

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Τοξικολογία»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΟΓΚΟΕΠΑΓΩΓΙΚΩΝ LNCRNAS ΣΕ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΜΕ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ CRISPR-
NICKASE KO»**



Βουλτσίδου Μαγδαληνή

Λάρισα, 2024

**“DEACTIVATION OF ONCOGENIC LNCRNAS IN CANCER CELL LINES
WITH CRISPR-NICKASE KO TECHNOLOGY”**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής Μεταπτυχιακής Διατριβής:

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέλη:

Σαμαρά Μαρία: Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία του τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θώδου Ελένη- Ειρήνη: Επίκουρος καθηγήτρια Κυτταρολογίας του τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024. Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον επίκουρο καθηγητή και επιβλέποντά μου, Γιακουντή Αντώνιο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμβάλλω στο ερευνητικό του έργο, την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του. Οι γνώσεις και η εμπειρία που απέκτησα κατά το χρονικό διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο συνέβαλαν στην ακαδημαϊκή μου εξέλιξη και αποτελούν σημαντικά εφόδια για την μελλοντική μου πορεία. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, τις συμβουλές και την συνεχή τους υποστήριξη, καθώς επίσης και τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής για τη συμμετοχή τους. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την αδιάκοπη συμπαράσταση, υποστήριξη και εμπιστοσύνη της σε εμένα.

Περιεχόμενα

1.1.Γαστρικός Καρκίνος και Επιδημιολογικά στοιχεία	9
1.1.1. Ιστολογική και Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου	10
1.1.2. Διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου	13
1.2. Μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (Long non-coding RNAs, lncRNAs)	14
1.2.1. Ρόλος και ενδοκυττάριος εντοπισμός των lncRNAs	15
1.2.2. LncRNAs και καρκίνος	17
1.2.3. LncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες διάγνωσης και θεραπείας	19
1.3. Μηχανισμός CRISPR/Cas9	20
1.3.1. Η περίπτωση της νικάσης (CRISPR/nCas9)	23
2. Σκοπός	25
3. Υλικά και Μέθοδοι	26
3.1. Υλικά	26
3.1.1. Πλασμιδιακός φορέας	26
3.1.2. Βακτηριακά στελέχη	26
3.1.3. Κυτταρική σειρά	27
3.1.4. Ένζυμα Περιορισμού	27
3.1.5. Kit απομόνωσης και καθαρισμού πλασμιδιακού DNA	28
3.2. Μέθοδοι	28
3.2.1. Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων	29
3.2.2. Αντιδράσεις λιγάσης και πέψων	29
3.2.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preps)	30
3.2.4. Διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση	33
3.2.5. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA	36
3.2.6. Απομόνωση RNA (RNA extraction)	36
3.2.7. Κατεργασία με DNάση (DNase treatment)	36
3.2.8. Σύνθεση cDNA	37
3.2.9. Διαγνωστική cDNA PCR και ηλεκτροφόρηση	38

4. Αποτελέσματα	40
4.1. Κλωνοποίηση των sgRNAs στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro και έλεγχος θετικών κλώνων	40
4.2. Γραμμικοποίηση της πλασμιδιακής κατασκευής για τη διαμόλυνση της καρκινικής κυτταρικής σειράς AGS	43
4.3. Γονοτύπηση κυτταρικών κλώνων AGS	43
4.4. Αλληλούχιση κατά Sanger της αλληλουχίας DNA των κυτταρικών κλώνων	47
4.5. Έλεγχος έκφρασης σε επίπεδο DNA ύστερα από το knock-out	47
4.6. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των μετασχηματισμένων καρκινικών κυττάρων ύστερα από το επιτυχές knock-out	48
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα	50
6. Βιβλιογραφία	53

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος (ή καρκίνος του στομάχου) αποτελεί μία από τις συνηθέστερες, αλλά και σοβαρότερες μορφές καρκίνου, που εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ηλικίας 50-70 ετών. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων δεν είναι ιδιαίτερα εμφανής στα πρώτα στάδια της νόσου με αποτέλεσμα την καθυστερημένη διάγνωση και θεραπεία των ασθενών. Το πρόβλημα της μη έγκαιρης διάγνωσης είναι ιδιαίτερα έντονο στις χώρες της Ανατολικής Ασίας, όπου τα περιστατικά καρκίνου του στομάχου είναι πολυάριθμα και η προτεινόμενη θεραπεία σε προχωρημένα στάδια της νόσου εμφανίζει μειωμένη αποτελεσματικότητα. Η μεγάλη επιβάρυνση του συστήματος υγείας και η κακή πρόγνωση των ασθενών οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης μη παρεμβατικών εργαλείων που θα διευκολύνουν τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου και θα συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη και πιο στοχευμένη θεραπεία του. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (Long non-coding RNAs, LncRNAs), αποτελούν πιθανούς βιοδείκτες διάγνωσης διαφόρων ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ο γαστρικός καρκίνος. Τα μόρια αυτά εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση και φαίνεται να συμμετέχουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Λόγω της ιστο-ειδικότητας που παρουσιάζουν και της παρουσίας τους στα βιολογικά υγρά καθίστανται ιδανικά ως βιοδείκτες διάγνωσης ασθενειών. Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτελεί η μελέτη ενός νέου lncRNA, του RECUR1, το οποίο βάσει μη δημοσιοποιημένων δεδομένων φαίνεται να εκφράζεται στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, τη συνηθέστερη μορφή των γαστρικών όγκων. Μέρος της μελέτης του συγκεκριμένου lncRNA αποτελεί η εκτομή του πρώτου εξονίου του, μέσω της τεχνολογίας CRISPR/nCas9. Τα αποτελέσματα απέδειξαν την επιτυχή λειτουργία του συστήματος στην πλειοψηφία των κυτταρικών κλώνων, καταδεικνύοντας την μεγάλη ακρίβεια που έχει η εφαρμογή του συστήματος CRISPR/nCas9 στην επεξεργασία του γονιδιώματος.

Λέξεις κλειδιά: γαστρικός καρκίνος, lncRNA, RECUR1, βιοδείκτες, CRISPR/nCas9

Abstract

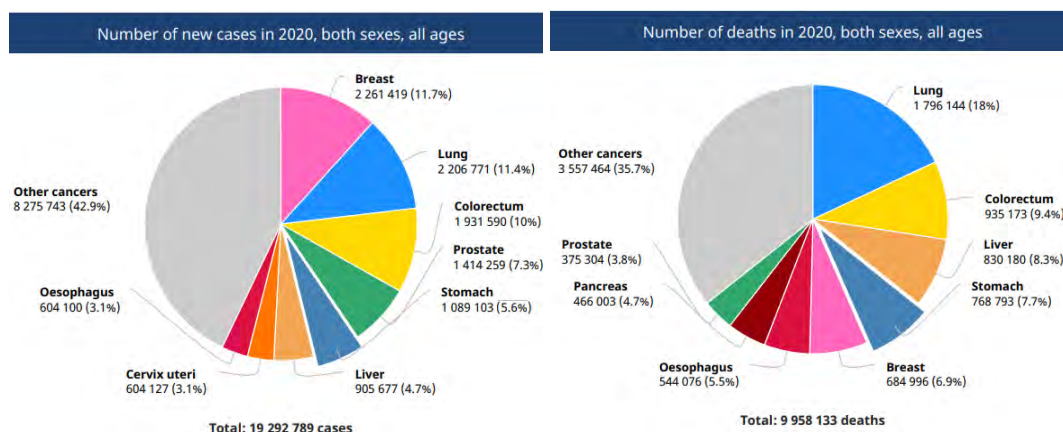
Gastric cancer (or stomach cancer) is one of the most common, but also severe forms of cancer, which appears mainly in people at the age of 50-70. Symptom manifestation is not particularly evident in the early stages of the disease, resulting in delayed diagnosis and treatment of patients. The challenge of delayed diagnosis is evident in East Asian countries, where stomach cancer cases are numerous and the proposed treatment in advanced stages of the disease shows reduced effectiveness. The significantly elevated burden on the health system and the poor prognosis of patients led to the need of identifying non-invasive tools that will facilitate the diagnosis of gastric cancer and contribute to its effective and more targeted treatment. Long non-coding RNAs (Long non-coding RNAs, lncRNAs) are potential biomarkers for the diagnosis of various diseases, including gastric cancer. These molecules regulate major cellular functions, have a regulatory role in gene expression and seem to participate in carcinogenesis. Due to their tissue-specificity and their presence in biological fluids, they are ideal as biomarkers for disease diagnosis. The aim of this master's thesis is the study of a new lncRNA, RECUR1, which, based on unpublished data, appears to be expressed in gastric adenocarcinoma, the most common type of gastric tumors. Part of the study of this lncRNA, is the excision of its first exon, through CRISPR/nCas9 technology. The results demonstrated the successful operation of the system in most of the cell clones, exhibiting the great precision of the application of the CRISPR/nCas9 system in genome editing.

Keywords: gastric cancer, lncRNA, RECUR1, biomarkers, CRISPR/nCas9

1. Εισαγωγή

1.1 Γαστρικός Καρκίνος και Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο γαστρικός καρκίνος (ή καρκίνος του στομάχου) αποτελεί μια από τις σοβαρότερες, αλλά ταυτόχρονα συνήθεις, περιπτώσεις καρκίνου παγκοσμίως. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α.) μειώνεται σταδιακά τα τελευταία 70 χρόνια, αλλά παραμένει συχνό φαινόμενο σε χώρες της Ανατολικής Ασίας, όπως Κίνα, Ιαπωνία και Κορέα [1]. Το έτος 2018, ποσοστό της τάξης του 5,7% των παγκόσμιων καταγεγραμμένων περιπτώσεων καρκίνου αφορούσε το γαστρικό καρκίνο, ενώ ευθυνόταν για το 8,2% των θανάτων από καρκίνο. Μεταξύ των ηλικιών, παρουσιάζει αύξηση σε συνάρτηση με το ηλικιακό έτος, έχοντας ως κρίσιμη την ηλικία των 55 ετών, ενώ μεταξύ φύλων παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα στους άντρες [2]. Επιδημιολογικά δεδομένα με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) έδειξαν μια μικρή μείωση ως προς την επίπτωση και τη θνησιμότητα της νόσου..

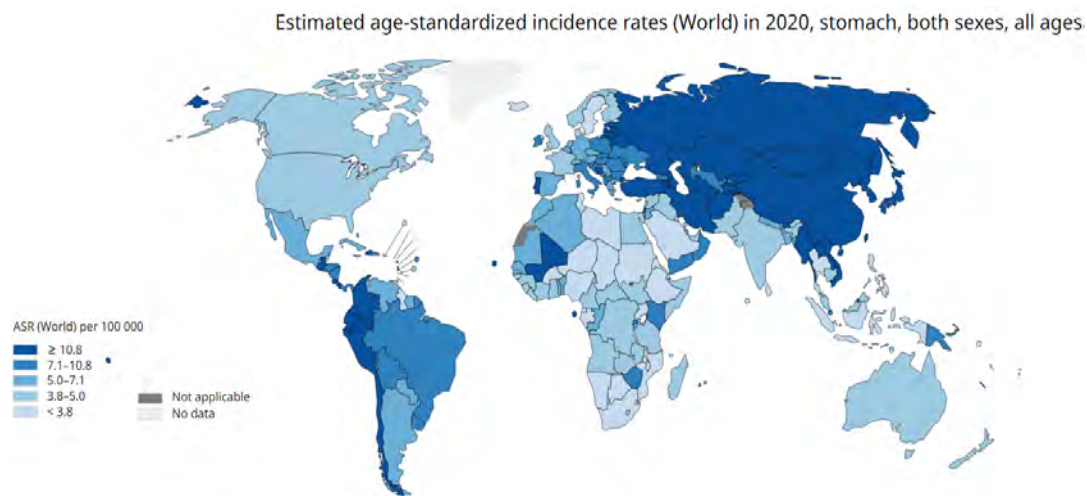


Εικόνα 1. Καταγραφή των περιστατικών εμφάνισης καρκίνου και θανάτων προερχόμενων από αυτόν, ανεξαρτήτως ηλικίας και φύλου, το 2020 (WHO, 2020).

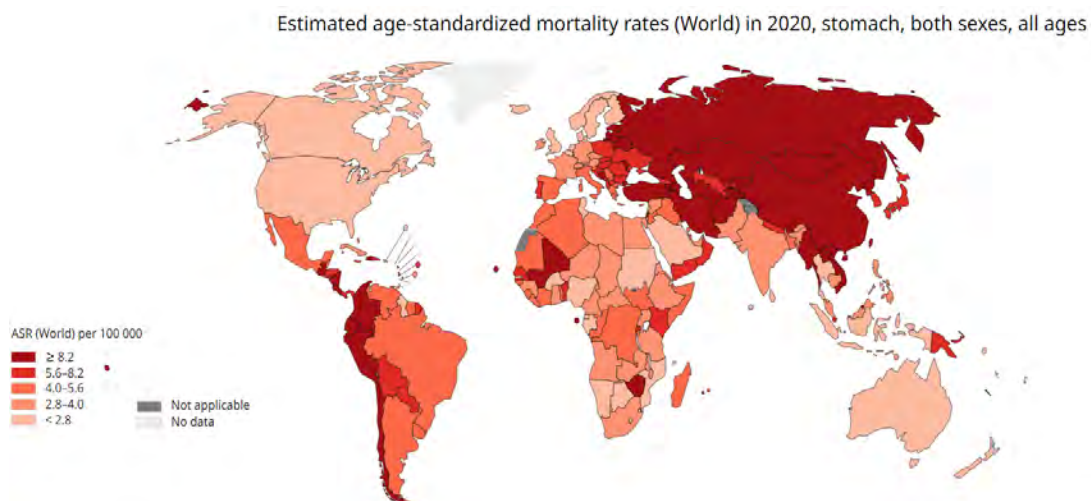
Το 90% των περιπτώσεων με γαστρικό καρκίνο είναι αδενοκαρκινώματα. Πρόκειται για όγκους με φτωχή πρόγνωση, λόγω της απουσίας συμπτωμάτων στα πρώιμα στάδια της νόσου, γεγονός που οδηγεί σε καθυστερημένη διάγνωση.. Η έγκαιρη διάγνωση εξασφαλίζει ποσοστά 5ετούς επιβίωσης της τάξης του 90%, αντιθέτως όταν η διάγνωση καθυστερεί τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης δεν ξεπερνούν το 20% [3].

Ο γαστρικός καρκίνος εμφανίζει ιδιόμορφη γεωγραφική κατανομή, καθώς ένα ποσοστό της τάξης του 50% καταγράφεται στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ στις

χώρες χαμηλού κινδύνου συγκαταλέγονται περιοχές στη Νότιας Ασία, Βόρεια και Ανατολική Αφρική, Βόρεια Αμερική κ.α. [4].



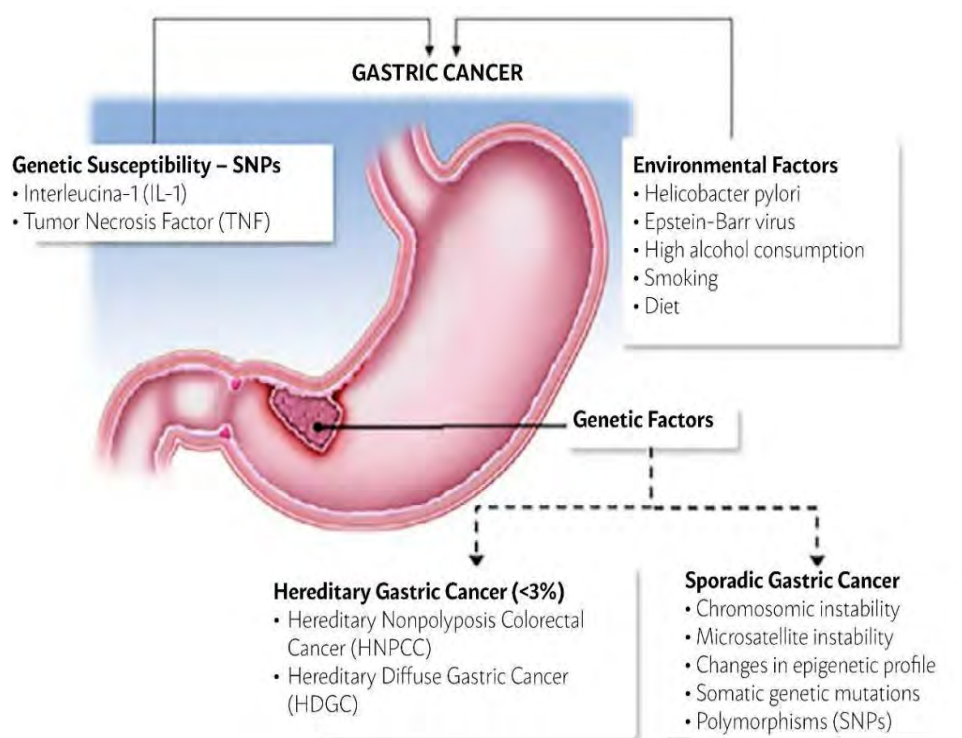
Εικόνα 2. Γεωγραφική κατανομή εμφάνισης περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου, ανεξαρτήτως φύλου και ηλικίας, το 2020 (WHO, 2020).



Εικόνα 3. Γεωγραφική κατανομή καταγεγραμμένων θανάτων από γαστρικό καρκίνο, ανεξαρτήτως φύλου και ηλικίας, το 2020 (WHO, 2020).

Η νόσος είναι πολυπαραγοντική, σπάνια εμφανίζεται σε ηλικίες κάτω των 40 ετών, ενώ τα ποσοστά εμφάνισης αυξάνονται σταθερά σε ηλικίες 50-70 ετών [5]. Οι γεωγραφικές, φυλετικές και ηλικιακές διακυμάνσεις στη συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου υποδηλώνουν πως οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και ο τρόπος ζωής συμβάλλουν στην αιτιολογία της νόσου [6].

