



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

Χρήστος Χρ. Γιαννακάς

BSc. Βιοχημεία &
Βιοτεχνολογία

ΛΑΡΙΣΑ 2024

« ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΟΣ ΟΓΚΟΕΠΑΓΩΓΙΚΟΥ lncRNA ΣΕ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΜΕ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ CRISPR-
NICKASE KO Η/ΚΑΙ CRISPR-INHIBITION»

“DEACTIVATION OF AN ONCOGENIC lncRNA IN CANCER
CELL LINE WITH CRISPR-NICKASE KO AND/OR CRISPR-
INHIBITION TECHNOLOGY”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Σαμαρά Μαρία , Επίκουρος Καθηγήτρια (μόνιμη) Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Θώδου Ελένη, Επίκουρος Καθηγήτρια (επί θητεία), Ιατρός Κυτταρολόγος Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τις σπουδές μου στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, και στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Τοξικολογία», είχα τη μοναδική ευκαιρία και χαρά εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κυρίου Αντώνιου Γιακουντή.

Μια απροσδόκητη τροπή στον κύκλο σπουδών μου, είχε σαν αποτέλεσμα να βρεθώ στην αίθουσα διδασκαλίας του κυρίου Γιακουντή, που υπό διαφορετικές συνθήκες δε θα τον συναντούσα. Η στιγμή ήταν κομβική για εμένα, καθώς η προσωπικότητά του υπήρξε πηγή έμπνευσης και εσωτερικής αναζήτησης. Είμαι και θα παραμείνω πηγαία ευγνώμων για το πολύτιμο χρόνο του, την ουσιαστική καθοδήγηση, τις αναλυτικές συζητήσεις μαζί του για ερευνητικές ανησυχίες, καθώς και την αμέριστη υπομονή και κατανόηση που έδειξε προς το πρόσωπό μου, σε μία περίοδο κρίσιμη που το είχα ανάγκη. Τον ευχαριστώ βαθύτατα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε αυτό το εργαστήριο.

Είμαι επίσης ευγνώμων για το περιβάλλον, στο οποίο μου επέτρεψε να βρεθώ ο κύριος Γιακουντής. Η ομάδα που στελέχωνε το εργαστήριο, την περίοδο που εκπόνησα τη διπλωματική μου, ήταν αντιπροσωπευτική των αξιών του: άτομα ευγενή, ικανότατα, εργατικά και με ξεχωριστή προσωπικότητα. Έχω την επιθυμία να τα ευχαριστήσω ξεχωριστά.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω εγκάρδιες ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Ελένη-Ροντιόλα Μπεγκόλλι, η οποία με καθοδήγησε και με εκπάιδευσε στο εργαστήριο. Διαθέτει έναν εξαιρετικό τρόπο εκμάθησης που με προετοίμασε για να λειτουργώ αυτόνομα και με αυτοπεποίθηση. Υπήρξε δίπλα μου σε κάθε βήμα της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, από την αρχή μέχρι και το τέλος. Η συμβολή της στην περάτωση της εργασίας ήταν τουλάχιστον καίρια. Είμαι ευγνώμων για τα μηνύματα που μου μετέφερε, τόσο ως ερευνήτρια, όσο και ως άνθρωπος. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, θέλω να εκφράσω και προς την υποψήφια διδάκτορα Μυρτώ Χατζηαγγέλου, η οποία στάθηκε δίπλα μου και με καθοδήγησε σε τεχνικά θέματα κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Αξιομνημόνευτα στοιχεία της θα παραμείνουν οι γνώσεις, ο ζήλος της να βοηθά, η ευγένεια του χαρακτήρα της και η αστείρευτη θετική διάθεση, η οποία ήταν άκρως μεταδοτική στα μέλη του εργαστηρίου. Ένα ακόμη άτομο που υπήρξε συνεκτικός κρίκος και στην οποία χρωστάω ευγνωμοσύνη, είναι η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Σταμπούλογλου. Η οργάνωσή της, η ανταλλαγή πληροφοριών, η βοήθεια που παρείχε και το άφθονο χιούμορ της, άφησαν ένα πολύ χαρμόσυνο αποτύπωμα κατά τη συνύπαρξή μας στο εργαστήριο. Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω να αναφερθώ στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες, Μαριλένα Μοσχοπούλου και Πολυξένη Γοργιά, με τις οποίες εκπονήσαμε ταυτόχρονα τις διπλωματικές μας εργασίες. Εμπιστοσύνη, αλληλοϋποστήριξη και φιλία. Αυτές είναι οι αξίες που αποκόμισα από τη συνεργασία μαζί τους στο εργαστήριο και είμαι ειλικρινά ευγνώμων που είχα την ευκαιρία να συνυπάρξω μαζί τους. Είναι κάτι σπάνιο και σπουδαίο. Γνώρισα δύο ανθρώπους ικανότατους, ευαίσθητους, πολυμαθείς και δυναμικούς. Σας ευχαριστώ ειλικρινά, για όλα.

Κλείνοντας την εκτενή αυτή αναφορά, δε θα μπορούσα να παραλείψω την αναφορά στους πολυαγαπημένους μου γονείς, τη γλυκύτατη αδερφή μου και τα προσφιλή μου πρόσωπα. Όλοι αυτοί, με τον τρόπο του ο καθένας, με στήριξαν ποικιλοτρόπως, πίστεψαν σε μένα, μου έδωσαν δύναμη και με ώθησαν να ξεπεράσω τα όρια μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική νόσος με υψηλό ποσοστό εμφάνισης στον παγκόσμιο πληθυσμό, και αποτελεί την τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Το μείζον πρόβλημα στη συγκεκριμένη μορφή καρκίνου είναι ο ασυμπτωματικός χαρακτήρας στα πρώιμα στάδια εμφάνισης της νόσου, σε συνδυασμό με την έλλειψη αξιόπιστων βιοδεικτών για την ανίχνευσή του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου να γίνεται σε προχωρημένα στάδια, το οποίο συνοδεύεται από κακή απόκριση στα διαθέσιμα θεραπευτικά σχήματα και τελικά κακή πρόγνωση για την επιβίωση των ασθενών. Είναι λοιπόν αναγκαίο να βρεθούν βιοδείκτες, αρκετά ευαίσθητοι και ειδικοί, που να επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση. Η εξελίξεις στον τομέα της μεταγραφομικής, έχουν αποκαλύψει τη σπουδαιότητα των μακρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (lncRNAs). Τα lncRNAs συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός θάνατος και η απόπτωση, δρώντας ως ρυθμιστές της έκφρασης σε ογκοεπαγωγικά και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έχει επίσης βρεθεί ότι στους κακοήθεις όγκους όπου οι κυτταρικές διεργασίες διαταράσσονται, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής τους, είναι ανάλογες της προόδου της νόσου. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των lncRNAs είναι η υψηλή ιστοειδικότητα και η παρουσία τους στα βιολογικά υγρά. Ο συνδυασμός των παραπάνω στοιχείων, καθιστά τα lncRNAs ιδανικούς βιοδείκτες για την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, είναι απαραίτητος ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της δράσης των lncRNAs. Αξιοποιώντας εργαλεία γενετικής τροποποίησης, όπως το CRISPR-Cas9, είναι δυνατή η δημιουργία κυτταρικών σειρών-μοντέλων για τη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων στόχων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ο στόχος ήταν η απενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου με δύο διαφορετικές τεχνολογίες CRISPR. Το πρώτο εργαλείο αφορούσε τη σίγηση γονιδίων μέσω της τεχνολογίας CRISPR-inhibition, όπου κύτταρα AGS μετασχηματίστηκαν με τη χρήση λεντιικών φορέων, ώστε να εκφράζουν σταθερά το σύστημα dCas9-KRAB-MeCP2. Το δεύτερο εργαλείο που εξετάστηκε ήταν η σίγηση γονιδίου μέσω CRISPR-knock out, όπου κύτταρα AGS μετασχηματίστηκαν με τη χρήση λεντιικών φορέων, οι οποίοι εισήγαγαν το σύστημα Cas9-gRNA. Το gRNA ήταν σχεδιασμένο ώστε να στοχεύει την περιοχή του υποκινητή του ογκοεπαγωγικού γονιδίου lncRNA RECUR1, με σκοπό την ολική απενεργοποίηση της έκφρασής του.

ABSTRACT

Gastric cancer is a multifactorial disease with a high incidence rate worldwide, ranking as the third most common cause of cancer-related deaths. The major problem with this type of cancer is its asymptomatic nature in early stages of the disease, combined with the lack of reliable biomarkers for its detection. As a result, the detection of gastric cancer often occurs at advanced stages, leading to poor response to available therapeutic regimens and ultimately poor prognosis for patient survival. Therefore, it is necessary to identify biomarkers that are sensitive and specific enough to allow for early diagnosis. Advances in the field of transcriptomics have revealed the importance of long non-coding RNA molecules (lncRNAs). lncRNAs participate in fundamental cellular processes such as cell proliferation, cell death, and differentiation, acting as regulators of gene expression in oncogenic and tumor-suppressive genes. It has also been found that in cancerous tumors where cellular processes are disrupted, changes in their expression levels are proportional to disease progression. Another characteristic of lncRNAs is their high tissue specificity and their presence in biological fluids. The combination of these factors makes lncRNAs ideal biomarkers for the detection of gastric cancer.

To achieve this goal, functional characterization of lncRNA action is necessary. By leveraging genetic modification tools such as CRISPR-Cas9, it is possible to create cell line models for studying gene function. In this thesis, the objective was to deactivate an oncogene using two different CRISPR technologies. The first tool involved gene silencing through CRISPR-inhibition technology, where AGS cells were transformed using lentiviral vectors to stably express the dCas9-KRAB-MeCP2 system. The second tool examined was gene silencing through CRISPR-knockout, where AGS cells were transformed using lentiviral vectors introducing the Cas9-gRNA system. The gRNA was designed to target the promoter region of the oncogenic lncRNA RECUR1 gene, aiming for complete silencing of its expression.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Γαστρικός καρκίνος
 - 1.1.1 Επιδημιολογία κι παράγοντες κινδύνου
 - 1.1.2 Ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου
 - 1.1.3 Προκλήσεις Γαστρικού καρκίνου
- 1.2 Μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (lncRNAs) – Χαρακτηριστικά και Ταξινόμηση
 - 1.2.1. Λειτουργικός ρόλος των lncRNAs
 - 1.2.2. Τα lncRNAs στο Γαστρικό Καρκίνο
 - 1.2.3. Χρήση των lncRNAs ως βιοδείκτες
 - 1.2.4. Εργαλεία μελέτης των lncRNAs- Λειτουργικός Χαρακτηρισμός
- 1.3. Εργαλεία Γενετικής Τροποποίησης
 - 1.3.1. CRISPR-Cas9
 - 1.3.2. CRISPR Inhibition
 - 1.3.3. CRISPR Activation

2. Σκοπός Εργασίας:

3. Υλικά & Μέθοδοι

- 3.1 κυτταρικές σειρές
- 3.2 πλασμίδια
- 3.3 Απομόνωση RNA
- 3.4 Κατεργασία με DNAase
- 3.5 Σύνθεση cDNA
- 3.6 Αντίδραση ποσοτικής PCR (qPCR)
- 3.7 Αντίδραση PCR
- 3.8 Western Blot
- 3.9 Απομόνωση DNA

4. Αποτελέσματα

- 4.1 Εργαλείο KRAB
- 4.2 Ανάλυση πρωτεϊνικών Cas9 επιπέδων με Western Blot
- 4.3 Εργαλείο PX333

5. Συζήτηση

6. Βιβλιογραφία

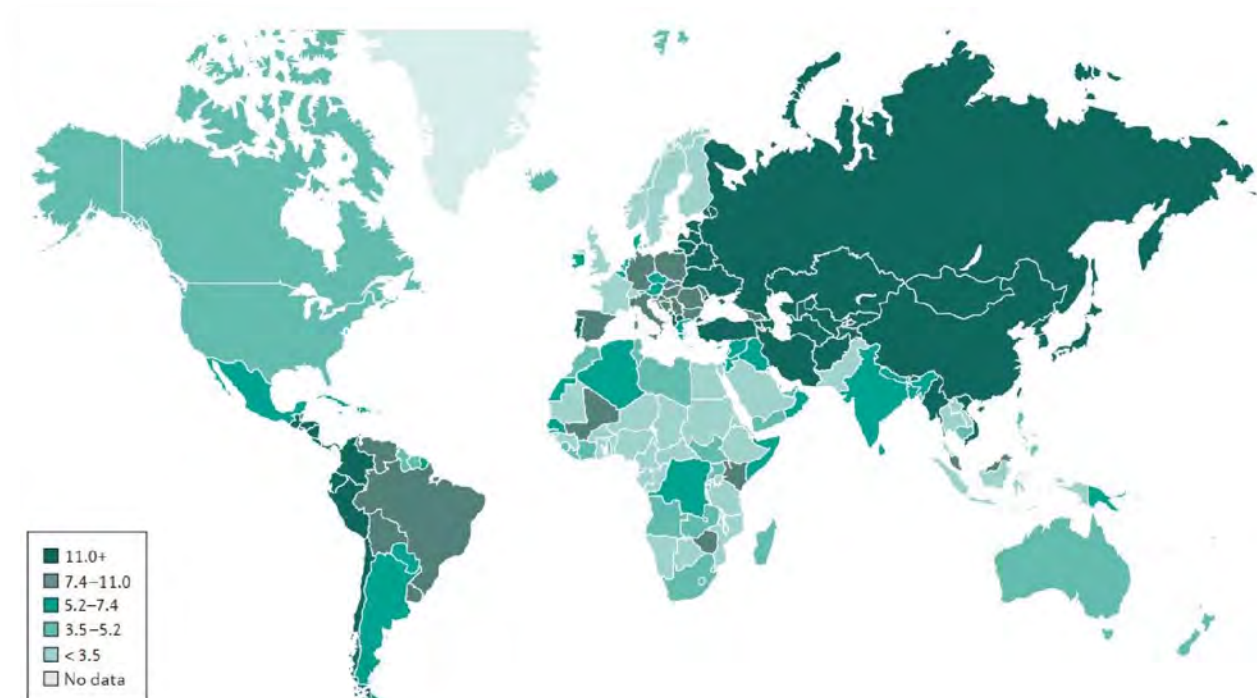
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΑΣΤΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1.1 Επιδημιολογία και Παράγοντες Κινδύνου

Πιο συγκεκριμένα, ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή κακοηθειών στο στομάχι [2]. Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου, έως και ~95%, αφορά το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (Gastric Adenocarcinoma - GAC) [3]. Η ασθένεια εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια τόσο ως προς την κλινική εικόνα, όσο και προς τον γονότυπο, καθιστώντας δύσκολη την κατηγοριοποίηση των διαφόρων υπότυπων της. Σύμφωνα με τα στοιχεία από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), σε παγκόσμιο επίπεδο, ο Γαστρικός καρκίνος επιβαρύνει σημαντικά τα συστήματα υγείας, καθότι αποτελεί την 5^η πιο συχνή μορφή εμφάνισης καρκίνου και την 3^η πιο συχνή αιτία θανάτου [4]. Μόνο το 2020, οι θάνατοι από ΓΚ, ανήλθαν σε 760.000. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το 2023 αναμένεται να διαγνωσθούν περισσότεροι από 20.000 ασθενείς, ενώ περίπου 16.000 πρόκειται να υποκύψουν στη νόσο [5, 6]. Υπάρχει διαφοροποίηση ανάμεσα στα δύο φύλα, με τους άνδρες να προσβάλλονται σε διπλάσιο βαθμό σε σχέση με τις γυναίκες [3]. Στους άντρες αποτελεί την 3^η πιο συχνή μορφή καρκίνου, ενώ στις γυναίκες την 4^η [4]. Όσον αφορά τη γεωγραφική κατανομή, έχει παρατηρηθεί μια σταθεροποίηση σε ανεπτυγμένες χώρες, σε αντίθεση με τις αναπτυσσόμενες χώρες και χώρες της Ασιατικής ηπείρου, της κεντρικής Ευρώπης και της Νότιας Αμερικής, όπου τα ποσοστά παραμένουν υψηλά [7, 8] (**Εικόνα 1**). Τα στοιχεία για το προσδόκιμο ζωής όσων έρχονται αντιμέτωποι με τη προκειμένη ασθένεια, δεν είναι καθόλου ενθαρρυντικά. [9] Σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, γενετική ετερογένεια των όγκων και οι μεταστάσεις, καθιστούν τις φαρμακευτικές και χειρουργικές προσεγγίσεις

Εικόνα 1: Η επιδημιολογία της νόσου, όπως διακρίνεται από τη γεωγραφική της κατανομή. Συχνότητα



εμφάνισης της νόσου ανά 100.000, άνδρες και γυναίκες μεικτά [8].

αναποτελεσματικές, με το προσδόκιμο να μειώνεται δραματικά στους 9-10 μήνες ζωής [3, 6].

Παράγοντες κινδύνου

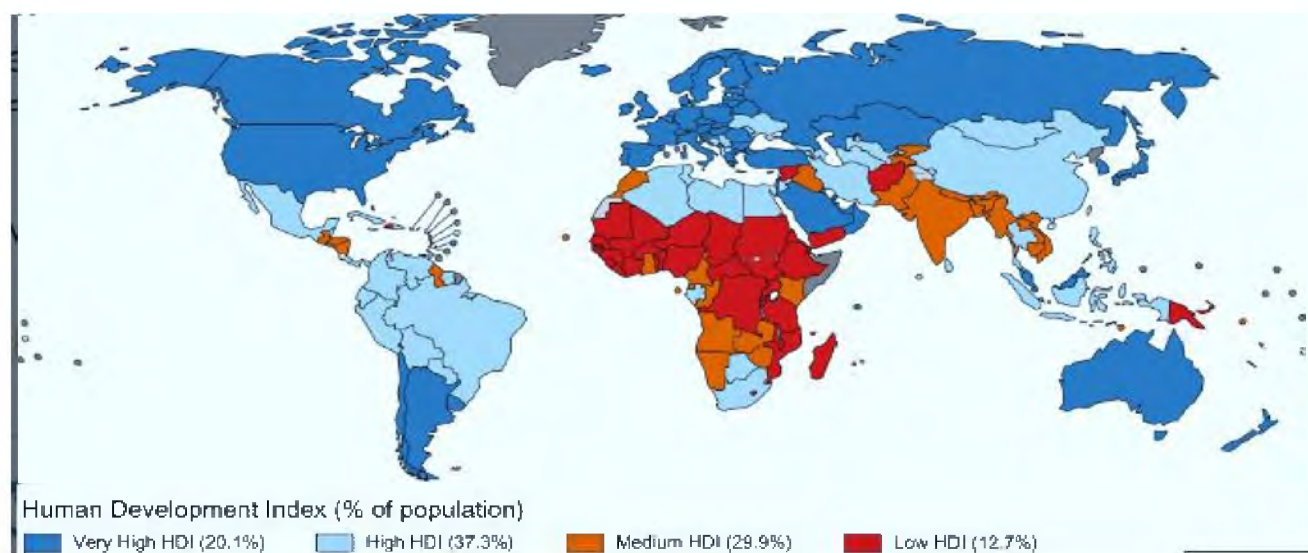
Οι παράγοντες κινδύνου που ευνοούν την εμφάνιση του ΓΚ διακρίνονται κατά βάση σε γενετικούς και σε περιβαλλοντικούς.

