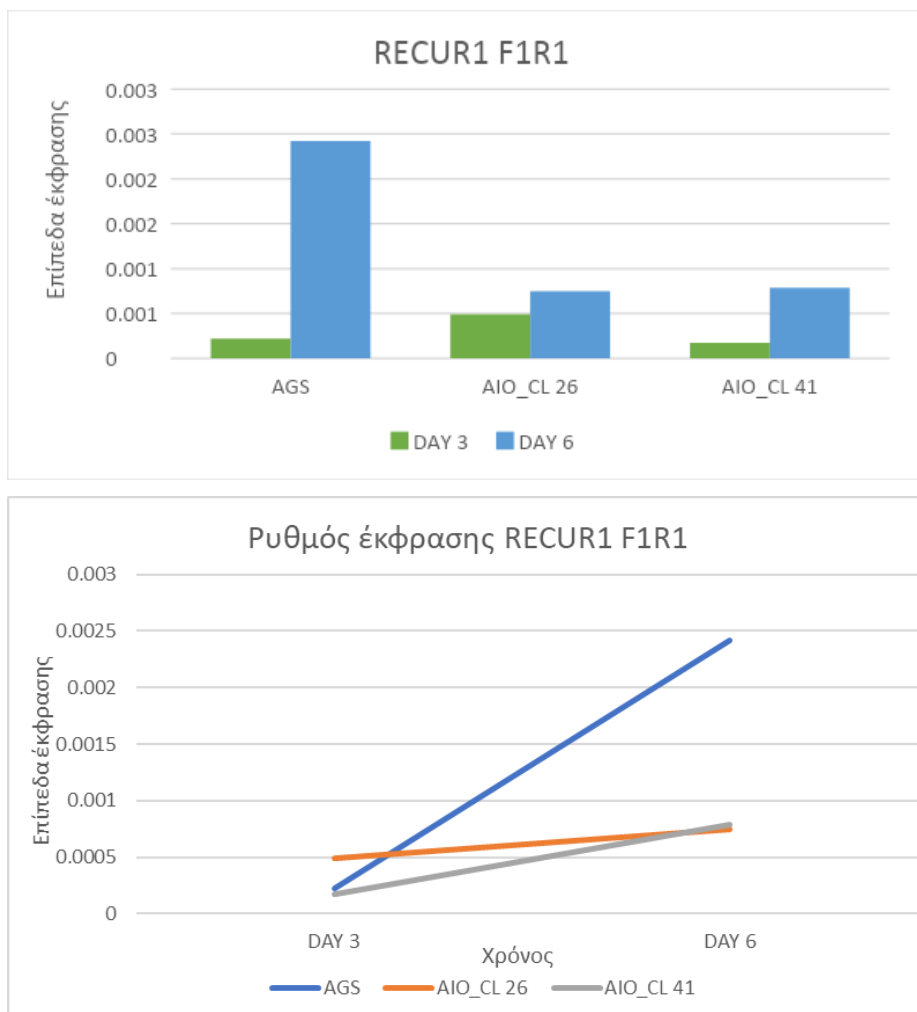
Το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη αναγνωρίζει την αλληλουχία αγρίου τύπου και κόβει το προϊόν της αντίδρασης PCR συνολικού μήκους 200 nt, σε δύο τμήματα 170nt και 30nt. Η παρουσία του εναλλακτικού αλληλομόρφου του SNP ενδιαφέροντος, αλλοιώνει τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται πέψη του προϊόντος. Στην **Εικόνα 4.14** διακρίνονται τα αποτελέσματα της πέψης ύστερα από ηλεκτροφόρηση. Στον αρνητικό μάρτυρα στη συνθήκη Digested παρατηρείται μια ζώνη κοντά στα 170nt, και μία ζώνη κοντά στα 200 nt στον θετικό μάρτυρα, και αυτό μας υποδηλώνει ότι η αντίδραση της πέψης ήταν αποτελεσματική. Στα κύτταρα AGS διακρίνονται 2 ζώνες, μια κοντά στα 200nt και μια άλλη αμέσως πιο κάτω. Στην περίπτωση των κυττάρων KATO III είναι εμφανές η ζώνη κοντά στα 200 nt.



**Εικόνα 4.14:** Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης της περιοχής του υποκινητή του *RECUR1* με σκοπό την ανίχνευση SNP, PM: Promoter, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE, Ladder 100bp EnzyQuest

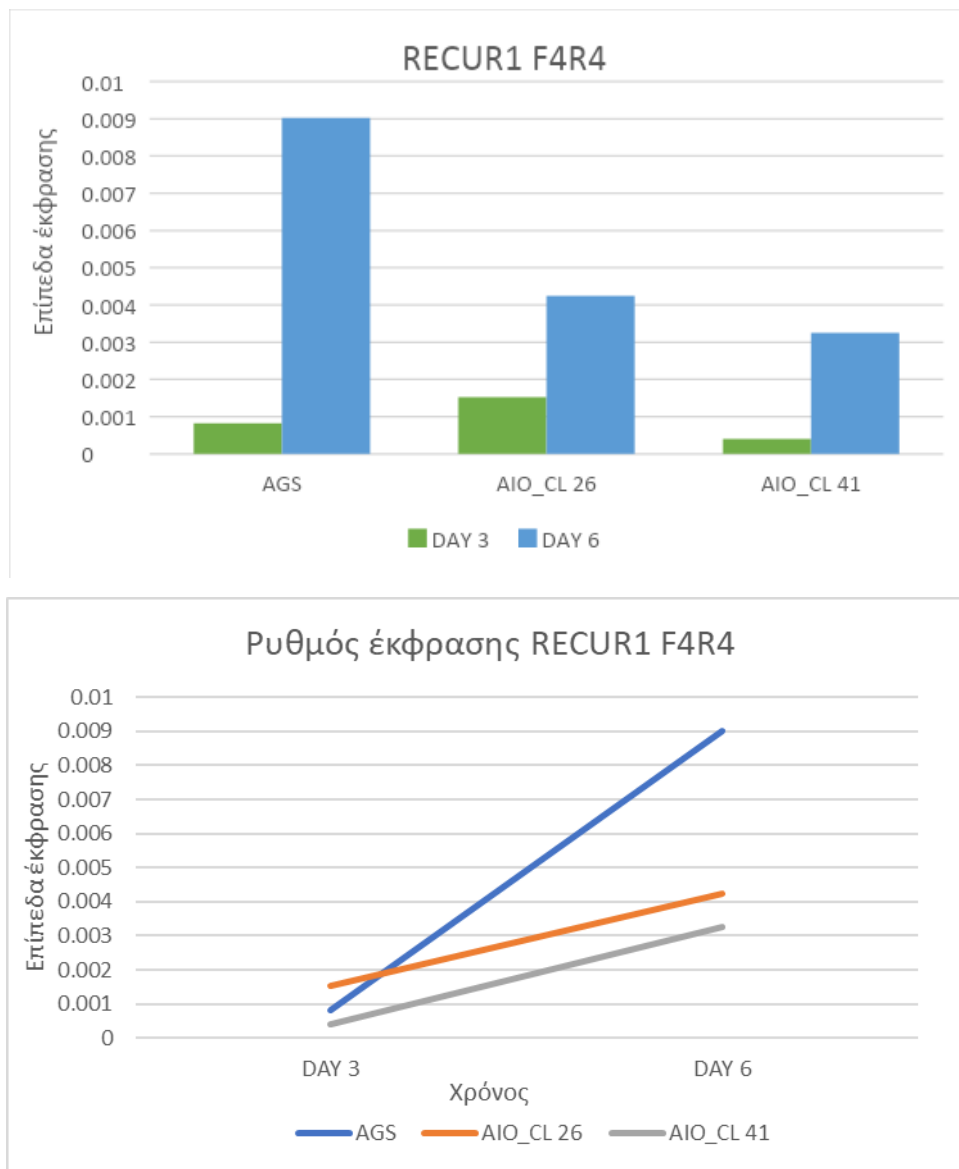
#### 4.1.8 Έκφραση του μεταγράφου *RECUR1* και του γονιδίου στόχου του στις CRISPR μεταλλαγμένες σειρές

Στη συνέχεια της μελέτης του knock-out στον υποκινητή, πραγματοποιήθηκε ανάλυση qPCR με σκοπό την παρατήρηση της έκφρασης του *RECUR1* και του γονιδίου στόχου του. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι κλώνοι 26, 41 λόγω υψηλότερου ποσοστού σίγησης του *RECUR1*, και κύτταρα AGS αγρίου τύπου. Αρχικά, στο **Διάγραμμα 3** απεικονίζεται η έκφραση του *RECUR1*, ανά διάστημα 3 ημερών με δυο διαφορετικές μορφές διαγραμμάτων. Παρατηρείται λοιπόν, ότι την 3<sup>η</sup> μέρα η έκφραση του *RECUR1* εμφανίζεται υψηλότερη στο κλώνο 26, σε σχέση με τα κύτταρα AGS και τον κλώνο 41, ο οποίος παρουσιάζει την χαμηλότερη έκφραση του *RECUR1*. Την 6<sup>η</sup> μέρα, παρατηρείται απότομη αύξηση της έκφρασης του *RECUR1* στα κύτταρα AGS, ενώ στον κλώνο 26 η μεταβολή της έκφρασης είναι ελάχιστη. Επίσης, ο κλώνος 41 χαρακτηρίζεται από υψηλότερο ρυθμό αύξησης της έκφρασης σε σύγκριση με τον 26. Και στις δύο περιπτώσεις όμως, παρόλο που σημειώνεται μερική αύξηση της έκφρασης του *RECUR1*, η οποία φαίνεται να φτάνει στο ίδιο επίπεδο, αυτή είναι αρκετά πιο χαμηλή συγκριτικά με τα κύτταρα AGS.