Βασικότερη αιτία ανάπτυξης του γαστρικού καρκίνου θεωρείται η λοίμωξη από το αρνητικό κατά gram (-) βακτήριο, *Helicobacter pylori*, το οποίο προκαλεί αλλαγές στο γαστρικό βλεννογόνο και επηρεάζει τη φυσιολογική γαστρική χλωρίδα [7]. Τα στελέχη του *Helicobacter pylori* διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την παθογένεια, με τα πιο λοιμώδη να φέρουν το γονίδιο *cagA* με κυτταροτοξική δράση [8]. Παράλληλα, ο ιός Epstein-Barr (EBV) εντοπίζεται στο 5-16% των περιπτώσεων του γαστρικού καρκίνου και η παρουσία του συνδέεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκινώματος, λόγω της προκαλούμενης μεθυλίωσης που προκαλεί στο γονιδίωμα [9]. Οι προαναφερόμενοι παράγοντες σε συνδυασμό με κακή διατροφή, αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο καρκινογένεσης [10]. Το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο. Γονιδιακοί πολυμορφισμοί που συνδέονται τόσο με φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως οι ιντερλευκίνες IL1B, IL1RN και IL1, όσο και με κληρονομικά αυτοσωμικά σύνδρομα, όπως ο οικογενής αδενωματώδης πολύποδας (FAP) και το σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS), φαίνεται να συνδέονται με την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου [11].

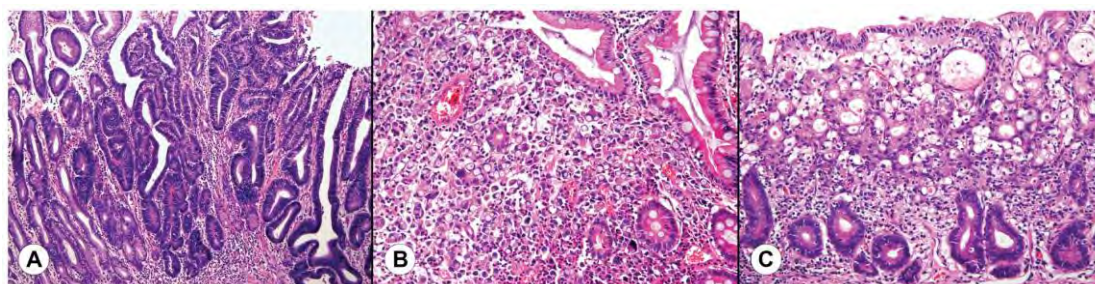


Εικόνα 4. Παράγοντες κινδύνου για τον γαστρικό καρκίνο [11].

1.1.1. Ιστολογική και Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα μπορούν να υποδιαιρεθούν ιστολογικά στον εντερικό, διάχυτο και μεικτό τύπο, με βάση την ταξινόμηση κατά Lauren. Η διαφοροποίησή τους

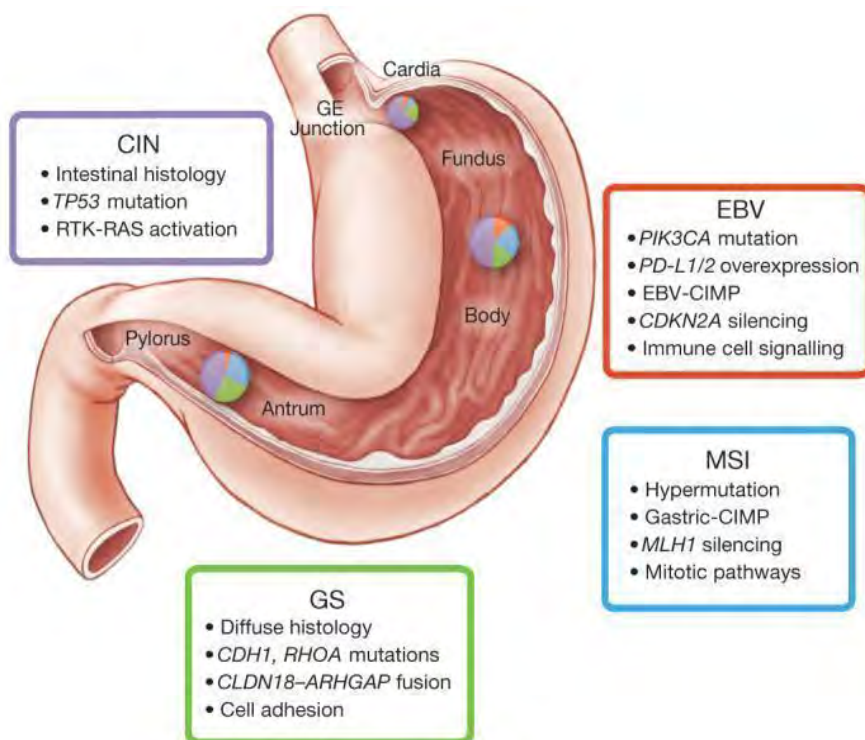
σε αυτούς τους υποτύπους πραγματοποιείται στα πρώιμα στάδια της νόσου. Μεταξύ των υποτύπων, ποσοστά της τάξης του 54% εμφανίζονται στο εντερικό τύπο γαστρικού καρκίνου, ενώ ακολουθεί ο διάχυτος τύπος, στον οποίο οφείλεται το 32% των περιπτώσεων. Ο εντερικός τύπος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη σωληνοειδών δομών, τη μεγάλη συνοχή των καρκινικών κυττάρων, καθώς και το σχηματισμό αδένων. Αντιθέτως, ο διάχυτος τύπος δεν εμφανίζει μεγάλη κυτταρική συνοχή, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ταχείας διεξόδου των καρκινικών κυττάρων στα γαστρικά τοιχώματα, χωρίς τη δημιουργία αδένων. Στον μεικτό υποτύπο του γαστρικού καρκίνου περιλαμβάνονται γαστρικοί όγκοι που εμφανίζουν χαρακτηριστικά τόσο του εντερικού υποτύπου, όσο και του διάχυτου [12].



Εικόνα 5. Ιστολογική απεικόνιση του γαστρικού καρκίνου με βάση την ταξινόμηση κατά Lauren. *A:* Εντερικός τύπος γαστρικού καρκίνου, *B:* Διάχυτος τύπος γαστρικού καρκίνου, *Γ:* Μικτός τύπος γαστρικού καρκίνου [12].

Η μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου, βάσει του TCGA (The Cancer Genome Atlas), γίνεται μέσω της κατάταξης του σε υποτύπους που σχετίζονται με τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), τη χρωμοσωμική αστάθεια των όγκων (CIN), τη γονιδιωματική σταθερότητα (GS) και την θετικότητα των όγκων στον ιό Epstein-Barr (EBV⁺). Συγκεκριμένα, οι όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων λόγω της ανεπάρκειας του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Στις μεταλλάξεις αυτές συμπεριλαμβάνονται και αλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σηματοδότησης σχετικές με την ογκογένεση. Όγκοι με γονιδιωματική σταθερότητα δεν εμφανίζουν χρωμοσωμικές αλλαγές, αλλά φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια, όπως το RHOA ή προκαλούν συντήξεις σε πρωτεΐνες της οικογένειας RHO. Αντιθέτως, οι χρωμοσωμικά ασταθείς όγκοι, εμφανίζουν έντονη ανευπλοειδία, καθώς και ενίσχυση του υποδοχέα κινασών-τυροσίνης [13]. Παράλληλα, σε ένα ποσοστό της τάξης του 71% των χρωμοσωμικά ασταθών γαστρικών όγκων, παρατηρούνται μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 [14]. Όγκοι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (EBV⁺) αφορούν το 10% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων. Σε αυτόν τον υποτύπο του γαστρικού καρκίνου

καταγράφονται μεταλλάξεις σε γονίδια, όπως το PIK3CA, υπερέκφραση των γονιδίων CD274 και PDCD1LG2 που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PD-L1 και PD-L2, καθώς και υπερμεθυλίωση του DNA [15].



Εικόνα 6. Κύρια χαρακτηριστικά των τεσσάρων υποτύπων του γαστρικού καρκίνου [12].

1.1.2. Διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου

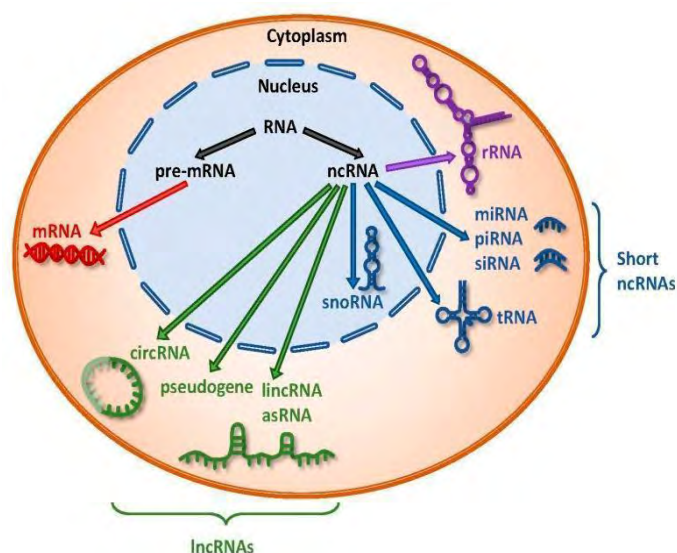
Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί ιάσιμη νόσο σε περίπτωση που η διάγνωση γίνει σε πρώιμο στάδιο. Για το σκοπό αυτό, συνιστάται η διενέργεια προληπτικών ελέγχων από τον πληθυσμό, κυρίως των περιοχών που εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά της νόσου, όπως Κίνα και Ιαπωνία. Από τις διαγνωστικές μεθόδους που προτείνονται, η ενδοσκόπηση αποτελεί την πιο αποτελεσματική λόγω της μεγάλης ευαισθησίας και ειδικότητας που προσφέρει. Με την συγκεκριμένη εξέταση παρέχονται πληροφορίες για τη θέση και μορφή του όγκου, καθώς και την οπτική εκτίμηση της έκτασης του καρκινώματος [16]. Εκτός της ενδοσκόπησης, για τον προσδιορισμό του καρκινικού σταδίου χρησιμοποιείται συχνά η αξονική τομογραφία και η λαπαροσκόπηση. Επιπλέον, για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν βιοδείκτες που, με μη επεμβατικό τρόπο, δίνουν τη δυνατότητα προσδιορισμού της έκφρασης ορισμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση.

Όσον αφορά τη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου, η χειρουργική επέμβαση αποτελεί την καλύτερη λύση σε όγκους αρχικού σταδίου, ενώ η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται κυρίως σε προχωρημένα στάδια της νόσου.

1.2. Μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (Long non-coding RNAs, lncRNAs)

Η εξέλιξη της τεχνολογίας και η ανάπτυξη νέων μεθόδων αλληλούχησης (Next Generation Sequence-NGS) συνέβαλε στην εύρεση μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (non coding RNAs- ncRNAs) στο ανθρώπινο γονιδίωμα, τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες [17]. Τα μόρια αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μικρά και μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs, βάσει του μεγέθους τους. Συγκεκριμένα, τα lncRNAs (Long non-coding RNAs) έχουν μήκος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων και μεταγράφονται κυρίως από την RNA πολυμεράση II. Τα μόρια αυτά συχνά εμφανίζουν κάλυμα 5' μεθυλ-κυτοσίνης και πολύ-αδενυλιωμένη ουρά στο 3' άκρο τους [18].

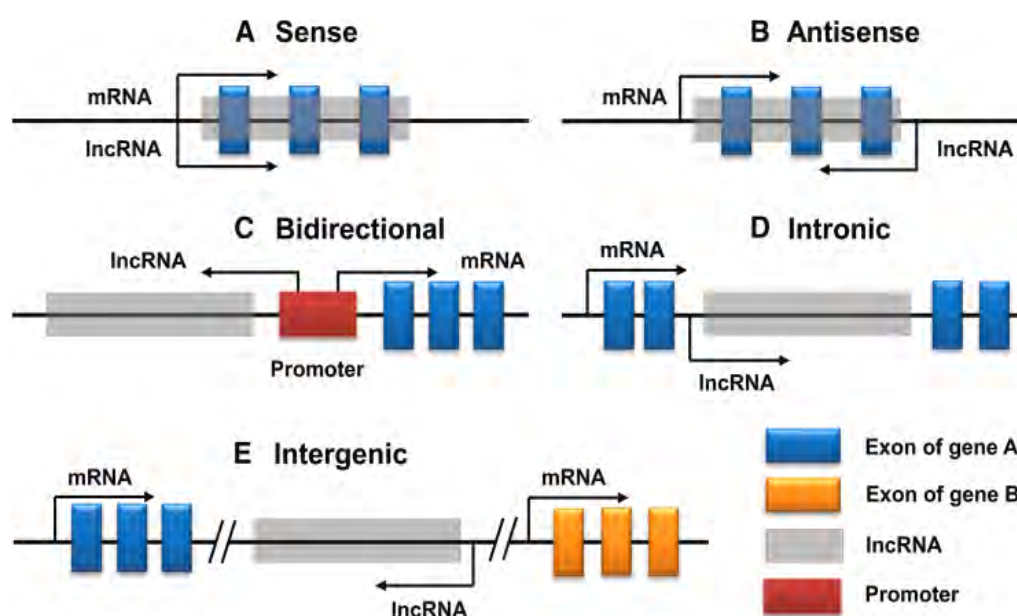
Τα lncRNAs αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία των μη κωδικοποιητικών RNAs στο γονιδίωμα των θηλαστικών και περιλαμβάνουν μακρά μεσογονιδιακά ncRNAs (lincRNAs), αντισηματικά RNAs (asRNAs), κυκλικά RNAs (circRNAs) και ψευδογονίδια [19]. Τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs έχουν μήκος μικρότερο των 200 νουκλεοτιδίων και περιλαμβάνουν microRNAs, siRNAs, snoRNAs, rRNAs, tRNAs και piRNAs [20].



Εικόνα 7. Κατηγοριοποίηση των μη κωδικοποιητικών RNAs [19].

Τα lncRNAs εμφανίζουν ελάχιστο δυναμικό κωδικοποίησης σε σύγκριση με τα mRNAs, είναι λιγότερο εξελικτικά διατηρημένα και απαρτίζονται από μικρότερο αριθμό εξονίων. Ωστόσο, φαίνεται να συμμετέχουν σε πληθώρα βιολογικών διαδικασιών και να αποτελούν ρυθμιστές βασικών κυτταρικών λειτουργιών που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και τη (μετα)μεταγραφική δραστηριότητα [21].

Τα lncRNAs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν αναλόγως τη θέση τους στο γονιδίωμα σε σχέση με τα κωδικοποιητικά γονίδια σε πέντε κατηγορίες, τα νοηματικά, τα αντινοηματικά, τα αμφίδρομα, τα ιντρονικά και τα διαγονιδιακά. Πιο συγκεκριμένα, τα νοηματικά lncRNAs βρίσκονται στην κωδική αλυσίδα του κωδικοποιητικού γονιδίου και μεταγράφονται με την ίδια φορά με αυτό, ενώ τα αντινοηματικά βρίσκονται στην συμπληρωματική του και μεταγράφονται αντίθετα. Τα αμφίδρομα μόρια εμφανίζονται κοντά στον υποκινητή του σχετικού γονιδίου και μεταγράφονται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Τέλος, τα ιντρονικά lncRNAs προκύπτουν από μακρά εσώνια, ενώ τα διαγονιδιακά προέρχονται από το αντίστοιχο κωδικοποιητικό τμήμα δύο γονιδίων [22].



Εικόνα 8. Ταξινόμηση των lncRNAs με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα.[22].

1.2.1. Ρόλος και ενδοκυττάριος εντοπισμός των lncRNAs

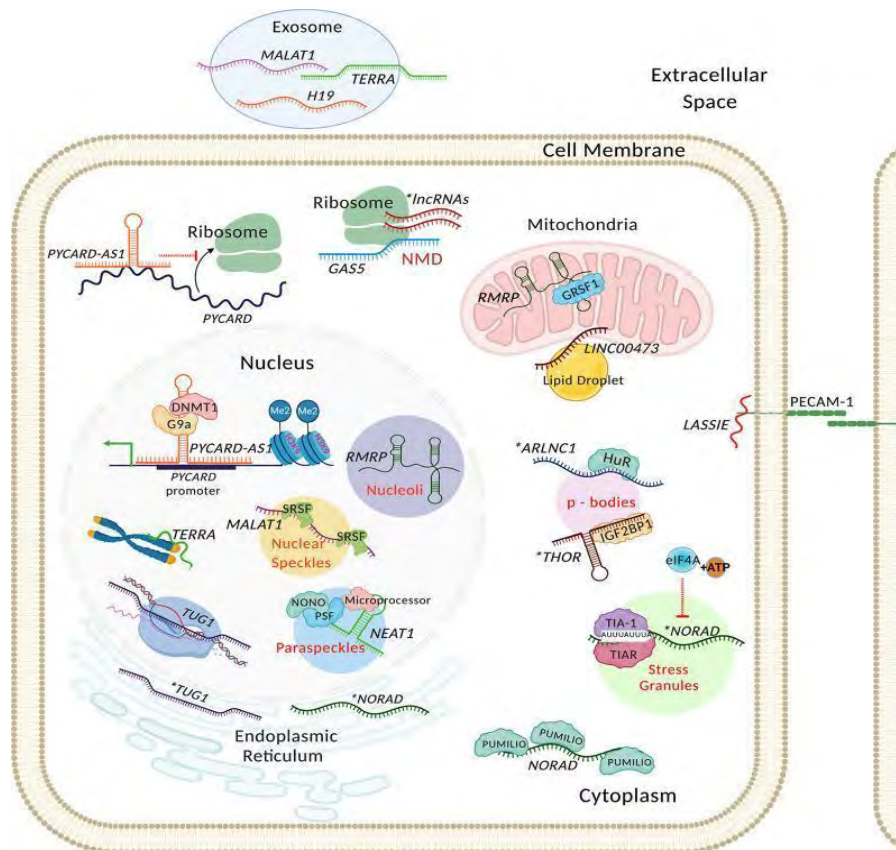
Τα lncRNAs αποτελούν σημαντικά μόρια καθώς συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση [23]. Παράλληλα, η συμβολή τους έχει επιβεβαιωθεί σε διεργασίες συσχετιζόμενες με τη μεταγραφή [24], τη συναρμολόγηση, την σύνθεση

και τον εντοπισμό των πρωτεϊνών [25], την απόπτωση [26], τον επαναπρογραμματισμό [27], την πολυδυναμία των βλαστοκυττάρων [28] και την απόκριση σε συνθήκες κυτταρικής καταπόνησης. Επιπλέον, ορισμένα lncRNAs φαίνεται να συμβάλουν στην εξέλιξη του καρκίνου, αλλά και στην ανάπτυξη άλλων ασθενειών [29].