Γενετικοί:

Η κληρονομικότητα του Γαστρικού Αδενοκαρκινώματος αφορά ένα πολύ μικρό ποσοστό των ασθενών. Ο τρόπος κληρονομής είναι αυτοσωμικός επικρατής. [10]. Σχετίζεται με μεταλλάξεις σε γονίδια της γαμετικής κυτταρικής σειράς, όπως μετάλλαξη στο γονίδιο *CDH1*, μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA *MLH1* και *CTNNA1* και μεταλλάξεις απενεργοποίησης στα γονίδια *BRCA*. Το κοινό των παραπάνω γονιδίων είναι πως κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ογκοκατασταλτική δράση. Τα γονίδια *CDH1*, *MLH1* και *CTNNA1* κωδικοποιούν τη μεταγραφή πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην κυτταρική συγκόλληση (cell adhesion) και συνοχή των ιστών, όπως η πρωτεΐνη cadherin 1 (E-cadherin) και catenin a1. Τα γονίδια *BRCA* κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA [10, 11]. Οι παραπάνω μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με αυξημένη προδιάθεση εμφάνισης της νόσου στα μέλη των οικογενειών που τις φέρουν [11].

Περιβαλλοντικοί

Το περιβάλλον και οι συνθήκες διαβίωσης φαίνεται πως σχετίζονται με τα περιστατικά εμφάνισης του ΓΚ. Σύμφωνα με μελέτες, η προσβολή από παθογόνα, όπως το *Helicobacter pylori* και ο ιός Epstein-Barr (EBV), συνδέεται άρρηκτα με την εμφάνιση της νόσου, λόγω χρόνιας φλεγμονής στο βλεννογόνο του στομάχου [3]. Η συσχέτιση αυτή ενισχύεται, καθότι έχει καταδειχθεί πως σε περιοχές όπου υπήρξε καταπολέμηση της διασποράς παθογόνων και οι συνθήκες υγιεινής βελτιώθηκαν, διαπιστώθηκε μείωση στα κρούσματα εμφάνισης γαστρικού αδενοκαρκινώματος [12]. Η εμφάνιση της νόσου είναι ανάλογη του δείκτη ανάπτυξης μιας γεωγραφικής περιοχής. Οι κακές συνθήκες διαβίωσης εντείνουν τους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ΓΚ [13] (**εικόνα 2**).



ΕΙΚΟΝΑ 2: Παγκόσμια στατιστική ανάλυση για τον καρκίνο, 2020. Οι εκτιμήσεις του GLOBOCAN για τη συχνότητα εμφάνισης και τη θνησιμότητα 36 τύπων καρκίνου, σε 185 χώρες.

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί πως σημαντική επίδραση στην εμφάνιση του ΓΚ έχουν η διατροφή και η καθαρότητα του νερού, η αυξημένη κατανάλωση αλατος, η έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ενώσεις, (λιπάσματα, βιομηχανικά απόβλητα), το αυξημένο σωματικό βάρος και το κάπνισμα [3, 14, 15].

Στάδια της νόσου

Οι παράγοντες κινδύνου που αναφέρθηκαν παραπάνω αυξάνουν τις πιθανότητες για μεταλλάξεις που τελικά θα οδηγήσουν σε κακοήθεις νεοπλασίες. Τα στάδια αυτά αποτελούν προκαρκινωμάτωσης καταστάσεις που ευνοούν την εμφάνιση του ΓΚ. Τέτοιες καταστάσεις είναι:

- 1) Χρόνια ατροφική γαστρίτιδα, και πιο συγκεκριμένα στο άντρο του στομάχου
- 2) Αδενωμάτωσης γαστρικοί πολύποδες
- 3) Δυσπλαστικές αλλοιώσεις του γαστρικού επιθηλίου
- 4) Εντερική μεταπλασία του γαστρικού βλεννογόνου.

1.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΓΑΣΤΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ιστοπαθολογική:

Για την αρτιότερη διάγνωση και θεραπεία ασθενών με καρκίνο του στομάχου, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός σαφώς καθορισμένου συστήματος ταξινόμησης. Η μεγάλη ποικιλομορφία στα γονοτυπικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων, έχει οδηγήσει σε διάφορα μοντέλα ταξινόμησης, ανάλογα με [3, 15]:

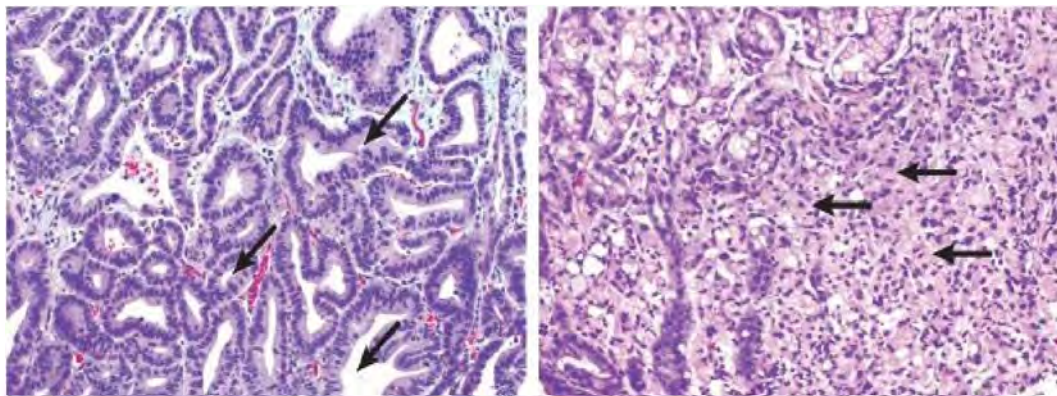
- την ανατομική θέση εμφάνισης του όγκου (ΓΚ καρδιακής μοίρας, μη-καρδιακός ΓΚ, θόλος στομάχου, άντρο)
- τα ιστοπαθολογικά γνωρίσματα
- τις μοριακές διαφοροποιήσεις του όγκου

Ταξινόμηση κατά Lauren:

Το 1965 προτάθηκε το σύστημα ταξινόμησης κατά Laurén, το οποίο χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα [16, 17]. Σύμφωνα με αυτό, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διακρίνεται σε εντερικό και σε διάχυτο γαστρικό υπότυπο [9].

Στον εντερικό υπότυπο, τα κύτταρα του όγκου αναπτύσσονται σε σωληνοειδείς δομές, εμφανίζουν καλή κυτταρική συνοχή και σχηματίζουν συμπαγείς όγκους με σαφή όρια εξάπλωσης (**Εικόνα 3-αριστερά**). Προσβάλλει συχνά το άντρο του στομάχου και αναπτύσσεται σε έδαφος εντερικής μεταπλασίας του γαστρικού βλεννογόνου. Επίσης αυτός ο τύπος καρκίνου έχει την ικανότητα να μεθίσταται μέσω της αγγειακής και λεμφικής κυκλοφορίας [18]. Η πιο συχνή αιτία εμφάνισης αυτού του τύπου είναι προσβολή από το παθογόνο *H.pylori*, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η διατροφή και η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες. Τα στάδια εμφάνισης περιλαμβάνουν ατροφική γαστρίτιδα, εντερική μεταπλασία, δυσπλασία και τελικά γαστρικό καρκίνο [18].

Αντιθέτως, στον διάχυτο υπότυπο τα καρκινικά κύτταρα δεν σχηματίζουν συμπαγείς όγκους. Διεισδύουν στα στρώματα του στομάχου ως μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων,



Εικόνα 3: Ιστολογική ταξινόμηση γαστρικού αδενοκαρκινώματος κατά Lauren (χρώση αιματοξυλίνη/ εωσίνης). Αριστερά: Εντερικός τύπος. Δεξιά: Διάχυτος τύπος

με αποτέλεσμα ο όγκος να αποτελείται από πληθυσμό μη συνεκτικών διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων (**εικόνα 3-δεξιά**) [18]. Ο υπότυπος αυτός ξεκινά από κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου και συνδέεται με γαστρίτιδα. Είναι αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής του βλεννογόνου, παρακάμπτοντας τα ενδιάμεσα στάδια στην πορεία καρκινογένεσης, και οδηγεί απευθείας στο τελικό στάδιο [17, 18].

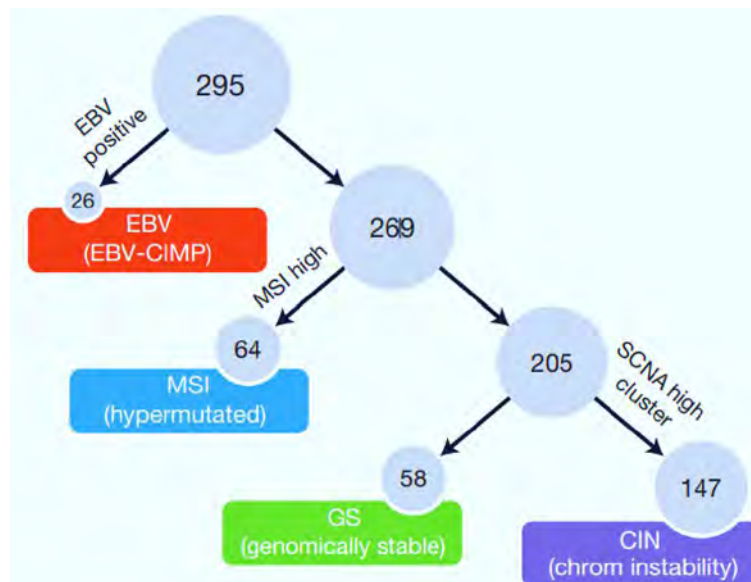
Ταξινόμηση Κατά Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO)

Συμπληρωματικά με την ταξινόμηση κατά Lauren, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει συντάξει μια πιο αναλυτική λίστα ταξινόμησης των διάφορων ειδών τύπου ΓΚ, η οποία περιλαμβάνει και άλλους υπότυπους με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης. Πιο συγκεκριμένα, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα κατατάσσεται σε τέσσερις υπότυπους: θηλώδες, σωληνοειδές, βλενώδες και μεικτού τύπου [16]. Στην παρούσα ταξινόμηση, ο πιο συχνός τύπος εμφάνισης, είναι το σωληνοειδές γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Ασθενείς με θηλώδες αδενοκαρκίνωμα, έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζουν υψηλά ποσοστά μεταστάσεων των όγκων, και έχουν χειρότερη έκβαση της νόσου.

Το πρόβλημα που προκύπτει από την ταξινόμηση βάσει ιστοπαθολογικών κριτηρίων είναι ότι, ενώ μπορούν να παρέχουν μια κατεύθυνση για διάγνωση και χειρουργική επέμβαση, δεν βοηθούν στην εξατομικευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση. Η μεγάλη ετερογένεια που εμφανίζει ο ΓΚ σε επίπεδο μοριακής βιολογίας, καθιστά αναγκαία τη διάκριση των διαφόρων τύπων του βάσει του μοριακού τους αποτυπώματος.

Μοριακή Ταξινόμηση:

Οι διαρκείς έρευνες και η πρόοδος στην αλληλούχηση του γονιδιώματος (Αλληλούχηση Νέας Γενιάς - NGS) αποφέρουν πληθώρα νέων αποτελεσμάτων, τα οποία εμπλουτίζουν την εικόνα της μοριακής βάσης του ΓΚ. Μέχρι στιγμής έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη σταθερότητα του γονιδιώματος, με αναδιατάξεις στη χρωματίνη και με την κυτταρική συνοχή. [19].



Εικόνα 4: Διάγραμμα ροής που απεικονίζει την μοριακή ταξινόμηση των διάφορων υπότυπων γαστρικού αδενοκαρκινώματος [20].

Για τις ανάγκες μιας πιο σαφούς και πλήρους ταξινόμησης, αλλά και πιο στοχευμένης φαρμακευτικής προσέγγισης, η κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA) προέβη σε αξιολόγηση των μοριακών ευρημάτων των τελευταίων ετών. Συγκεντρώθηκαν αποτελέσματα από έξι διαφορετικές βάσεις δεδομένων, αναλύθηκαν τα δεδομένα γαστρικού καρκίνου από 295 ασθενείς για διαταραχές σε σηματοδοτικά μονοπάτια και γονιδιακές μεταλλάξεις και εν τέλει προτάθηκαν τέσσερις μοριακοί υπότυποι του ΓΚ [20, 21]

1. Όγκοι θετικοί σε μόλυνση από τον ιό Epstein-Barr (EBV): Ο EBV μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος και το 90% των φορέων, δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Σε κάποιες όμως περιπτώσεις, υπό αδιευκρίνιστες ακόμα συνθήκες, ο ιός προσβάλλει κύτταρα του επιθηλιακού ιστού και μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση [22]. Οι EBV+ όγκοι έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζουν αυξημένη υπερμεθυλίωση χρωματίνης στις περιοχές των υποκινητών, όπως για παράδειγμα στον υποκινητή του γονιδίου *CDKN2A*, το οποίο κωδικοποιεί για πρωτεΐνες (p16 και p14) που έχουν κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση και την απόπτωση, κι επομένως με ογκοτασταλατική δράση. Το συγκεκριμένο μοτίβο βρέθηκε σε όλους τους όγκους, θετικούς στον EBV [23]. Βρέθηκαν επίσης σε αυξημένη συχνότητα, μεταλλάξεις στα γονίδια *PIK3CA*, *ARID1A* και *BCOR*, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετάφραση πρωτεϊνών και τον κυτταρικό κύκλο. [24]. Το μετάγραφο του γονιδίου *PIK3CA* είναι η πρωτεΐνη p110α, η οποία αποτελεί υπομονάδα της κινάσης PI3K. Η PI3K εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια της κυτταρικής ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και επιβίωσης. Το γονίδιο *ARID1A* συμμετέχει στη γονιδιακή ρύθμιση μέσω αναδιάταξης της χρωματίνης. Τέλος, το *BCOR* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με αντιαποπτωτική λειτουργία. Αυτός ο τύπος καρκίνου εμφανίζεται κυρίως στο θόλο και το σώμα του στομάχου [25].
2. Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια – Chromosomal Instability (CIN): Σε αυτό τον υπότυπο, ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται από αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδιώματος (ανευπλουδία), καθώς και μεταβολές σε διάφορες χρωμοσωμικές επικράτειες, όπως μεταθέσεις, ενισχύσεις, διαγραφές ή απώλεια ετεροζυγωτίας. Συχνά, οι CIN+ όγκοι εμφανίζουν ενίσχυση στην έκφραση γονιδίων, όπως *EGFR*, *HER2*, *HER3*, *JAK2*, *FGFR2*, *MET*, *PIK3CA* και *KRAS/NRAS* [25]. Επίσης παρατηρείται ενεργοποίηση του μονοπατιού κινάσης τυροσίνης RTK/RAS, επηρεάζοντας γονίδια όπως *VEGFA*, *ERBB2* και *EBB3* [21], επάγοντας την αγγειογένεση στον

όγκο. Εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή της γαστροοισοφαγικής συμβολής του καρδίας του στομάχου.

3. Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability-MSI): Στη συγκεκριμένη περίπτωση καρκίνου, είναι χαρακτηριστική η μεταβολή του γονιδιώματος, με τη δημιουργία επαναλαμβανόμενων μικροδορυφόρων, οι οποίοι προκαλούνται από απώλεια DNA κατά την επιδιόρθωση μη-συμπληρωματικών ζευγών βάσεων [25]. Ο υπότυπος MSI έχει συσχετιστεί με την παρουσία υπερμεταλλάξεων σε γονίδια όπως τα *KRAS*, *ALK*, *ARID1A* του μονοπατιού της PI3K. Εντοπίζεται κυρίως στο άντρο του στομάχου.
4. Όγκοι με γονιδιωματική σταθερότητα: Σε αυτό τον υπότυπο γαστρικού αδενοκαρκινώματος, δεν παρατηρούνται εκτεταμένες μεταβολές στο γονιδίωμα του κυττάρου. Στην ταξινόμηση κατά Lauren, αντιστοιχούν στο διάχυτο τύπο ΓΚ [22]. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *RHOA* (*ras homolog gene family member A*), μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1* και ανακατατάξεις στα γονίδια *CLDN18-ARHGAP*. Οι παραπάνω μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη κυτταρική συγκόλληση και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων στους γύρω ιστούς [21, 22]

1.1.3. Προκλήσεις Γαστρικού καρκίνου

Η ανίχνευση του Γαστρικού Καρκίνου σε πρώιμα στάδια είναι δύσκολη και συνήθως εντοπίζεται όταν τα συμπτώματα γίνουν εντονότερα. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου όμως, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν παρουσιάζουν ικανοποιητικό ποσοστό επιτυχίας. Η ασθένεια εμφανίζει μεγάλη βιολογική και γενετική ετερογένεια, όπου κάθε ασθενής φαίνεται να έχει διαφορετικό γενετικό και μοριακό προφίλ στην εξέλιξη της νόσου. [26]. Αυτό αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τη συμβατική φαρμακευτική προσέγγιση λόγω μη ειδικής στόχευσης. Η εναλλακτική της χειρουργικής επέμβασης ενέχει κινδύνους και δεν είναι αποτελεσματική σε όλους τους υπότυπους του ΓΚ. Η πιο συνήθης μέθοδος διάγνωσης είναι η ενδοσκόπηση με ταυτόχρονη λήψη ιστού για βιοψία, αλλά κι αυτή η μέθοδος είναι επιρρεπής σε πρόκληση τραυματισμών [9]. Το προσδόκιμο ζωής των ασθενών δεν ξεπερνά κατά μέσο όρο τα πέντε έτη και είναι επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέων μη επεμβατικών διαγνωστικών βιοδεικτών.

Σε χώρες όπως η Ιαπωνία, όπου ο ΓΚ είναι ο πρώτος σε αιτία θανάτου από καρκίνο, έχουν θεσμοθετηθεί αυστηρά πρωτόκολλα ανίχνευσης και διάγνωσης του ΓΚ. Ο πληθυσμός χωρίζεται σε κατηγορίες με βάση την πιθανότητα εμφάνισης και υποβάλλεται μαζικά σε εξετάσεις με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση [9]. Αξιοποιούνται μέθοδοι όπως, φθοροφωτογραφία, ενδοσκόπηση, ανάλυση πεπσινογόνου και γκρελίνης από το γαστρικό βλεννογόνο και ανίχνευση αντισωμάτων για *H.pylori*. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα από το 1985 έως και το 2005 να μειωθούν σημαντικά οι θάνατοι από ΓΚ [27].

Είναι επομένως ανάγκη να αναπτυχθούν διαγνωστικοί βιοδείκτες, ειδικοί για το γαστρικό καρκίνο και τους υπότυπούς του, που θα επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση και εν δυνάμει ιστοειδική στόχευση των καρκινικών κυττάρων του ΓΚ..