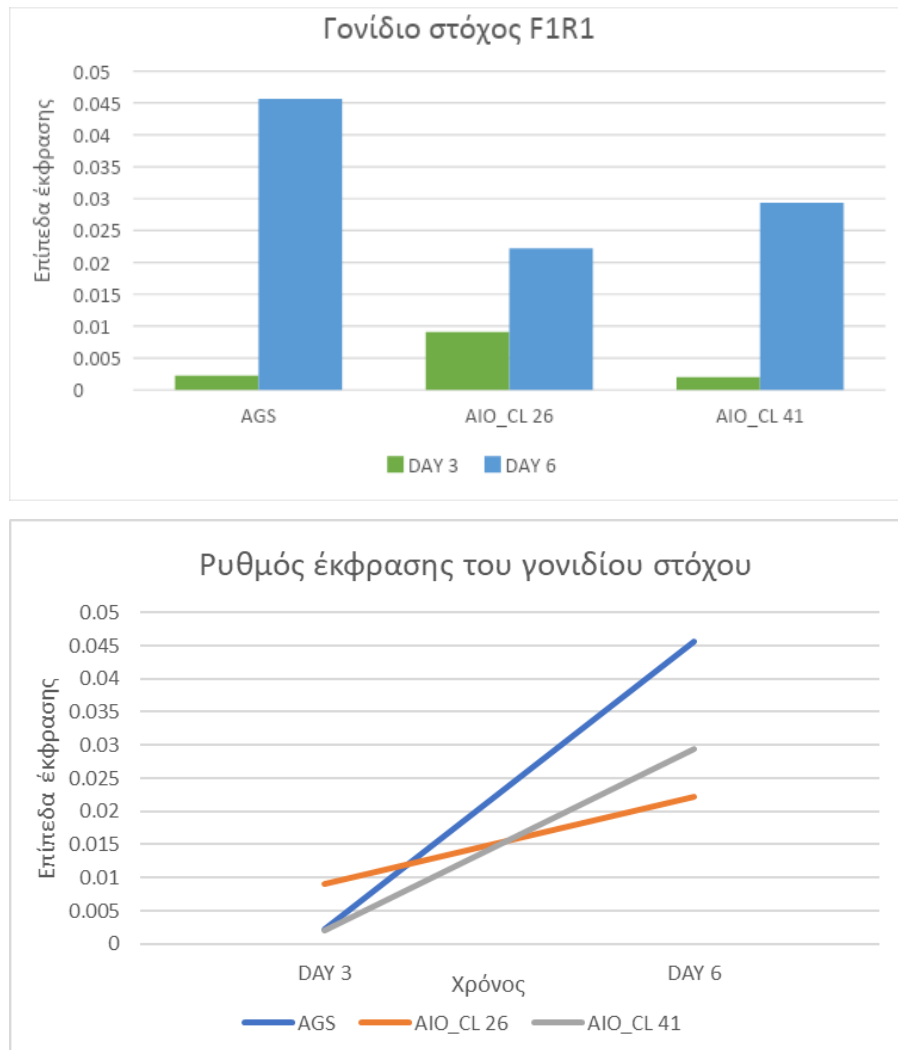
**Διάγραμμα 3:** Έκφραση του *RECUR1* με τους εκκινητές *F1R1*, με δυο τρόπους απεικόνισης. Κανονικοποιημένη έκφραση με *GAPDH*.

Μελετήθηκε επίσης και μια 2<sup>η</sup> ισομορφή του RECUR1, η οποία ενισχύθηκε με σετ εκκινήτων F4R4. Στο **Διάγραμμα 4** παρουσιάζεται η έκφραση της δεδομένης ισομορφής του RECUR1 με δύο διαφορετικά διαγράμματα, όπως και στην περίπτωση της πρώτης ισομορφής. Σε αυτή την περίπτωση η έκφραση του RECUR1 εμφανίζεται υψηλότερη σε όλους τους κλώνους, συγκριτικά με την προηγούμενη ισομορφή. Συγχρόνως, παρατηρείται ότι την 3<sup>η</sup> μέρα ο κλώνος 26 χαρακτηρίζεται όπως και πριν από την υψηλότερη έκφραση του μεταγράφου, σε σχέση με τα κύτταρα AGS, και τον κλώνο 41, που επίσης εμφανίζει τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Την 6<sup>η</sup> μέρα, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου στα κύτταρα AGS αυξάνονται απότομα. Στους κλώνους 26 και 41 ενώ σημειώνεται μερική αύξηση, τα επίπεδα παραμένουν χαμηλά σε σχέση με το κοντρόλ, και παρόμοια μεταξύ τους.



**Διάγραμμα 4:** Έκφραση του RECUR1 με τους εκκινήτες F4R4, με δυο τρόπους απεικόνισης. Κανονικοποιημένη έκφραση με GAPDH.

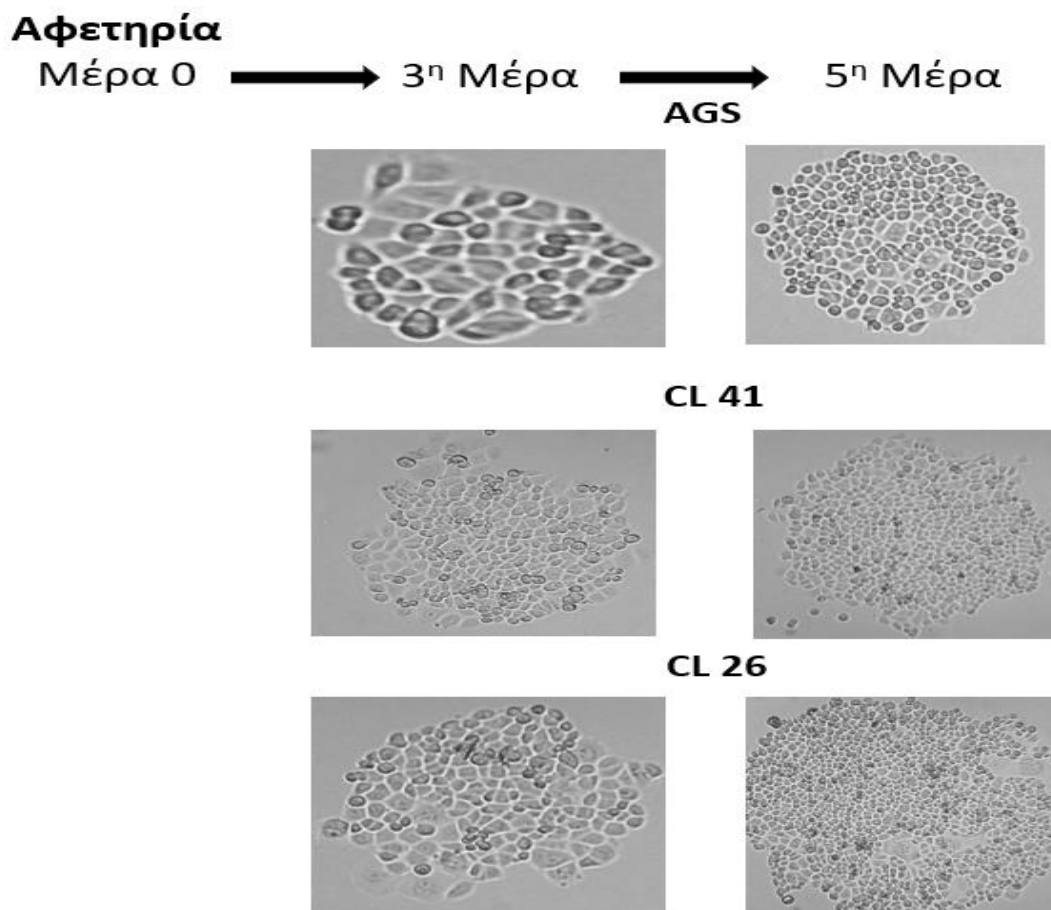
Εξετάστηκε επίσης και ο τρόπος που επηρεάζεται ο ρυθμός έκφρασης του γονιδίου στόχου του RECUR1 στους γενετικά τροποποιημένους κλώνους σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Στο **Διάγραμμα 5** διακρίνεται ο ρυθμός έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου ανά διαστήματα 3 ημερών, όπως έγινε και στην περίπτωση του RECUR1. Την 3<sup>η</sup> μέρα, η υψηλότερη έκφραση του γονιδίου σημειώνεται στον κλώνο 26, σε σχέση με τα κύτταρα AGS και τον κλώνο 41. Αυτό συμφωνεί με την υψηλότερη έκφραση του RECUR1 στον συγκεκριμένο κλώνο. Όπως και προηγουμένως, ήταν αναμενόμενη η απότομη αύξηση στο ρυθμό έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα AGS την 6<sup>η</sup> μέρα. Η αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου στον κλώνο 26 παρουσιάζει χαμηλότερο ρυθμό σε σχέση με τον κλώνο 41, όπως και στην περίπτωση των δυο ισομορφών του RECUR1.