Τα συγκεκριμένα μόρια εμφανίζονται κυρίως εντός του πυρήνα, στη χρωματίνη, υποδηλώνοντας την επιρροή που αυτά ασκούν στην DNA αλληλουχία [30]. Βάσει της επίδρασης και της θέσης τους, ταξινομούνται σε cis- και trans- δραστικά lncRNAs. Τα cis- lncRNAs ρυθμίζουν την έκφραση κοντινών γονιδίων, ενώ τα trans- lncRNAs σχετίζονται με την έκφραση πιο απομακρυσμένων γονιδίων ασκώντας δράση σε όλο το γονιδίωμα [31]. Ωστόσο, lncRNA μόρια φαίνεται να εντοπίζονται και στο κυτταρόπλασμα, σε ορισμένα οργανίδια και μακρομοριακές δομές, έχοντας διαφορετικό ρόλο. Τα κυτταροπλασματικά lncRNAs συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής του σήματος, μετα- μεταγραφικό έλεγχο, ρύθμιση δραστηριότητας πρωτεϊνών και μεσολαβούν στη σταθερότητα του mRNA, ενώ τα πυρηνικά lncRNAs σχετίζονται κυρίως με τη μεταγραφική δραστηριότητα και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [32-34].

Εκτός από τη ύπαρξη και τη δράση τους στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, τα lncRNA έχουν εντοπιστεί μέσω τεχνολογιών αλληλούχησης RNA (RNA-seq) και σε λοιπά οργανίδια και κυτταρικές δομές [35]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως μιτοχονδριακά lncRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στα μιτοχονδριακά γονίδια και στην ομοιόστασή τους, αλληλεπιδρώντας με τα αντίστοιχα πυρηνικά μόρια [36, 37]. Επιπλέον, lncRNA μόρια έχουν εντοπιστεί σε ριβοσωμικές περιοχές, χωρίς όμως να έχει εξακριβωθεί η λειτουργία τους. Το εναλλακτικό μάτισμα, η δημιουργία ισομορφών, η μετα-μεταγραφική επεξεργασία και ο εντοπισμός των lncRNAs σε διαφορετικές κυτταρικές θέσεις με διαφορετικές λειτουργίες, εγείρουν το επιστημονικό ενδιαφέρον και υποδηλώνουν την μεγάλη τους σημασία για την κυτταρική λειτουργία [38].

Η δράση των lncRNAs συμβάλει στην αλληλεπίδραση DNA, RNA και πρωτεϊνών [39]. Ορισμένα lncRNAs υβριδοποιούνται σε ειδικές αλληλουχίες DNA ή RNA και έχουν την ικανότητα σχηματισμού δευτεροταγούς ή τριτοταγούς δομής που τους επιτρέπει την αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες. Παράλληλα, μετάγραφα των μορίων έχουν βρεθεί κατά τη διάρκεια των σταδίων της εμβρυογένεσης και της διαφοροποίησης των οργάνων [40]. Η εμπλοκή τους στις παραπάνω διαδικασίες, σε συνδυασμό με την τροποποίηση της έκφρασής τους φαίνεται να αποτελεί αιτία ανάπτυξης και εξέλιξης ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος.

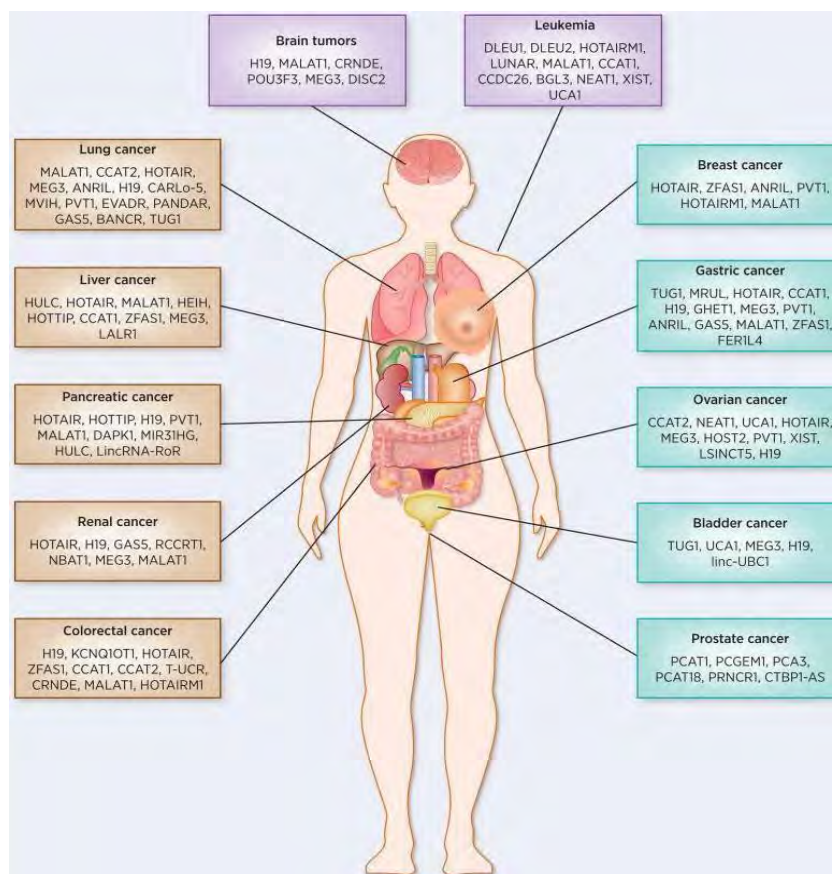


Εικόνα 9. Εντοπισμός μορίων lncRNA εσωτερικά των κυτταρικών δομών[38].

1.2.2. lncRNAs και καρκίνος

Τα χαρακτηριστικά των lncRNAs στη μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και η συμμετοχή τους στην ανάπτυξη, διαίρεση και κυτταρικό θάνατο, υποδεικνύουν τη σημασία και τη συσχέτισή τους με την πρόκληση καρκινογένεσης σε περίπτωση τροποποιήσεων αυτών των διαδικασιών [41]. Ορισμένα lncRNAs ρυθμίζονται από ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια και μέσω μεταλλάξεων και αλλοιώσεων στην έκφρασή τους φαίνεται να εμπλέκονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Μεταλλάξεις στα lncRNAs συνδέονται στενά, τόσο με την πρωτοπαθή εστία, όσο και με τις μεταστάσεις [42].

Οι καρκίνοι του ουροποιητικού συστήματος, του γαστρεντερικού και του αναπνευστικού είναι ορισμένοι από τους καρκίνους στους οποίους έχει αναφερθεί η δράση των lncRNA μορίων [43].



Εικόνα 10. *LncRNAs* συσχετιζόμενα με διάφορες μορφές καρκίνου [43].

Στον γαστρικό καρκίνο, πλήθος μελετών αναφέρει τη δράση των lncRNA μορίων. Ενδεικτικά, το lncRNA MEG3 δρα ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και στη μετάσταση μέσω της οδού σηματοδότησης του παράγοντα p53. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 παρατηρούνται σε πληθώρα όγκων και σχετίζονται άμεσα με τη γαστρική καρκινογένεση [44]. Τα lncRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως ογκογονίδια, ή να έχουν ογκοκατασταλτική δράση. Συγκεκριμένα, τα lncRNAs H19 και HOTAIR φαίνεται να προάγουν τη δημιουργία γαστρικού αδενοκαρκινώματος, ενώ τα GAS5 και MEG3 δρουν κατασταλτικά. Ειδικότερα, το H19 αποτελεί τυπικό παράδειγμα lncRNA που προκαλεί ογκογένεση, αφού βρίσκεται απορρυθμισμένο σε πολλές μορφές καρκίνου [40]. Το HOTAIR προκαλεί ογκογένεση και σχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό συμβάλλοντας στη μείωση της επιβίωσης των ανθρώπων με γαστρικό καρκίνο. Παράλληλα, το lncRNA HOXA11-AS εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο γαστρικό καρκίνο και συνδέεται με κακή πρόγνωση των ασθενών, αφού σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση και τη μετάσταση. Το μόριο αυτό μπορεί να αλληλοεπιδράσει με γονίδια, όπως τα *CDH1*, *E2F1* και *CDKN1A*, συμβάλλοντας στη μεθυλίωση του DNA [44]. Τέλος, το lncRNA MLK7-AS1

υπερεκφράζεται και συνδέεται με τη φτωχή πρόγνωση της νόσου και τη μειωμένη επιβίωση των ασθενών [46].

Το GAS5 είναι ένα lncRNA μήκους περίπου 630 νουκλεοτιδίων που συνδέεται με τις διαδικασίες της απόπτωσης, της μετάστασης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιδιόρθωσης του DNA και της αγγειογένεσης. Αλληλοεπιδρά με τα miR-21 και miR-222, ενεργοποιεί το μονοπάτι PTEN/AKT και δρα ογκοκατασταλτικά τους καρκίνους στομάχου, θυρεοειδούς, ενδομητρίου, τραχήλου και πνεύμονα [47].

1.2.3. LncRNAs ως καρκινικοί βιοδείκτες διάγνωσης και θεραπείας

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί θανατηφόρο νόσο, η θεραπεία της οποίας πραγματοποιείται μέσω χειρουργικής επέμβασης και χημειοθεραπείας. Η καθυστέρηση στη διάγνωση συνεπάγεται μειωμένα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών λόγω αναποτελεσματικότητας των θεραπευτικών μεθόδων. Το πρόβλημα έρχεται να επιλύσει η ανάπτυξη βιοδεικτών που θα συμβάλλουν τόσο στην έγκαιρη διάγνωση των ασθενών, όσο και στην αποτελεσματικότερη θεραπεία τους. Συγκεκριμένα, τα lncRNAs έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον ως βιοδείκτες για πρωταρχικό έλεγχο της νόσου, θεραπεία και αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αγωγής, γεγονός που οφείλεται στη μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητά τους [48]. Σήμερα, οι χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες για τον καρκίνο του στομάχου περιλαμβάνουν τα αντιγόνα CEA, AFP, CA19-9, CA72-4, CA125 κ.α., τα οποία όμως έχουν χαμηλή ευαισθησία, επιβεβαιώνοντας μόλις το 4,7- 33,3% των περιπτώσεων [49]. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα αυτών των αντιγόνων ως εργαλεία διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου, έχει οδηγήσει στην αυξανόμενη μελέτη των lncRNAs, τα οποία φαίνεται να είναι περισσότερο αποτελεσματικά ως πιθανοί καρκινικοί βιοδείκτες λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της έκφρασης τους.

Για παράδειγμα, εξαιτίας της παρουσίας των lncRNAs στο πλάσμα του αίματος, στα ούρα, στο σάλιο, στο γαστρικό υγρό κ.α. επιτυγχάνεται πιο ολοκληρωμένη παρακολούθηση των ασθενών μέσω της συχνής λήψης δειγμάτων. Με αυτό τον τρόπο, ελέγχονται η απόκριση του ασθενούς στη θεραπεία, η αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής, οι ενδεχόμενες μεταστάσεις και η πιθανή υποτροπή της νόσου [50]. Η εξέλιξη της νόσου μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη φυσιολογική σύνθεση του πλάσματος, οι οποίες μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν προσδιορίζοντας τη σοβαρότητα της νόσου [51]. Συγκεκριμένα, για τον καρκίνο του στομάχου υπάρχουν ορισμένα διαθέσιμα lncRNAs που λειτουργούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες, μεταξύ των οποίων είναι τα HULC και ZNFX1-AS1. Οι βιοδείκτες αυτοί εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τους βιοδείκτες CEA,

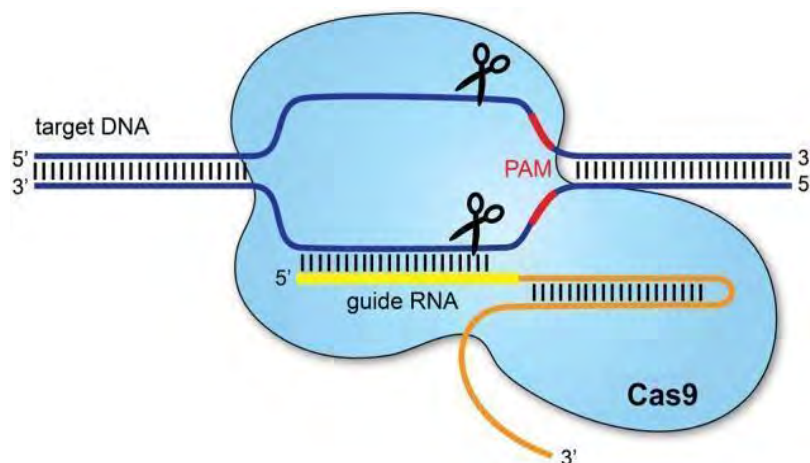
CA19-9 και CY211 [52]. Τέλος, τα lncRNAs PANDAR , FOXD2-AS1, SMARCC2, B3GALT5-AS1 και C5orf66-AS1, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για τον καρκίνο του στομάχου [53, 54]. Τα παραπάνω μόρια συμβάλλουν στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά, τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλους καρκινικούς βιοδείκτες. Η πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο εξαρτάται από το μέγεθος του όγκου, τον τύπο του καρκινώματος και την παρουσία μεταστάσεων. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης ορισμένων lncRNAs, όπως το LINC00086, σχετίζονται άμεσα με τους παραπάνω παράγοντες και συνδέονται με το χαμηλό προσδόκιμο ζωής των ασθενών με γαστρικό καρκίνο [54].

1.3. Μηχανισμός CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) και πρωτεΐνης Cas αποτελεί φυσικό μηχανισμό προστασίας των προκαρυωτικών οργανισμών έναντι των ιών που τους προσβάλλουν. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός παρατηρήθηκε το 1987 στο βακτήριο *Escherichia coli* και έκτοτε εντοπίστηκε σε πληθώρα βακτηρίων και αρχαίων [55]. Σήμερα, η τεχνολογία CRISPR/Cas έχει ευρεία εφαρμογή ως μηχανισμός επεξεργασίας του γονιδιώματος για τη γενετική βελτίωση ζώων και φυτών, καθώς και για τη γονιδιακή θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών.

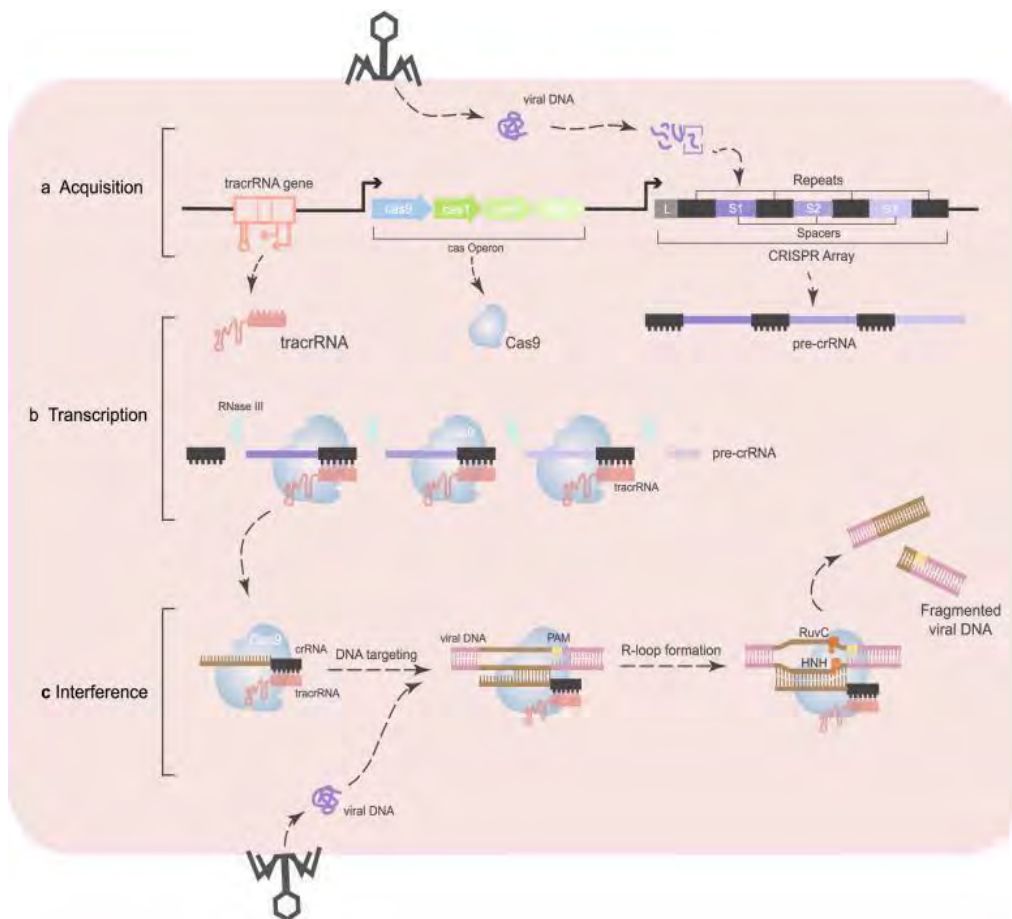
Τα συστήματα CRISPR/Cas ταξινομούνται σε έξι τύπους αναλόγως την δομή και αλληλουχία των Cas πρωτεϊνών, με πιο καλά μελετημένους τους τύπους I, II και III. Ο τύπος II αποτελείται μόνο από Cas πρωτεΐνες και λόγω της ευκολίας του χρησιμοποιείται ευρέως στην επεξεργασία του γονιδιώματος [56]. Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελείται από δύο βασικά συστατικά, την ενδονουκλεάση Cas9 που προκαλεί δίκλωνη ρήξη του DNA, καθώς και ένα RNA οδηγό (gRNA) που κατευθύνει την νουκλεάση στο ακριβές σημείο στόχευσης [57]. Η ενδονουκλεάση Cas9 αποτελείται από επικράτειες, κυριότερες εκ των οποίων είναι η επικράτεια αναγνώρισης (REC) και νουκλεάσης (NUC). Οι περιοχές PI, HNH και RuvC περιλαμβάνονται στην NUC και είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση του μοτίβου PAM και την δημιουργία ρήξεων των δύο αλυσίδων αντίστοιχα. Το μοτίβο PAM αποτελεί μια σύντομη αλληλουχία τριών νουκλεοτιδίων που βρίσκεται στο DNA και λειτουργεί ως αλληλουχία αναγνώρισης για την πρόσδεση της νουκλεάσης Cas. Στην περίπτωση του τύπου II (Cas9) η αλληλουχία αυτή είναι η 5'-NGG-3', όπου N μπορεί να είναι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο [56]. Η Cas9 δεν λειτουργεί μόνη της για την δημιουργία ρήξεων στο γονιδίωμα, αλλά σε συνδυασμό με το κατάλληλο sgRNA, το οποίο είναι συνδεδεμένο με την περιοχή REC, αναγνωρίζει το μοτίβο PAM και οδηγεί την νουκλεάση στο DNA-στόχο [58]. Το sgRNA είναι ένα μονόκλωνο μόριο περιήπου

20 νουκλεοτιδίων που έχει προκύψει από τον συνδυασμό του crRNA και του tracrRNA. Ο συνδυασμός του ώριμου tracrRNA με το crRNA και την Cas9 οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλέγματος ριβονουκλεοπρωτεΐνης που οδηγείται στη θέση αναγνώρισης της PAM και καταστρέφει το DNA. Στην περίπτωση των προκαρυωτικών οργανισμών ο μηχανισμός αυτός καταστρέφει το ξένο DNA που εισάγεται στο κύτταρο λειτουργώντας ως ένα σύστημα άμυνας του οργανισμού [59].