1.2 Μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) -

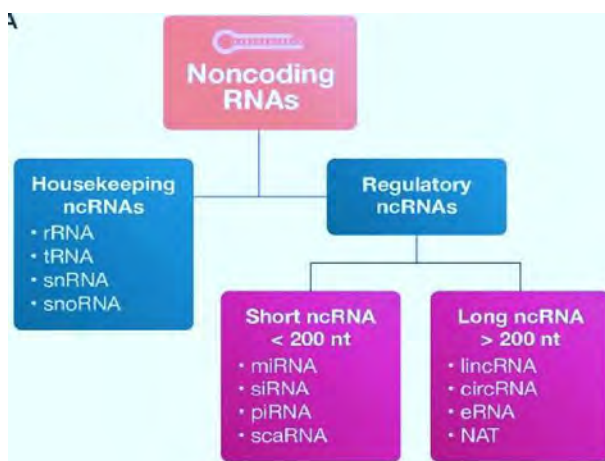
Χαρακτηριστικά και ταξινόμηση

Το RNA έχει υπάρξει στο επίκεντρο των ερευνών της μοριακής βιολογίας για δεκαετίες. Σύμφωνα με τα ευρήματα της αναπτυξιακής βιολογίας, το RNA υπήρξε το πρωταρχικό μόριο της ζωής στη γη, έχοντας την ικανότητα να μεταβιβάζει τη γενετική πληροφορία και να δρα καταλυτικά σε αντιδράσεις [28]. Οι λειτουργίες αυτές στην πορεία της εξέλιξης μεταβιβάστηκαν σε πιο σταθερά μόρια, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες. Η ιδέα πως το RNA έχει μόνο ρόλο μεταβατικό μεταξύ DNA-πρωτεϊνών προέκυψε πρόσφατα, τις δεκαετίες 1940 και 1950, με την υπόθεση «ένα γονίδιο-μία πρωτεΐνη» και με την ανάπτυξη του Κεντρικού δόγματος της Βιολογίας από τον F.Crick. Ωστόσο, πολύ σύντομα τα ευρήματα στα πεδία της

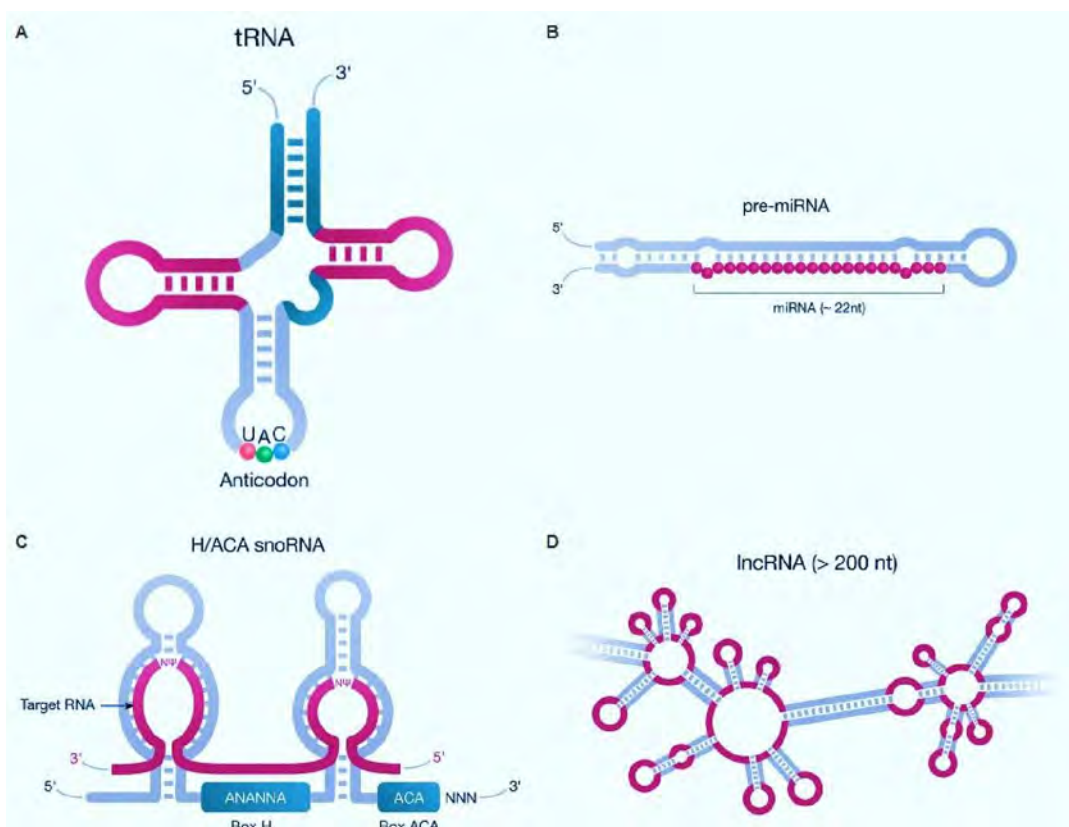
γενετικής και της μοριακής βιολογίας απέδειξαν πως το RNA δε λειτουργεί μονάχα ως μόριο-αγγελιαφόρος μεταξύ DNA-πρωτεϊνών, αλλά συμμετέχει ενεργά στη γονιδιακή ρύθμιση και έκφραση, λαμβάνοντας μέρος στις διαδικασίες επιγενετικού ελέγχου της κυτταρική διαφοροποίησης και ανάπτυξης [28].

Τα μόρια RNA διακρίνονται σε κωδικοποιητικά (messenger RNA, mRNA) και μη-κωδικοποιητικά (non-coding RNA, ncRNA) (**Εικόνα 5**). Το mRNA, που μεταφράζεται σε πρωτεΐνες, αποτελεί μονάχα το 1,6% του συνολικού ανθρώπινου μεταγραφώματος. Τα μη-κωδικοποιητικά RNA διακρίνονται σε επιμέρους κατηγορίες, ανάλογα τον τρόπο δράσης τους: στα ιδιόσυστα ncRNAs (tRNA, rRNA, snRNA) και στα ρυθμιστικά ncRNAs [29]. Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στο χαρακτηρισμό και τη λειτουργία των μακρών μη-κωδικοποιητικών RNA (lncRNAs), τα οποία είναι υποκατηγορία των ρυθμιστικών ncRNAs και έρευνες καταδεικνύουν τη σημασία τους στην κυτταρική ρύθμιση και ανάπτυξη [30].

Πρόκειται για μια ομάδα ετερογενών μορίων RNA με μήκος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Έχουν την ικανότητα να λειτουργούν είτε απευθείας ως μετάγραφα των γονιδίων τους, είτε μέσω ματίσματος (splicing) [30].



Εικόνα 5: Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τα είδη των μη-κωδικοποιητικών μορίων RNA (ncRNAs).
[Πηγή:<https://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/coding-non-coding-rna?ID=Q1070M70KWE7>]



Εικόνα 6: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των τεσσάρων βασικών κατηγοριών ncRNAs. A) transfer RNA (tRNA), B) πρώιμο miRNA και ώριμο microRNA (miRNA), C) μικρό πυρηνικό RNA (small nuclear RNA, snoRNA), D) μακρύ μη-κωδικοποιητικό RNA (lncRNA). [Πηγή: <https://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/coding-non-coding-rna?ID=Q1070M70KWE7>]

Η τάξη των lncRNAs αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα μη-κωδικοποιητικών μεταγράφων στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι έρευνες δείχνουν πως παίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα μεγάλο φάσμα κυτταρικών διεργασιών, τόσο σε φυσιολογικό επίπεδο, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, απόπτωση, κυτταρικό κύκλο, μετάσταση, βλάβες στο DNA και με καρκινογένεση [31]. Άλλο ένα χαρακτηριστικό των lncRNAs είναι πως τα γονίδιά τους εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα, προσομοιάζοντας τον μεταγραφικό «θόρυβο» [32]. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί λειτουργίας των lncRNAs, με τον επικρατέστερο να είναι η διαμεσολάβησή τους σε επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA, επιστρεφώντας σύμπλοκα πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων σε διάφορους γενετικούς τόπους [33]. Για την καλύτερη κατανόηση των λειτουργιών τους, τα lncRNAs ταξινομούνται σε κατηγορίες βάσει τριών διαφορετικών κριτηρίων: α) την γονιδιωματική τους θέση, β) τη μηχανισμό δράσης τους, και γ) τον κυτταρικό εντοπισμό.

1.2.1 Λειτουργικός ρόλος των lncRNAs

Τα lncRNA έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τις λειτουργίες του κυττάρου με τρεις βασικούς μηχανισμούς:

❑ Συμμετέχουν στην επιγενετική τροποποίηση γονιδίων:

Τα πυρηνικά lncRNA έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, επιστρατεύοντας συμπλέγματα αναδιάταξης της χρωματίνης και συμπλέγματα τροποποίησης της χρωματίνης σε γονιδιακούς τόπους-στόχους, τα οποία επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης, τη δομή των ιστονών και το βαθμό μεθυλίωσης του DNA [35]. Η μεθυλίωση του DNA είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη επιγενετική τροποποίηση. Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου εμφανίζουν εκτεταμένα πρότυπα απομεθυλίωσης του DNA κατά μήκος του γονιδιώματος, σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, εκθέτοντας πολλαπλές θέσεις μεταθετών στοιχείων και οδηγώντας σε γενικότερη αστάθεια του γονιδιώματος [36]. Σε επίπεδο μεθυλίωσης ιστονών, τα lncRNAs έχουν συσχετιστεί με τροποποιήσεις όπως H3K4me3, H3K9me2, και H3K27me3 στην περιοχή του υποκινητή. Οι τροποποιήσεις αυτές, αλλάζουν τη δομή της χρωματίνης, κι άρα το μοτίβο έκφρασης των γονιδίων στον εν λόγω γενετικό τόπο. Ένα παράδειγμα τέτοιου lncRNA είναι το HOTAIR, το οποίο μεταγράφεται από τη συστοιχία γονιδίων HOXC. Το συγκεκριμένο lncRNA έχει την ικανότητα να επιστρατεύει το σύμπλοκο τροποποίησης της χρωματίνης, αλλάζοντας την κατάσταση της χρωματίνης (ευχρωματίνη-ετεροχρωματίνη) και επηρεάζοντας τα επίπεδα μεταγραφής αρκετών γονιδίων στόχων. Αντίστοιχο αποτέλεσμα μπορούν να επιφέρουν κι άλλα lncRNAs, όπως το INK4, με τη διαφορά ότι εδώ το lncRNA λειτουργεί σαν ικρίωμα για τα συμπλέγματα PRC1 και PRC2, οδηγώντας εν τέλει στη σίγηση του γονιδίου *CDKN2A*. Τα lncRNAs συμβάλλουν επίσης στην προσέλκυση μεθυσών και απομεθυσών, για την αλλαγή της διαμόρφωσης της χρωματίνης. Για παράδειγμα, το lncRNA TARID μπορεί και προσδένεται στο γονίδιο *GADD45A* (αναστολή της ανάπτυξης ύστερα από βλάβες στο DNA), προκαλεί την απομεθυλίωση της 5-μεθυλοκυτοσίνης στον υποκινητή του γονιδίου TCF21 (ογκοκατασταλτικό γονίδιο), επιτρέποντας έτσι την μεταγραφική ενεργοποίηση του TCF21 [35].

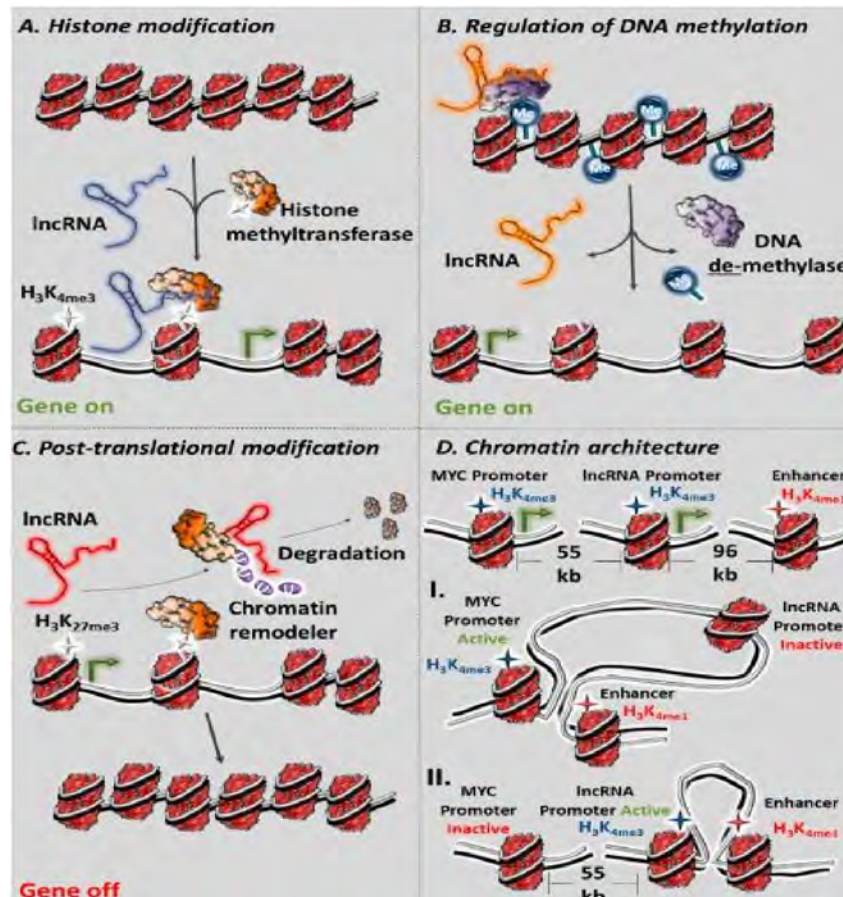
❑ Συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων:

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στο DNA και ελέγχουν τη μεταγραφή, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη σταθερότητα των μορίων RNA. Ορισμένα lncRNAs λειτουργούν ως προσδέτες και αλληλοεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες για να σχηματίσουν σύνθετα σύμπλοκα που ελέγχουν τη μεταγραφή γονιδίων. Τα lncRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε μέσω cis, είτε μέσω trans ρύθμισης [35]. Για παράδειγμα, το lncRNA TCF7, προσελκύει το σύμπλοκο SWI/SNF (ομάδα πρωτεϊνών εξαρτώμενες από ATP που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη) στον υποκινητή του γονιδίου TCF7, ρυθμίζοντας την έκφραση του ίδιου κι ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, το οποίο τελικά προωθεί την ανανέωση των ηπατικών καρκινικών κυττάρων και τη δημιουργία όγκου [37]. Άλλα lncRNA λειτουργούν τα ίδια ως μεταγραφικοί ρυθμιστές. Παράδειγμα αποτελεί το lncRNA GAS5, το οποίο αναδιπλώνεται σε μορφή που προσομοιάζει το DNA, προσδένεται στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και εμποδίζει την δραστηριότητά του. Το lncRNA GAS5 μπορεί να μειώσει την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων κι έχει συσχετιστεί με τη διάγνωση της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας [38].

❑ Συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων:

Ένας επιπλέον μηχανισμός λειτουργίας των lncRNAs είναι η συμμετοχή τους στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, μέσω εναλλακτικού ματίσματος του mRNA, σταθεροποίησης του mRNA και της μετάφρασης των πρωτεϊνών. Η πλειοψηφία των lncRNAs αυτών είναι

αντιγονημικά (anti-sense) [35]. Ένα παράδειγμα σταθεροποίησης των mRNA από lncRNA, είναι το lncRNA PXN-AS1, το οποίο όταν εκφράζεται προσδένεται στην 3'-UTR περιοχή του mRNA PXN (Paxillin). Η πρόσδεση αυτή, εμποδίζει την λειτουργία του miRNA-24, που κανονικά προσδένεται στο mRNA PXN και οδηγεί στην αποικοδόμησή του [39]. Ένα άλλο παράδειγμα πρωτεϊνικής ρύθμισης από lncRNA, είναι η δράση του lncRNA GAS5. Το εν λόγω, προσελκύει τον παράγοντα εκκίνησης της μετάφρασης eIF4E για να συνδεθεί στο mRNA c-MYC, εμποδίζοντας έτσι την μετάφραση της πρωτεΐνης c-MYC [40].



Εικόνα 9: Παρουσιάζονται μοριακοί μηχανισμοί τροποποίησης της χρωματίνης από τα lncRNAs. Α) lncRNAs όπως το HOTAIR, αλληλεπιδρούν με παράγοντες ανασύστασης της χρωματίνης (μεθυλοτρανσφεράσες), επάγοντας ή καταστέλλοντας στη μεθυλίωση ιστονών, με συνέπεια τη γονιδιακή ρύθμιση. Β) lncRNAs όπως το TARID, ρυθμίζουν την γονιδιακή ρύθμιση μέσω απομεθυλίωσης των γονιδίων στόχων. Γ) τα lncRNAs ρυθμίζουν τις λειτουργίες της χρωματίνης μέσω anti-differentiation noncoding RNA (ANCR), στοχεύοντας τη σταθερότητα των παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Δ) τα lncRNAs επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων, μέσω αλλαγών στην αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Για παράδειγμα ο υποκινητής του lncRNA PVT1 μπορεί και ανταγωνίζεται ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής για την πρόσδεση στους ενισχυτές γονιδίων.

1.2.2. Τα lncRNAs στο Γαστρικό Καρκίνο

Τα δεδομένα από έρευνες μετα-ανάλυσης και από αλληλουχήσεις υψηλής απόδοσης, έχουν καταδείξει έναν μεγάλο αριθμό από lncRNAs που συσχετίζονται με την εμφάνιση και την πρόοδο του Γαστρικού Καρκίνου. Όσο αυξάνονται οι γνώσεις μας για τους μηχανισμούς λειτουργίας των lncRNAs, των στόχων τους και του τρόπου ρύθμισής τους, τόσο περισσότερο θα βελτιωθούν και οι τεχνικές έγκαιρης διάγνωσης και αντιμετώπισης της ασθένειας [31].

Σημαντικός αριθμός ερευνών έχει δείξει ότι τα lncRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του ΓΚ, μέσω της στόχευσης βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Ακολούθως θα περιγραφούν τα βασικότερα μονοπάτια που επηρεάζονται από τη δράση των lncRNAs (**Εικόνα 10**).

Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT:

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/AKT είναι εμφανές πως ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές λειτουργίες στα καρκινικά κύτταρα του ΓΚ, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετάσταση και η αντίσταση σε φάρμακα. Η απορρύθμιση του μονοπατιού σχετίζεται άμεσα με την πορεία του ΓΚ [31]. Έχουν βρεθεί lncRNAs που εμπλέκονται στην πορεία του μονοπατιού, όπως για παράδειγμα το lncRNA LOC101928316, η υπερέκφραση του οποίου, παρεμποδίζει την έκφραση των κινασών PI3K και mTOR, και των φωσφορυλιωμένων κινασών p-AKT και p-mTOR [41]. Ένα άλλο lncRNA, XLOC_006753, εμφανίζει αυξορύθμιση σε κύτταρα ΓΚ, προκαλώντας αντίσταση στην θεραπεία [42].

Σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK

Το μονοπάτι των MAP Κινασών φυσιολογικά είναι στενά συνδεδεμένο με θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετανάστευση και η κυτταρική γήρανση. Η διατάραξη της ομοιόστασης του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο σε διάφορα ήδη καρκίνων, μεταξύ αυτών και του ΓΚ. [31]. Το lncRNA LINC00152-1 έχει καταδειχθεί πως μειώνει σημαντικά την έκφραση των κινασών ERK-1/2 και MEK1/2. Η έκθεση καρκινικών κυττάρων σε σταυροσπορίνη (ενεργοποιητής του μονοπατιού ERK/MAPK), έχει σαν αποτέλεσμα την αναίρεση της επίδρασης του LINC00152-1 στο μονοπάτι [43]. Άλλο παράδειγμα lncRNA που επιδρά στο εν λόγω σηματοδοτικό μονοπάτι, είναι το lncRNA AK025387. Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφρασή του σε κύτταρα MKN-45 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος, μέσης διαφοροποίησης), αυξορρυθμίζει σημαντικά την έκφραση των Raf-1, MEK2, και ERK, ενώ η μειωρρύθμιση του lncRNA AK025387, αντιστρέφει τις επιδράσεις στα επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών [43].

Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-catenin:

Το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση βιολογικών διεργασιών στα φυσιολογικά κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση των βλαστικών κυττάρων του βλεννογόνου και η ομοιόσταση [31]. Και σε αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι, έχουν εντοπισθεί lncRNAs, τα οποία επηρεάζουν τη φυσιολογική πορεία του μονοπατιού. Τέτοια είναι τα GASL1, HCG11, LINC00665, LINC01503, lincRNA-p21, LINC01314, LINC01225, και FAM83H-AS1 [39, 42, 44, 45].

Τα lncRNA και η εξέλιξη του ΓΚ:

Το πιο διακριτό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι διατήρηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού και η αποφυγή από τους μηχανισμούς απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου [31]. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί από τους ερευνητές, σε κύτταρα ΓΚ έχει παρατηρηθεί η αύξηση στην έκφραση ογκοεπαγωγικών lncRNAs (πχ SNHG7, CCHE1 και lncMIF-AS1), τα οποία φαίνεται να επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την αναστολή της απόπτωσης [46-48]. Αντίστοιχα έχει παρατηρηθεί πως lncRNA με ογκοκατασταλτική δράση (MT1JP and BG981369), εμφανίζουν μειωμένη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα ΓΚ [31, 49].

Η προσβολή των γειτονικών ιστών, ακολουθούμενη από τη μετάσταση, είναι άλλο ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων. Μελέτες έχουν καταδείξει πως και σε αυτό το στάδιο τα lncRNAs έχουν διακριτό ρόλο [31]. Παράδειγμα αποτελεί το lncRNA GCRL1, το οποίο μπορεί ενισχύσει τα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έχει δείχθει πως το mRNA-885-3p μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση, μειωρρυθμίζοντας την έκφραση της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 4 (CDK4) σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Το lncRNA GCRL1 έχει την ικανότητα να προσελκύει το mRNA-885-3p (δράση ως lncRNA-decoy), και αυξορρυθμίζει την έκφραση της CDK4, λειτουργώντας ογκοεπαγωγικά [50].

Τα lncRNA και η διαφυγή από το Ανοσοποιητικό σύστημα:

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διαφεύγουν της στόχευσης από ανοσοποιητικό σύστημα είναι κάτι που απασχολεί τους ερευνητές, καθότι σχετίζεται άμεσα με την περίοδο αδράνειας ενός όγκου και με τα στάδια της ανάπτυξης, της διήθησης και της μετάστασης, μειώνοντας έτσι το χρονικό θεραπευτικό εύρος [31]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως τα lncRNAs συμμετέχουν στους μηχανισμούς προστασίας του όγκου από το ανοσοποιητικό. Τέτοια lncRNAs είναι τα UCA1, H19, και SNHG15. Για παράδειγμα το UCA1 συμβάλλει στην αποφυγή της στόχευσης των καρκινικών κυττάρων ΓΚ, μέσω υπερέκφρασης της πρωτεΐνης PDL1 (Programmed Cell Death Ligand 1), καθώς λειτουργεί σαν lncRNA-δόλωμα προσελκύοντας τα miRNA-193a και miRNA-214 [51].

Τα lncRNA και η επανγωγή αγγειογένεσης:

Η αγγειογένεση, ένα από τα βασικά ορόσημα του καρκίνου, είναι κρίσιμο στάδιο στην ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου και ευνοεί τη μετάσταση. Έχουν βρεθεί lncRNAs, η δράση των οποίων σχετίζεται με τη διαδικασία της αγγειογένεσης [31]. Για παράδειγμα, το lncRNA PVT1 έχει συσχετιστεί με αυξημένη πυκνότητα τριχοειδών αγγείων σε κύτταρα ΓΚ, καθώς έχει βρεθεί πως αυξάνει την έκφραση του γονιδίου VEGFA, δηλαδή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα. Η παραπάνω διαδικασία είναι εξαρτώμενη από αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι STAT3, επαγόμενες από το lncRNA PVT1 [52]. Ένα άλλο lncRNA, το LINC01410, έχει φανεί πως προάγει την αγγειογένεση και τη μετάσταση, στοχεύοντας το miRNA-532-5p, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση του γονιδίου NCF2 και τη διαρκή ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κΒ [53].

Τα lncRNA και η διατήρηση της βλαστικής ικανότητας των κυττάρων :

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs), είναι κύτταρα όγκου με ιδιότητες που προσομοιάζουν τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, όπως είναι η αποφυγή της γήρανσης, η μετάσταση και η έναρξη δημιουργίας όγκων [31]. Σύμφωνα με μελέτες, εικάζεται πως τα CSCs αποτελούν έναν από τους κυριότερους λόγους ανάπτυξης ανθεκτικότητας των όγκων στα φαρμακευτικά σχήματα [54]. Έχει φανεί πως ορισμένα lncRNAs συμβάλλουν στη διατήρηση της βλαστικής ικανότητας των CSCs. Χαρακτηριστικό

1.2.3. Χρήση των lncRNAs ως βιοδείκτες

Οι διαθέσιμες μέθοδοι για την ανίχνευση του ΓΚ έχουν σοβαρά μειονεκτήματα στην εφαρμογή τους. Μπορεί να έχουν χαμηλή ευαισθησία στην ανίχνευση, με αποτέλεσμα η ασθένεια να διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, και οι πιθανότητες επιβίωσης του ασθενούς μειώνονται δραματικά. Μπορεί να είναι πολύ επεμβατικές με κινδύνους για τον ασθενή (ενδοσκόπηση και βιοψία) ή να μην έχουν μεγάλη ακρίβεια στην αφαίρεση του όγκου, με κίνδυνο μεταστάσεων. Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα συχνά δεν εμφανίζουν την απαραίτητη ιστοειδικότητα για τον ΓΚ [31, 56]. Για παράδειγμα, οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ΓΚ είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (carcinoembryonic antigen, CEA) και τα υδατανθρακικά αντιγόνα (Carbohydrate antigens), όπως τα CA19-9 και CA125 [26, 57]. Το μειονέκτημα των παραπάνω είναι πως δεν είναι αποκλειστικοί δείκτες για την εμφάνιση μόνο του ΓΚ και δεν μπορούν να ανιχνεύσουν τη νόσο στα πρώιμα στάδια, μειώνοντας έτσι την ακρίβεια και την ευαισθησία τους.

Οι συνεχείς έρευνες στοιχειοθετούν σταδιακά την εικόνα για τους στόχους και τους μηχανισμούς δράσης των μακρών μη-κωδικοποιητικών RNA. Τα στοιχεία που έχουμε στη διάθεσή μας έως τώρα, καθιστούν τα lncRNAs ιδανικούς υποψήφιους βιοδείκτες για την ανίχνευση του ΓΚ. Όπως διαφαίνεται και από τους μηχανισμούς που περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες, τα lncRNA εμφανίζονται να έχουν διακριτό και σαφή ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Επίσης έχει παρατηρηθεί πως οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής τους συσχετίζονται άμεσα με ογκοεπαγωγικά ή ογκοκατασταλτικά μοτίβα, κάτι που τους προσδίδει ακρίβεια στις μετρήσεις και στην εκτίμηση της προόδου ενός καρκινικού όγκου [58].

Τα lncRNAs εντοπίζονται να κυκλοφορούν ελεύθερα στο πλάσμα του αίματος, και τα επίπεδά τους κυμαίνονται σε τόσο υψηλό βαθμό όσο και στην περιοχή που εντοπίζεται ο καρκινικός όγκος από τον οποίο προήλθαν. Επομένως η ανίχνευση και η ποσοτικοποίησή τους μπορεί να συσχετιστεί με την πρόοδο του καρκινικού όγκου [31, 59]. Το χαρακτηριστικό αυτό καθιστά τα lncRNAs ιδανικά ως βιοδείκτες για την ανίχνευση καρκίνων σε κλινικό επίπεδο. Μάλιστα ένας αξιόλογος αριθμός lncRNAs έχουν προταθεί για χρήση ως βιοδείκτες ανίχνευσης του Γαστρικού Καρκίνου [31]. Για παράδειγμα, μελέτες μετα-ανάλυσης έδειξαν πως η έκφραση του lncRNA HOTAIR είναι σημαντικά αυξημένη στο πλάσμα ασθενών με ΓΚ, συγκριτικά με υγιή άτομα, με το βαθμό ευαισθησίας να αγγίζει το 88% και το βαθμό ειδικότητας το 84% [31, 60, 61]. Άλλα lncRNAs με παρόμοιο μοτίβο έκφρασης και ειδικότητας για το ΓΚ, είναι τα lncRNA H19 και lncRNA B3GALT5-AS1 [31, 45, 57].

Συνοψίζοντας, η εύκολη ανίχνευση των lncRNAs στα βιολογικά υγρά (αίμα, γαστρικά υγρά), η σταθερότητα κι η ιστοειδικότητα που τα χαρακτηρίζει και η άμεση συσχέτιση της έκφρασής τους με το στάδιο εξέλιξης ενός καρκινικού όγκου, είναι χαρακτηριστικά που καθιστούν τα lncRNAs εν δυνάμει αξιόπιστους βιοδείκτες για την ανίχνευση του καρκίνου. Μάλιστα, η ιστοειδικότητά τους, θα μπορούσε να τα καταστήσει ιδανικούς θεραπευτικούς στόχους.

1.2.4 Λειτουργικός Χαρακτηρισμός των lncRNAs

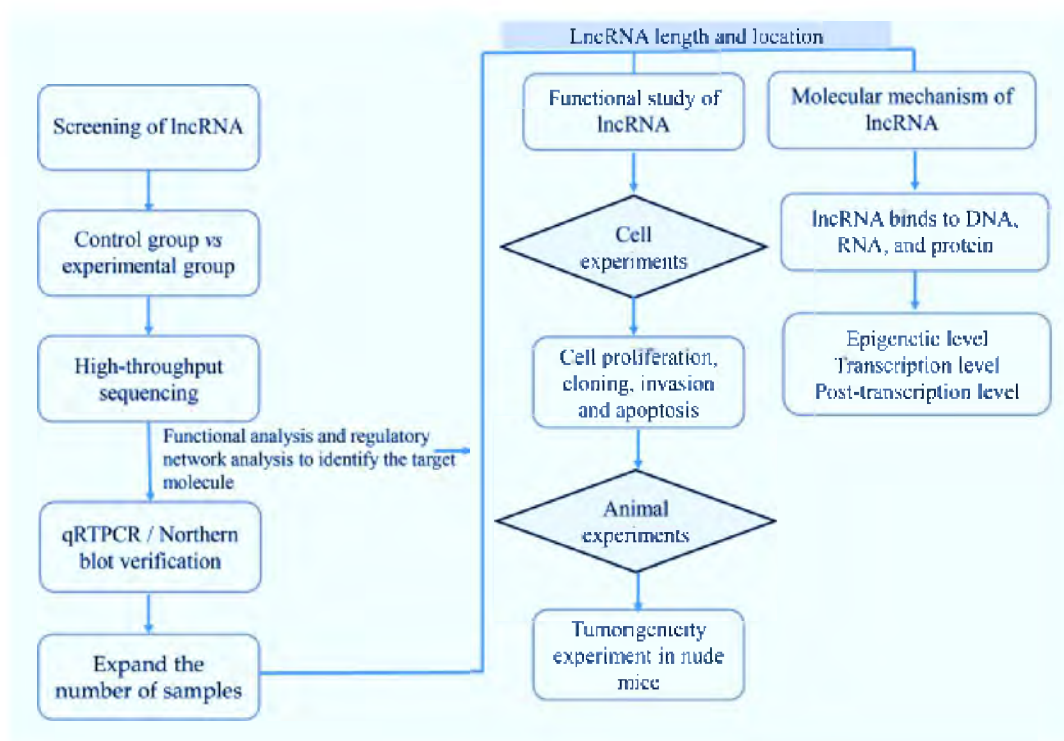
Τα lncRNAs παρουσιάζονται ως πολλά υποσχόμενα μόρια, τόσο για τη χρήση τους ως βιοδείκτες ασθενειών, όσο και ως ιστοειδικοί στόχοι φαρμάκων. Για την αξιοποίησή τους όμως, είναι απαραίτητο να χαρακτηριστεί η λειτουργία τους, οι μηχανισμοί δράσης τους και οι στόχοι τους.

Η λειτουργική μελέτη των lncRNAs μπορεί να γίνει με *in vitro* και *in vivo* πειράματα [31] (**Εικόνα 11**).

- ***In vivo*:** πειράματα υπερέκφρασης (overexpression) ή γονιδιακής σίγησης (knock down) του γονιδίου ενός lncRNA, μπορούν να δώσουν πληροφορίες για το ρόλο του στις βιολογικές διεργασίες, αναλύοντας τις αλλαγές στο φαινότυπο του κυττάρου, στην ευαισθησία σε φάρμακα, αλλαγές στους δείκτες μετάβασης επιθηλιακού ιστού σε μεσεγχυματικό και αλλαγές σε δείκτες

βλαστικότητας κυττάρων. Το τελικό στάδιο είναι εμφύτευση των σταθερών μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών στη ράχη διαγονιδιακών ποντικών, όπου μελετάται η ικανότητα των lncRNAs να προκαλέσουν ογκογένεση.

- 2 ***In vitro***: χρήση λεντικών πλασμιδιακών φορέων για σίγηση (knock down) ή υπερέκφραση γονιδίων lncRNAs. Οι πλασμιδιακοί φορείς χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό κυττάρων, γίνεται διαλογή μέσω ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και ύστερα ακολουθείται εξαγωγή ολικού RNA και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), ώστε να ανιχνευθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που στοχεύθηκαν.

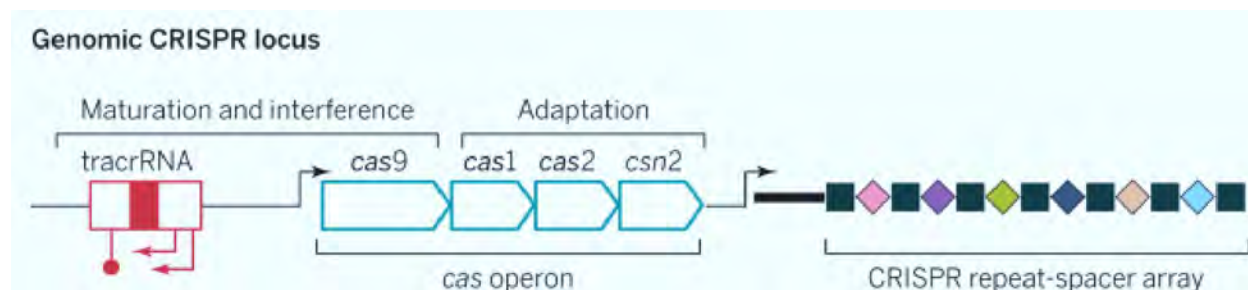


Εικόνα 11: Σχεδιάγραμμα ροής για στρατηγικές έρευνας της λειτουργίας και του μηχανισμού δράσης των lncRNAs [31].

1.3 Εργαλεία Γενετικής Τροποποίησης

1.3.1. CRISPR-Cas9

Το σύστημα CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – Cas 9 (CRISPR-associated protein 9), αφορά ένα σύστημα προστασίας και επίκτητης ανοσίας των βακτηρίων, και συγκεκριμένα στο βακτήριο *Streptococcus pyogenes*, ως απόκριση σε προσβολή από βακτηριοφάγους ιούς και μεταφοράς πλασμιδίων [67]. Η λειτουργία του συστήματος αυτού αποσαφηνίστηκε, και πλέον χρησιμοποιείται από τους ερευνητές ως ένα πανίσχυρο εργαλείο τροποποίησης του γονιδιώματος, επιγενετικής τροποποίησης της μεταγραφής, και χαρτογράφησης του γονιδιώματος.



Εικόνα 14: Απεικόνιση του οπερονίου του γονιδίου cas, που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες για τη δημιουργία του tracrRNA, των ενδονουκλεασών Cas9, Cas1, Cas2 καθώς και της αλληλουχίας CRISPR που περιλαμβάνει τα spacers, δηλαδή τμήματα DNA από προηγούμενες προσβολές από παθογόνα [68].

Για τις ανάγκες της γενετικής μηχανικής, το σύστημα CRISPR-Cas9, έχει απλοποιηθεί συγκριτικά με τον φυσικό μηχανισμό στα βακτήρια, και πλέον αποτελείται μόνο από την ενδονουκλεάση Cas9 και ένα ενιαίο μόριο single guide RNA (sgRNA), το οποίο περιέχει τις απαραίτητες λειτουργίες για τη στόχευση και σύνδεση, υποκαθιστώντας το ρόλο του φυσιολογικού guide RNA, το οποίο αποτελείται από δύο μικρά μόρια RNA (crRNA:tracrRNA) [63, 69].