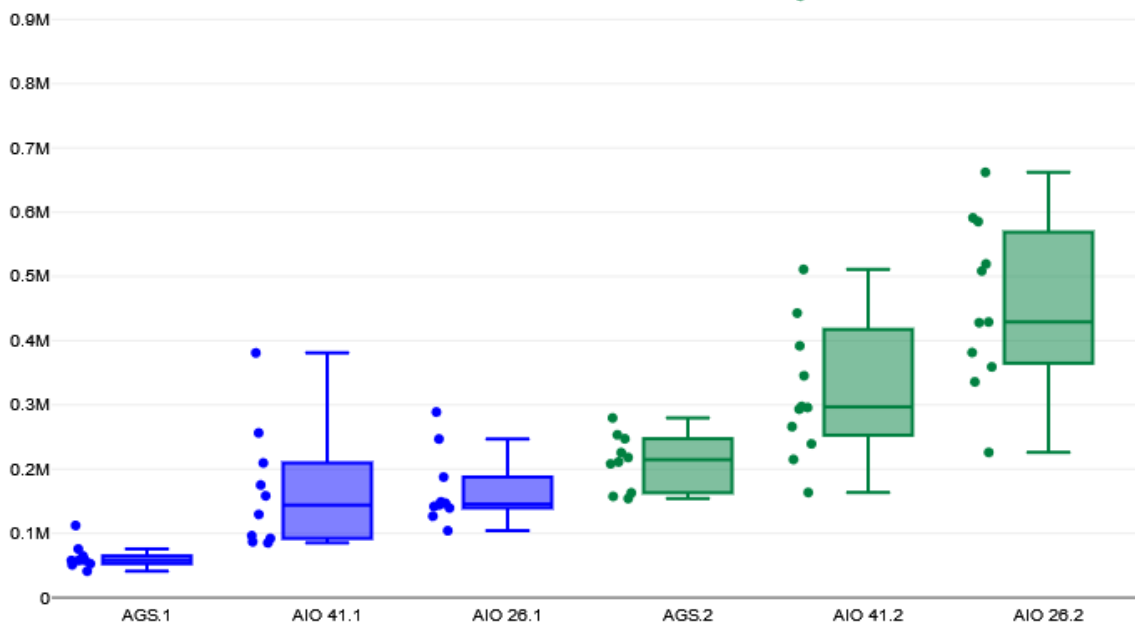
**Διάγραμμα 5:** Έκφραση του γονιδίου στόχου του RECUR1, με δυο τρόπους απεικόνισης. Κανονικοποιημένη έκφραση με GAPDH.

#### 4.1.9 Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (CFA)

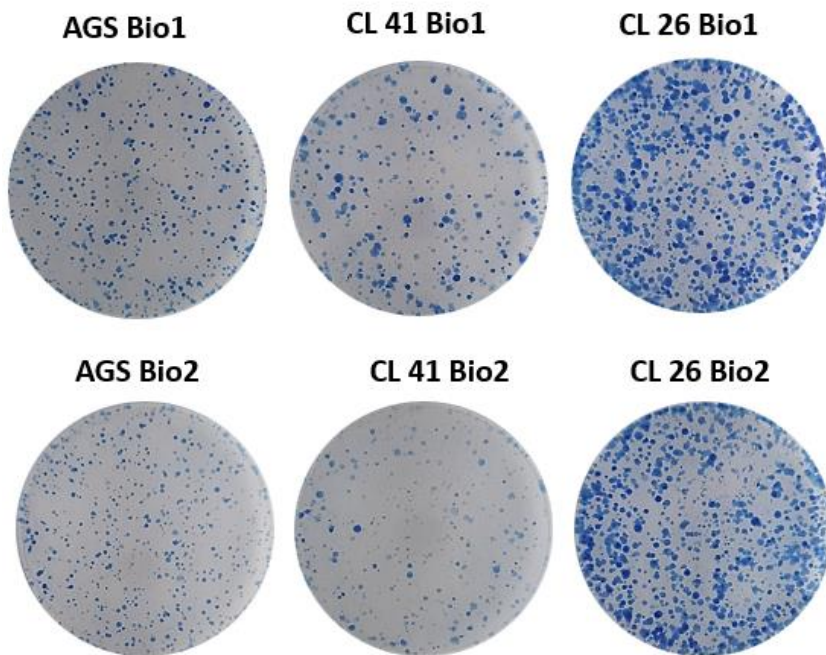
Για την κατασκευή ενός επιτυχημένου μοριακού εργαλείου, είναι απαραίτητη η πολύπλευρη μελέτη της δράσης του, τόσο σε γενετικό όσο και σε επίπεδο φαινοτύπου. Μέσω της γονοτύπησης έγινε επιλογή των γενετικά τροποποιημένων κλώνων, των οποίων η έκφραση του RECUR1 και του γονιδίου στόχου του μελετήθηκαν σε μεταγενέστερο στάδιο. Με αυτό τον τρόπο διεξάχθηκαν συμπεράσματα για τη επίδραση της γενετικής τροποποίησης του υποκινητή στην μεταγραφική του ενεργότητα. Το επόμενο βήμα είχε ως σκοπό την μελέτη της συμπεριφοράς των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων ως προς την ικανότητα τους να δημιουργήσουν κλώνους ή αποικίες έπειτα από συνεχή διαίρεση, σε σύγκριση με κύτταρα AGS αγρίου τύπου, με τα αποτελέσματα να εμφανίζονται στην **Εικόνα 4.15**. Την 3<sup>η</sup> μέρα αφού στρώθηκαν εκ νέου κύτταρα, από την εμφάνιση των κλώνων στο μικροσκόπιο, ο μεγαλύτερος πληθυσμός κυττάρων παρατηρείται στον κλώνο 41 και ακολουθεί σε δεύτερη θέση ο κλώνος 26, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου AGS. Την 5<sup>η</sup> μέρα φαίνεται πως τα κύτταρα AGS παρουσιάζουν τον λιγότερο αριθμό κυττάρων. Ωστόσο, ο κλώνος 26 εμφανίζει τον μεγαλύτερο πληθυσμό, ακόμη και από τον κλώνο 41. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 6**. Επιπρόσθετα, στην **Εικόνα 4.16** απεικονίζονται τα κύτταρα ύστερα από 7 μέρες, έπειτα από χρώση με μπλε του μεθυλενίου. Για κάθε κλώνο εξετάστηκαν δυο βιολογικές επαναλήψεις.



*Εικόνα 4.15: Όψη των κλώνων κάτω από το μικροσκόπιο σε κάθε αναγραφόμενη μέρα*



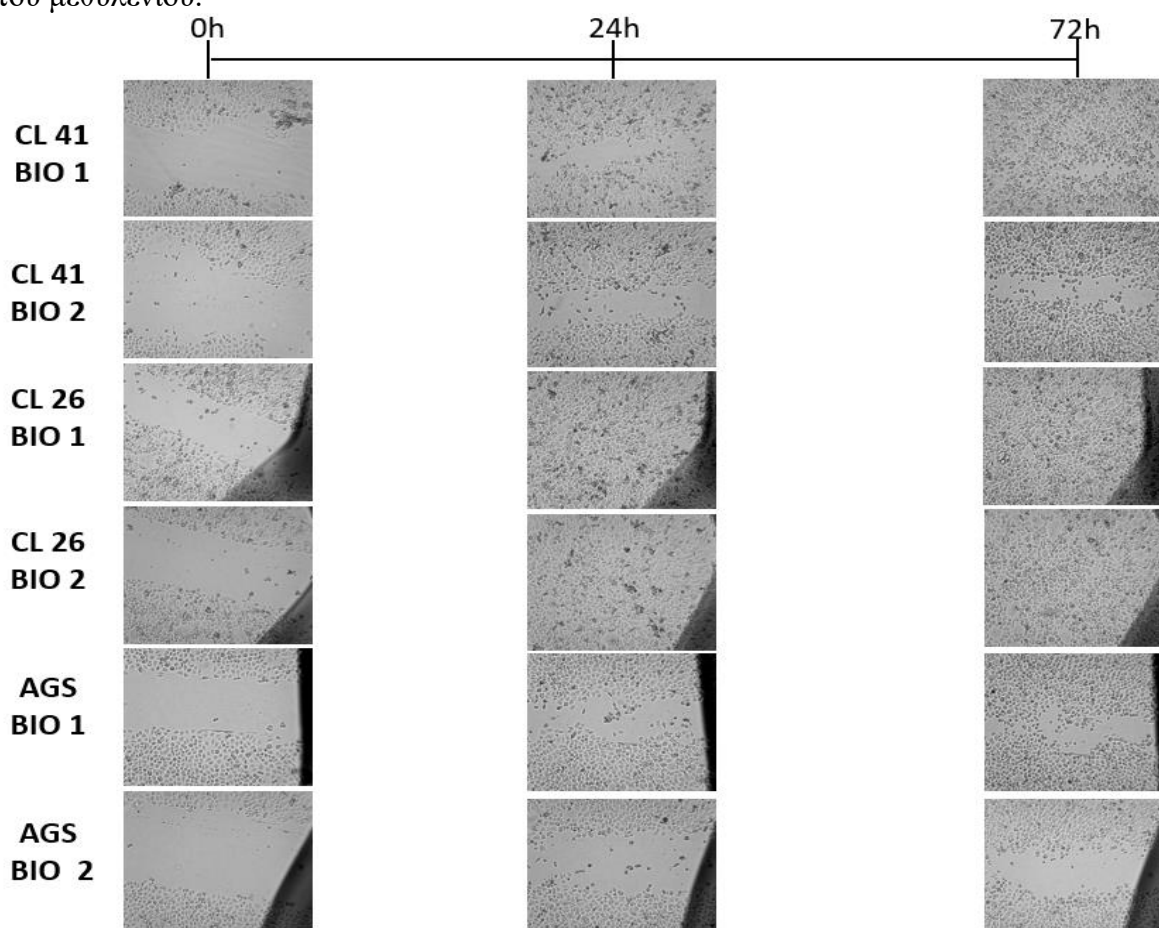
*Διάγραμμα 6: Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών σε κάθε κλώνο, μπλε χρώμα = 3<sup>η</sup> μέρα, πράσινο χρώμα = 5<sup>η</sup> μέρα*