Εικόνα 11. Το σύστημα CRISPR/Cas9, όπου το gRNA οδηγεί την ενδονουκλεάση Cas9 να προκαλέσει δίκλωνη ρήξη σε στοχευμένη θέση του γονιδιώματος [60].

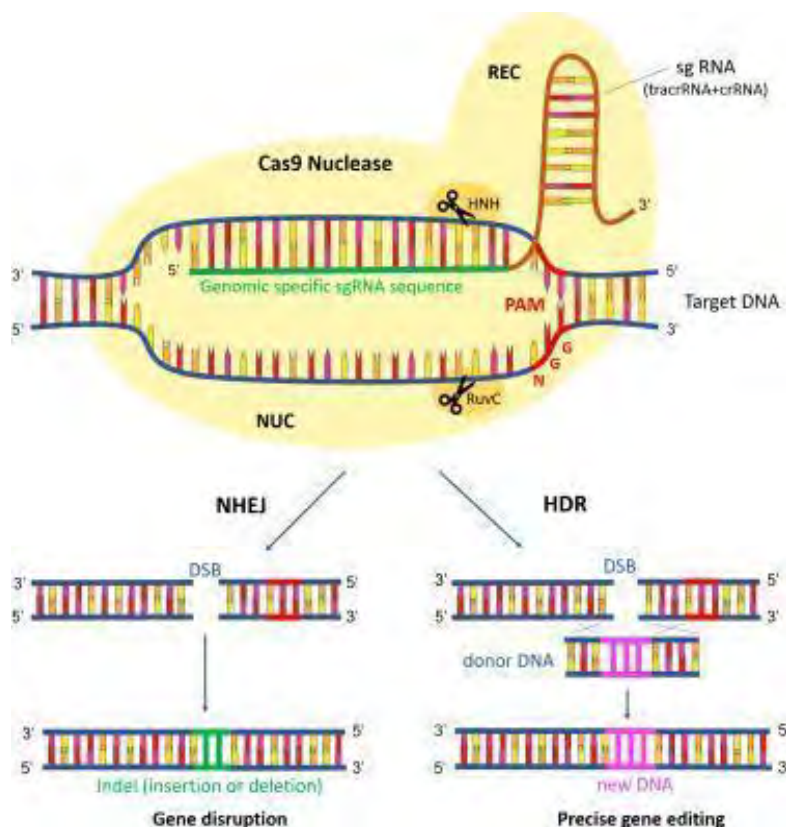
Το σύστημα CRISPR/Cas9 δρα ως εξής: αρχικά, το ξένο DNA εισάγεται στο κύτταρο και η ενδονουκλεάση Cas9 το επεξεργάζεται δημιουργώντας μικρά θραύσματα DNA που ονομάζονται αλληλουχίες protospacers [61]. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες αυτές ενσωματώνονται στη συστοιχία CRISPR, ο γενετικός τόπος της οποίας μεταβάλλεται συνεχώς μέσω της προσθήκης νέων protospacer αλληλουχιών. Στη συνέχεια, ακολουθεί η βιογένεση των crRNAs κατά την οποία πραγματοποιείται η μεταγραφή της CRISPR συστοιχίας σε ένα πρόδρομο μόριο RNA (pre-crRNA). Το τελευταίο υβριδοποιείται με το tracrRNA δημιουργώντας ένα σύμπλοκο ενεργής ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP) που διασπάται από την RNase III. Από τη διάσπαση προκύπτουν ώριμα crRNA μονομερή που έχουν ομολογία έναντι του ιικού DNA, ενώ παράλληλα φέρουν ένα μέρος της παλινδρομικής αλληλουχίας στα άκρα τους [62, 63]. Τέλος, κατά τη διαδικασία παρεμβολής, το ώριμο crRNA καθοδηγεί την Cas9 στα ομόλογα τμήματα του ξένου γονιδιώματος προκαλώντας την αποικοδόμηση των συγκεκριμένων αλληλουχιών. Η δημιουργία δίκλωνων ρήξεων (DSB) στις αλυσίδες του ξένου DNA γίνεται από τις περιοχές HNH και RuvC της ενδονουκλεάσης Cas9, οι οποίες διασπούν τη συμπληρωματική και μη συμπληρωματική αλυσίδα DNA αντίστοιχα [64].



Εικόνα 12. Στάδια του μηχανισμού CRISPR/Cas9 για την καταστροφή του ξένου DNA που εισάγεται στο κύτταρο και την απόκτηση ανοσίας του οργανισμού [65].

Ο συγκεκριμένος μηχανισμός ανοσίας των προκαρυωτικών οργανισμών, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από τον κλάδο της βιοτεχνολογίας για τη γονιδιωματική επεξεργασία και κυρίως για την καταστολή γονιδίων. Οι δίκλωνες ρήξεις που προκύπτουν ύστερα από τη δράση του συστήματος CRISPR/Cas9 ενεργοποιούν τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς επιδιόρθωσης αποσκοπώντας στην αποκατάσταση της βλάβης. Η επιδιόρθωση του τμήματος DNA που υπέστη τη ρήξη μπορεί να πραγματοποιηθεί με ομόλογο (HDR) ή μη ομόλογο τρόπο (NHEJ) [66]. Η ομόλογη συνένωση των άκρων (HDR) αποτελεί ακριβέστερη διαδικασία και απαιτεί την ύπαρξη μια ομόλογης αλληλουχίας, η οποία θα λειτουργήσει ως πρότυπο για την επιδιόρθωση του τμήματος. Αντιθέτως, η μη ομόλογη συνένωση (NHEJ) λειτουργεί συνδέοντας απευθείας τα άκρα του DNA, με αποτέλεσμα την ταχεία επιδιόρθωση του σημείου και συνεπώς την εύκολη εισαγωγή μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις αυτές, εάν συμβούν σε κωδική περιοχή του γονιδίου, μπορεί να οδηγήσουν στη μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και κατ' επέκταση στη μη λειτουργικότητα του παραγόμενου προϊόντος [67, 68]. Η NHEJ επιδιόρθωση, λόγω σφαλμάτων σε περιπτώσεις επεξεργασίας του

γονιδιώματος μπορεί να προκαλέσει σημειακές ενθέσεις ή ελλείψεις νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων (gene knockout) [69].

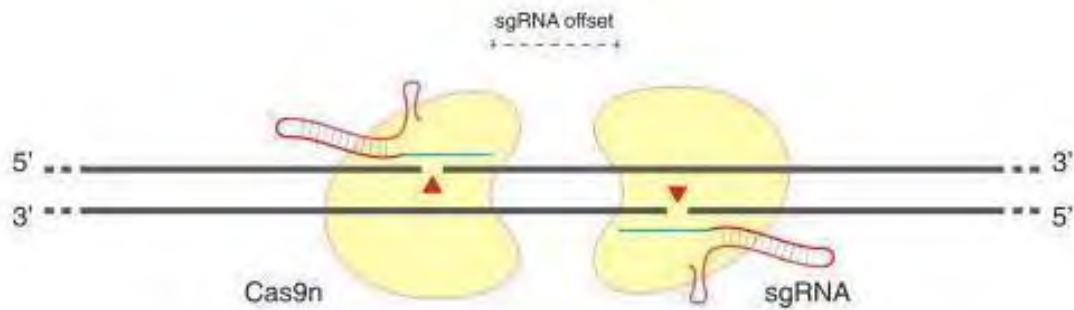


Εικόνα 13. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης, NHEJ και HDR, των δίκλωνων ρήξεων που προκύπτουν από τη δράση του συστήματος CRISPR/Cas9 [56].

1.3.1. Η περίπτωση της νικάσης (CRISPR/nCas9)

Το σύστημα CRISPR/Cas9, αν και είναι ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο για την επεξεργασία του γονιδιώματος, φέρει το μειονέκτημα της πιθανής μη ειδικής στόχευσης και την εισαγωγή ανεπιθύμητων μεταλλάξεων σε σημεία του γονιδιώματος μακριά από την επιθυμητή περιοχή αναγνώρισης (off-target mutations) [70]. Η ανάγκη για βελτίωση της ειδικότητας στόχευσης οδήγησε στην παραλλαγή του συστήματος και τη δημιουργία μιας τροποποιημένης μορφής του, της νικάσης-Cas9 (nCas9). Η παραλλαγή αυτή προέρχεται από την τροποποίηση των περιοχών RuvC και HNH της Cas9 μέσω των μεταλλάξεων D10A και H840A αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις αυτές επιτρέπουν στο ζεύγος νικασών nCas9 να εισάγει ταυτόχρονα μονόκλωνες ρήξεις στους κλώνους του DNA, αυξάνοντας την ειδικότητα αναγνώρισης του στόχου [71]. Για την επίτευξη αυτού, δύο sgRNAs που στοχεύουν αντίθετους κλώνους, καθοδηγούν τις nCas9 να εισάγουν μονόκλωνες ρήξεις στο γονιδίωμα, σε κοντινή απόσταση μεταξύ

τους. Η ύπαρξη μονόκλωνων ρήξεων συμβάλλει στην ακριβή αναγνώριση της επιθυμητής περιοχής και στην ομόλογη επιδιόρθωση των σημείων του DNA που υπέστησαν μονόκλωνη και όχι δίκλωνη ρήξη, ύστερα από τη δράση του ενός μόνο sgRNA [72].



Εικόνα 14. Σύστημα CRISPR/nCas9, όπου δύο sgRNAs καθοδηγούν τις nCas9 για την εισαγωγή μονόκλωνων ρήξεων σε αντίθετους κλώνους DNA [71].

2. Σκοπός

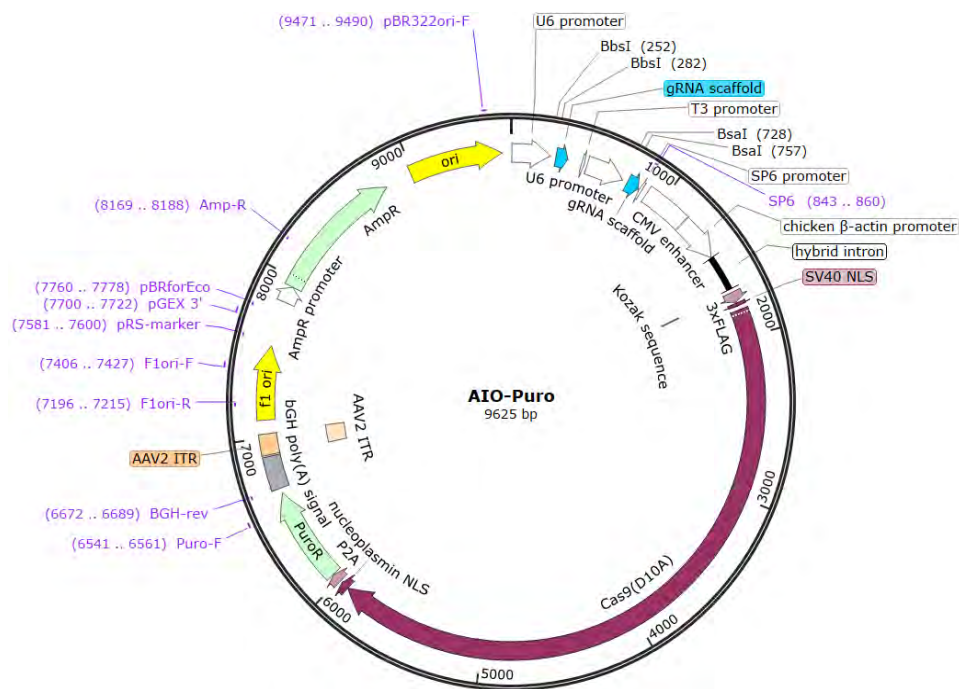
Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτελεί η μελέτη ενός μακρού μη-κωδικοποιητικού RNA (lncRNA) του RECUR1, το οποίο βάσει μη δημοσιευμένων δεδομένων φαίνεται να εκφράζεται στο γαστρικό καρκίνο. Το συγκεκριμένο lncRNA αποτελεί, μεταξύ άλλων, ένα από τα μελετώμενα μόρια του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής. Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απαλοιφή ενός τμήματος του πρώτου εξονίου του lncRNA RECUR1, μέσω της τεχνολογίας CRISPR/nCas9. Η τεχνολογία αυτή παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και αποτελεσματικότητα όσον αφορά την επεξεργασία του γονιδιώματος, καθιστώντας την αξιόπιστο εργαλείο για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία. Για τη λειτουργία του συστήματος CRISPR/nCas9 στα κύτταρα της καρκινικής κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιήθηκε, ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση και ενσωμάτωση δύο single guide RNAs (sgRNAs) στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Τα sgRNAs που χρησιμοποιήθηκαν κατεύθυναν την πρωτεΐνη Cas9 στο σημείο στόχευσης, εισάγοντας μονόκλωνες ρήξεις στο γονιδίωμα και προκαλώντας την απαλοιφή ενός τμήματος του πρώτου εξονίου του lncRNA RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του. Η γονοτύπηση των γενετικά τροποποιημένων καρκινικών κυττάρων επιβεβαίωσε την εκτομή τμήματος του πρώτου εξονίου, αποδεικνύοντας την αξιοπιστία του συστήματος CRISPR/nCas9 στην επεξεργασία του γονιδιώματος.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Πλασμιδιακός φορέας

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο AIO-puro (All in One-puro) μεγέθους 9625 bp (RRID: Addgene_74630). Ο συγκεκριμένος φορέας περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cas9 (D10A), η οποία λειτουργεί ως νικάση στο σύστημα CRISPR/nCas9. Για την έκφραση της nCas9, το πλασμίδιο διαθέτει δύο θέσεις εισαγωγής single guide RNA (sgRNA) που εκφράζονται από ανεξάρτητους υποκινητές U6 και σε συνδυασμό με την nCas9 προκαλούν μονόκλωνες ρήξεις σε στοχευμένες περιοχές του γονιδιώματος. Το πλασμίδιο διαθέτει επίσης, δύο γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR) και την πουρομυκίνη (PuroR), τα οποία αξιοποιούνται ως δείκτες επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων και των μετασχηματισμένων καρκινικών κυττάρων, αντίστοιχα.



Εικόνα 15. Πλασμιδιακός φορέας AIO-puro. Πλασμιδιακός χάρτης Addgene, αριθμός καταλόγου: 74630. Απεικόνιση μέσω του λογισμικού SnapGene Viewer.

3.1.2. Βακτηριακά στελέχη

Για την κλωνοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα με τα δύο sgRNAs, επιλέχθηκαν τα στελέχη DH5α, του βακτηρίου *Escherichia coli*. Τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη αποτελούν δημοφιλή εργαστηριακά εργαλεία κλωνοποίησης

λόγω της υψηλής απόδοσης μετασχηματισμού τους, καθώς και της μεγάλης σταθερότητας του ένθετού τους εξαιτίας της μετάλλαξης *rec A1* που φέρουν. Οι μεταλλάξεις στο άκρο A, προσδίδουν στα στελέχη αυτά αυξημένο πεδίο εφαρμογής και διατήρησης της ποιότητας του DNA.

3.1.3. Κυτταρική σειρά

Η διαμόλυνση με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε στην καρκινική κυτταρική σειρά «AGS», η οποία προέρχεται από πρωτεύοντα επιθηλιακά κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος (RRID: CVCL_0139).