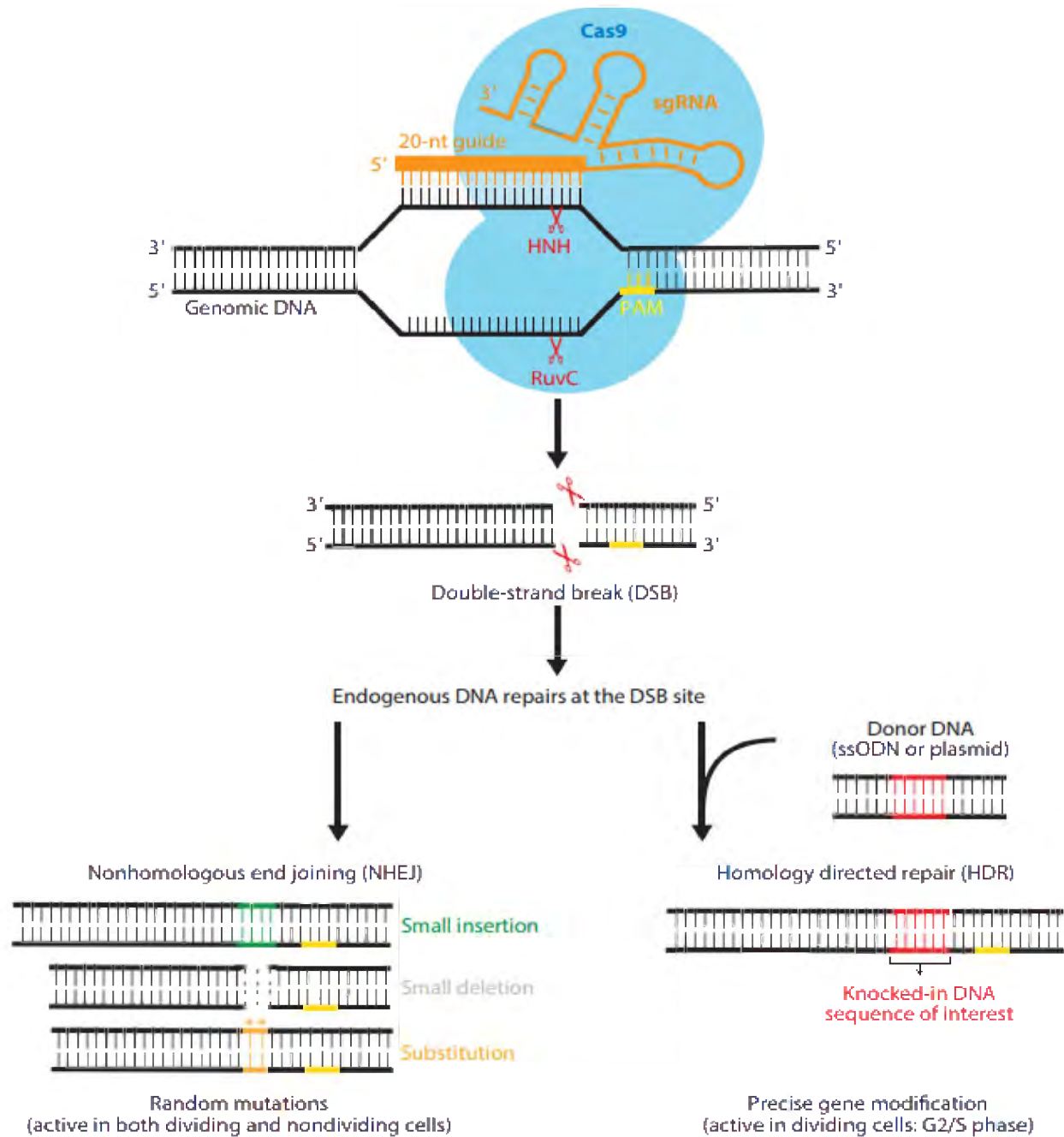
Το ένζυμο Cas9, πρόκειται για μία ενδονουκλεάση, μεγάλου μοριακού βάρους και μήκους 1368 αμινοξέων. Έχει δύο διακριτές επικράτειες με δράση νουκλεάσης: την HNH πάνω στην οποία συνδέεται το gRNA/sgRNA και κόβει το DNA-στόχο ανοδικά της αλληλουχίας PAM, και τη RuvC που κόβει το DNA στο συμπληρωματικό κλώνο. Η Cas9 συμμετέχει επίσης στις διαδικασίες ωρίμανσης του crRNA και της ενσωμάτωσης νέων τμημάτων DNA spacers στην αλληλουχία CRISPR [67].

Από τη δράση της Cas9 πάνω σε αλληλουχίες στόχους προκύπτουν δίκλωνες ρήξεις. Προκειμένου το κύτταρο να επισκευάσει αυτές τις ρήξεις, ακολουθεί τους κλασσικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όπως και στις προηγούμενες τεχνικές genome editing (NHEJ και HDR repair) (Εικ 15) [67]. Η λειτουργία του συστήματος επιτρέπει την οργάνωση πειραμάτων γονιδιακής σίγησης (knock down), καταστροφής γονιδίων (knock-out) ή εισαγωγής γονιδίων (knock-in), στο γονιδίωμα-στόχο.

Μειονεκτήματα της μεθόδου:

Περιορισμό αποτελεί το γεγονός ότι για να λειτουργήσει το σύστημα, θα πρέπει να υπάρχει η αλληλουχία PAM καθοδικά της αλληλουχίας-στόχου [63]. Επιπλέον, το μικρό μήκος του sgRNA ενέχει την πιθανότητα να αναγνωρίσει και να συνδεθεί σε μη-ειδικές αλληλουχίες στο γονιδίωμα, προκαλώντας ανεπιθύμητες μεταλλάξεις, αγγίζοντας σε περιπτώσεις έως και 50% αύξηση στην έκτοπη δραστηριότητα του συστήματος. Η αυξημένη αυτή πιθανότητα για έκτοπες μεταλλάξεις, έχει ως συνέπεια τη γενικότερη

αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος, διαταράσσοντας τη φυσιολογική λειτουργία και άλλων γονιδίων [65].



Εικόνα 15: Συνολική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης του συστήματος νουκλεάσης CRISPR-Cas9 [67] .

Τροποποίηση της λειτουργίας του CRISPR-Cas9 με Τελεστές

Η ευκολία στο χειρισμό και τις δυνατότητες τροποποίησης του συστήματος CRISPR-Cas9, έχει ανοίξει το δρόμο σε νέες οδούς σκέψης και αξιοποίησης της μεθόδου. Οι ερευνητές έχουν κατορθώσει να προσδώσουν στην Cas9 μόρια-τελεστές που επιτρέπουν την μεταγραφική τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων-στόχων [63]. Η σύνδεση της dCas9 με μόρια αναστολής της έκφρασης, χρησιμοποιείται για πειράματα γονιδιακής σίγησης μέσω παρεμπόδισης της έκφρασης (CRISPR inhibition, CRISPR-i). Η σύνδεση της dCas9 με μόρια ενεργοποιητές της έκφρασης, χρησιμοποιείται για πειράματα γονιδιακής ενίσχυσης και υπερέκφρασης (CRISPR activation, CRISPR-a) [63, 67].

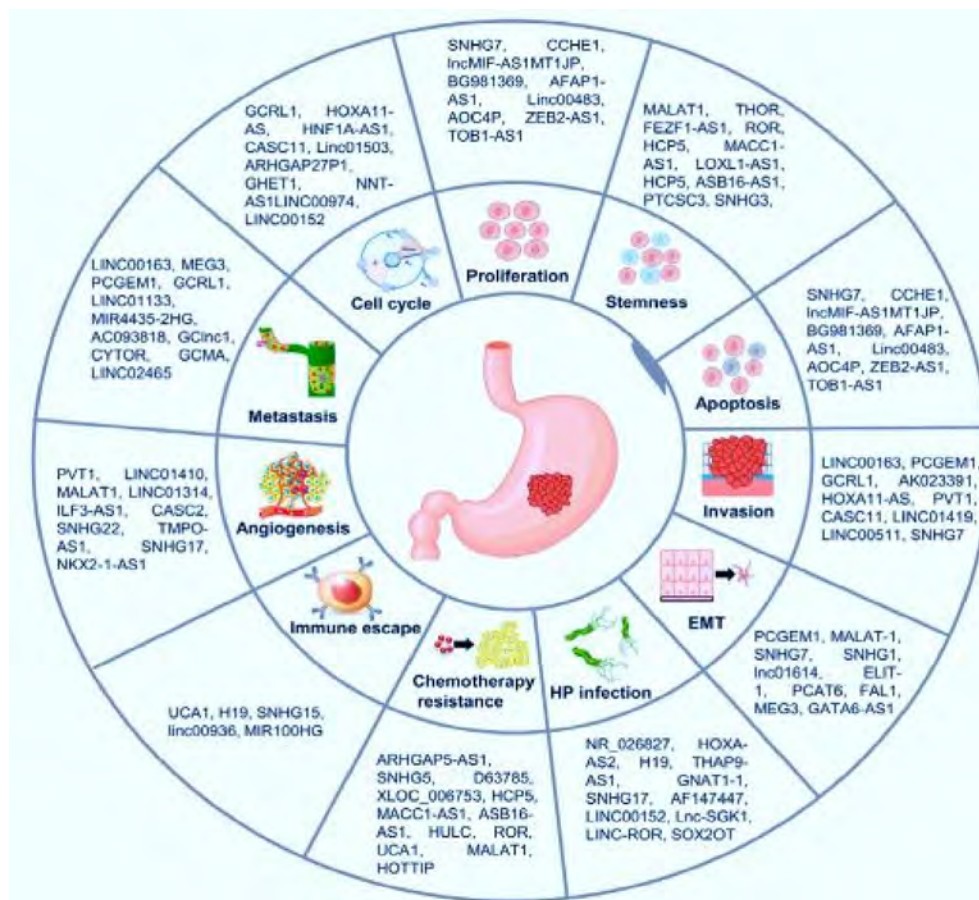
1.3.2. CRISPR-interference (CRISPR-i)

Η στοχευμένη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος, είναι απαραίτητη για το λειτουργικό χαρακτηρισμό γονιδίων υπό μελέτη. Το σύστημα CRISPR-Cas9, συνδυαστικά με παράγοντες καταστολής της έκφρασης, μπορεί να λειτουργήσει ως μηχανισμός παρεμπόδισης της φυσιολογικής γονιδιακής έκφρασης. Το CRISPR-i μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτόχρονη καταστολή πολλαπλών γονιδίων (knock-down) και τα αποτελέσματα της επίδρασης είναι αντιστρεπτά, σε αντίθεση με τις τεχνικές ολικής διαγραφής γονιδίων (knock-out) [70]. Για να επαναδιαμορφώσουν το κλασσικό σύστημα CRISPR-Cas9 σε μηχανισμό παρεμπόδισης της γονιδιακής έκφρασης, οι ερευνητές χρησιμοποιούν μια καταλυτικά ανενεργή ενδονουκλεάση Cas9 (dead), η οποία φέρει δύο σημειακές μεταλλάξεις στις επικράτειες με δράση νουκλεάσης, HNH και RuvC [71]. Η ενδονουκλεάση διατηρεί την ικανότητα πρόσδεσης στην αλληλουχία στόχο, χωρίς όμως να την τέμνει [63]. Από πειράματα σίγησης, έχει φανεί πως έκφραση της dCas9 σε συνδυασμό με sgRNA, το οποίο έχει συμπληρωματική αλληλουχία με το γονίδιο-στόχο 20bp, μπορεί να πετύχει σίγηση του γονιδίου στόχου, έως και 99% [71]. Το σύμπλοκο dCas9-sgRNA μπορεί να εμποδίσει την γονιδιακή μεταγραφή, ακόμα κι όταν προσδένεται στη μη-στοχευμένη αλυσίδα του DNA. Για να μπλοκαριστεί η μεταγραφή στο στάδιο της επιμήκυνσης, το sgRNA θα πρέπει να σχεδιαστεί με στόχο είτε την μη-κωδική αλυσίδα του DNA, είτε την αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου (UTR). Στην περίπτωση αυτή, το σύμπλοκο dCas9-sgRNA δρα ως αναστολέας στην πορεία της πολυμεράσης επιμήκυνσης του RNA (RNAP). Για να παρεμποδιστεί η έναρξη της μεταγραφής, το σύμπλοκο dCas9-sgRNA θα πρέπει ιδανικά να προσδεθεί στο μη-κωδικό κλώνο του DNA, στη θέση πρόσδεσης της πολυμεράσης RNAP ή στα cis-acting motifs του υποκινητή, λειτουργώντας σαν στερικό εμπόδιο στην πρόσδεση των παραγόντων της μεταγραφής [71]. Για να βελτιωθεί η ικανότητα παρεμπόδισης της μεταγραφής, στη dCas9 προστίθενται επικράτειες με κατασταλτική δράση. Τέτοια επικράτεια είναι η KRAB (Kruppel associated box) του γονιδίου Kox1, μήκους 75 αμινοξέων, η οποία αποτελεί έναν από τους πιο δραστικούς παράγοντες καταστολής [72, 73]. Πειράματα μελέτης της γονιδιακής έκφρασης, όπου η dCas9 ήταν συντηγμένη με μεταγραφικούς παράγοντες, γνωστούς για την ανασταλτική τους δράση στην έκφραση γονιδίων, και φθορίζουσα πρωτεΐνη (BFP), για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, έδειξε πως το σύμπλοκο dCas9-KRAB-sgRNA είναι ικανό να μειώσει τη γονιδιακή έκφραση έως και πέντε φορές, σε σύγκριση με τη φυσιολογική [73]. Η ρυθμιστική επικράτεια KRAB εντοπίζεται σε 400 περίπου ανθρώπινες πρωτεΐνες με δράση ενδονουκλεασών zinc-fingers (KRAB zinc finger proteins) [73]. Ένα ακόμη μόριο που μπορεί να προσδεθεί στο σύστημα dCas9-sgRNA, με σκοπό να αυξήσει την ικανότητα παρεμπόδισης της μεταγραφής, είναι η πρωτεΐνη MECP2 (methyl CpG binding protein 2) [74]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, φυσιολογικά, προσδένεται σε μεθυλιωμένες μορφές του DNA και προκαλεί την συσπείρωση της χρωματίνης, εμποδίζοντας παράγοντες της μεταγραφής από το να συνδεθούν στο γενετικό τόπο [74]. Εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ώριμα κύτταρα του νευρικού συστήματος και συμβάλει στην ομαλή λειτουργία των νευρικών κυττάρων, ρυθμίζοντας την απενεργοποίηση της

παράδειγμα αποτελεί το lncRNA MALAT1, η υπερέκφραση του οποίου αυξάνει την βλαστική ικανότητα, ενώ η σίγησή του (knock-down) τη μειώνει [55].

Τα lncRNA και η ανθεκτικότητα στις χημειοθεραπείες:

Η χημειοθεραπεία είναι επί του παρόντος μια από τις βασικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις στην καταπολέμηση του καρκίνου. Τα σχετικά φάρμακα χαρακτηρίζονται από έντονη κυτταροτοξικότητα, στοχεύοντας στην δημιουργία βλαβών στη διπλή έλικα του DNA ή στην επαγωγή της απόπτωσης. Τα καρκινικά κύτταρα, λόγω των συνεχών μεταλλάξεων, συχνά αποκτούν ανθεκτικότητα σε πολλές από τις φαρμακευτικές ουσίες που εφαρμόζονται, οδηγώντας στην αποτυχία της χημειοθεραπείας [31]. Έχει προταθεί πως η μη φυσιολογική έκφραση των lncRNAs, παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών όγκων σε φάρμακα. Το lncRNA ARHGAP5-AS1 υπερεκφράζεται σε χημειοανθεκτικά κύτταρα ΓΚ. Τα δεδομένα από κυτταρομετρία ροής έχουν δείξει ότι η σίγηση του ARHGAP5-AS1, έχει σαν αποτέλεσμα, τη δραματική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ΓΚ, την αύξηση της συγκέντρωσης των αντικαρκινικών φαρμάκων ενδοκυτταρικά και ενισχύει την κυτταρική απόπτωση από τη δράση των φαρμάκων [31].



Εικόνα 10: Συνοπτική παρουσίαση της δράσης των lncRNAs στο Γαστρικό Καρκίνο. Σε κάθε μηχανισμό λειτουργίας, παρατίθενται και παραδείγματα από lncRNAs που έχουν συσχετιστεί. Τα lncRNAs μπορούν να επηρεάσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την εισβολή σε γειτονικούς ιστούς, την κυτταρική διαφοροποίηση, τον κυτταρικό κύκλο, την αποφυγή από ανοσοποιητικό σύστημα, την ογκογένεση και την ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα [31].

έκφρασης γονιδίων. Σύμφωνα με πειράματα [74], έχειδειχθεί πως το σύμπλοκο dCas9-KRAB-MECP2-sgRNA, εμφανίζει τη βέλτιστη ικανότητα παρεμπόδισης της μεταγραφής.

1.3.3. CRISPR-activation (CRISPR-a)

Ακολουθώντας την ίδια λογική με το μηχανισμό παρεμπόδισης της μεταγραφής, οι ερευνητές διαπίστωσαν πως η σύνδεση του συμπλόκου CRISPR-Cas9 με μόρια και μεταγραφικούς παράγοντες που επάγουν τη μεταγραφή, μπορεί να λειτουργήσει ως σύστημα ενεργοποίησης/υπερέκφρασης ενός γονιδίου-στόχου. Η πρώτη γενιά του συστήματος ενεργοποίησης CRISPRa, περιλάμβανε τη σύντηξη της καταλυτικά ανενεργής ενδονουκλεάσης dCas9 με το μεταγραφικό παράγοντα VP64, ο οποίος είναι ισχυρός επαγωγέας της μεταγραφής [75, 76]. Η ανενεργή Cas9 χρειάζεται την προσθήκη μια επικράτειας τελεστή, όπως για παράδειγμα επικράτειες ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transcription activation domains, ADs), που θα επιτρέψουν στην ενδονουκλεάση να λειτουργήσει σαν εργαλείο κυτταρικού προγραμματισμού, σε μεταγραφικό επίπεδο [77, 78]. Σε πειράματα υβριδισμού της Cas9 με 20 διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, ξεχώρισαν τα σύμπλοκα της dCas9-VP64, dCas9-p65 και dCas9-Rta. Οι μεταγραφικοί παράγοντες p65 και Rta, δεν εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με το πρωταρχικό σύμπλοκο της Cas9-VP64. Η προσθήκη τους όμως στο σύμπλοκο, φάνηκε να αυξάνει τη δραστικότητα (Cas9-VP64-p65 και Cas9-VP64-Rta). Η μέγιστη δραστικότητα του συμπλόκου επετεύχθη όταν έγινε σύμπτυξη και των τριών μεταγραφικών παραγόντων, δίνοντας το τριμερές Cas9-VP64-p65-Rta (VPR) [79]. Προκειμένου να βελτιωθεί κι άλλο η δραστικότητα του συστήματος CRISPRa και να αυξηθεί το ποσοστό της επιτυχούς ενεργοποίησης, είναι απαραίτητη η εύρεση βέλτιστων θέσεων αγκυροβολίας για τους μεταγραφικούς παράγοντες. Οι ερευνητές δοκίμασαν τη σύντηξη της dCas9 και με άλλα μόρια. Οι συνδυασμοί συμπλόκων dCas9-SunTag-VP64 και dCas9-VP64 + MCP-VP64, φάνηκε μέσω πειραμάτων πως έχουν την ικανότητα να προσελκύουν περισσότερους μεταγραφικούς παράγοντες VP64 στο γενετικό τόπο, βελτιώνοντας τα ποσοστά ενεργοποίησης [75, 80]. Η σύντηξη της dCas9 με επιγενετικούς τροποποιητές, όπως ακετυλοτρανσφεράση p300, η ακετυλάση των ιστονών και το Tet1 (CpG απομεθυλάση του DNA), επίσης φάνηκε να έχει θετικό αποτέλεσμα στην ενεργοποίηση ενδογενών γονιδίων [75].