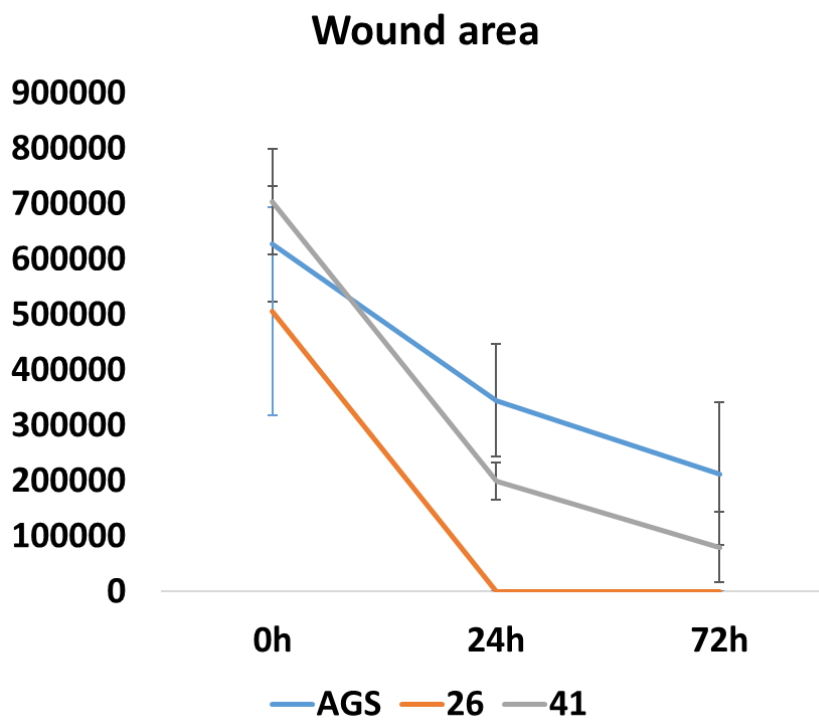
*Εικόνα 4.16: Χρώση κυττάρων με το μπλε του μεθυλενίου στο 6 well plate, έπειτα από 7 ημέρες πολλαπλασιασμού*

#### 4.1.10 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing)

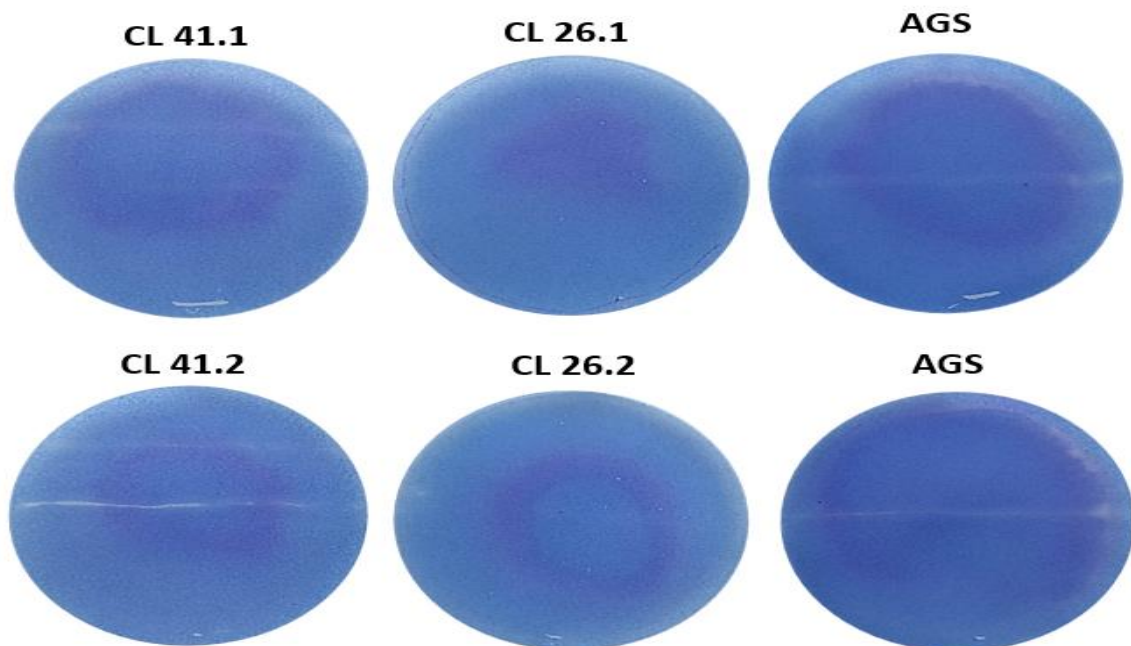
Με σκοπό την περαιτέρω μελέτη του φαινοτύπου που προκύπτει ως συνέπεια του ΚΟ του RECUR1 υποκινητή, πραγματοποιήθηκε το παρόν πείραμα ώστε να διερευνηθεί η κατευθυνόμενη μετανάστευση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, σκοπός ήταν η παρατήρηση του τρόπου με τον οποίο τα κύτταρα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, έτσι ώστε να κλείσουν την «πληγή» που προκλήθηκε *in vitro*. Αυτή η δοκιμασία παρομοιάζεται με την διαδικασία επούλωσης *in vivo* [105]. Στην **Εικόνα 4.17** παρουσιάζονται οι κλώνοι κάτω από το μικροσκόπιο σε τρεις χρονικές στιγμές. Ως αφετηρία (0h) ορίζεται η στιγμή της χάραξης της γραμμής. Παρατήρηση γίνεται αντίστοιχα στις 24h και 72h, ώστε να παρατηρηθεί ο ρυθμός μετανάστευσης των κυττάρων. Τα κύτταρα AGS αγρίου τύπου εμφανίζουν τον φυσιολογικό ρυθμό επούλωσης. Με βάση την εικόνα, ο κλώνος 26 παρουσιάζει τον μεγαλύτερο ρυθμό επούλωσης, διότι και στις 2 βιολογικές επαναλήψεις του μετά από 24 ώρες η χαραγμένη επιφάνεια φαίνεται να έχει ήδη καλυφθεί. Ακολουθεί ο κλώνος 41, στον οποίο παρατηρείται σταδιακή κάλυψη της γραμμής μεγαλύτερου ρυθμού συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου, παρόλο που δεν υπάρχει πλήρης κάλυψη μετά από 72 ώρες, ωστόσο η αρχική ακάλυπτη επιφάνεια είναι μεγαλύτερη σε αυτό τον κλώνο. Στο **Διάγραμμα 7** παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση του ρυθμού κάλυψης της χαραγμένης επιφάνειας, ενώ στην **Εικόνα 4.18** διακρίνονται τα κύτταρα μετά από 72 ώρες σε 6 well plate και έπειτα από χρώση με το μπλε του μεθυλενίου.



**Εικόνα 4.17:** Φωτογραφίες των κλώνων κάτω από το μικροσκόπιο για την παρατήρηση της κατευθυνόμενης μετανάστευσης των κυττάρων.



*Διάγραμμα 7: Ποσοτικοποίηση του ρυθμού κάλυψης της χαραγμένης επιφάνειας. Άξονας ψ= μονάδες χαραγμένης επιφάνειας, χ = χρόνος σε h*

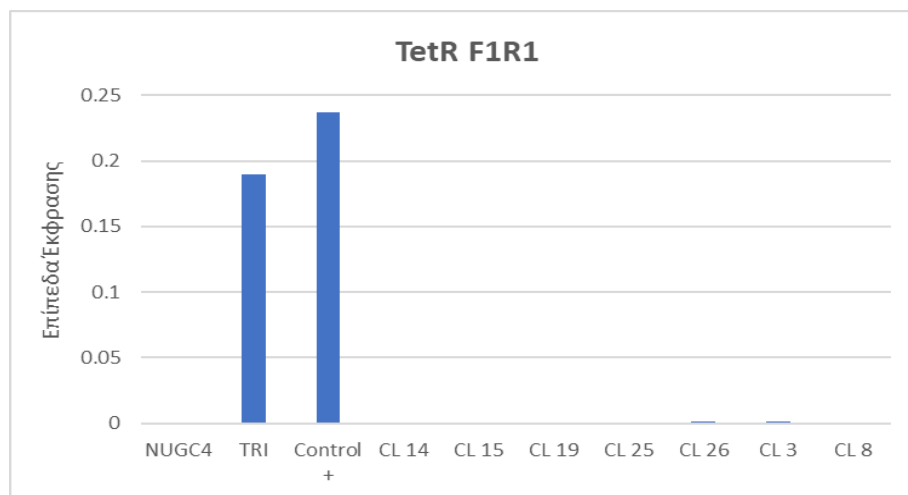


*Εικόνα 4.18: Χρώση κυττάρων με το μπλε του μεθυλενίου, έπειτα από 72h σε 6 well plate, για την διάκριση της χαραγμένης επιφάνειας*

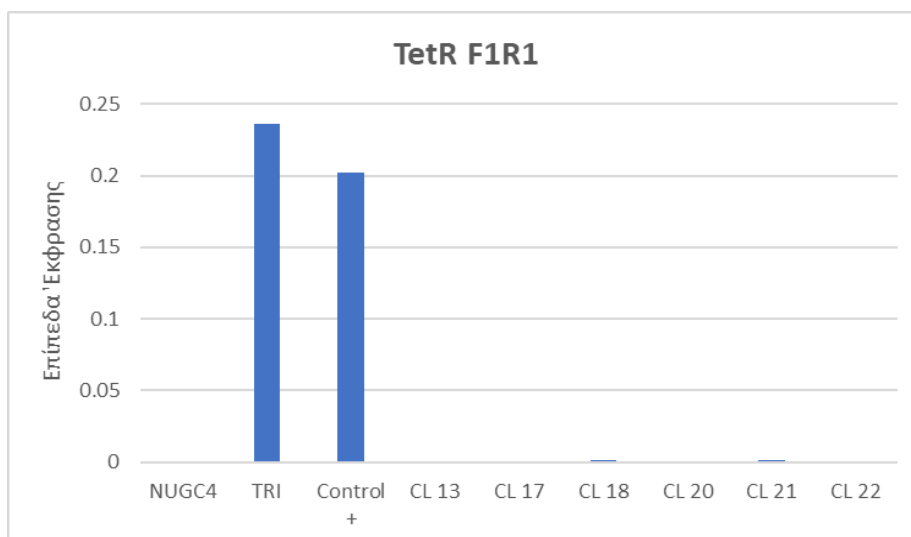
## 4.2 NUGC4 – TetR: Σύστημα Επαγόμενη Σίγησης

### 4.2.1 Ανάλυση επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης καταστολέα TetR

Έπειτα από την διαδικασία της γενετικής τροποποίησης των καρκινικών κυττάρων NUGC4 για την εισαγωγή του συστήματος TetR στο γονιδίωμα, σκοπός ήταν η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης. Στα **Διαγράμματα 8 και 9** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ενίσχυσης των μεταγράφων TetR από τους κλώνους που επιλέχθηκαν ύστερα από την επιλογή μέσω ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Σύμφωνα με αυτά, παρατηρείται μηδενική έκφραση, γεγονός που υποδηλώνει την αδυναμία έκφρασης της πρωτεΐνης TetR σε αυτά τα κύτταρα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, δηλαδή κύτταρα AGS που εκφράζουν την πρωτεΐνη TetR σε υψηλά επίπεδα, και κύτταρα NUGC4 αγρίου τύπου ως αρνητικός μάρτυρας.