3.1.4. Ένζυμα Περιορισμού

Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας έγινε χρήση των περιοριστικών ενζύμων BbSI, BsaI και PvuI της εταιρείας New England BioLabs:

- **BbSI:**

Το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro. Χρησιμοποιήθηκε στη συγκέντρωση 10.000 U/ml. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει είναι:



- **BsaI:**

Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα AIO-puro, ο οποίος περιείχε το ένθεμα sgRNA1. Η συγκέντρωσή του ήταν 10.000 U/ml. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει είναι:



- **PvuI:**

Ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την γραμμικοποίηση του πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος έφερε και τα δύο ενθέματα. Το ένζυμο αυτό είχε συγκέντρωση 20.000 U/ml. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει είναι:



3.1.5. Kit απομόνωσης και καθαρισμού πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν τα NucleoSpin Plasmid isolation kit και NucleoSpin Plasmid Protocol Kit της εταιρείας Macherey-Nagel, ενώ για τον καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το Gel and RCR Clean up Kit, DNA- RNA and protein purification της ίδιας εταιρείας.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με την υβριδοποίηση κατάλληλα σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων sgRNA1 και sgRNA2 με σκοπό το σχηματισμό δίκλωνων μορίων για κλωνοποίηση. Η δημιουργία των δίκλωνων μορίων πραγματοποιήθηκε μέσω θερμικής κατεργασίας (θερμικό σοκ) οδηγώντας, αρχικά, στην πλήρη αποδιάταξη των αλυσίδων και των σχηματιζόμενων διαμορφώσεών τους, και κατόπιν στην υβριδοποίησή τους.

Για την αντίδραση πραγματοποιήθηκε ανάμειξη νοηματικού ολιγονουκλεοτιδίου (sense oligo), αντινοηματικού ολιγονουκλεοτιδίου (antisense oligo), καθώς και διαλύματος υβριδοποίησης (annealing buffer) που περιείχε 100mM KOAc, 30mM Hepes και 2mM MgAc. Ακολούθησε η τοποθέτηση του μείγματος αντίδρασης στους 95°C για 5 λεπτά.

Πίνακας 3.1. Αντιδραστήρια για την αντίδραση υβριδοποίησης:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Νοηματικό ολιγονουκλεοτίδιο(100μM)	2 μl
Αντινοηματικό ολιγονουκλεοτίδιο (100μM)	2 μl
Διάλυμα υβριδοποίησης	96 μl
Vτ	100 μl

3.2.2. Αντιδράσεις λιγάσης και πέψεων

Αφού σχηματίστηκαν τα δίκλωνα μόρια των ολιγονουκλεοτιδίων sgRNA1 και sgRNA2, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις λιγάσης για την ενσωμάτωση των ενθεμάτων στον χρησιμοποιούμενο πλασμιδιακό φορέα AIO-puro. Οι αντιδράσεις λιγάσης πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά, με πρώτη την αντίδραση για την ενσωμάτωση του sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα και κατόπιν την ενσωμάτωση του sgRNA2 στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τέλος, τα αντιδραστήρια τοποθετήθηκαν για 16 ώρες στους 16°C.

Πίνακας 3.2. Αντιδραστήρια λιγάσης για την ενσωμάτωση των ολιγονουκλεοτιδίων στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Ένθεμα sgRNA	4 µl
Πλασμιδιακός φορέας AIO-puro	1,6 µl
Διάλυμα λιγάσης (10x, NEB)	1 µl
T4 DNA Λιγάση (400 U/µl, EnzyQuest)	0,5 µl
ddH ₂ O	2,9 µl
Vτ	10 µl

Για την ενσωμάτωση του εκάστοτε ολιγονουκλεοτιδίου ήταν απαραίτητη η δημιουργία κατάλληλων άκρων στον πλασμιδιακό φορέα, τα οποία θα ήταν συμβατά με τις αλληλουχίες των ενθεμάτων. Τα κατάλληλα άκρα του φορέα προέκυψαν μέσω των αντιδράσεων πέψεων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πέψη του άκοπου πλασμιδιακού φορέα AIO-puro με το ένζυμο BbSI, ώστε να επιτευχθεί η ενσωμάτωση του sgRNA1, ενώ στη συνέχεια έγινε πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με το ένζυμο BsaI για την προσθήκη του sgRNA2. Για τις αντιδράσεις πέψης τα δείγματα πλασμιδιακού DNA τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους 37°C για 5 ώρες.

Πίνακας 3.3. Αντιδραστήρια για την πέψη:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	7,5 µl
rCutSmart διάλυμα (NEB, 10x)	5 µl

Ένζυμο περιορισμού (NEB)	1,5 µl
ddH ₂ O	36 µl
V _τ	50 µl

Αφού ενσωματώθηκαν και τα δύο ενθέματα sgRNAs στον πλασμιδιακό φορέα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού PvuI, με σκοπό τη γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και την ευκολότερη εισαγωγή του στα κύτταρα της καρκινικής κυτταρικής σειράς AGS. Για την αντίδραση πέψης με το ένζυμο PvuI χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που απεικονίζονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Αντιδραστήρια για την πέψη με το ένζυμο περιορισμού PvuI:

Συστατικά	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	6,22 µl
rCutSmart διάλυμα (NEB, 10x)	10 µl
Ένζυμο περιορισμού (NEB)	3 µl
ddH ₂ O	80,78 µl
V _τ	100 µl

Η αντίδραση πέψης διήρκησε 5 ώρες. Στο διάστημα αυτό, το δείγμα βρισκόταν σε σταθερή θερμοκρασία 37°C μέσα στο υδατόλουτρο. Για την επιβεβαίωση της πέψης, στο μέσο διάστημα των 5 ωρών, απομακρύνθηκε το 10% του όγκου της αντίδρασης και ηλεκτροφορήθηκε. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro.

3.2.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preps)

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών στελεχών DH5a του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E.coli*) με τα ενθέματα ολιγονουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω θερμικού σοκ (heatshock). Αναλυτικότερα, σε 50 µl βακτηριακών κυττάρων DH5a προστέθηκαν 5 µl προϊόντος από την αντίδραση λιγάσης που προηγήθηκε, δηλαδή ανασυνδυασμένου

πλασμιδιακού φορέα, και το μείγμα αφέθηκε στον πάγο για 20 λεπτά. Κατόπιν, έγινε τοποθέτηση στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα (θερμικό σοκ) και αμέσως μετά προσθήκη 945 μl θρεπτικού μέσου χωρίς αμπικιλίνη (L.B. Free). Η διαδικασία συνεχίστηκε με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες και την παραμονή τους στο θάλαμο επώασης, στους 37°C, 160 rpm για 50 λεπτά. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τοποθετήθηκαν 350 μl από την υγρή καλλιέργεια σε τρυβλίο που περιείχε αμπικιλίνη και αφέθηκε για επώαση στους 37°C για 16 ώρες. Μόλις σχηματίστηκαν οι αποικίες στα τρυβλία, επιλέχτηκαν οι καταλληλότερες και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 2 ml θρεπτικού μέσου με αμπικιλίνη ο καθένας. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν για επώαση στους 37°C, 210 rpm για 16 ώρες. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας διατηρήθηκαν όσο το δυνατόν άσηπτες συνθήκες.

Ο έλεγχος ενσωμάτωσης των ολιγονουκλεοτιδίων (sgRNAs) στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες σε μικρή κλίμακα (mini preps) το εργαστηριακό πρωτόκολλο και του εμπορικά διαθέσιμου NucleoSpin Plasmid isolation kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Η διαδικασία ξεκίνησε με την παρασκευή των απαιτούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία περιείχαν:

- Διάλυμα I → Tris 50mM, EDTA 10mM και ddH₂O. Το διάλυμα δεν περιείχε RNase A, οπότε προστέθηκε σε ποσότητα 5 μl (100 μg/ml).
- Διάλυμα II → NaOH 0,2M, 1% SDS και ddH₂O
- Διάλυμα III → Οξικό κάλιο 5M, άνυδρο οξικό οξύ και ddH₂O

Αφού ετοιμάστηκαν τα διαλύματα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των υγρών καλλιεργειών για 2 λεπτά, 4°C, 13.000 rpm, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2 ml. Στο ίζημα που προέκυψε προστέθηκαν 100 μl κρύου διαλύματος I και έγινε ανακίνηση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl διαλύματος II που βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε ήπια ανάδευση. Ύστερα από 5 λεπτά στα δείγματα προστέθηκαν 150 μl κρύου διαλύματος III, ανακινήθηκαν και αφέθηκαν για 5 λεπτά σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, 4°C, 13.000 rpm και το υπερκείμενο που προέκυψε μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf μαζί με 1 ml αιθανόλης 100%. Κατόπιν, τα δείγματα αφέθηκαν για 20 λεπτά στους -80°C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά, 4°C, 13.000 rpm. Στο ίζημα προστέθηκαν 600 μl αιθανόλης 70%, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και το ίζημα που προέκυψε αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Με την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου, προέκυψε ίζημα πλασμιδιακού DNA το οποίο επαναδιαλύθηκε σε 100 μl ddH₂O στους 65°C για 5 λεπτά και μετρήθηκε η συγκέντρωσή του.

Ύστερα από την επιτυχή ενσωμάτωση του ενθέματος sgRNA2 πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από το πήκτωμα αγαρόζης μέσω του Gel and RCR Clean up Kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Για το σκοπό αυτό, αφαιρέθηκε το επιθυμητό τμήμα από το πήκτωμα αγαρόζης με ένα νυστέρι και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο για την απομόνωση του περιεχόμενου DNA. Αναλυτικότερα, τα κομμένα τμήματα του πηκτώματος αγαρόζης τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο τύπου Eppendorf, το οποίο ζυγίστηκε και υπολογίστηκε το καθαρό βάρος του πηκτώματος. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του διαλύματος NT1 σε ποσότητα διπλάσια από το καθαρό βάρος του πηκτώματος αγαρόζης. Το δείγμα θερμάνθηκε στους 55°C για 10 λεπτά και το διάλυμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε στήλη, η οποία φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό. Ακολούθησε προσθήκη 700 μl NT3 διαλύματος και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για δύο φορές και ολοκληρώθηκε με τη φυγοκέντρωση της άδειας στήλης. Τέλος, στη στήλη προστέθηκαν 22 μl ddH₂O, έγινε φυγοκέντρωση 1 λεπτού και επώαση του δείγματος στους 70°C για 5 λεπτά. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε μετρήθηκε στη συσκευή Quawell. Τα ρυθμιστικά διαλύματα για την εκτέλεση της διαδικασίας περιλαμβάνονταν στο χρησιμοποιούμενο εμπορικό Kit.

Για την απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα AIO-puro, ο οποίος φέρει τα δύο ενθέματα ολιγονουκλεοτιδίων, χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Plasmid Protocol Kit της εταιρείας Marcherey-Nagel. Η διαδικασία ξεκίνησε με την τοποθέτηση της εκάστοτε υγρής καλλιέργειας σε σωληνάριο τύπου Eppendorf και συνεχίστηκε με φυγοκέντρωση για 2 λεπτά, 11.000 rcf. Κατόπιν, προστέθηκαν 250 μl κρύου διαλύματος A1 καθώς και 250 μl διαλύματος A2 σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από ήπια ανάδευση και παραμονή των δειγμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε η προσθήκη 300 μl διαλύματος A3 και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά. Με το πέρας αυτής αφαιρέθηκαν 750 μl υπερκειμένου και τοποθετήθηκαν σε στήλη, η οποία φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό. Αφού φυγοκεντρήθηκε όλη η ποσότητα υπερκειμένου για κάθε καλλιέργεια, προστέθηκαν 500 μl διαλύματος AW στη στήλη. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρωση για 1 λεπτό και στην άδεια στήλη προστέθηκαν 600 μl διαλύματος A4. Κατόπιν έγιναν δύο φυγοκεντρήσεις 1 και 3 λεπτών, ώστε να απορριφθεί όλο το διάλυμα και να στεγνώσει η στήλη. Έπειτα, προστέθηκε στη στήλη ζεστό ddH₂O σε ποσότητα 50 μl και τα δείγματα αφέθηκαν για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε μία τελική φυγοκέντρωση 1 λεπτού και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων στη συσκευή Quawell. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνονταν στο εμπορικό Kit.

3.2.4. Διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση

Η επιτυχής πέψη των προϊόντων και η ενσωμάτωση των ενθεμάτων των ολιγονουκλεοτιδίων στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, ελέγχθηκαν μέσω διαγνωστικών PCR αντιδράσεων (Polymerase Chain Reaction). Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν είχαν σχεδιαστεί για την υβριδοποίηση των συγκεκριμένων τμημάτων της αλληλουχίας του φορέα, ενώ τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν το πλασμιδιακό DNA των μετασχηματισμένων βακτηρίων από τις υγρές καλλιέργειες.

Πίνακας 3.5. Αντιδραστήρια και ποσότητες αντίδρασης PCR για την επιβεβαίωση ένθεσης του *sgRNA1*:

Συστατικό	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	1 μ l
Πρόσθιος εκκινητής (10 μ M)	1 μ l
Ανάστροφος εκκινητής (10 μ M)	1 μ l
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq Kapa Biosystems (10x)	5 μ l
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs (10mM)	0,5 μ l
Ένζυμο πολυμεράσης Taq Kapa Biosystems (5U/ μ l)	0,2 μ l
ddH ₂ O	41,3 μ l
V _τ	50 μ l

Πίνακας 3.6. Συνθήκες εκτέλεσης PCR αντίδρασης για το ένθεμα *sgRNA1*:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C	30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	10 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72°C	50 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72°C	2 λεπτά
Κύκλοι	x25	
	4°C	∞

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Το πήκτωμα παρασκευάστηκε με τη διάλυση 1,5 ml αγαρόζης σε 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (0,5x). Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 10 μl διαλύματος χρωστικής (6x) και στη συνέχεια έγινε η τοποθέτησή τους στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Μαζί με τα δείγματα τοποθετήθηκε και ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών (Ladder). Η συσκευή ρυθμίστηκε ώστε να έχει σταθερή παροχή ρεύματος 120 V, 90 mA. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), στην οποία φάνηκαν οι φθορίζουσες ζώνες που επιβεβαίωναν την επιτυχή ενσωμάτωση του ενθέματος.

Ομοίως έγινε και στη διαγνωστική PCR που αφορούσε την επιβεβαίωση ενσωμάτωσης του sgRNA2, κάνοντας χρήση των εκκινητών (primers) που αντιστοιχούσαν σε αυτή την περίπτωση. Τα δείγματα προέρχονταν από βακτήρια DH5a που μετασχηματίστηκαν και ενσωμάτωσαν το δεύτερο ένθεμα (sgRNA2) στον πλασμιδιακό φορέα που περιείχε το ένθεμα sgRNA1.

Πίνακας 3.7. Αντιδραστήρια και ποσότητες αντίδρασης PCR για την επιβεβαίωση ένθεσης του sgRNA2:

Συστατικό	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	1 μl
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	1 μl
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq (Kapa Biosystems, 10x)	5 μl
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs (10mM)	0,5 μl
Ένζυμο πολυμεράση Taq (Kapa Biosystems, 5U/ μl)	0,2 μl
ddH ₂ O	41,3 μl
Vτ	50 μl

Πίνακας 3.8. Συνθήκες εκτέλεσης PCR αντίδρασης για το ένθεμα sgRNA2:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C	30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	10 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72°C	20 δευτερόλεπτα

Τελική επιμήκυνση	72°C	2 λεπτά
Κύκλοι	x25	
	4°C	∞

Στις διαγνωστικές PCR που έγιναν για το κάθε ένθεμα ξεχωριστά, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (Negative Control, N.C.) ο άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro. Για την επιβεβαίωση ενσωμάτωσης και των δύο sgRNAs στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro πραγματοποιήθηκε μια τελική διαγνωστική PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο νοηματικός εκκινητής (primer F) του sgRNA1 και ο αντινοηματικός εκκινητής (primer R) του sgRNA2.

Πίνακας 3.9. Αντιδραστήρια και ποσότητες αντίδρασης PCR για την επιβεβαίωση ένθεσης των sgRNA1 και sgRNA2:

Συστατικό	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	1 μl
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	1 μl
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	1 μl
Διάλυμα Taq (Kapa Biosystems, 10x)	5 μl
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs (10mM)	0,5 μl
Ένζυμο πολυμεράση Taq (Kapa Biosystems, 5U/ μl)	0,2 μl
ddH ₂ O	41,3 μl
Vτ	50 μl

Πίνακας 3.10. Συνθήκες εκτέλεσης PCR αντίδρασης για τα ενθέματα sgRNA1 και sgRNA2:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C	30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	10 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72°C	30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72°C	2 λεπτά
Κύκλοι	x25	

	4°C	∞
--	-----	---

3.2.5. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA

Ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε τόσο μετά την ενσωμάτωση του ενθέματος sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα, όσο και μετά την προσθήκη του sgRNA2. Για τον καθαρισμό, χρησιμοποιήθηκαν 40 μl Sodium acetate 3M, 99 μl πλασμιδιακού DNA και ddH₂O έως τελικού όγκου 400 μl. Στο διάλυμα προστέθηκε 1:1 φαινόλη/ χλωροφόρμιο και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, 4°C, 13.000 rpm. Από τις φάσεις που δημιουργήθηκαν, απομακρύνθηκε η πάνω φάση προσεκτικά και τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf με 2 μl γλυκογόνο και 1ml παγωμένη EtOH 100%. Αφού αφέθηκε για 1 ώρα στους -80°C, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 30 λεπτά και στο ίζημα προστέθηκαν 500 μl παγωμένης EtOH 70%. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ddH₂O.

3.2.6. Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Από τους κλώνους των καρκινικών κυττάρων που επιλέχθηκαν ύστερα από τη γενετική τους τροποποίηση, έγινε απομόνωση RNA. Αρχικά, τοποθετήθηκαν 750 μl τριζόλης (TRI) και 200 μl χλωροφορμίου στα δείγματα, και έγινε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης και 2 μl γλυκογόνου, ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν και πάλι για 15 λεπτά. Στο νέο υπερκείμενο προστέθηκαν 500 μl 70% Icecold αιθανόλης, ακολούθησε φυγοκέντρωση 13.000 rpm, 4°C για 10 λεπτά και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει καλά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση με 50 μl ddH₂O σε θερμοκρασία 65°C για 5 λεπτά και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις στη συσκευή Quawell.