2. Σκοπός

Ο καρκίνος του στομάχου βρίσκεται στην κορυφή του καταλόγου με τα είδη καρκίνου που προσβάλλουν πιο συχνά τον ανθρώπινο πληθυσμό. Η απουσία σοβαρής συμπτωματολογίας στα πρώιμα στάδια, σε συνδυασμό με την έλλειψη αξιόπιστων βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωσή του, συντελούν στην καθυστέρηση διάγνωσης, γεγονός που μειώνει δραματικά τις πιθανότητες επιβίωσης των ασθενών. Τα διαθέσιμα φάρμακα δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικά στα προχωρημένα στάδια της νόσου, λόγω έλλειψης ιστοειδικότητας. Επίσης ο γαστρικός καρκίνος εμφανίζει αυξημένη ετερογένεια, τόσο σε κυτταρικό επίπεδο και από όγκο σε όγκο, όσο και σε επίπεδο ασθενών. Είναι λοιπόν επιτακτική η ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών, αρκετά ευαίσθητων και ειδικών, που να επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση. Τα τελευταία χρόνια, οι συνεχείς εξελίξεις στον τομέα της μοριακής βιολογίας και πιο συγκεκριμένα της μεταγραφωμικής, έχουν αναδείξει τη χρησιμότητα μορίων του γονιδιώματος, που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν «μεταγραφικός θόρυβος». Ένα μεγάλο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί μόρια, τα οποία όμως δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Πρόκειται για τα μακρά μη-κωδικοποιητικά μόρια RNA (lncRNAs), τα οποία έχει διαπιστωθεί πως κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Έχει επίσης αποδειχθεί ο μεγάλος βαθμός συμμετοχής στους στην γονιδιακή ρύθμιση διάφορων τύπου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού. Χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό ιστοειδικότητας, γεγονός που τα καθιστά ιδανικούς βιοδείκτες και εν δυνάμει φαρμακευτικούς στόχους. Για την πλήρη αξιοποίησή τους όμως, απαιτείται πλήρης λειτουργικός χαρακτηρισμός των λειτουργιών και των στόχων τους. Υπό αυτό το πρίσμα, σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η ανάπτυξη εργαλείων επιγενετικής ρύθμισης και επίδρασης στη χρωματίνη, που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για το λειτουργικό χαρακτηρισμό lncRNAs που παρουσιάζουν διαγνωστικό και θεραπευτικό ενδιαφέρον στο γαστρικό καρκίνο.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

3.1 Κυτταρικές Σειρές

Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές:

- **AGS:** ανθρώπινη κυτταρική σειρά από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα
- **HDC1:** κύτταρα HEK (human embryonic kidney) που εκφράζουν σταθερά την ενδονουκλεάση dCas9
- **LDC10:** κύτταρα LS174 που εκφράζουν σταθερά την ενδονουκλεάση dCas9, κλώνος #10
- **AGDC16:** κύτταρα AGS με σταθερή έκφραση της ενδονουκλεάσης dCas9

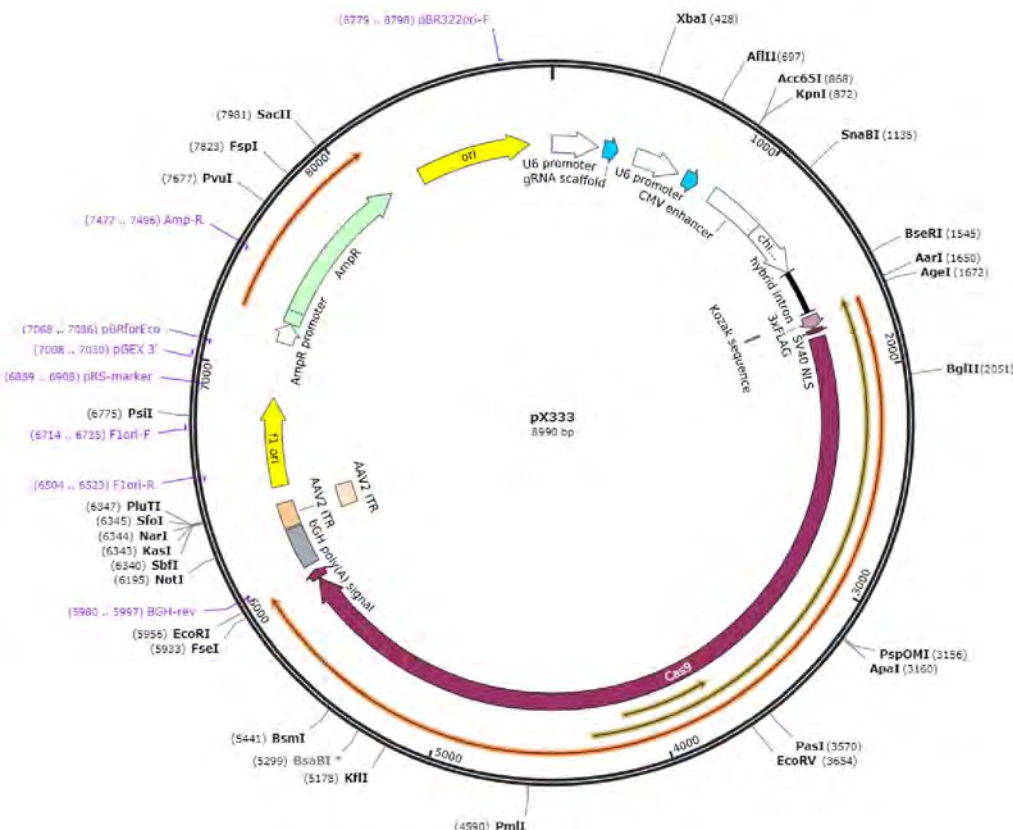
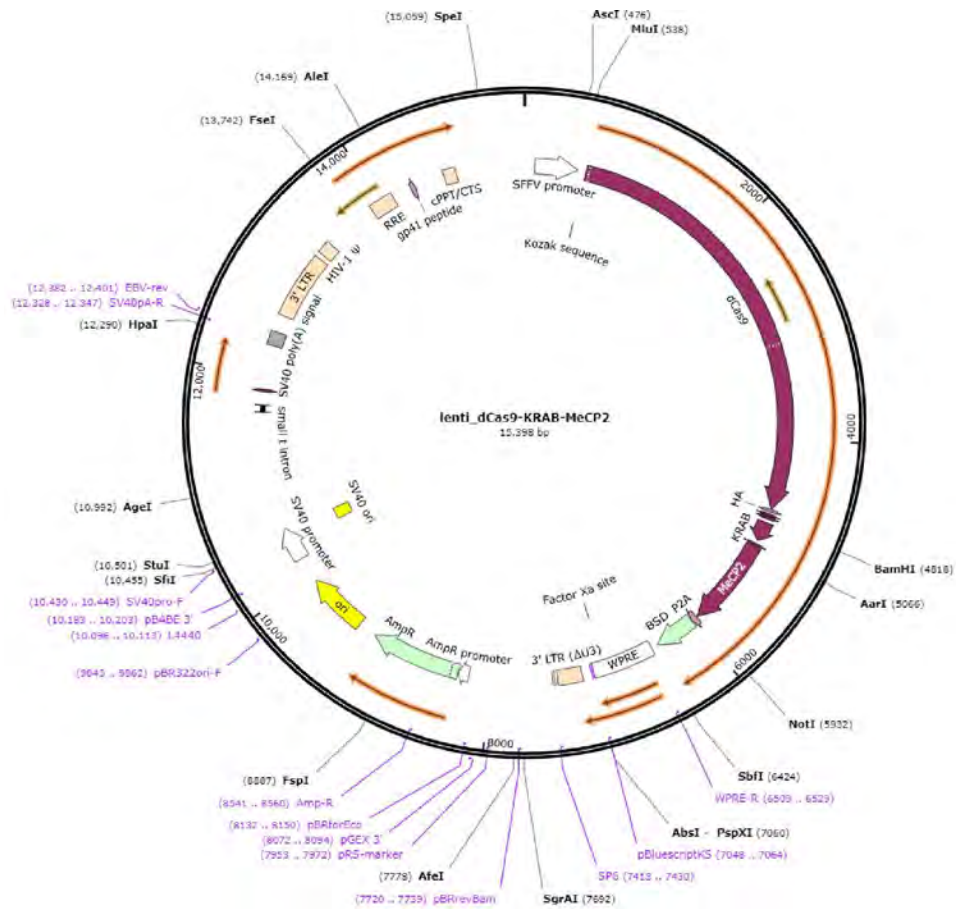
3.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Για τα πειράματα γενετικής τροποποίησης των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πλασμίδια.

Για το μηχανισμό γονιδιακής σίγησης με το σύστημα KRAB, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας lenti_dCas9-KRAB-MeCP2 (ID:122205) με μήκος 15.398bp. Μεταξύ άλλων, περιέχει τις βασικές αλληλουχίες για τη μεταγραφή της dCas9 (καταλυτικά ανενεργή μορφή της Cas9), του RNA οδηγού (guide RNA – gRNA), της υπομονάδας KRAB και της πρωτεΐνης MeCP2.

Για το μηχανισμό Knock-Down (KD) σίγησης χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας PX333 (ID: 64073), μήκους 8990bp. Φέρει τις αλληλουχίες για την σύνθεση της Cas9 και του sgRNA για το γονίδιο στόχο.

Εικόνα: Πλασμιδιακός φορέας
lenti_dCas9-KRAB-MeCP2
(Addgene plasmid # 122205 ;
<http://n2t.net/addgene:122205> ;
RRID:Addgene_122205)



Εικόνα: Πλασμιδιακός φορέας
pX333 (Addgene plasmid #
64073 ;
<http://n2t.net/addgene:64073> ;
RRID:Addgene_64073)

3.3 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Η απομόνωση του RNA ξεκινά με την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τα τριβλία ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών και την προσθήκη 1ml τριζόλης. Ύστερα από 1 λεπτό αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα συλλέγονται σε σωλήνες Eppendorf και τοποθετούνται στον πάγο. Έπειτα προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο και γίνεται έντονη ανάδευση, προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική. Μετά ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5', σε 14000rpm, στους 4°C. Στο τέλος της, συλλέγεται η υδατική φάση η οποία περιέχει το RNA, όπου προστίθενται 500μl ισοπροπανόλης και 1μl γλυκογόνου. Αναμονή 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα ξανά φυγοκέντρηση για 15' (14000rpm, 4°C). Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% και ύστερα τελευταία φυγοκέντρηση για 10' (14000rpm, 4°C). Απορρίπτεται ξανά το υπερκείμενο, το tube αφήνεται ανοιχτό για ξήρανση του ιζήματος και έπειτα επανιαδιαλύεται σε H₂O. Το δείγμα ολικού RNA αναδεύεται καλά και μετράται η συγκέντρωσή του σε φασματοφωτόμετρο. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Quawell Q3000 UV για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C.

3.4 Κατεργασία με DNAase (DNAase Treatment)

Ύστερα από την απομόνωση του RNA, ακολουθεί η κατεργασία με DNAase, η οποία είναι ένζυμο με δράση δεσοξυριβονουκλεάσης και καταστρέφει τυχόν υπολείμματα DNA που έχουν παραμείνει στο δείγμα, υδρολύοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Το ένζυμο RNAase out απενεργοποιεί ένζυμο που μπορούν να υδρολύσουν το RNA, δρώντας προστατευτικά προς τα δείγματα.

Η ενζυμική αντίδραση γίνεται σε υδατόλουτρο για 1h, στους 37 °C και οι όγκοι των αντιδραστηρίων φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Δείγμα RNA	25
DNAse I Buffer 10x (Thermoscientific)	3
DNAse I, RNAse-free (ThermoFisher scientific)	1
RNAse out	0,5
WFI	0,5
	V _{ΤΕΛ} = 30

Πίνακας 1 : Σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην κατεργασία με DNAase.

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η DNAse I (RNAse-free), όπου έχει διασφαλιστεί η απουσία μορίων που μπορούν να υδρολύσουν το RNA. Το RNAse out λειτουργεί προστατευτικά προς το δείγμα RNA εμποδίζοντας πιθανά ένζυμα που επίσης μπορούν να υδρολύσουν το RNA.

Με το πέρασμα της 1 ώρας, τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση. Προστίθενται 40μl οξικού νατρίου (SodiumAcetate), 330μl WFI (ddH₂O) και 400ml διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου. Στο βήμα αυτό απομακρύνονται ενζυμικά κατάλοιπα. Το δείγμα αναδεύεται έντονα και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5' (14000rpm, 4°C). Ύστερα αφαιρείται προσεκτικά το

υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέα Eppendorf tubes, όπου και προστίθενται 1μl γλυκογόνου και 1000μl EtOH 100% (4°C). Το δείγμα ανακινείται ήπια και αποθηκεύεται στους -80°C για τουλάχιστον 1h, ώστε να γίνει απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων με κατακρήμνιση με αιθανόλης. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30' (14000rpm, 4°C). Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μl EtOH 75% (4°C) και ακολουθεί φυγοκέντρηση ξανά για 10' (14000rpm, 4°C). Στο τέλος της φυγοκέντρησης, αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, και το ίζημα που δημιουργήθηκε αφήνεται να στεγνώσει για 10'. Τέλος ακολουθεί επαναδιάλυση σε 25μl WFI και επώαση σε heatblock για 5' στους 65 °C. Μετά τη θέρμανση, γίνεται έντονη ανάδευση, τοποθέτηση στον πάγο και τα μετράται η συγκέντρωση του δείγματος σε RNA, στο φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 UV.

3.5 Σύνθεση cDNA (cDNA synthesis)

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας είναι η σύνθεση δίκλωνων μορίων συμπληρωματικού DNA από τα μονόκλωνα μόρια RNA του δείγματος. Το στάδιο αυτό χωρίζεται σε δύο βήματα. Για την αντίδραση σύνθεσης απαιτούνται 1000ng RNA σε τελικό όγκο 10μl. Σε νέα Eppendorf tubes προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα αραιωμένου δείγματος, καθώς και 2μl από τα αντιδραστήρια όπως φαίνονται στον πίνακα 2.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Randomhexamers (100mM) (Takara)	1
dNTPs (10mM)	1
Δείγμα RNA	10
	$V_{\text{τελ}} = 12$

Πίνακας 2: Σύσταση μίγματος από εκκινητές και dNTPs.

Ακολουθεί θέρμανση στους 65 °C για 5' . Παράλληλα ετοιμάζονται και προστίθενται τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, όπως φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
5x Buffer (Invitrogen)	4
DTT 100Mμ (Invitrogen)	2
M-MLV (Invitrogen)	1
WFI	0.5
RNAase out	0,5
	$V_{\text{τελ}} = 8$

Πίνακας 3: Σύσταση μίγματος για τον ολοκλήρωση της σύνθεσης cDNA

Το σύνολο της αντίδρασης επωάζεται για 2h σε υδατόλουτρο, στους 37 °C. Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και προστίθενται 380μl WFI. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

3.6 Αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

Η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου μας επιτρέπει να υπολογίσουμε την αρχική ποσότητα DNA σε ένα δείγμα. Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBRgreen 2x (ThermoFisher), η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται πάνω στα δίκλινα μόρια DNA. Η αύξηση στα επίπεδα και την ένταση φθορισμού της χρωστικής είναι ανάλογα της ποσότητας DNA του δείγματος, και μετρώνται από το μηχάνημα. Χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα qPCR της BIO-RAD, ενώ η προετοιμασία της αντίδρασης και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το αντίστοιχο λογισμικό της εταιρείας, το CFX Manager (BIO-RAD). Η σύσταση της αντίδρασης παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
DNA	4
SYBRgreen Buffer Mix(2X) (Thermofisher)	10
Primer F/R	2
WFI	4
	$V_{\text{TEA}}=20$

Πίνακας 4: Σύσταση αντιδραστηρίων για την ποσοτική PCR

Στα πειράματα σίγησης που πραγματοποιήθηκαν, σκοπός ήταν να γίνει εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων. Για να αποφευχθούν σφάλματα στην ποσοτικοποίηση, είναι αναγκαία η κανονικοποίηση με τη χρήση ενός γονιδίου αναφοράς. Χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσύστατο γονίδιο *GAPDH*, του οποίου η έκφραση είναι σταθερή σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκαν αφενός ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *GAPDH*, εξομαλύνοντας τυχόν σφάλματα και αφετέρου ως προς τα επίπεδα έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου προς μελέτη, στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, δίνοντας την απόλυτη τιμή αύξησης ή μείωσης των επιπέδων έκφρασης.

3.7. Διαγνωστική PCR

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν έγινε επιτυχώς η knock-down σίγηση του γονιδίου *RECUR1* χρειάστηκε να γίνει μία διαγνωστική PCR. Το DNA από τα δείγματα καθαρίστηκε και ακολούθησε PCR, ώστε να ενισχυθεί. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν σχεδιασμένοι για να υβριδίσουν εκατέρωθεν του γονιδίου ενδιαφέροντος. Η αντίδραση στήθηκε σύμφωνα με τα δεδομένα του ακόλουθου πίνακα. Στα 10μl από το μίγμα των αντιδραστηρίων προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα δείγματος, ώστε η τελική συγκέντρωση DNA να είναι 100ng και ο τελικός όγκος αντίδρασης 50μl. Μαζί με τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε και ένα δείγμα ελέγχου, κύτταρα AGS, τα οποία όμως δεν υπεβλήθησαν στη διαδικασία knock-down σίγησης.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Primer F1	1
Primer R1	1
dNTPs (Thermo Scientific (10mM)	0,5
KAPA Taq Polymerase	0,2
KAPA Taq A Buffer with Mg (10X)	5
WFI	2,3
	$V_{\text{TEΛ}}=10$

Πίνακας 5: Σύσταση αντιδραστηρίων για τη διαγνωστική PCR

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε τυπικές συνθήκες, οι οποίες αναγράφονται ακολούθως:

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (seconds)
Αρχική Αποδιάταξη	95	2
Αποδιάταξη	95	20
Υβριδοποίηση εκκινήτων	58	10
Επέκταση	72	15
Τελική επέκταση	72	2
Αναμονή	4	∞

Πίνακας 6: Οι συνθήκες εκτέλεσης της αντίδρασης PCR

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται, για να γίνει διαχωρισμός των τμημάτων DNA βάσει μεγέθους (μήκος bp). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αгарόζης 2%. Στα δείγματα προστέθηκε Loading Dye 6X. Μαζί με τα δείγματα, ηλεκτροφορήθηκε και ο αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή τα κύτταρα AGS.

3.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μορίων βάσει μοριακού βάρους και εν τέλει την ημι-ποσοτικοποίησή τους. Στην παρούσα διπλωματική, η τεχνική αξιοποιήθηκε για την ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων που προέκυψαν από το πείραμα επιγενετικής σίγησης με το εργαλείο KRAB-dCas9 σε κύτταρα AGS. Οι πρωτεΐνες πρώτα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης και ύστερα μεταφέρονται από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά, ακολουθεί η διαδικασία του blocking, όπου οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης εμποτίζονται με αντισώματα και σημαίνονται οι πρωτεΐνες. Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, είναι η αποτύπωση των δειγμάτων σε φωτογραφικό μικροφίλμ και η εμφάνισή τους. Αναλυτικότερα η διαδικασία που ακολουθήθηκε, ήταν η εξής:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα διαλύματα. Για την ηλεκτροφόρηση είναι το Running Buffer, ενώ για τη μεταφορά από το gel πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είναι το Resolving/Transfer Buffer. Η σύστασή τους φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

Running Buffer	Transfer Buffer
100ml 10X Running Buffer (-SDS)	100ml 10X Running Buffer (-SDS)
10ml SDS 10%	200ml MeOH
900ml H ₂ O	700ml H ₂ O

Πίνακας 7: Σύσταση των απαιτούμενων για την ηλεκτροφόρηση διαλυμάτων.