**Διάγραμμα 8:** Ανάλυση επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης καταστολέα TetR σε κύτταρα NUGC4, ύστερα από γενετική τροποποίηση. Κανονικοποιημένη έκφραση με GAPDH.

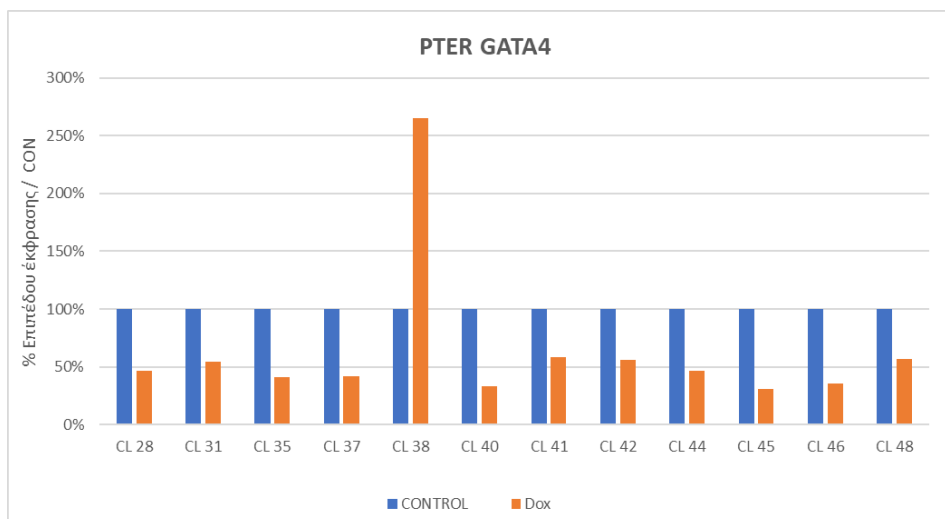


**Διάγραμμα 9:** Ανάλυση επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης καταστολέα TetR σε κύτταρα NUGC4, ύστερα από γενετική τροποποίηση. Κανονικοποιημένη έκφραση με GAPDH.

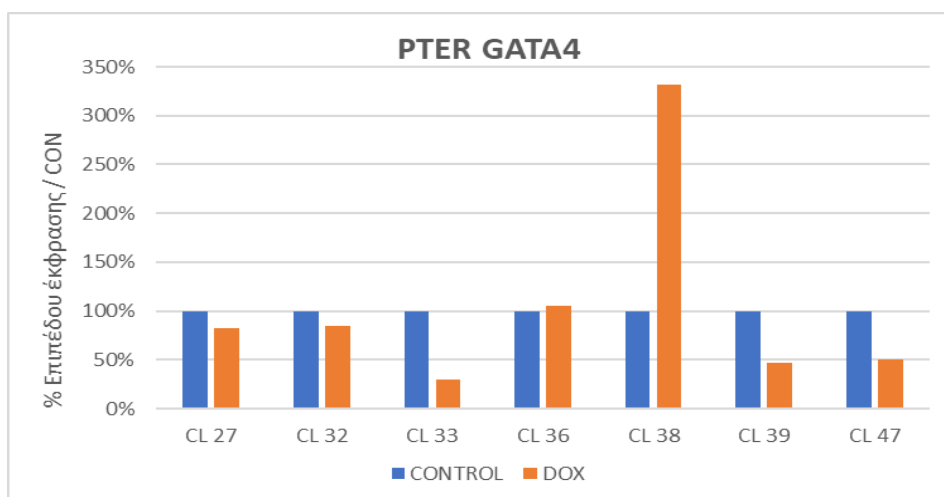
## 4.3 AGS PTER GATA4

### 4.3.1 Ανάλυση επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες ενότητες της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ο σκοπός αυτού του μοριακού εργαλείου είναι η επαγόμενη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, με τεχνολογία TetR - RNAi. Με βάση αυτά που περιγράφηκαν στην ενότητα 3, αναμένεται μείωση των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, έπειτα από προσθήκη της δοξκυκλίνης. Το **Διάγραμμα 10** συνοψίζει τα αποτελέσματα των δυο 6 well plates που εξετάστηκαν σε πρώτη φάση, έπειτα από ανάλυση με την ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR). Τα κοντρόλ (Con) είναι οι κλώνοι πριν την προσθήκη δοξκυκλίνης. Αυτοί φέρουν στο γονιδίωμα τους τον χειριστή TetO στον shGATA4 υποκινητή, ώστε η μεταγραφή του shRNA να καταστέλλεται λόγω της πρόσδεσης της πρωτεΐνης καταστολέα στον χειριστή TetO. Παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα στην πλειοψηφία των κλώνων που αναγράφονται παρακάτω, με την καλύτερη απόδοση στους κλώνους 35 και 37 με ποσοστό σίγησης 59%, 40 με 67% και 45 με 70%. Αντίστοιχα, στο **Διάγραμμα 11** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση ενός ακόμη 6 well plate, στο οποίο η καλύτερη απόδοση της σίγησης εμφανίζεται στον κλώνο 33 με ποσοστό 70%.



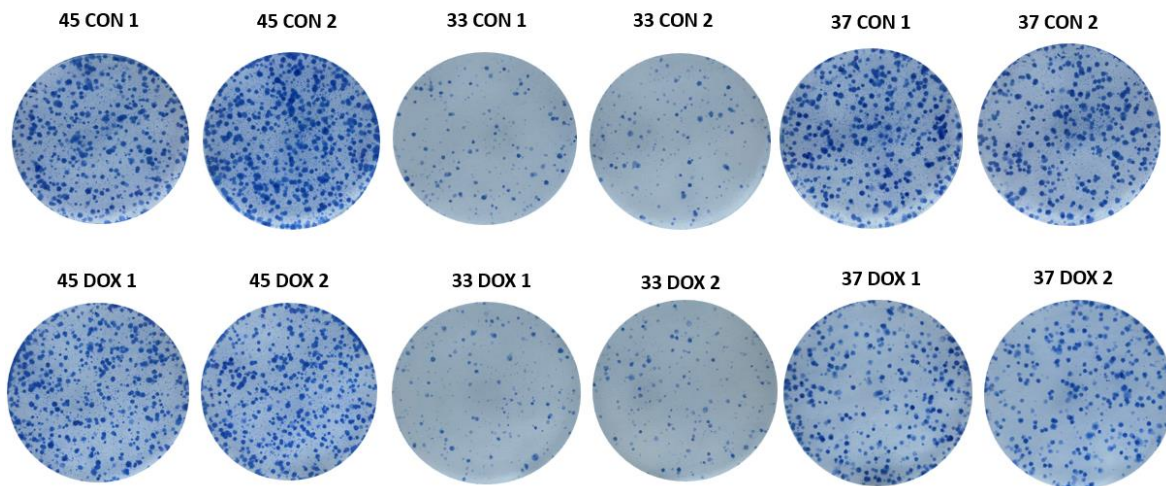
**Διάγραμμα 10:** Ανάλυση επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 πριν (con) και μετά (dox) την επαγόμενη σίγηση του με το σύστημα TetR – RNAi.



**Διάγραμμα 11:** Ανάλυση επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 πριν (con) και μετά (dox) την επαγόμενη σίγηση του με το σύστημα TetR – RNAi. Κανονικοποιημένη έκφραση με GAPDH.

### 4.3.2 Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (CFA)

Στη συνέχεια του προηγούμενου πειράματος, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία CFA, ώστε να διερευνηθεί πώς η σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 επιδρά στον φαινότυπο, και συγκεκριμένα στην ικανότητα πολλαπλασιασμού και δημιουργίας αποικιών. Παρομοίως με την προηγούμενη υποενότητα 4.1.9, η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιέχει τα ίδια βήματα. Στην **Εικόνα 4.19** απεικονίζονται τα κύτταρα ύστερα από χρώση με το μπλε του μεθυλενίου, 7 ημέρες μετά την αρχική τους επίστρωση. Για κάθε κλώνο εφαρμόστηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις. Παρατηρείται ότι στους κλώνους 45 και 37 και αντίστοιχα στις βιολογικές επαναλήψεις τους, η συνθήκη ελέγχου (CON) εμφανίζει περισσότερες και πυκνότερες αποικίες σε σχέση με την συνθήκη παρουσία δοξκυκλίνης (DOX). Ο κλώνος 33 δεν εμφανίζει διακριτές διαφορές στις 2 συνθήκες, πιθανότατα λόγω επίστρωσης λίγων κυττάρων.



**Εικόνα 4.19:** Χρώση κυττάρων με το μπλε του μεθυλενίου στο 6 well plate, έπειτα από 7 ημέρες πολλαπλασιασμού.

## 5. Συζήτηση

Προηγούμενες μελέτες εστιάζουν στην συσχέτιση μεταξύ των lncRNA και διάφορων τύπων καρκίνου, αφού πολλά από αυτά τα μετάγραφα βρέθηκαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο, και μάλιστα προτείνεται η χρήση τους ως βιοδείκτες. Παραδείγματα τέτοιων lncRNA που βρέθηκαν να είναι αυξορυθμισμένα σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο είναι το H19, το οποίο φυσιολογικά εκφράζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [106], το LINC00152 που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση [107], και τα μη-κωδικά μετάγραφα CUDR και LSINCT-5 των οποίων οι μηχανισμοί δράσης απαιτούν περισσότερη αποσαφήνιση [108]. Από την άλλη, βρέθηκαν lncRNA τα οποία είναι μειορυθμισμένα στον γαστρικό καρκίνο, όπως το FER1L4 [109] και το PTENP1 [110] τα οποία επίσης ανιχνεύονται στο πλάσμα των ασθενών, και κατατάσσονται στην κατηγορία των ογκοκατασταλτικών μη-κωδικών μεταγράφων.