3.2.7. Κατεργασία με DNάση (DNase treatment)

Η διαδικασία κατεργασίας των δειγμάτων με DNάση πραγματοποιήθηκε για την αποικοδόμηση των υπολειπόμενων μορίων DNA. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε μείγμα με την παρακάτω σύσταση:

Πίνακας 3.11. Αντιδραστήρια και ποσότητες αντίδρασης DNάσης:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
---------------	----------

Δείγμα RNA	25 μ l
Διάλυμα (10x, ThermoScientific)	3 μ l
DNase I (1U/ μ l, ThermoScientific)	1 μ l
RNase out (40 U/ μ l, Invitrogen)	0,5 μ l
ddH ₂ O	0,5 μ l
V _τ	30 μ l

Ακολούθησε η τοποθέτηση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 37°C και κατόπιν έγινε η προσθήκη 40 μ l Sodium Acetate 3M pH=5.6, 330 μ l ddH₂O και 400 μ l φαινόλης/χλωροφορμίου στο καθένα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά, αφαιρέθηκε η πάνω φάση προσεκτικά και συμπληρώθηκε με 1000 μ l παγωμένης αιθανόλης 100% και 2 μ l γλυκογόνου. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -80°C για τουλάχιστον 1 ώρα και φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 30 λεπτά. Στο ίζημα προστέθηκαν 500 μ l παγωμένης αιθανόλης 70% και έγινε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά. Το ίζημα που προέκυψε αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Η επαναδιάλυση αυτού έγινε με 25 μ l ddH₂O σε θερμοκρασία 65°C για 5 λεπτά.

3.2.8. Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από τα RNA δείγματα, υπολογίστηκαν 1000 ng του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 10 μ l. Κατόπιν, προστέθηκαν 1 μ l τυχαία εξαμερή (Random hexamers, 100 mM) και 1 μ l dNTPs (10 mM) και ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε η προσθήκη των λοιπών αντιδραστηρίων και επώαση για 2 ώρες στους 37°C. Τέλος, τα δείγματα cDNA συμπληρώθηκαν με ddH₂O έως τελικό όγκο 400 μ l και τα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Πίνακας 3.12. Αντιδραστήρια και ποσότητες αντίδρασης σύνθεσης cDNA:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Διάλυμα (5x, Invitrogen)	4 μ l
DTT (100mM, Invitrogen)	2 μ l

RNase out (40U/μl, Invitrogen)	0.5 μl
MMLV (200 U/μl, Invitrogen)	1 μl
ddH ₂ O	0,5 μl
Vτ	8 μl

3.2.9. Διαγνωστική cDNA PCR και ηλεκτροφόρηση

Για την εκτίμηση των γενετικών τροποποιήσεων του υπό μελέτη γονιδίου σε επίπεδο DNA πραγματοποιήθηκε μια διαγνωστική cDNA PCR με την ακόλουθη σύσταση:

Πίνακας 3.13. Αντιδραστήρια και ποσότητες για την αντίδραση διαγνωστικής cDNA PCR:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Δείγμα cDNA	4 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα Taq (Kapa Biosystems, 10x)	5 μl
Πρόσθιος εκκινητής(10μM)	1 μl
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	1 μl
Ένζυμο πολυμεράση Taq (Kapa Biosystems, 5U/ μl)	0,2 μl
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs (10mM)	0,5 μl
ddH ₂ O	38,3 μl
Vτ	50 μl

Πίνακας 3.14. Συνθήκες εκτέλεσης PCR αντίδρασης cDNA μορίων:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C	45 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	62°C	10 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72°C	25 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72°C	2 λεπτά
Κύκλοι	x45	

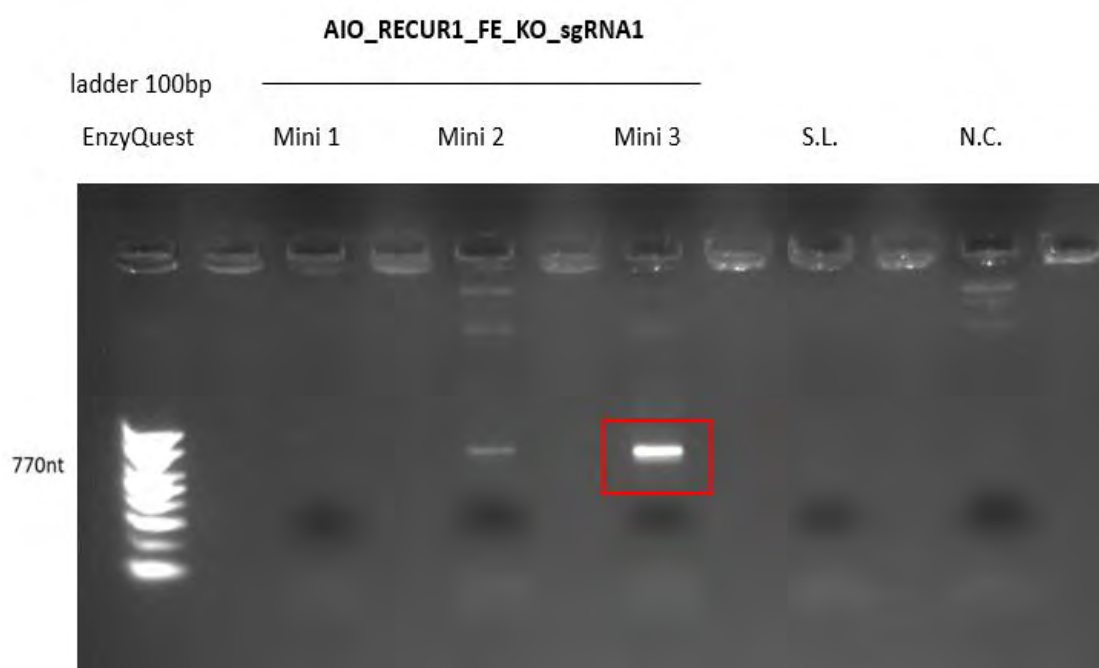
	4°C	∞
--	-----	---

Ακολούθησε η προσθήκη 10 µl διαλύματος χρωστικής (6x) σε κάθε δείγμα και η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάστηκε με τη διάλυση 2 g αγαρόζης σε 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (0,5x). Ως αρνητικός μάρτυρας (N.C.) χρησιμοποιήθηκε cDNA κυττάρων AGS (1000 ng), ενώ παράλληλα τοποθετήθηκε στο πήκτωμα ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών (Ladder 100bp, EnzyQuest) σε ποσότητα 3 µl. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής παροχής 120V, 90 mA. Η οπτικοποίηση των PCR προϊόντων έγινε με την έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

4. Αποτελέσματα

4.1. Κλωνοποίηση των sgRNAs στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro και έλεγχος θετικών κλώνων

Για τον έλεγχο ενσωμάτωσης των ολιγονουκλεοτιδίων sgRNA1 και sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v. Αρχικά, ελέγχθηκε η επιτυχής ενσωμάτωση του sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, ο οποίος είχε υποστεί πέψη και έφερε συμβατά άκρα με το ένθεμα sgRNA1. Σε περίπτωση επιτυχούς ενσωμάτωσης αναμενόταν στην ηλεκτροφόρηση ένα προϊόν μεγέθους περίπου 770 νουκλεοτιδίων. Τα δείγματα DNA που ελέγχθηκαν για το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προέρχονταν από τρεις διαφορετικές βακτηριακές αποικίες. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα self-ligation (S.L.) από βακτηριακά κύτταρα που δεν έφεραν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας (N.C.) χρησιμοποιήθηκε ο άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro. Για την εξακρίβωση του μεγέθους των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών (Ladder 100bp) της εταιρείας EnzyQuest.



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v για τον έλεγχο ενσωμάτωσης του ενθέματος sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro. S.L.: Self Ligation δείγμα, N.C.: αρνητικός μάρτυρας, άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαίωσε την επιτυχία ένθεσης του sgRNA1 στις αποικίες 2 και 3 (Εικόνα 15) και τελικά επιλέχθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο της αποικίας 3 (mini 3).

Για τον έλεγχο ενσωμάτωσης του sgRNA2 στον ήδη ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, λήφθηκαν δείγματα από δύο διαφορετικές βακτηριακές αποικίες. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε δείγμα Self-ligation (S.L.) από αποικία που δεν έλαβε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με το ένθεμα sgRNA2. Ως αρνητικός μάρτυρας (N.C.) χρησιμοποιήθηκε ο άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro. Στην περίπτωση επιτυχούς ενσωμάτωσης αναμενόταν, ύστερα από την ηλεκτροφόρηση, η εμφάνιση φθορίζοντος προϊόντος μεγέθους περίπου 300 νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v για τον έλεγχο ένθεσης του sgRNA2 στον ήδη ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, S.L.: Self ligation δείγμα, N.C.: αρνητικός μάρτυρας, άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 4.2.) επιβεβαίωσε την επιτυχί ενσωμάτωση του sgRNA2 ενθέματος στον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα AIO-puro στην αποικία 2 (mini 2).

Ωστόσο, για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων ενσωμάτωσης και των δύο ενθεμάτων (sgRNA1 και sgRNA2) στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, έγινε μέσω μιας τελικής διαγνωστικής PCR και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση. Το πλασμιδιακό DNA που ελέγχθηκε προερχόταν από τα κύτταρα της αποικίας 2 (mini 2), η οποία όπως

φαίνεται στην Εικόνα 17, περιλάμβανε το ένθεμα sgRNA2. Στη διαγνωστική PCR χρησιμοποιήθηκε, επίσης, δείγμα self-ligation (S.L.) από βακτηριακά κύτταρα που δεν έλαβαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, καθώς και ο άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro ως αρνητικός μάρτυρας (N.C.). Σε περίπτωση επιβεβαίωσης ενσωμάτωσης και των δύο ενθεμάτων (sgRNA1 και sgRNA2), αναμενόταν η εμφάνιση προϊόντος μεγέθους περίπου 500 νουκλεοτιδίων, ύστερα από την ηλεκτροφόρηση που έγινε σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v.

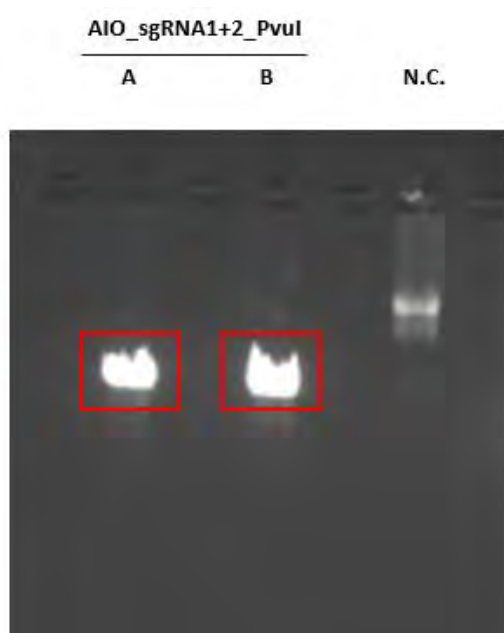


Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v., Πραγματοποιήθηκε στα βακτηριακά κύτταρα της αποικίας 2 (Mini 2) για την επιβεβαίωση ενσωμάτωσης των δύο ενθεμάτων (sgRNA1 και sgRNA2) στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro. S.L.: Self ligation δείγμα, N.C.: αρνητικός μάρτυρας, άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την επιτυχία ενσωμάτωσης των δύο ενθεμάτων (sgRNA1 και sgRNA2) στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18. Με την ενσωμάτωση των δύο single guide RNAs (sgRNAs) στον πλασμιδιακό φορέα ολοκληρώθηκε η επιθυμητή πλασμιδιακή κατασκευή που στοχεύει στην παροδική έκφραση του συστήματος CRISPR/nCas9 για το knock-out του πρώτου εξονίου του RECUR1, ύστερα από τη διαμόλυνση των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς AGS.

4.2. Γραμμικοποίηση της πλασμιδιακής κατασκευής για τη διαμόλυνση της καρκινικής κυτταρικής σειράς AGS

Υστερα από την επιτυχή ενσωμάτωση και των δύο ενθεμάτων (sgRNA1 και sgRNA2) στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού PvuI. Η πέψη με το συγκεκριμένο ένζυμο αποσκοπούσε στη γραμμικοποίηση του πλασμιδίου, ώστε να γίνει ευκολότερη η διαμόλυνση των κυττάρων της καρκινικής σειράς AGS. Η επιτυχής πέψη επιβεβαιώθηκε με την εμφάνιση προϊόντος στις θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Ως αρνητικός μάρτυρας (N.C.) χρησιμοποιήθηκε ο άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro.

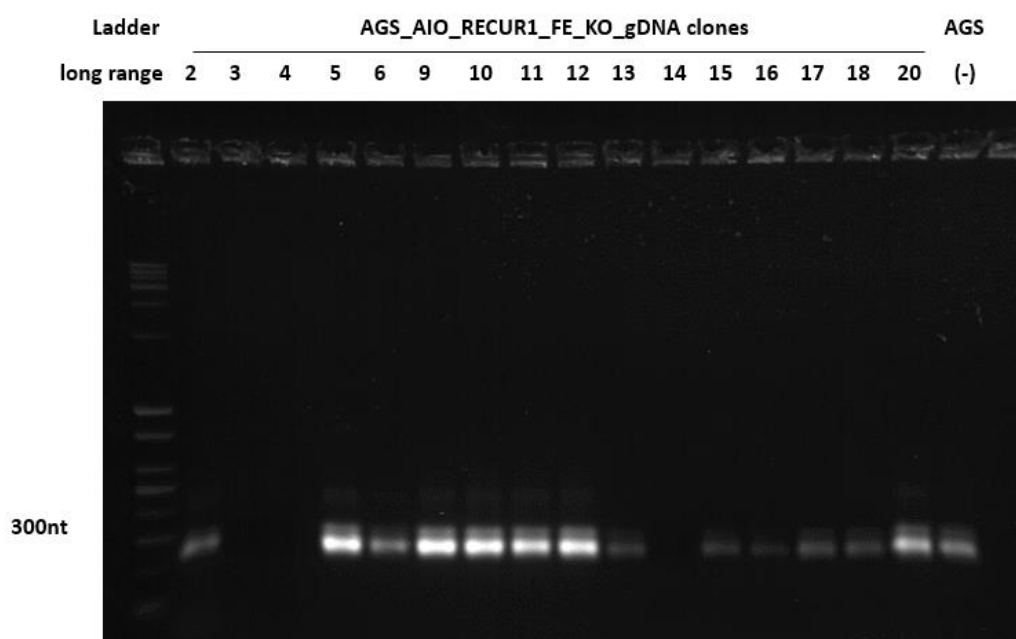


Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα AIO-puro με το ένζυμο περιορισμού PvuI σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/w. A και B: οι 2 επαναλήψεις προερχόμενες από δείγμα τις ίδιας αντίδρασης, N.C.: αρνητικός μάρτυρας, άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-puro.

4.3. Γονοτύπηση κυτταρικών κλώνων AGS

Αφού ολοκληρώθηκε η διαμόλυνση των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς AGS με το σύστημα απενεργοποίησης του πρώτου εξονίου του lncRNA RECUR1 μέσω του φορέα AIO-puro, έγινε η απομόνωση του γενωμικού DNA των αναπτυχθέντων κυτταρικών κλώνων. Συνολικά συλλέχθηκαν 22 κλώνοι κυττάρων. Το γενωμικό DNA απομονώθηκε σε δύο φάσεις αναλόγως του σταδίου ανάπτυξης του κάθε κλώνου. Στην πρώτη φάση απομονώθηκε το γενωμικό DNA των κλώνων 2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18 και 20, ενώ στη δεύτερη φάση απομονώθηκε το DNA των κλώνων 7,8,19,21,22 και 23, οι οποίοι εμφάνισαν πιο αργή ανάπτυξη

συγκριτικά με τους πρώτους. Και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να ελεγχθεί η λειτουργία του εισαχθέντος συστήματος CRISPR/Cas9 με χρήση του φορέα AIO-puro στα καρκινικά κύτταρα. Για τον έλεγχο του συστήματος, σε κάθε κυτταρικό κλώνο πραγματοποιήθηκε αρχικά διαγνωστική PCR για την ύπαρξη του γονιδίου της ακτίνης, ενός γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene). Η παρουσία του γονιδίου της ακτίνης δίνει κατά την ηλεκτροφόρηση ένα προϊόν μεγέθους περίπου 300 νουκλεοτιδίων. Ως μάρτυρας (AGS -) χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από καρκινικά κύτταρα AGS.