Στη συνέχεια στήθηκε η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (BIO-RAD) και παρασκευάστηκε το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα (gel) στην κάθετη ηλεκτροφόρηση διακρίνεται σε δύο φάσεις, εκείνο του διαχωρισμού (Resolving Gel) και εκείνο της συσσώρευσης (Stacking Gel). Η σύστασή τους αναγράφεται παρακάτω:

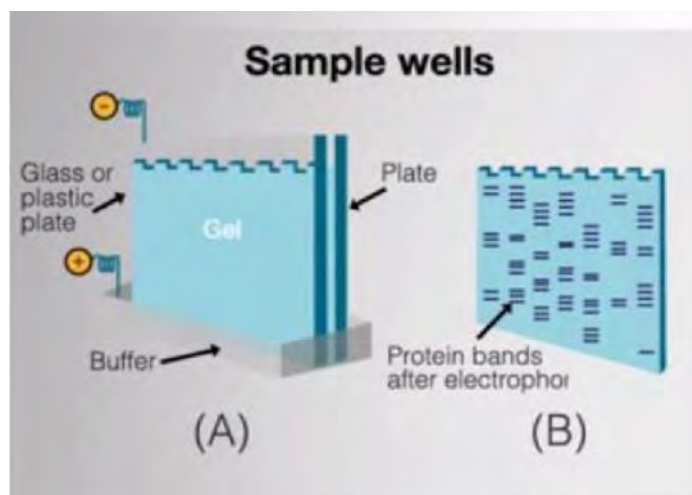
Σύσταση Πηκτής Διαχωρισμού (Resolving Gel)	
Αντιδραστήρια	Όγκος (ml)
H ₂ O	4,8
40% Acrylamide Bis Solution (BIO-RAD)	2,5
1,5M Tris pH=8,8	2,5
10% SDS	0,1
10% Ammonium Persulfate	0,1
TEMED (PanReac AppliChem)	0,004
	V _{TEA} = 10

Πίνακας 8: Σύσταση αντιδραστηρίων για την παρασκευή του Resolving gel

Σύσταση Πηκτής Συσσώρευσης (Stacking Gel) 5%	
Αντιδραστήρια	Όγκος (ml)
H ₂ O	2,96
40% Acrylamide Bis Solution	0,48
1M Tris pH=6,8	0,5
10% SDS	0,04
10% Ammonium Persulfate (APS)	0,04
TEMED	0,004
	V _{TEA} = 4

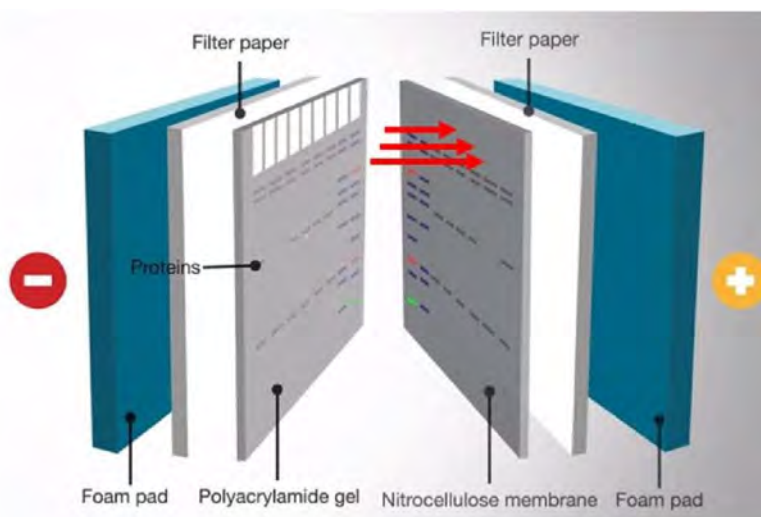
Πίνακας 9: Σύσταση αντιδραστηρίων για την παρασκευή του Stacking gel

Οι πηκτές εισάγονται στα ειδικά πλαίσια, όπου και θα στερεοποιηθούν. Όταν πήξουν, είναι έτοιμες για να γίνει η προσθήκη των δειγμάτων. Ύστερα πληρώνεται το δοχείο με το διάλυμα του Running Buffer. Συνδέονται τα ηλεκτρόδια και η ηλεκτροφόρηση ξεκινά με την τάση να ρυθμίζεται αρχικά στα 75V, για να περάσουν τα δείγματα ομαλά από το Stacking Gel στο Resolving Gel, κι έπειτα στα 110V.



Εικόνα 16: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του τρόπου διαχωρισμού των πρωτεϊνών στο σύστημα κάθετης ηλεκτροφόρησης, στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. (Πηγή: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/western-blot-transfer-methods.html>)

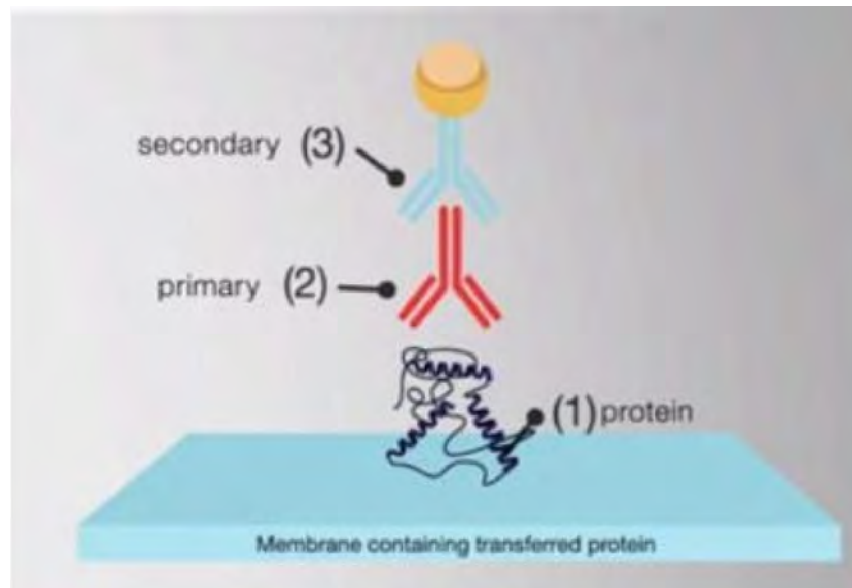
Όταν η ηλεκτροφόρηση πλησιάζει στο τέλος, ξεκινά η προετοιμασία για την μεταφορά των δειγμάτων από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την επιτυχή μεταφορά, αξιοποιείται μια κατασκευή με πολλαπλές στρώσεις χαρτιών Whatmann, σπόγγων, μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και της πηκτής πολυακρυλαμιδίου (**Εικόνα 17**). Η κατασκευή εισάγεται στο δοχείο, πληρώνεται το δοχείο με το διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) και εφαρμόζεται ηλεκτρικό



πεδίο

Εικόνα 17: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της κατασκευής του «sandwich» , για τη μεταφορά των δειγμάτων από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (Πηγή: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/western-blot-transfer-methods.html>)

Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών, σειρά έχει η ανίχνευση και η σήμανσή τους με ειδικά αντισώματα (Blocking). Η μεμβράνη επωάστηκε αρχικά με 10ml διαλύματος 5% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σκόνης σε TBST-T 1X (9ml ddH₂O, 1ml TBS 10x, 0,1ml Tween-20) για 1h, προκειμένου να



Εικόνα 18: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της πρόσδεσης των αντισωμάτων (πρωτογενές και δευτερογενές) πάνω στην πρωτεΐνη-στόχο, η οποία έχει μεταφερθεί στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (Πηγή: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/western-blot-transfer-methods.html>)

καλυφθούν μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος. Ύστερα αφαιρείται το γάλα, και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα, με το οποίο η μεμβράνη επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση, για ~16 ώρες. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό προς την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Επόμενο βήμα είναι η απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος, η πλύση της μεμβράνης για την απομάκρυνσή του, και η εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο είναι ειδικό για σύνδεση με το πρωτογενές αντίσωμα. Είναι επίσης συνδεδεμένο με ένα ένζυμο -δείκτη, την υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP), το οποίο αντιδρά με εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα και εκπέμπει φως (χημειοφωταύγεια).

Το τελευταίο στάδιο της τεχνικής Western Blot, είναι η αποτύπωση κι η εμφάνιση του σήματος χημειοφωταύγειας από την πρωτεΐνη, πάνω σε φωτογραφικό φιλμ. Παρασκευάζεται το διάλυμα χημειοφωταύγειας ECL (αναλογία 1:1), με το οποίο θα αντιδράσει το ένζυμο του δευτερογενούς αντισώματος. Η μεμβράνη επωάστηκε με το διάλυμα χημειοφωταύγειας για 5 λεπτά. Ύστερα συνεχίστηκε η διαδικασία σε σκοτεινό δωμάτιο, λόγω φωτοευαισθησίας της μεθόδου. Πάνω στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, τοποθετήθηκαν για λίγα δευτερόλεπτα κομμάτια από φωτογραφικό φιλμ, τα οποία ύστερα εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα εμφάνισης και μονιμοποίησης. Τα φιλμ ξεπλύθηκαν με νερό, και πάνω τους σημειώθηκαν οι ζώνες των δειγμάτων.

3.9 Απομόνωση DNA

Για τις ανάγκες του πειράματος knock-down σίγησης γονιδίου, χρειάστηκε η απομόνωση του DNA από τα κύτταρα υπό μελέτη. Αρχικά τα κύτταρα συγκεντρώθηκαν από την καλλιέργεια, φυγοκεντρούνται στα 3000rpm για 5' και στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 400μl Lysis Buffer 1X. Γίνεται ανάδευση κι ύστερα προστίθεται Πρωτεϊνάση K (4μl) για να διασπαστούν τα πρωτεϊνικά στοιχεία των κυττάρων. Τα δείγματα μπαίνουν στο υδατόλουτρο και επωάζονται ολονυκτίως, στους 55 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 400μl Ισοπροπανόλης, γίνεται ήπια ανάδευση, ώστε να γίνει κατακρήμνιση του DNA. Με τη βοήθεια ενός αγκίστρου, το συσσωμάτωμα του DNA απομακρύνεται από το tube και αφήνεται να στεγνώσει για 30'. Έπειτα τοποθετείται σε νέο tube προστίθεται Elution Buffer (100μl) για να γίνει διάλυση ολονυκτίως. Στο τέλος ακολουθεί θέρμανση του δείγματος στους 65 °C για αποδιάταξη του συσσωματώματος, έντονη ανάδευση και μέτρηση της συγκέντρωσης DNA του δείγματος στο μηχάνημα Quawell Q3000 UV. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C.

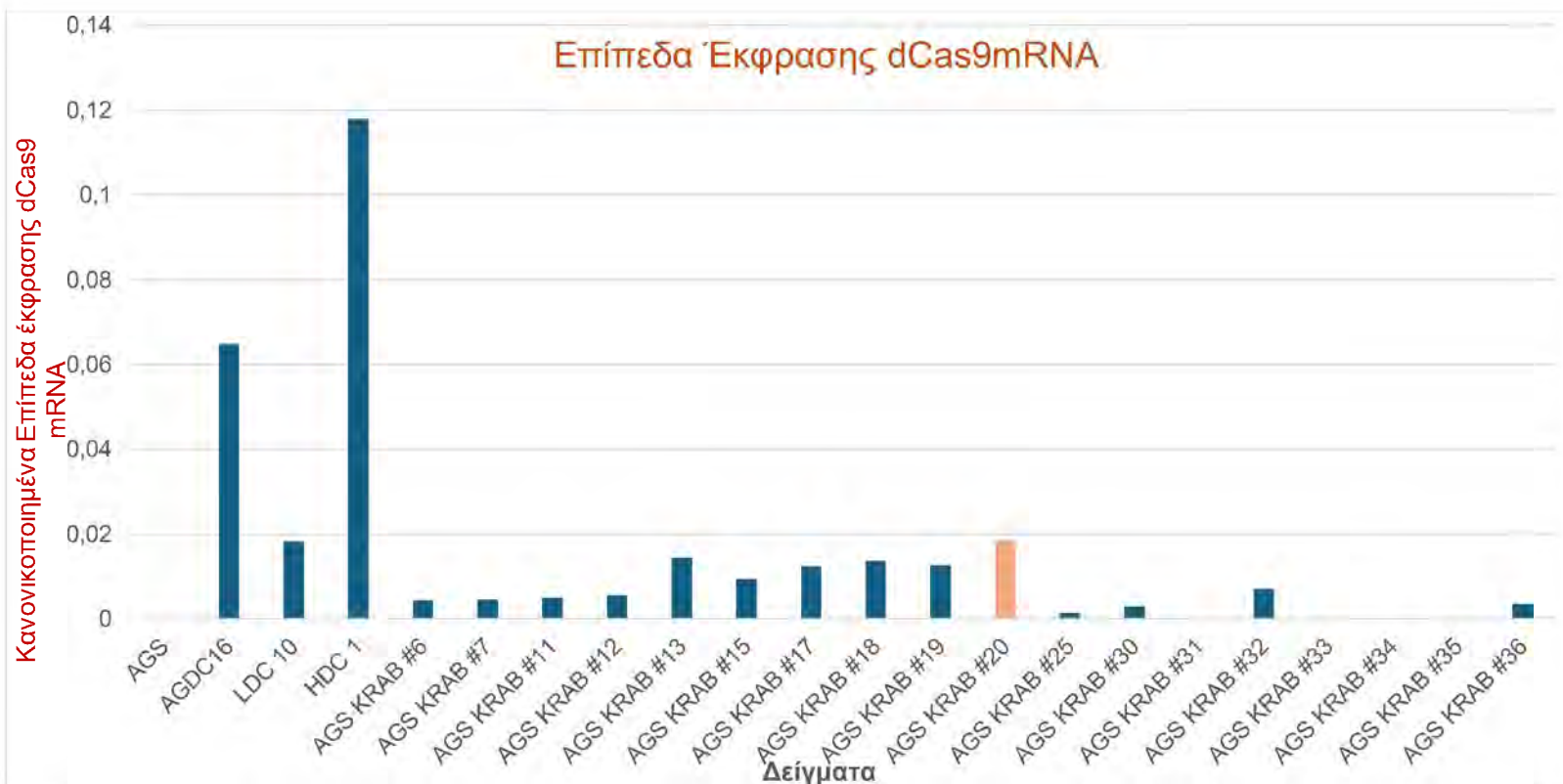
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της ερευνητικής δραστηριότητας του εργαστηρίου, εντάσσεται και η δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών, προκειμένου χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη και το λειτουργικό χαρακτηρισμό lncRNAs, των οποίων η δραστηριότητα μπορεί να σχετίζεται με τον Γαστρικό Καρκίνο.

Στα πλαίσια αυτού του ενδιαφέροντος, κύτταρα AGS επιμολύνθηκαν με ιικούς φορείς που ενείχαν το πλασμίδιο με την αλληλουχία για τη δημιουργία των εργαλείων KRAB και PX333 αντίστοιχα. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν, έγινε διαλογή με το αντιβιοτικό βλασπισιδίνη, κι ύστερα επιλέχθηκαν μοναδιαίες αποικίες, οι οποίες αναπτύχθηκαν μεμονωμένα ώστε να ακολουθήσει απομόνωση ολικού RNA.

4.1 Εργαλείο KRAB

Στις αποικίες που επιλέχθηκαν, ακολουθήσε απομόνωση RNA. Ύστερα έγινε κατεργασία με DNAase για καθαρισμό του δειγμάτων από υπολειμματικό DNA και αντίδραση σύνθεσης cDNA, από τα δείγματα RNA. Επόμενο βήμα ήταν η διενέργεια ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), προκειμένου να ανιχνευθεί αν ήταν επιτυχής η ένθεση του διαγονιδίου στα κύτταρα, και αν εκφράζεται το διαγονίδιο. Στην qRT-PCR, οι primers ήταν σχεδιασμένοι να ανιχνεύσουν το mRNA της ενδονουκλεάσης dCas9. Τα αποτελέσματα της μεθόδου, φαίνονται ακολούθως στο **Διάγραμμα 1**:



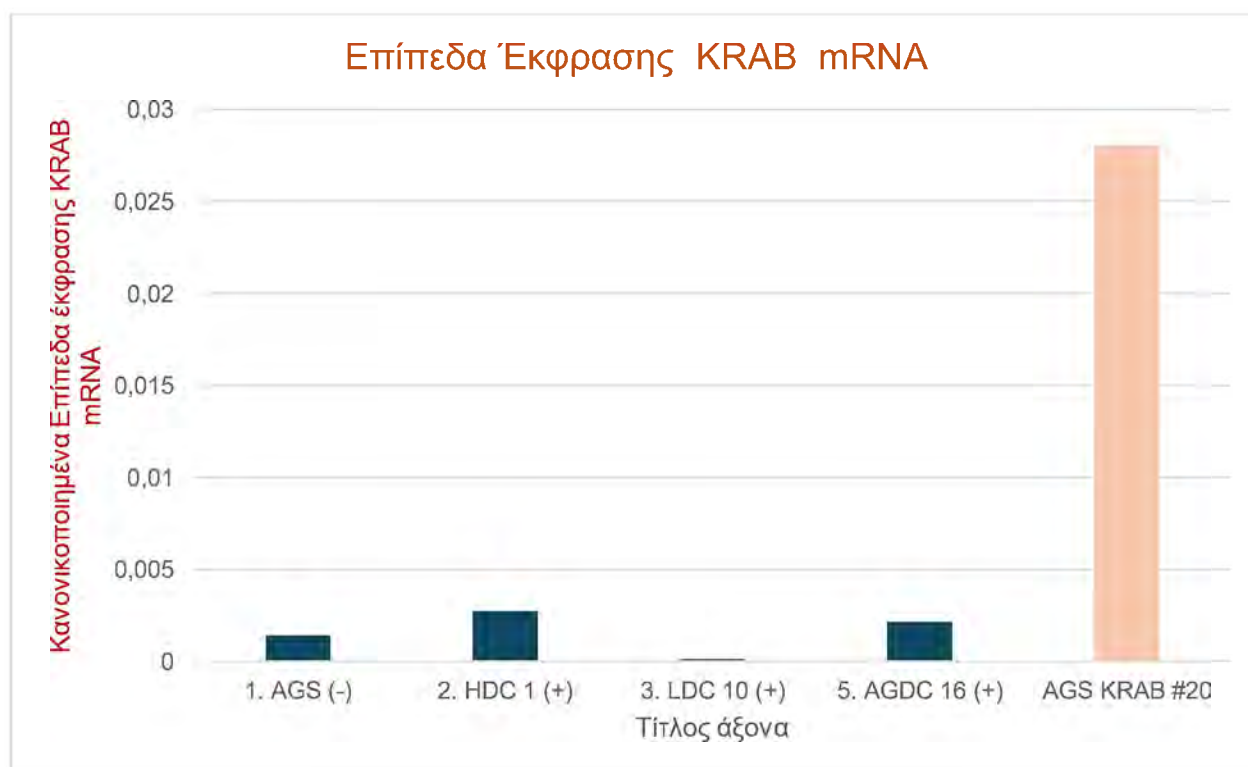
Διάγραμμα 1: Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης της dCas9 mRNA, ύστερα από qRT-PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα AGS, με primers ως προς την ανίχνευση του mRNA της πρωτεΐνης dCas9. Δείγμα αρνητικού ελέγχου: μη τροποποιημένα κύτταρα AGS. Δείγματα θετικού ελέγχου: AGDC16, LDC10, HDC1. Primers: dCas9 F1/R1

Το δείγμα κυττάρων AGS, είναι μη τροποποιημένα κύτταρα γαστρικού καρκίνου, και αποτελούν το μάρτυρα αρνητικού ελέγχου, διότι δεν έχει υποστεί την τροποποίηση μέσω του πλασμιδιακού φορέα, κι

επομένως δεν περιέχουν το ένθεμα για την έκφραση του συμπλόκου dCas9-KRAB-MeCP2. Τα δείγματα AGDC16, LDC10, HDC1, αφορούν κυτταρικές σειρές στις οποίες εκφράζεται σταθερά το γονίδιο για την dCas9, επομένως χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες θετικού ελέγχου, για σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του mRNA dCas9 με τα υπό μελέτη δείγματα. Τα δείγματα με την ένδειξη «AGS KRAB #», αποτελούν τα υπό μελέτη δείγματα, στα οποία ερευνήθηκαν αρχικά τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της dCas9.