Το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στοχεύει στον χαρακτηρισμό των λειτουργιών διάφορων lncRNA που βρέθηκαν να έχουν απορρυθμισμένη έκφραση στον γαστρικό καρκίνο. Για την επίτευξη του στόχου κατασκευάζονται μοριακά εργαλεία, τα οποία προσφέρουν την δυνατότητα μελέτης των μη-κωδικών μεταγράφων μέσω καταστολής της έκφρασης τους. Το πρώτο εργαλείο που περιγράφεται στην παρούσα εργασία, αφορά τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών από τις οποίες αποκόπτεται η περιοχή του υποκινητή του RECUR1 η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4. Για την στόχευση και την αποκοπή της περιοχής στόχο χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης Cas9, η Cas9<sup>D10A</sup>, η οποία έχει ενεργή μόνο τη μια επικράτεια ενδονουκλεάσης, τη HNH, και δυο ειδικά σχεδιασμένα sgRNA. Για τη μεταφορά του συστήματος στα κύτταρα χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας All in One, ο οποίος περιέχει το γονίδιο της μεταλλαγμένης νικάσης (Cas9<sup>D10A</sup>), δύο sgRNA και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής. Σε σύγκριση με μια συμβατική γενετική τροποποίηση μέσω CRISPR/Cas9 αγρίου τύπου κατά την οποία το κάθε στοιχείο μεταφέρεται ξεχωριστά στα κύτταρα, η συγκεκριμένη παραλλαγή εμφανίζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα διαμόλυνσης των κυττάρων, μειωμένη μη επιθυμητή στόχευση και αυξημένη μεταλλαξιγένεση [103].

Στην προσπάθεια που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, από τις εικόνες της γονοτύπησης προκύπτει ότι το σύστημα αποδείχθηκε αποτελεσματικό, καθώς η ύπαρξη της δεύτερης ζώνης στο πύκτωμα αγαρόζης υποδηλώνει την περιοχή του υποκινητή στόχου από την οποία απουσιάζουν γύρω στις 32 βάσεις. Αυτό είναι το αποτέλεσμα των ρήξεων που προκλήθηκαν από την νικάση Cas9<sup>D10A</sup> και των επιδιορθωτικών μηχανισμών των κυττάρων, αποδεικνύοντας ότι τα sgRNA που σχεδιάστηκαν οδήγησαν το ένζυμο στην αλληλουχία στόχο. Επίσης, με την εικόνα της γονοτύπησης 2 μήνες μετά την αρχική, επιβεβαιώνεται η δημιουργία μιας σταθερής κυτταρικής σειράς στην οποία οι απόγονοι των κυττάρων κληροδοτούν συνεχώς τη γενετική τροποποίηση.

Ο συνηθέστερος τρόπος επιδιόρθωσης της μεταλλαξιγένεσης μέσω CRISPR/Cas9 πραγματοποιείται από τον μηχανισμό NHEJ του κυττάρου. Εδώ κατά την ένωση των άκρων προκύπτουν ενθέςεις ή απαλοιφές σε κρίσιμες περιοχές όπως κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης ή την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης εφόσον το γονίδιο είναι κωδικοποιητικό. Αυτό δεν είναι δυνατό να συμβεί στην περίπτωση των lncRNA εφόσον δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες [111]. Γι' αυτό και μια εναλλακτική λύση είναι η απενεργοποίηση των ρυθμιστικών τους στοιχείων, μέσα στα οποία εντάσσεται και ο υποκινητής.

Από την ανάλυση μέσω qPCR προκύπτει ότι η αποκοπή της ρυθμιστικής περιοχής μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του ίδιου του γονιδίου, δηλαδή του RECUR1, και αυτό με τη σειρά του

επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου του. Σε αυτήν την περίπτωση δηλαδή, πραγματοποιήθηκε σταθερή σίγηση του RECUR1. Το γεγονός ότι οι κλώνοι ήταν ετερόζυγοι ως προς τη απενεργοποίηση του υποκινητή αιτιολογεί την μερική έκφραση των μεταγράφων που παρατηρείται. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, σε άλλα πειράματα απενεργοποίησης υποκινητών των lncRNA μέσω CRISPR/Cas9, και συγκεκριμένα του MALAT1, σημειώθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου μεταξύ 2 και 41% συγκριτικά με κύτταρα ελέγχου [112]. Σε μια άλλη έρευνα [113], η απενεργοποίηση του υποκινητή του lncRNA Sox2ot, είχε ως αποτέλεσμα την αποκοπή των πρώτων 2 εξονίων του μεταγράφου χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης του. Αυτό τονίζει την περιπλοκότητα του μηχανισμού ρύθμισης της μεταγραφής των lncRNA και την ανάγκη της μελέτης που υπάρχει γύρω από αυτήν.

Στη συνέχεια των πειραμάτων, υπήρξε η ανάγκη επαλήθευσής της απουσίας των βάσεων από τον υποκινητή και σε νουκλεϊκό επίπεδο, ώστε να διακρίνεται με λεπτομέρεια η δράση της Cas9<sup>D10A</sup> και των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Τα αποτελέσματα από τους γενετικά τροποποιημένους κλώνους επιβεβαιώνουν την δημιουργία ενός επιτυχημένου μοριακού εργαλείου απενεργοποίησης του υποκινητή του RECUR1. Από την αλληλούχηση των ζωνών αγρίου τύπου των θετικών κλώνων φαίνεται η ένθεση ενός νουκλεοτιδίου που έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP), και μάλιστα παρουσιάζεται ως σπάνιο αλληλόμορφο. Όταν στάλθηκε για αλληλούχηση η περιοχή του υποκινητή από άλλες κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε ότι αυτό το SNP υπήρχε μόνο στην σειρά KATO-III. Η παρουσία ενός SNP στη περιοχή του υποκινητή μπορεί να σχετίζεται με τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων και άρα με τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή, μηχανισμός που προσδίδει πλεονέκτημα για την επιβίωση του κυττάρου [60]. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με μελέτες GWAS για SNP, όταν έγινε η κατάταξη των SNP που σχετίζονται με ασθένειες, βρέθηκε ότι περίπου το 93% των αλληλόμορφων εντοπίζονται σε μη-κωδικές περιοχές γονιδίων όπως υποκινητές και ενισχυτές [114].

Με βάση τα δεδομένα της αλληλούχησης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης σε κύτταρα KATO-III ώστε να επιβεβαιωθεί ανεξάρτητα η ύπαρξη του SNP στην περιοχή του υποκινητή. Σύμφωνα με την εικόνα της πέψης, αυτά τα κύτταρα φέρουν το συγκεκριμένο SNP, καθώς η ζώνη της ηλεκτροφόρησης στα 200nt υποδηλώνει προϊόν που δεν έχει υποστεί πέψη. Στην περίπτωση όμως των κυττάρων AGS, η εικόνα δεν είναι ξεκάθαρη εφόσον διακρίνονται δύο ζώνες, η μια στα 200 nt ίδια με τη ζώνη του θετικού μάρτυρα και μια αμέσως από κάτω, η οποία φαίνεται ίδια με τη ζώνη στα 170nt όπως και στον αρνητικό μάρτυρα. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί από την ύπαρξη του SNP σε αυτά τα κύτταρα σε ετεροζυγωτία, είτε στην ατελή πέψη των προϊόντων από το ένζυμο. Μελλοντικές δοκιμές θα διεξαχθούν από το εργαστήριο με σκοπό να βρεθεί η προέλευση του συγκεκριμένου SNP στους γενετικά μεταλλαγμένους κλώνους, εφόσον από την αλληλούχηση των κυττάρων AGS αγρίου τύπου προκύπτει ότι αυτά δεν φέρουν το νουκλεοτίδιο.

Συνεχίζοντας την μελέτη του μοριακού εργαλείου, από τις αναλύσεις των επιπέδων έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου στόχου του ανά διαστήματα 3 ημερών στους θετικούς κλώνους, προκύπτει ότι ακόμη και με την επανα-καλλιέργεια των κυττάρων και το πέρασμα των ημερών, υπάρχει αδυναμία μεταγραφής λόγω απενεργοποίησης του υποκινητή. Γι' αυτό και την 6<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα έκφρασης τους είναι χαμηλά σε σύγκριση με τα κύτταρα κοντρόλ, στα οποία ανιχνεύεται απότομη αύξηση στην έκφραση τους. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να αναλυθούν σε συνδυασμό με τις εικόνες από τη δοκιμασία δημιουργίας αποικιών των κυττάρων (CFA). Από τη μελέτη του φαινοτύπου προκύπτει ότι με το πέρασμα των ημερών από την εκ νέου επίστρωση των κυττάρων, οι κλώνοι με απενεργοποιημένο υποκινητή φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένους ρυθμούς πολλαπλασιασμού και επιβίωσης, σε σχέση

με τα κύτταρα του μάρτυρα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και από τη δοκιμασία επούλωσης πληγών για την κατευθυνόμενη μετανάστευση των κυττάρων, όπου οι κλώνοι 26 και 41 παρουσιάζουν μεγαλύτερους ρυθμούς μετανάστευσης σε σύγκριση με τα κύτταρα AGS. Άρα από τις φαινοτυπικές αναλύσεις του μοριακού εργαλείου συμπεραίνει κανείς ότι η αποκοπή της συγκεκριμένης ρυθμιστικής περιοχής προσδίδει ένα ευνοϊκό χαρακτηριστικό στα καρκινικά κύτταρα, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και την γρήγορη μετανάστευση.