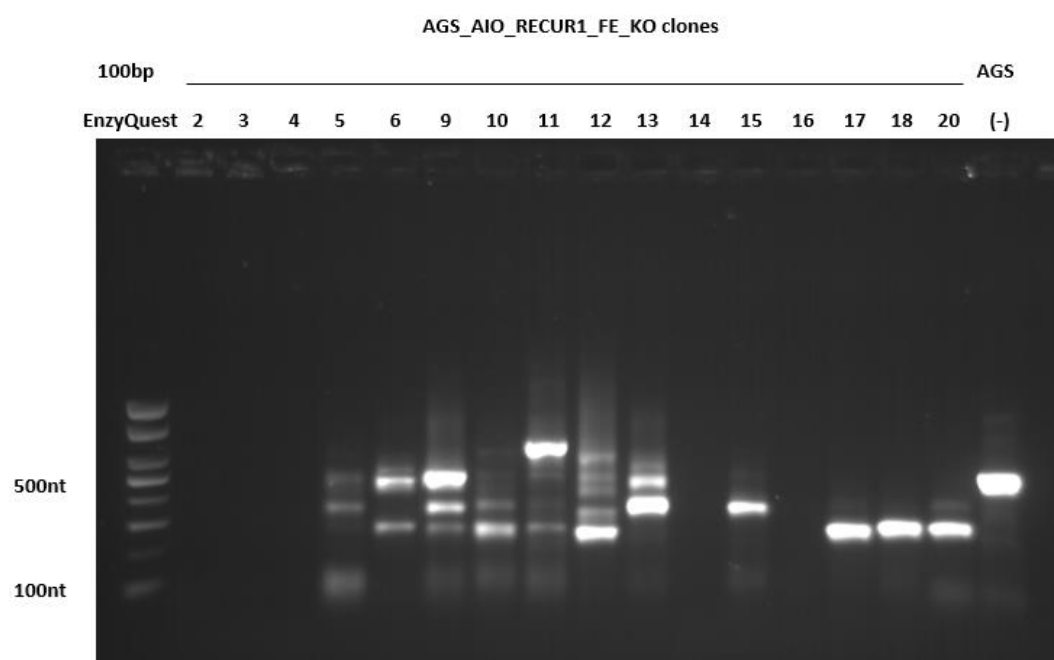


Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών κλώνων 2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18 και 20 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%w/v για τον έλεγχο του γονιδίου της ακτίνης.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ζώνης ειδικής για το γονίδιο της ακτίνης στην πλειοψηφία των κλώνων. Η απουσία ζώνης για το συγκεκριμένο γονίδιο (κλώνοι 3,4 και 14) οφείλεται στο γεγονός ότι ο αριθμός των κυττάρων που λήφθηκε για να γίνει η απομόνωση του DNA ήταν αρκετά μικρός, με αποτέλεσμα τη δυσκολία λήψης και απομόνωσης του DNA. Συνεπώς, παρατηρείται απουσία τους και στην επόμενη ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο του συστήματος CRISPR/nCas9, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αποκοπή μέρους του πρώτου εξονίου του lncRNA RECURI και του γονιδίου-στόχου του.

Για την επιβεβαίωση εκτομής του υπό μελέτη γονιδίου που πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος CRISPR/nCas9 και του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro, αναμενόταν

στην ηλεκτροφόρηση προϊόν μεγέθους περίπου 250 νουκλεοτιδίων. Αντιθέτως, σε περίπτωση αποτυχίας του συστήματος αναμενόταν ένα προϊόν μεγέθους 500 νουκλεοτιδίων. Η εξακρίβωση του μεγέθους των φθορίζοντων προϊόντων έγινε μέσω της χρήσης μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών (Ladder 100bp) της εταιρείας EnzyQuest.

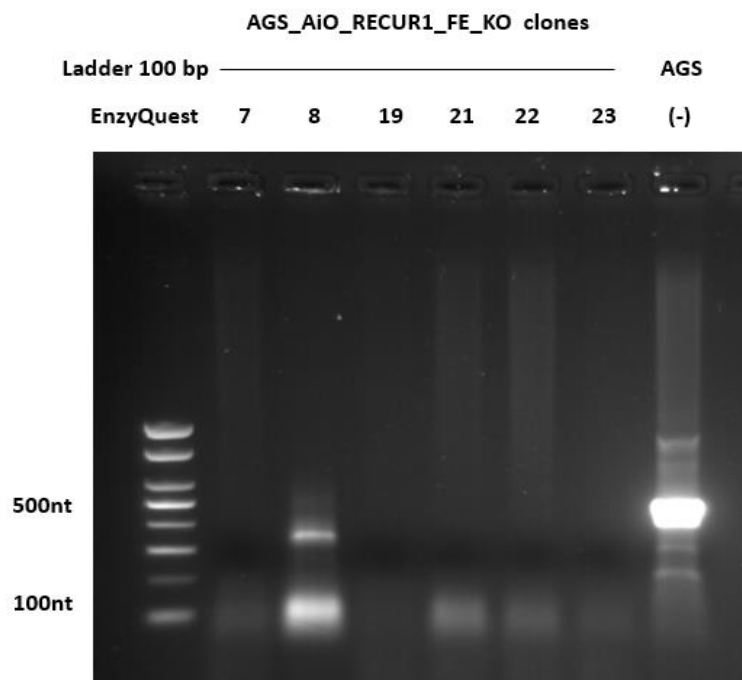


Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών κλώνων 2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18 και 20 σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v για τον έλεγχο αποκοπής του πρώτου εξονίου του *IncRNA RECUR1* μέσω του συστήματος επεξεργασίας γονιδιώματος CRISPR/nCas9.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απέδειξαν την επιτυχή δράση του συστήματος CRISPR/nCas9 στην πλειοψηφία των κυτταρικών κλώνων. Συγκεκριμένα, στους κλώνους 17, 18 και 20 απεικονίζεται η εκτομή του επιθυμητού τμήματος και στα δύο αλληλόμορφα (πιθανή ένδειξη ομοζυγωτίας), ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο κλώνος 15, ο οποίος εμφανίζει ομοζυγωτία και εκτομή μικρότερου μέρους της περιοχής στόχου. Οι κλώνοι 6 και 13 εμφανίζουν ετεροζυγωτία, καθώς η αποκοπή του επιθυμητού τμήματος πραγματοποιήθηκε στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα. Τέλος, στους υπόλοιπους κλώνους εμφανίζονται επιπλέον φθορίζουσες ζώνες που υποδηλώνουν την ύπαρξη παραπροϊόντων.

Ομοίως πραγματοποιήθηκε και για τους κλώνους 7,8,19,21,22 και 23, οι οποίοι ελέγχθηκαν σε δεύτερη φάση, λόγω της πιο αργής τους ανάπτυξης. Σε περίπτωση επιτυχούς εκτομής αναμενόταν ένα προϊόν μεγέθους περίπου 250 νουκλεοτιδίων. Ως αρνητικός μάρτυρας (AGS -) χρησιμοποιήθηκε το γενωμικό DNA από καρκινικά

κύτταρα AGS που δεν είχαν διαμολυνθεί με το σύστημα CRISPR/nCas9 μέσω του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών (Ladder 100 bp) της εταιρείας EnzyQuest.



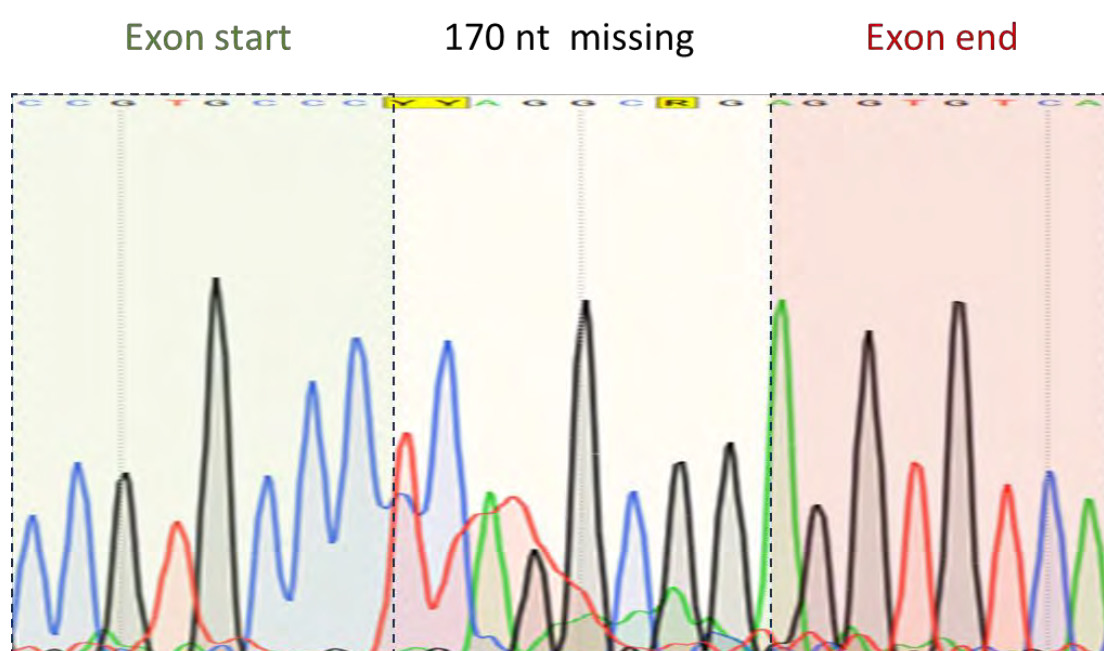
Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών κλώνων 7,8,19,21,22 και 23 σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v για τον έλεγχο αποκοπής του πρώτου εξονίου του *lncRNA RECURI*.

Όπως προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση, PCR προϊόν ανιχνεύτηκε μόνο στον κλώνο 8, ενώ στους υπόλοιπους κυτταρικούς κλώνους δεν εμφανίστηκαν προϊόντα. Η απουσία ζωνών στους υπόλοιπους κλώνους αποδίδεται στην μικρή ποσότητα κυττάρων που συλλέχθηκαν από τους κλώνους 7,19,21,22 και 23, η οποία δυσκόλεψε τη διαδικασία απομόνωσης του γενωμικού τους DNA.

Οι κλώνοι 15, 17, 18 και 20 εμφάνισαν τα καλύτερα και πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με την λειτουργία και αποτελεσματικότητα του εργαλείου CRISPR/nCas9 που κατασκευάστηκε και εισήχθηκε στα καρκινικά κύτταρα μέσω του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro. Συνεπώς, οι συγκεκριμένοι κυτταρικοί κλώνοι επιλέχθηκαν για την μετέπειτα πορεία της πειραματικής διαδικασίας. Για τους κλώνους 15 και 18, πραγματοποιήθηκε επιπλέον η απομόνωση του γενωμικού τους DNA από το πήκτωμα αгарόζης με σκοπό την ανάλυση της αλληλουχίας τους (DNA-sequencing).

4.4. Αλληλούχηση κατά Sanger της αλληλουχίας DNA των κυτταρικών κλώνων

Η επιβεβαίωση εκτομής τμήματος του 1^{ου} εξονίου του RECURI μέσω του συστήματος CRISPR/ηCas9, έγινε με την αλληλούχηση κατά Sanger, της οποίας τα αποτελέσματα απεικονίζονται με τη μορφή χρωματογραφήματος τεσσάρων χρωμάτων. Οι διαφορετικού χρώματος κορυφές αντιστοιχούν σε διαφορετικές βάσεις, με την αδενίνη να απεικονίζεται με πράσινο, τη θυμίνη με κόκκινο, τη γουανίνη με μαύρο και την κυτοσίνη με μπλε. Το αποτέλεσμα της αλληλούχησης για τον κλώνο 18 δεν ήταν σαφές, ενώ για τον κλώνο 15 υπήρξε επιβεβαίωση των αναμενόμενων αποτελεσμάτων.

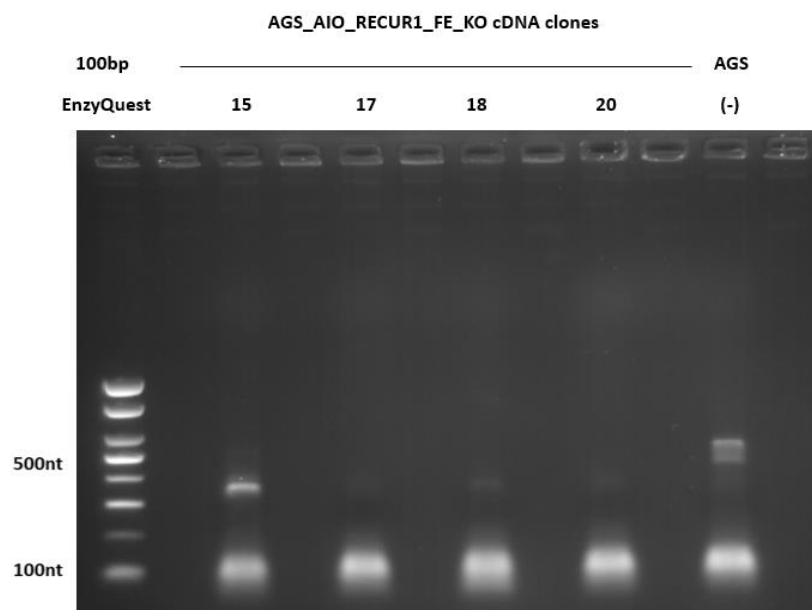


Εικόνα 23. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων αλληλούχησης κατά Sanger του κυτταρικού κλώνου 15, όπου επιβεβαιώνεται η εκτομή τμήματος του πρώτου εξονίου του *lncRNA1 RECURI*.

4.5. Έλεγχος έκφρασης σε επίπεδο DNA ύστερα από το knock-out

Αφού πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, κατεργασία DNάσης και σύνθεση cDNA των επιλεγμένων κυτταρικών κλώνων (κλώνοι 15,17,18 και 20), έγινε διαγνωστική cDNA PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο μίας πρώιμης εκτίμησης της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου ύστερα από το knock-out του πρώτου εξονίου, σε επίπεδο DNA. Η εκτίμηση της παρουσίας προϊόντων μεγέθους 250 νουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών (Ladder 100bp) της εταιρείας EnzyQuest,

ενώ παράλληλα έγινε χρήση αρνητικού μάρτυρα (AGS -) που προερχόταν από το cDNA κυττάρων AGS.



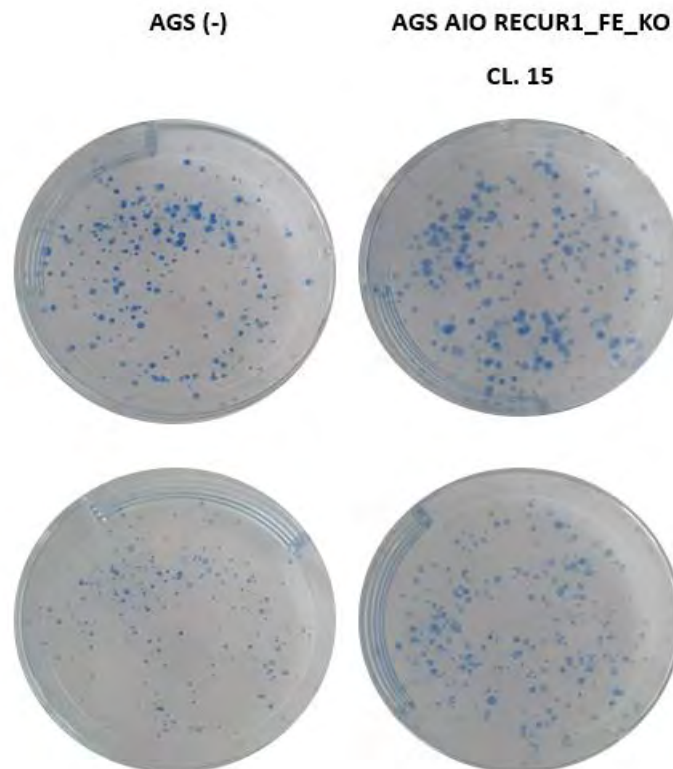
Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση των cDNA των κυτταρικών κλώνων 15,17,18 και 20 σε πήκτωμα αραρόζης 1% w/v για την παρατήρηση της έκφρασης σε επίπεδο DNA, ύστερα από το knock-out του πρώτου εξονίου του *lncRNA RECURI* και του γονιδίου-στόχου του.

Τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση της PCR των cDNA μορίων δεν κατέστησαν σαφή, γεγονός που συνδέεται με τη λειτουργία των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν. Για τον λόγο αυτό, αποτελεί σημαντικό βήμα η περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων κυτταρικών κλώνων ως προς τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασής τους μέσω της χρήσης qPCR (Real time quantitative PCR).

4.6. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των μετασχηματισμένων καρκινικών κυττάρων ύστερα από το επιτυχές knock-out

Ακολούθησε η παρατήρηση του φαινοτυπικού αποτυπώματος του κυτταρικού κλώνου 15 με τη χρώση κυτταρικών αποικιών της μεθόδου CFA (Colony Formation Assay). Η συγκεκριμένη δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών αποτελεί μία *in vitro* μέθοδο που στηρίζεται στην ικανότητα που έχει ένα μοναδικό κύτταρο να αναπτύξει αποικία. Για τον φαινοτυπικό έλεγχο, κύτταρα που δεν έλαβαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (AGS -) έναντι των κυττάρων στα οποία επιτεύχθηκε το knock-out (AGS AIO RECURI_FE_KO). Από τα φαινοτυπικά αποτελέσματα παρατηρείται αυξημένη επιφάνεια κάλυψης των μετασχηματισμένων

κυττάρων, έναντι εκείνων που δεν έλαβαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ωστόσο, παρατηρείται έντονη ποικιλομορφία μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων όσον αφορά το μέγεθος των αποικιών που σχηματίστηκαν, καθώς και του αριθμού τους. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε ανάγκη επανάληψης της διαδικασίας, καθώς επίσης και στην στατιστική επεξεργασία και ποσοτικοποίηση του μεγέθους και του αριθμού των αποικιών.



Εικόνα 25. Παρατήρηση των φαινοτυπικών αποτελεσμάτων των κυττάρων AGS, ύστερα από το *knock-out* του 1^{ου} εξονίου του *RECUR1*, με τη μέθοδο CFA.

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μία από τις συνηθέστερες αλλά και σοβαρότερες κακοήθειες σε παγκόσμιο επίπεδο, γεγονός που οφείλεται στην κακή του πρόγνωση και τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας των ασθενών. Η έγκαιρη ανίχνευση της νόσου έχει μεγάλη σημασία για τη εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών και συνδέεται άμεσα με την καλύτερη πρόγνωση και τη μικρότερη επιβάρυνση του συστήματος υγείας [73].