Σκοπός του δεύτερου μοριακού εργαλείου ήταν η κατασκευή ενός συστήματος επαγόμενης σίγησης RNAi. Όπως περιγράφεται και στην εισαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας, το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία μιας σταθερής κυτταρικής σειράς NUGC4 που να εκφράζει στο γονιδίωμα της την πρωτεΐνη καταστολέα TetR. Έπειτα από την γενετική τροποποίηση, ενώ τα κύτταρα παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υποδηλώνοντας την ενσωμάτωση της κασέτας στο γονιδίωμα, σύμφωνα με τις αναλύσεις qPCR η έκφραση της πρωτεΐνης είναι μηδενική. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην πρόκληση στρες των κυττάρων λόγω χρήσης λεντιών, ή στη μη ικανοποιητική ενεργότητα του υποκινητή. Επίσης, η φύση και τα χαρακτηριστικά των κυττάρων αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν για την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, καθώς σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο αποδείχθηκε ότι τα NUGC4 κύτταρα είναι πιο απαιτητικά ως προς τον μετασχηματισμό τους. Μία μέθοδος για την ενίσχυση της έκφρασης της πρωτεΐνης TetR μελετήθηκε από τον Zhang και τους συνεργάτες του, όπου έγινε αντικατάσταση της απλής κασέτας έκφρασης με μια συζευγμένη μορφή CMV-TetR-IRES-Puro, καταφέροντας υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα MCF-7 [115].

Το τρίτο και τελευταίο μοριακό εργαλείο που εξετάστηκε στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας αφορά την δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών, στις οποίες υπάρχει ενσωματωμένη στο γονιδίωμα μια ρυθμιστική κασέτα για την επαγόμενη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4. Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας αποτελεί πρωτοπόρο (pioneer) «τροποποιητή» χρωματίνης, ο οποίος συμμετέχει στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων, εμπλέκεται στην διεξαγωγή της σωστής εμβρυογένεσης του εντέρου, και καθοδηγεί τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων. Βρέθηκε επίσης ότι μαζί με τον GATA5 είναι πιθανό να λειτουργούν ως όγκο-κατασταλτικά γονίδια [116]. Δεδομένα από τη βάση The Cancer Genome Atlas (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) υποδεικνύουν ότι ο GATA4 εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε δείγματα γαστρικού καρκίνου σε σχέση με φυσιολογικού ιστού [117].

Αποδείχθηκε από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, ότι είναι επίσης υπεύθυνος για την ρύθμιση της μεταγραφής του μη κωδικού μεταγράφου RECUR1. Με σκοπό να μελετηθεί η συμβολή του στον γαστρικό καρκίνο και συγκεκριμένα στην ρύθμιση της έκφρασης του lncRNA, πραγματοποιήθηκε πείραμα απώλειας-λειτουργίας. Ωστόσο, το γεγονός ότι εμπλέκεται σε διεργασίες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων αποτελεί εμπόδιο για την σταθερή και πλήρη σίγηση του. Με το σύστημα TetO-DOX πετύχαμε την επαγόμενη σίγηση του, που μελλοντικά θα χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή πειραμάτων στα οποία είναι εφικτή η χρονική και ποσοτική ρύθμιση της έκφρασης του. Για την κατασκευή του συγκεκριμένου μοριακού εργαλείου χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα κύτταρα AGS, τα οποία κατασκευάστηκαν σε προγενέστερο χρόνο στο εργαστήριο ώστε να εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη καταστολέα TetR. Με την προσθήκη δοξυκυκλίνης στα κύτταρα που επιλέχθηκαν μέσω ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης του GATA4. Αυτό που συνέβη σε μοριακό επίπεδο είναι η πρόσδεση της πρωτεΐνης TetR από τη δοξυκυκλίνη παρεμποδίζοντας την δέσμευση της από τον χειριστή TetO, με αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή H1. Η έκφραση των sh1GATA4 οδήγησε τελικά στη στόχευση του μεταγράφου και στη σίγηση του μέχρι και κατά 70%.

Μελλοντικοί στόχοι του εργαλείου είναι η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου στόχου του έπειτα την επαγόμενη σίγηση του GATA4, τα οποία αναμένονται να είναι χαμηλά. Τα αποτελέσματα μας είναι συγκρίσιμα με αυτά της έρευνας των [118], όπου κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν την κασέτα επαγόμενης σίγησης του GATA4 (80% ποσοστό σίγησης ) με τη χρήση παρόμοιου φορέα pTER, με σκοπό τη μελέτη των επιπτώσεων της χαμηλής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα στη λειτουργία των οργάνων. Από τη φαινοτυπική ανάλυση του εργαλείου με τη δοκιμασία CFA φαίνεται ότι στη συνθήκη DOX, όπου ο GATA4 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, τα κύτταρα εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, αφού οι αποικίες που δημιουργούνται είναι λιγότερες σε σχέση με τη συνθήκη control και στις δυο βιολογικές επαναλήψεις. Με βάση τη βιβλιογραφία και άλλων πειραμάτων σίγησης του GATA4 σε κύτταρα πνεύμονα [119], η σίγηση του μπορεί να επιφέρει και τον αντίθετο αντίθετο φαινότυπο, δηλαδή αυξημένη δημιουργία αποικιών με έντονο πολλαπλασιασμό. Οι διαφορές στη συμπεριφορά των κυττάρων πιθανότατα να οφείλονται στην διαφορετική και ιστοειδική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα καθώς και στον σχηματισμό πολλών διαφορετικών μεταγραφικών ρυθμιστικών συμπλόκων.

Συμπερασματικά, πετύχαμε την κατασκευή δύο μοριακών εργαλείων τα οποία μελλοντικά θα χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες της λειτουργίας lncRNA. Έχοντας στη διάθεση μας τέτοια εργαλεία, είναι δυνατό να διεξαχθούν τόσο μοριακές, όσον και φαινοτυπικές αναλύσεις, με προοπτικές για *in vivo* πειράματα. Σε κάθε περίπτωση όμως, είναι απαραίτητη η πολύπλευρη μελέτη της δράσης αυτών των εργαλείων, για να εξακριβωθεί ότι τα αποτελέσματα προκύπτουν πράγματι από την απενεργοποίηση του υποκινητή του RECUR1 και τη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 αντίστοιχα.

## Βιβλιογραφία

1. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17036.
2. Zhao, J., et al., *Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome*. Science, 2008. **322**(5902): p. 750-6.
3. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
4. Thrift, A.P. and H.B. El-Serag, *Burden of Gastric Cancer*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020. **18**(3): p. 534-542.
5. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.
6. Yusefi, A.R., et al., *Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(3): p. 591-603.
7. Ajani, J.A., et al., *Cancer Stem Cells: The Promise and the Potential*. Seminars in Oncology, 2015. **42**: p. S3-S17.
8. Chiurillo, M.A., *Role of the Wnt/beta-catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review*. World J Exp Med, 2015. **5**(2): p. 84-102.
9. Overholtzer, M., et al., *Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12405-10.

10. Carpenter, R.L. and H.W. Lo, *Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer*. *Discov Med*, 2012. **13**(69): p. 105-113.
11. Xu, X., et al., *Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice*. *Oncogene*, 2000. **19**(15): p. 1868-74.
12. Yaghoobi, M., R. Bijarchi, and S.A. Narod, *Family history and the risk of gastric cancer*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(2): p. 237-42.
13. 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.
14. Sexton, R.E., et al., *Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies*. *Cancer Metastasis Rev*, 2020. **39**(4): p. 1179-1203.
15. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(11).
16. Zhao, J., et al., *Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells*. 2013. **119**(2): p. 304-312.
17. Vo, Q.N., et al., *Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation*. *J Clin Pathol*, 2002. **55**(9): p. 669-75.
18. Lee, J., et al., *High-throughput mutation profiling identifies frequent somatic mutations in advanced gastric adenocarcinoma*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38892.
19. Iizasa, H., et al., *Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma*. *Viruses*, 2012. **4**(12): p. 3420-39.
20. Bonelli, P., et al., *Precision medicine in gastric cancer*. *World J Gastrointest Oncol*, 2019. **11**(10): p. 804-829.
21. 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.
22. Dedeurwaerdere, F., et al., *Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 12880.
23. Wang, K., et al., *Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer*. *Nature Genetics*, 2011. **43**(12): p. 1219-1223.
24. Ling, Y., et al., *Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020. **18**: p. 3301-3308.
25. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. *Nature*, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
26. Wang, Q., G. Liu, and C. Hu, *Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma*. 2019. 2019.
27. Janssen, A. and R.H. Medema, *Genetic instability: tipping the balance*. *Oncogene*, 2013. **32**(38): p. 4459-4470.
28. Orr, B. and D.A. Compton, *A double-edged sword: how oncogenes and tumor suppressor genes can contribute to chromosomal instability*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 164.
29. Bielski, C.M. and B.S. Taylor, *Homing in on genomic instability as a therapeutic target in cancer*. *Nature Communications*, 2021. **12**(1): p. 3663.
30. Yashima, K., et al., *Gastric Cancer Screening in Japan: A Narrative Review*. *J Clin Med*, 2022. **11**(15).
31. Hall, C., et al., *A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice*. *Ann Coloproctol*, 2019. **35**(6): p. 294-305.
32. Steinberg, W., *The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen*. *Am J Gastroenterol*, 1990. **85**(4): p. 350-5.
33. Zhang, J., et al., *The threshold of alpha-fetoprotein (AFP) for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2020. **15**(2): p. e0228857.
34. Osaki, M. and F. Okada, *Exosomes and Their Role in Cancer Progression*. *Yonago Acta Med*, 2019. **62**(2): p. 182-190.

35. Zhang, Z., et al., *Liquid biopsy in gastric cancer: predictive and prognostic biomarkers*. Cell Death & Disease, 2022. **13**(10): p. 903.
36. Lee, H., Z. Zhang, and H.M. Krause, *Long Noncoding RNAs and Repetitive Elements: Junk or Intimate Evolutionary Partners?* Trends in Genetics, 2019. **35**(12): p. 892-902.
37. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, *Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 629-641.
38. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021. **22**(2): p. 96-118.
39. Zhang, F.F., et al., *Metastasis-associated long noncoding RNAs in gastrointestinal cancer: Implications for novel biomarkers and therapeutic targets*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(39): p. 8735-8749.
40. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. 2019. **11**(10): p. 1524.
41. Nagano, T., et al., *The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin*. Science, 2008. **322**(5908): p. 1717-20.
42. Yoon, J.-H., et al., *The long noncoding RNA LUCAT1 promotes tumorigenesis by controlling ubiquitination and stability of DNA methyltransferase 1 in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Letters, 2018. **417**: p. 47-57.
43. Wongtrakongate, P., et al., *Association of the Long Non-coding RNA Steroid Receptor RNA Activator (SRA) with TrxG and PRC2 Complexes*. PLOS Genetics, 2015. **11**(10): p. e1005615.
44. Wang, K.C., et al., *A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 120-124.
45. Rinn, J.L., et al., *Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human *HOX* Loci by Noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-1323.
46. Ji, Q., et al., *A heat shock-responsive lncRNA Heat acts as a HSF1-directed transcriptional brake via m(6)A modification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(25).
47. Mariner, P.D., et al., *Human Alu RNA Is a Modular Transacting Repressor of mRNA Transcription during Heat Shock*. Molecular Cell, 2008. **29**(4): p. 499-509.
48. Espinoza, C.A., et al., *B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(9): p. 822-9.
49. Yang, Z., et al., *The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription*. Nature, 2001. **414**(6861): p. 317-22.
50. 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.
51. Gonzalez, I., et al., *A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(5): p. 370-6.
52. Beltran, M., et al., *A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition*. Genes Dev, 2008. **22**(6): p. 756-69.
53. Cai, X. and B.R. Cullen, *The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor*. Rna, 2007. **13**(3): p. 313-6.
54. Carrieri, C., et al., *Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 454-7.
55. Yoon, J.H., et al., *LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation*. Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 648-55.
56. Gong, C. and L.E. Maquat, *lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements*. Nature, 2011. **470**(7333): p. 284-8.
57. Yuan, J.H., et al., *A long noncoding RNA activated by TGF- $\beta$  promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma*. Cancer Cell, 2014. **25**(5): p. 666-81.
58. Liu, X.H., et al., *Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 92.

59. Ma, Z., et al., *Long non-coding RNA SNHG15 inhibits P15 and KLF2 expression to promote pancreatic cancer proliferation through EZH2-mediated H3K27me3*. *Oncotarget*, 2017. **8**(48): p. 84153-84167.
60. Aznaourova, M., et al., *Disease-Causing Mutations and Rearrangements in Long Non-coding RNA Gene Loci*. 2020. **11**.
61. Gupta, R.A., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis*. *Nature*, 2010. **464**(7291): p. 1071-1076.
62. Yap, K.L., et al., *Molecular Interplay of the Noncoding RNA *ANRIL* and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of *INK4a**. *Molecular Cell*, 2010. **38**(5): p. 662-674.
63. Wang, X., et al., *Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 126-130.
64. Gibb, E.A., et al., *Human Cancer Long Non-Coding RNA Transcriptomes*. *PLOS ONE*, 2011. **6**(10): p. e25915.
65. Gao, N., et al., *Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers*. 2020. **10**.
66. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
67. Micura, R., *Small interfering RNAs and their chemical synthesis*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002. **41**(13): p. 2265-9.
68. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells*. 2002. **296**(5567): p. 550-553.
69. Zhong, X., et al., *Noncoding RNA for Cancer Gene Therapy*. *Recent Results Cancer Res*, 2016. **209**: p. 51-60.
70. Kim, D. and J. Rossi, *RNAi mechanisms and applications*. *Biotechniques*, 2008. **44**(5): p. 613-6.
71. Chen, X., et al., *RNA interference-based therapy and its delivery systems*. *Cancer Metastasis Rev*, 2018. **37**(1): p. 107-124.
72. Dana, H., et al., *Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA*. *Int J Biomed Sci*, 2017. **13**(2): p. 48-57.
73. Baron, U. and H. Bujard, *Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: Principles and advances*, in *Methods in Enzymology*, J. Thorner, S.D. Emr, and J.N. Abelson, Editors. 2000, Academic Press. p. 401-421.
74. Hedayatianfard, K., M. Akhlaghi, and H. Sharifiyazdi, *Detection of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from fish farms using polymerase chain reaction*. *Vet Res Forum*, 2014. **5**(4): p. 269-75.
75. Das, A.T., L. Tenenbaum, and B. Berkhout, *Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression*. *Curr Gene Ther*, 2016. **16**(3): p. 156-67.
76. Kappel, S., et al., *Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(16): p. 4527-36.
77. Boettcher, M. and M.T. McManus, *Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR*. *Mol Cell*, 2015. **58**(4): p. 575-85.
78. Ishino, Y., et al., *Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product*. *J Bacteriol*, 1987. **169**(12): p. 5429-33.
79. Mojica, F.J.M. and F. Rodriguez-Valera, *The discovery of CRISPR in archaea and bacteria*. 2016. **283**(17): p. 3162-3169.
80. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science*, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
81. Makarova, K.S., et al., *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(6): p. 467-77.

82. Ma, Y., L. Zhang, and X. Huang, *Genome modification by CRISPR/Cas9*. FEBS J, 2014. **281**(23): p. 5186-93.
83. Wei, Y., R.M. Terns, and M.P. Terns, *Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation*. Genes Dev, 2015. **29**(4): p. 356-61.
84. Xiao, Y., et al., *How type II CRISPR-Cas establish immunity through Cas1-Cas2-mediated spacer integration*. Nature, 2017. **550**(7674): p. 137-141.
85. Wei, Y., et al., *Sequences spanning the leader-repeat junction mediate CRISPR adaptation to phage in Streptococcus thermophilus*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(3): p. 1749-58.
86. Amitai, G. and R. Sorek, *CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(2): p. 67-76.
87. Barrangou, R., et al., *CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes*. 2007. **315**(5819): p. 1709-1712.
88. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-338.
89. Drider, D. and C. Condon, *The continuing story of endoribonuclease III*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2004. **8**(4): p. 195-200.
90. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
91. Hille, F. and E. Charpentier, *CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance*. 2016. **371**(1707): p. 20150496.
92. Richter, H., L. Randau, and A. Plagens, *Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(7): p. 14518-31.
93. Shah, S.A., et al., *Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity*. RNA Biol, 2013. **10**(5): p. 891-9.
94. Hryhorowicz, M., et al., *CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017. **65**(3): p. 233-240.
95. Gasiunas, G., et al., *Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(39): p. E2579-86.
96. Chen, M., et al., *CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges*. Cancer Letters, 2019. **447**: p. 48-55.
97. Yip, B.H., *Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies*. Biomolecules, 2020. **10**(6).
98. Janik, E., et al., *Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-Cas9*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
99. Fu, Y., et al., *High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 822-6.
100. Hsu, P.D., et al., *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 827-32.
101. Cho, S.W., et al., *Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases*. Genome Res, 2014. **24**(1): p. 132-41.
102. Shen, B., et al., *Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects*. Nature Methods, 2014. **11**(4): p. 399-402.
103. Chiang, T.W., et al., *CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24356.
104. Ran, F.A., et al., *Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity*. Cell, 2013. **154**(6): p. 1380-1389.
105. Rodriguez, L.G., X. Wu, and J.-L. Guan, *Wound-Healing Assay*, in *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, J.-L. Guan, Editor. 2005, Humana Press: Totowa, NJ. p. 23-29.
106. ARITA, T., et al., *Circulating Long Non-coding RNAs in Plasma of Patients with Gastric Cancer*. 2013. **33**(8): p. 3185-3193.

107. Li, Q., et al., *Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer*. *Tumor Biology*, 2015. **36**(3): p. 2007-2012.
108. Dong, L., et al., *Circulating CUDR, LSINCT-5 and PTENP1 long noncoding RNAs in sera distinguish patients with gastric cancer from healthy controls*. 2015. **137**(5): p. 1128-1135.
109. Song, H., et al., *Long non-coding RNA expression profile in human gastric cancer and its clinical significances*. *J Transl Med*, 2013. **11**: p. 225.
110. Yu, G., et al., *Pseudogene PTENP1 functions as a competing endogenous RNA to suppress clear-cell renal cell carcinoma progression*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(12): p. 3086-97.
111. Liu, S.J. and D.A. Lim, *Modulating the expression of long non-coding RNAs for functional studies*. 2018. **19**(12): p. e46955.
112. Aparicio-Prat, E., et al., *DECKO: Single-oligo, dual-CRISPR deletion of genomic elements including long non-coding RNAs*. *BMC Genomics*, 2015. **16**(1): p. 846.
113. Li, P.-Y., et al., *CRISPR/Cas9-mediated gene editing on Sox2ot promoter leads to its truncated expression and does not influence neural tube closure and embryonic development in mice*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021. **573**: p. 107-111.
114. Maurano, M.T., et al., *Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA*. *Science*, 2012. **337**(6099): p. 1190-5.
115. Zhang, J., et al., *A more efficient RNAi inducible system for tight regulation of gene expression in mammalian cells and xenograft animals*. *RNA*, 2007. **13**(8): p. 1375-83.
116. Akiyama, Y., et al., *GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(23): p. 8429-39.
117. Yang, X., et al., *GATA4 Forms a Positive Feedback Loop with CDX2 to Transactivate MUC2 in Bile Acids-Induced Gastric Intestinal Metaplasia*. *Gut and Liver*, 0000. **0**(0).
118. Thurisch, B., et al., *Transgenic mice expressing small interfering RNA against Gata4 point to a crucial role of Gata4 in the heart and gonads* %J *Journal of Molecular Endocrinology*. 2009. **43**(4): p. 157-169.
119. Gao, L., et al., *Lung cancer deficient in the tumor suppressor GATA4 is sensitive to TGFBR1 inhibition*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 1665.