Η ανάγκη για νέα προγνωστικά και θεραπευτικά εργαλεία έστρεψε το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια σε μια κατηγορία μη κωδικοποιητικών μορίων, τα long non-coding RNAs (lncRNAs). Μέσω βιοπληροφορικών αναλύσεων, έχει παρατηρηθεί η έκφραση τέτοιων μορίων σε διάφορες περιπτώσεις ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος, με αποτέλεσμα τη συσχέτιση της απορυθμισμένης έκφρασής τους με την εκδήλωση της νόσου. Ανάλογες μελέτες υποστηρίζουν τον δυνητικό ρόλο των lncRNAs μορίων στη διάγνωση και πρόγνωση διάφορων τύπων καρκίνου. Στη βιβλιογραφία, η έκφραση οκτώ lncRNA μορίων συσχετίστηκε με την εκδήλωση ηπατικού καρκίνου, ενώ υπάρχουν αναφορές για την σημασία τριών lncRNAs (RP11-160H22.5, XLOC_014172 και LOC149086) ως πιθανοί βιοδείκτες με ογκοκατασταλτική δράση [74, 75]. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου τα lncRNAs HULC και ZNF1-AS1 εκφράζονται σε βιοψίες των ασθενών, όχι όμως των υγιών ατόμων, κάνοντας τα συγκεκριμένα μόρια προτεινόμενα ως πιθανούς βιοδείκτες διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου [76].

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη ενός νέου lncRNA, του RECUR1, το οποίο βάσει βιοπληροφορικών αναλύσεων φαίνεται να εκφράζεται στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Συγκεκριμένα, η πειραματική διαδικασία αποσκοπούσε στην εκτομή μέρους του πρώτου εξονίου του RECUR1, που πραγματοποιήθηκε μέσω μιας παραλλαγής του συστήματος CRISPR/Cas9.

Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο επεξεργασίας του γονιδιώματος που έχει εφαρμοστεί για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος. Η τεχνολογία αυτή έχει εφαρμοστεί σε τρεις πτυχές θεραπείας του καρκίνου που σχετίζονται με το καρκινικό γονιδίωμα, την ανοσοθεραπεία και τις επιγενετικές τροποποιήσεις με κατάργηση ή απενεργοποίηση των προκαλούμενων καρκινογόνων λοιμώξεων που προκαλούνται από συγκεκριμένη ομάδα ιών [77]. Μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις στην εξατομικευμένη θεραπεία που οφείλεται στην τεχνολογία CRISPR/Cas9 αποτελεί η δημιουργία του χιμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα T-κυττάρων (CAR). Κατά τη διάρκεια της θεραπείας αυτής, συλλέγονται T-

λεμφοκύτταρα από καρκινοπαθείς ασθενείς και τροποποιούνται γενετικά, ώστε μόλις εισαχθούν και πάλι στον οργανισμό να μπορέσουν να αναγνωρίσουν και να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται στην αύξηση της λειτουργίας των CAR T-κυττάρων [78]. Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της θεραπείας CAR αποδείχτηκε στην πρώτη κλινική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα [79].

Το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη και θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου. Πράγματι, μέσω του συγκεκριμένου μηχανισμού πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του ογκογονιδίου *EGFL6* που εμπλέκεται σε στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση του καρκίνου των ωοθηκών [80]. Επίσης το γονιδίωμα του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων υπέστη επεξεργασία μέσω CRISPR/Cas9 για τη διερεύνηση του συσχετιζόμενου με αυτόν, καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [81]. Μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 έχει στοχοποιηθεί μια μεγάλη κατηγορία γονιδίων σε καρκινικά ηπατικά κύτταρα, τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη και τη μετάσταση της νόσου. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν τη σημασία του *YES1* ως πιθανό στόχο που σχετίζεται με την πρόκληση καρκινογένεσης καρκίνου του πνεύμονα, ύστερα από την απενεργοποίησή του μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Από τη χρήση αυτού του συστήματος έχει επιβεβαιωθεί η συσχέτιση πληθώρας γονιδίων ή λοιπών μορίων και με άλλους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του μαστού, του παγκρέατος, του προστάτη κ.α [82].

Όσον αφορά το γαστρικό καρκίνο, το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί για το knock-out του γονιδίου *ARID1A*, το οποίο εντοπίζεται μεταλλαγμένο στο 31% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων, ιδιαίτερα των υποτύπων που συνδέονται με τη μικροδορυφορική αστάθεια και τον ιό Epstein-Barr [83]. Παράλληλα, ο συγκεκριμένος μηχανισμός επεξεργασίας του γονιδιώματος έχει χρησιμοποιηθεί στην αποκοπή του έβδομου εξονίου του *LRRFIP2*, το οποίο οδήγησε σε καταστολή της μετάστασης του γαστρικού καρκίνου στο ήπαρ, καθώς και στο knock-out του μεταγραφικού παράγοντα *SALL4* που υπερεκφράζεται σε πολλές μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού [84]. Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν την σημαντική μείωση αγγειογένεσης του καρκίνου του στομάχου *in vitro*, καθώς και το χαμηλό μεταστατικό δυναμικό ύστερα από τον μετασχηματισμό των καρκινικών κυττάρων με το σύστημα CRISPR/Cas9 [85].

Ωστόσο, πέραν της ευρείας χρήσης του για ερευνητικούς σκοπούς, χρησιμοποιείται σε κλινικές δοκιμές ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του στομάχου. Συγκεκριμένα, στο πλαίσιο αυτών των δοκιμών, χορηγούνται σε ασθενείς που εμφανίζουν μεταστατικό

επιθηλιακό γαστρικό καρκίνο, διηθητικά λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9. Παράλληλα, βρίσκεται σε εξέλιξη μια κλινική δοκιμή που επιδιώκει την τροποποίηση των λεμφοκυττάρων του περιφερειακού αίματος ασθενών που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο γαστρικού καρκίνου και εμφανίζουν θετικότητα στον ιό Epstein-Barr (EBV⁺) [86].

Η τεχνολογία CRISPR/Cas9, πέραν της γονιδιακής θεραπείας και της χρήσης της σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου, έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ιογενών μολύνσεων και αντιβακτηριδιακής θεραπείας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι νουκλεάσες Cas9 χρησιμοποιούνται για τη στόχευση συγκεκριμένων ιικών και βακτηριδιακών γονιδίων, προκαλώντας τον περιορισμό της ανάπτυξής τους και την προστασία του ανθρώπινου οργανισμού από τις αντίστοιχες λοιμώξεις [87, 88].

Η επεξεργασία του γονιδιώματος μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 έδωσε νέες προοπτικές για την διάγνωση, πρόληψη και θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος. Μέσω αυτής, δόθηκε η δυνατότητα στην επιστημονική κοινότητα να μελετήσει πληθώρα γονιδίων και άλλων μορίων που εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες και να τα συσχετίσει με σοβαρές ανθρώπινες ασθένειες. Η τεχνολογία αυτή αποτελεί σημαντικό εργαλείο βιοτεχνολογίας, που χρησιμοποιείται σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα, καθώς και σε κλινικές δοκιμές. Παρά τα σημαντικά της πλεονεκτήματα και την ποικιλία των εφαρμογών που παρουσιάζει, η τεχνολογία CRISPR/Cas9 εμφανίζει ορισμένους περιορισμούς που εφιστούν την προσοχή των μελετητών. Η πιθανότητα πρόκλησης μεταλλάξεων εκτός στόχου, οι απορρέουσες επιπτώσεις για τα κύτταρα και οι διάφοροι ηθικοί προβληματισμοί που προκύπτουν από το ευρύ πεδίο εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνολογίας, αποτελούν σημεία που χρήζουν περαιτέρω μελέτης και αξιολόγησης. Η τελειοποίηση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9, ώστε να εμφανίζει τη μέγιστη εξειδίκευση, ασφάλεια και αποτελεσματικότητα, αποτελεί μελλοντική πρόκληση των επιστημόνων. Η ραγδαία χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 καθιστά σαφή το ρόλο της ως βιοτεχνολογικό εργαλείο. Η αποτελεσματική και ορθή εφαρμογή της κρίνεται αναγκαία για τη μεγιστοποίηση των δυνατοτήτων που προσφέρει στους τομείς της ιατρικής έρευνας και της γονιδιακής θεραπείας.

6. Βιβλιογραφία

1. Correa, P., *Gastric cancer: overview*. Gastroenterol Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 211-7.
2. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
3. Miyahara, R., et al., *Prevalence and prognosis of gastric cancer detected by screening in a large Japanese population: data from a single institute over 30 years*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(9): p. 1435-42.
4. Ang, T.L. and K.M. Fock, *Clinical epidemiology of gastric cancer*. Singapore Med J, 2014. **55**(12): p. 621-8.
5. Gore, R.M., *Gastric cancer. Clinical and pathologic features*. Radiol Clin North Am, 1997. **35**(2): p. 295-310.
6. Crew, K.D. and A.I. Neugut, *Epidemiology of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(3): p. 354-62.
7. Dicken, B.J., et al., *Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions*. Ann Surg, 2005. **241**(1): p. 27-39.
8. Censini, S., et al., *cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14648-53.
9. Zhao, Y., et al., *Gastric cancer: genome damaged by bugs*. Oncogene, 2020. **39**(17): p. 3427-3442.
10. Correa, P., *Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention*. Cancer Res, 1992. **52**(24): p. 6735-40.
11. Camargo, M.C., et al., *Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(9): p. 1674-87.
12. Chong, Y., et al., *DNA methylation status of a distinctively different subset of genes is associated with each histologic Lauren classification subtype in early gastric carcinogenesis*. Oncol Rep, 2014. **31**(6): p. 2535-44.
13. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
14. Garattini, S.K., et al., *Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications*. World J Gastrointest Oncol, 2017. **9**(5): p. 194-208.

15. Chen, B.J., et al., *PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(13): p. 3462-73.
16. Sadowski, D.C. and L. Rabeneck, *Gastric ulcers at endoscopy: brush, biopsy, or both?* Am J Gastroenterol, 1997. **92**(4): p. 608-13.
17. Kung, J.T., D. Colognori, and J.T. Lee, *Long noncoding RNAs: past, present, and future*. Genetics, 2013. **193**(3): p. 651-69.
18. Wu, H., L. Yang, and L.L. Chen, *The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation*. Trends Genet, 2017. **33**(8): p. 540-552.
19. Chan, J.J. and Y. Tay, *Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(5).
20. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
21. Morris, K.V. and J.S. Mattick, *The rise of regulatory RNA*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(6): p. 423-37.
22. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
23. Kitagawa, M., et al., *Cell cycle regulation by long non-coding RNAs*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(24): p. 4785-94.
24. Martianov, I., et al., *Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 666-70.
25. Campalans, A., A. Kondorosi, and M. Crespi, *Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in Medicago truncatula*. Plant Cell, 2004. **16**(4): p. 1047-59.
26. Reeves, M.B., et al., *Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1345-8.
27. Loewer, S., et al., *Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells*. Nat Genet, 2010. **42**(12): p. 1113-7.
28. Sheik Mohamed, J., et al., *Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells*. RNA, 2010. **16**(2): p. 324-37.
29. Wapinski, O. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNAs and human disease*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(6): p. 354-61.
30. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.

31. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
32. Carrieri, C., et al., *Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 454-7.
33. Du, Z., et al., *Integrative analyses reveal a long noncoding RNA-mediated sponge regulatory network in prostate cancer*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10982.
34. Kugel, J.F. and J.A. Goodrich, *Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(4): p. 144-51.
35. Chen, K.H., et al., *RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells*. Science, 2015. **348**(6233): p. aaa6090.
36. Leucci, E., et al., *Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON*. Nature, 2016. **531**(7595): p. 518-22.
37. Mercer, T.R., et al., *The human mitochondrial transcriptome*. Cell, 2011. **146**(4): p. 645-58.
38. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCcation: lncRNA localization and function*. J Cell Biol, 2021. **220**(2).
39. Kashi, K., et al., *Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 3-15.
40. Yan, L., et al., *Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(9): p. 1131-9.
41. Huarte, M., *The emerging role of lncRNAs in cancer*. Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1253-61.
42. Vitiello, M., A. Tuccoli, and L. Poliseno, *Long non-coding RNAs in cancer: implications for personalized therapy*. Cell Oncol (Dordr), 2015. **38**(1): p. 17-28.
43. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm*. Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
44. Busuttil, R.A., et al., *Role of p53 in the progression of gastric cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(23): p. 12016-26.
45. Zhou, Z., et al., *Epigenetic regulation of long non-coding RNAs in gastric cancer*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19443-19458.
46. Quan, Y., et al., *Knockdown of long non-coding RNA MAP3K20 antisense RNA 1 inhibits gastric cancer growth through epigenetically regulating miR-375*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **497**(2): p. 527-534.
47. Li, Y., J. Gu, and H. Lu, *The GAS5/miR-222 Axis Regulates Proliferation of Gastric Cancer Cells Through the PTEN/Akt/mTOR Pathway*. Dig Dis Sci, 2017. **62**(12): p. 3426-3437.

48. Yuan, L., et al., *Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 96.
49. Shimada, H., et al., *Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association*. Gastric Cancer, 2014. **17**(1): p. 26-33.
50. Barlebo Ahlborn, L. and O. Ostrup, *Toward liquid biopsies in cancer treatment: application of circulating tumor DNA*. APMIS, 2019. **127**(5): p. 329-336.
51. Henriksen, K., et al., *The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2014. **10**(1): p. 115-31.
52. Xian, H.P., et al., *Circulating long non-coding RNAs HULC and ZNF1-AS1 are potential biomarkers in patients with gastric cancer*. Oncol Lett, 2018. **16**(4): p. 4689-4698.
53. Yang, Z., et al., *Plasma long noncoding RNAs PANDAR, FOXD2-AS1, and SMARCC2 as potential novel diagnostic biomarkers for gastric cancer*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 6175-6184.
54. Zhou, Q., et al., *Evaluation of C5orf66-AS1 as a Potential Biomarker for Predicting Early Gastric Cancer and Its Role in Gastric Carcinogenesis*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 2795-2805.
55. Leonova, E.I. and R.R. Gainetdinov, *CRISPR/Cas9 Technology in Translational Biomedicine*. Cell Physiol Biochem, 2020. **54**(3): p. 354-370.
56. Kozovska, Z., et al., *CRISPR: History and perspectives to the future*. Biomed Pharmacother, 2021. **141**: p. 111917.
57. Safari, F., et al., *CRISPR System: A High-throughput Toolbox for Research and Treatment of Parkinson's Disease*. Cell Mol Neurobiol, 2020. **40**(4): p. 477-493.
58. Nishimasu, H., et al., *Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA*. Cell, 2014. **156**(5): p. 935-49.
59. Hale, C.R., et al., *RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex*. Cell, 2009. **139**(5): p. 945-56.
60. Redman, M., et al., *What is CRISPR/Cas9?* Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2016. **101**(4): p. 213-5.
61. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-8.
62. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
63. Pougach, K., et al., *Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2010. **77**(6): p. 1367-79.
64. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.

65. Wang, S.W., et al., *Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer*. Mol Cancer, 2022. **21**(1): p. 57.
66. Wyman, C. and R. Kanaar, *DNA double-strand break repair: all's well that ends well*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 363-83.
67. Mladenov, E. and G. Iliakis, *Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways*. Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 61-72.
68. Wang, H., et al., *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. Cell, 2013. **153**(4): p. 910-8.
69. Perez, E.E., et al., *Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(7): p. 808-16.
70. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
71. Ran, F.A., et al., *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*. Cell, 2013. **154**(6): p. 1380-9.
72. Dianov, G.L. and U. Hubscher, *Mammalian base excision repair: the forgotten archangel*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(6): p. 3483-90.
73. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
74. Tang, J., et al., *Circulation long non-coding RNAs act as biomarkers for predicting tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2015. **6**(6): p. 4505-15.
75. Yang, Z., et al., *HULC and H19 Played Different Roles in Overall and Disease-Free Survival from Hepatocellular Carcinoma after Curative Hepatectomy: A Preliminary Analysis from Gene Expression Omnibus*. Dis Markers, 2015. **2015**: p. 191029.
76. Jin, C., et al., *Long non-coding RNA HULC as a novel serum biomarker for diagnosis and prognosis prediction of gastric cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(32): p. 51763-51772.
77. Mollanoori, H. and S. Teimourian, *Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy*. Biotechnol Lett, 2018. **40**(6): p. 907-914.
78. Zych, A.O., M. Bajor, and R. Zagozdzon, *Application of Genome Editing Techniques in Immunology*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018. **66**(4): p. 289-298.
79. Cyranoski, D., *CRISPR gene-editing tested in a person for the first time*. Nature, 2016. **539**(7630): p. 479.

80. Zhu, W., et al., *Knockout of EGFL6 by CRISPR/Cas9 Mediated Inhibition of Tumor Angiogenesis in Ovarian Cancer*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1451.
81. Shademan, B., et al., *CRISPR Technology in Cancer Diagnosis and Treatment: Opportunities and Challenges*. Biochem Genet, 2022. **60**(5): p. 1446-1470.
82. Shojaei Baghini, S., et al., *CRISPR/Cas9 application in cancer therapy: a pioneering genome editing tool*. Cell Mol Biol Lett, 2022. **27**(1): p. 35.
83. Lo, Y.H., et al., *A CRISPR/Cas9-Engineered ARID1A-Deficient Human Gastric Cancer Organoid Model Reveals Essential and Nonessential Modes of Oncogenic Transformation*. Cancer Discov, 2021. **11**(6): p. 1562-1581.
84. Lee, J., et al., *ESRP1-regulated isoform switching of LRRFIP2 determines metastasis of gastric cancer*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 6274.
85. Abouelnazar, F.A., et al., *SALL4 promotes angiogenesis in gastric cancer by regulating VEGF expression and targeting SALL4/VEGF pathway inhibits cancer progression*. Cancer Cell Int, 2023. **23**(1): p. 149.
86. Almeida, R.S., et al., *CRISPR/Cas9 Genome-Editing Technology and Potential Clinical Application in Gastric Cancer*. Genes (Basel), 2022. **13**(11).
87. Koo, T. and J.S. Kim, *Therapeutic applications of CRISPR RNA-guided genome editing*. Brief Funct Genomics, 2017. **16**(1): p. 38-45.
88. Roehm, P.C., et al., *Inhibition of HSV-1 Replication by Gene Editing Strategy*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23146.