Από τα δεδομένα του διαγράμματος φαίνεται πως τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου, αναμενόμενα δεν εκφράζουν καθόλου το mRNA dCas9, ενώ τα δείγματα θετικού ελέγχου παρουσιάζουν έκφραση σε υψηλά επίπεδα. Τα δείγματα υπό μελέτη παρουσιάζουν στο σύνολό τους χαμηλά επίπεδα έκφρασης του mRNA της dCas9. Ξεχώρισε ο κλώνος 20 (AGS KRAB #20), ο οποίος πλησίασε τα επίπεδα έκφρασης του θετικού μάρτυρα LDC10.

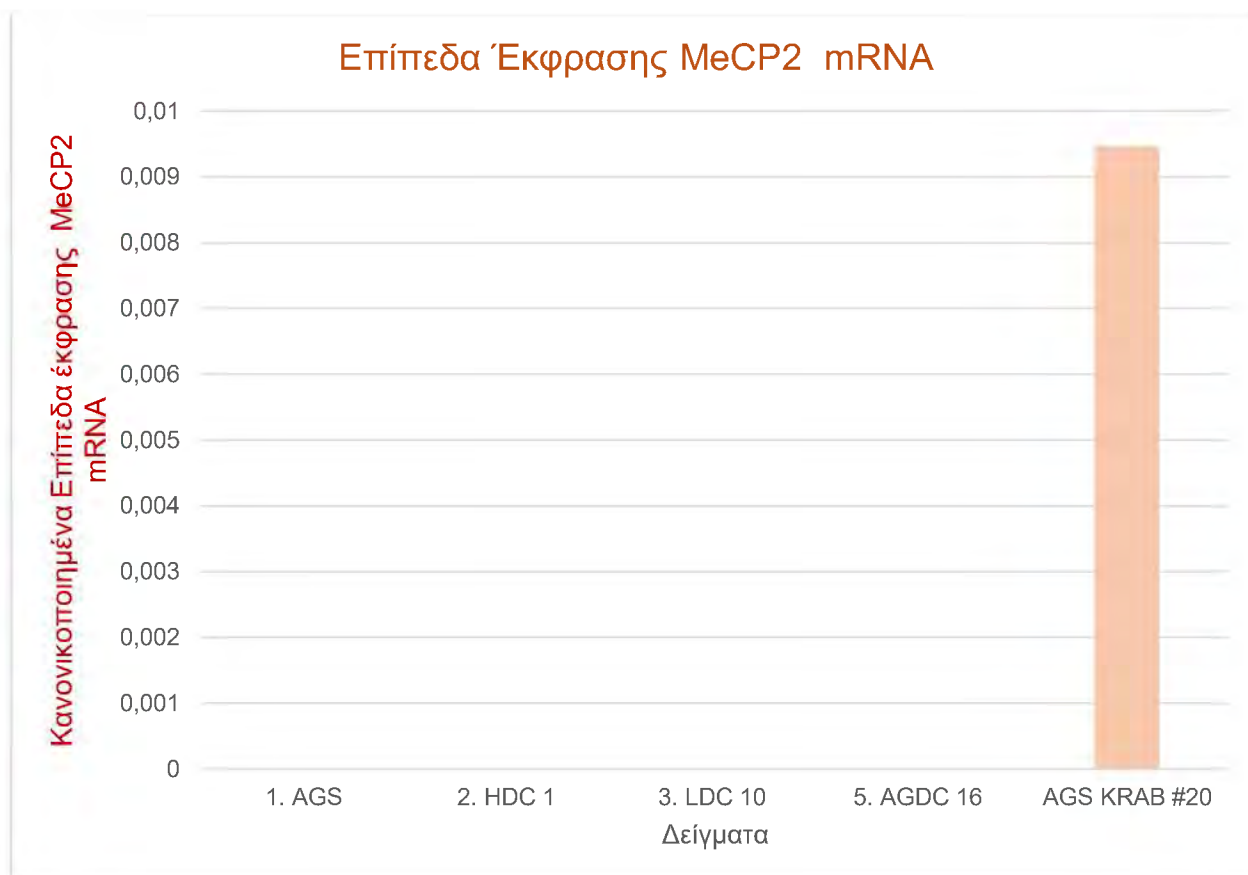
Ο συγκεκριμένος κλώνος επιλέχθηκε και περαιτέρω διερεύνηση με qRT-PCR, με σκοπό την ανίχνευση του mRNA των πρωτεϊνών KRAB και MeCP2, ώστε να διαπιστωθεί εάν εκφράζεται το mRNA και των άλλων δύο πρωτεϊνών του συμπλέγματος dCas9-KRAB-MeCP2. Στα ακόλουθα διαγράμματα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διερευνητικής qRT-PCR.



Διάγραμμα 2: Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του KRAB mRNA, ύστερα από qRT-PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα AGS, με primers ως προς την ανίχνευση του mRNA της πρωτεΐνης KRAB. Δείγμα αρνητικού ελέγχου: μη τροποποιημένα κύτταρα AGS. Δείγματα θετικού ελέγχου: AGDC16, LDC10, HDC1. Primers: KRAB F1/R1.

Στο διάγραμμα 2, φαίνονται τα αποτελέσματα ως προς την ανίχνευση του mRNA KRAB. Σημειώνεται πως η επικράτεια KRAB εντοπίζεται φυσιολογικά εντός του ανθρώπινου γονιδιώματος (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.3.2. CRISPRi), επομένως είναι αναμενόμενο να εντοπιστεί mRNA KRAB στα δείγματα ελέγχου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όλα τα δείγματα ελέγχου ήταν αρνητικοί μάρτυρες. Ο λόγος είναι πως στα μη-τροποποιημένα AGS κύτταρα, δεν υπάρχει το ένθεμα για το σύμπλοκο dCas9-KRAB-MeCP2, ενώ οι κυτταρικές σειρές AGDC16, LDC10, HDC1 είναι τροποποιημένες ώστε να εκφράζουν

σταθερά μόνο την dCas9. Επομένως δεν αναμένεται να ανιχνευθεί το mRNA KRAB σε μεγάλη ποσότητα, παρά μόνο στα φυσιολογικά επίπεδα. Αντιθέτως, στο δείγμα του κλώνου 20, ανιχνεύεται έκφραση του mRNA KRAB σε υψηλά επίπεδα, γεγονός που υποδεικνύει πως το κύτταρο εκφράζει επιτυχώς το ένθεμα.

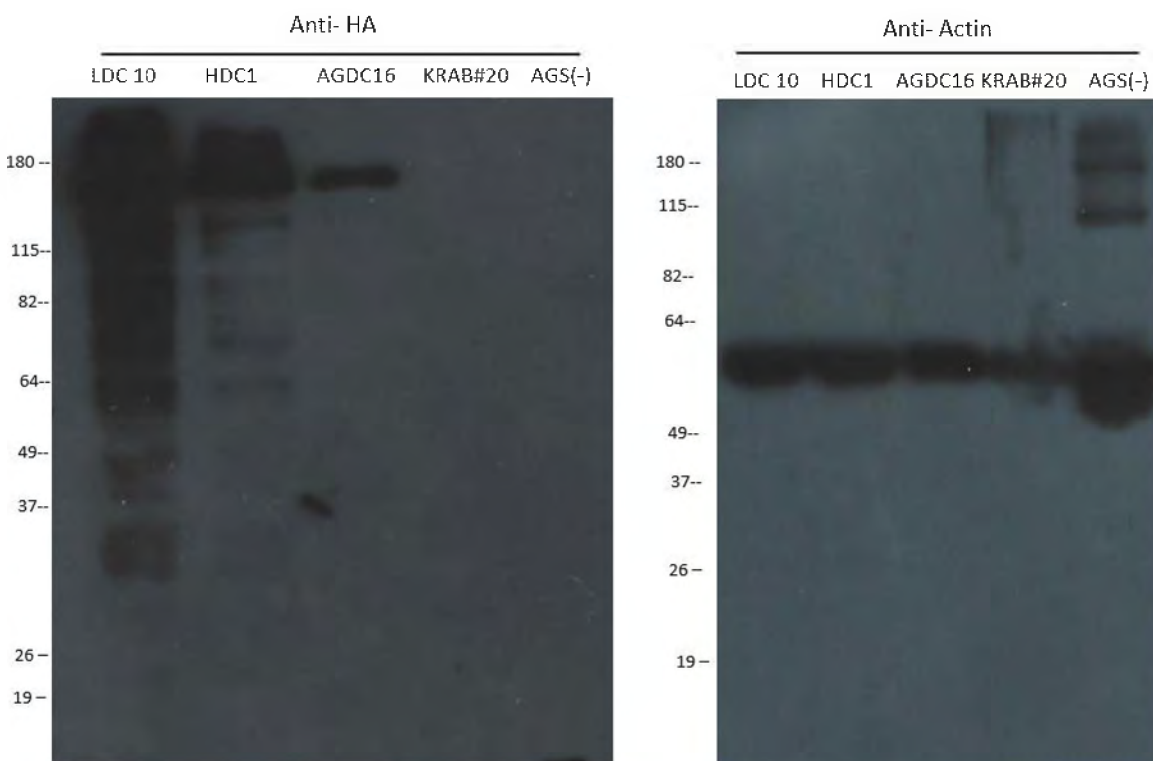


Διάγραμμα 3: Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του MeCP2 mRNA, ύστερα από qRT-PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα AGS, με primers ως προς την ανίχνευση του mRNA της πρωτεΐνης MeCP2. Δείγμα αρνητικού ελέγχου: μη τροποποιημένα κύτταρα AGS. Δείγματα θετικού ελέγχου: AGDC16, LDC10, HDC1. Primers: MeCP2 F1/R1.

Κατά αντιστοιχία, στο διάγραμμα 3, παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του μεταγραφικού παράγοντα MeCP2. Ο μεταγραφικός παράγοντας MeCP2 (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.3.2. CRISPRi) εκφράζεται σε υψηλό ποσοστό στα ώριμα κύτταρα του νευρικού συστήματος. Οι κυτταρικές σειρές των δειγμάτων ελέγχου εδώ είναι κύτταρα γαστρικού καρκίνου (AGS, AGDC16), κύτταρα HEK (HDC1) και κύτταρα LS174 (LDC10), επομένως είναι φυσιολογικό να μην εκφράζουν το mRNA MeCP2, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα. Το δείγμα του κλώνου 20, εμφανίζεται να εκφράζει το mRNA MeCP2, υποδηλώνοντας πως το ένθεμα εκφράζεται κανονικά.

4.2 Ανάλυση πρωτεϊνικών Cas9 επιπέδων με Western Blot

Αφού επιβεβαιώθηκε πως ο κλώνος 20 εκφράζει το μηχανισμό παρεμπόδισης (dCas9-KRAB-MeCP2 mRNA), επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος για έκφραση της πρωτεΐνης του συμπλόκου. Ακολούθησε πείραμα Western Blot με σκοπό την ανίχνευση της πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή αντισώματα λαγού anti-HA για την ανίχνευση ενός πρωτεϊνικού πεπτιδίου- tag (HA) το οποίο έχει συντηχθεί με την πρωτεΐνη της dCas9, του συμπλόκου dCas9-KRAB-MeCP2 και ύστερα δευτερογενή αντισώματα anti-rabbit προσδεδεμένα στο HRP με ένζυμο χημειοφωταύγειας, ώστε να γίνει η ανίχνευση. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε Western Blot για την ανίχνευση της ακτίνης, το οποίο είναι γονίδιο ιδιοσύστατης λειτουργίας των κυττάρων και βοηθά στην κανονικοποίηση των δειγμάτων. Για την ακτίνη χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή αντισώματα ποντικού anti-actin και για την ανίχνευσή τους, χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα anti-mouse.



Εικόνα 19: Αποτελέσματα Western Blot για της πρωτεΐνης dCas9, στο σύμπλοκο dCas9-KRAB-MeCP2. Πρωτογενές αντίσωμα για την KRAB: anti-HA. Πρωτογενές αντίσωμα για την Ακτίνη: anti-actin. Δείγμα αρνητικού ελέγχου: μη-τροποποιημένα AGS κύτταρα. Δείγματα θετικού ελέγχου: LDC10, HDC1, AGDC16.

Από τα αποτελέσματα της Western Blot, φαίνεται πως δεν ανιχνεύθηκε η πρωτεΐνη dCas9-KRAB-MeCP2. Στους μάρτυρες θετικού ελέγχου, η πρωτεΐνη ανιχνεύεται κανονικά. Συμπερασματικά, η δημιουργία του εργαλείου για τον συγκεκριμένο κλώνο, απέτυχε σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

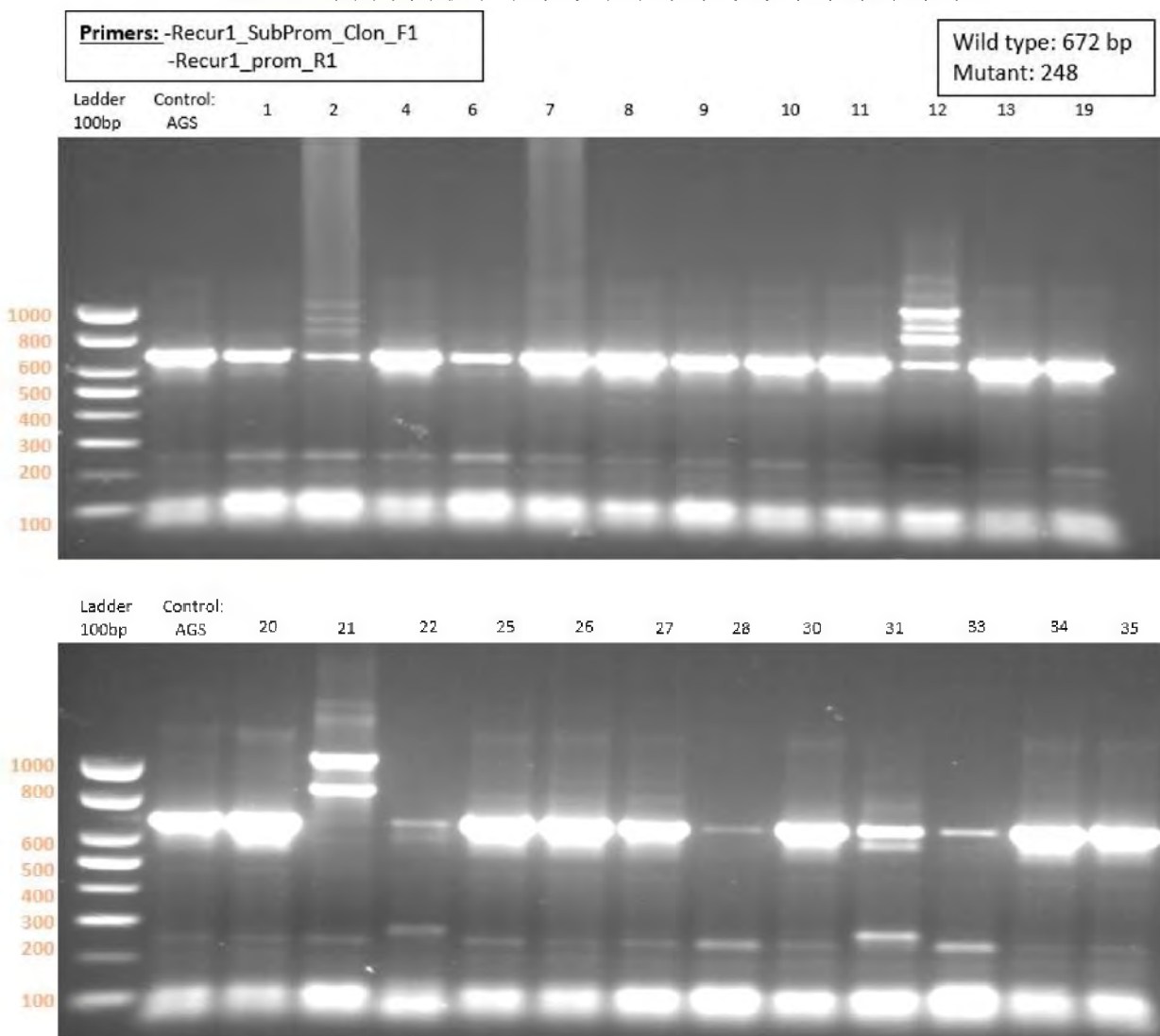
4.3 Εργαλείο PX333 για σίνηση μέσω αποκοπής DNA

Γι' αυτό το πείραμα σε καρκινικά γαστρικά κύτταρα AGS εφαρμόστηκε η τεχνική καταστολής της έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω αποκοπής τμημάτων DNA (knock-out). Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με λεντιούς, οι οποίοι έφεραν πλασμίδιο με το guide RNA που στόχευε τον υποκινητή του γονιδίου RECUR1, όπως αυτός έχει προσδιοριστεί από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μέσω ανοσοκαταβύθισης χρωματίνης.

Στις αποικίες που συλλέχθηκαν, ακολούθησε απομόνωση γονιδιωματικού DNA (DNA extraction),

Samples: AGS PX333 RECUR 1 PM

Clones #: 1,2,4,6,7,8,9,10,11,12,13,19,20,21,22,25,26,27,28,30,31,33,34,35



και ύστερα τα δείγματα οδηγήθηκαν σε PCR, με σκοπό την εύρεση των κλώνων στις οποίες το λειτούργησε το gRNA και έκοψε τη γονιδιωματική περιοχή στόχο.

Στις περιπτώσεις που το εργαλείο knock out λειτούργησε, αναμενόταν να έχει κοπεί η αλληλουχία του DNA ανάμεσα στην περιοχή που ενισχύουν οι primers Recur1_SubProm_Clon_F1 και Recur1_prom_R1, δίνοντας μια ζώνη προϊόντος ενίσχυσης στις 248bp. Αντίθετα, στις περιπτώσεις που το εργαλείο knock out δε λειτούργησε, ο φαινότυπος αγρίου τύπου, έδινε ζώνη προϊόντος στις 672bp.

Εικόνα 20: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης ύστερα από PCR. Οι primers της αντίδρασης ήταν Recur1_SubProm_Clon_F1 και Recur1_prom_R1. Μάρτυρας αρνητικού ελέγχου: μη τροποποιημένα κύτταρα AGS.

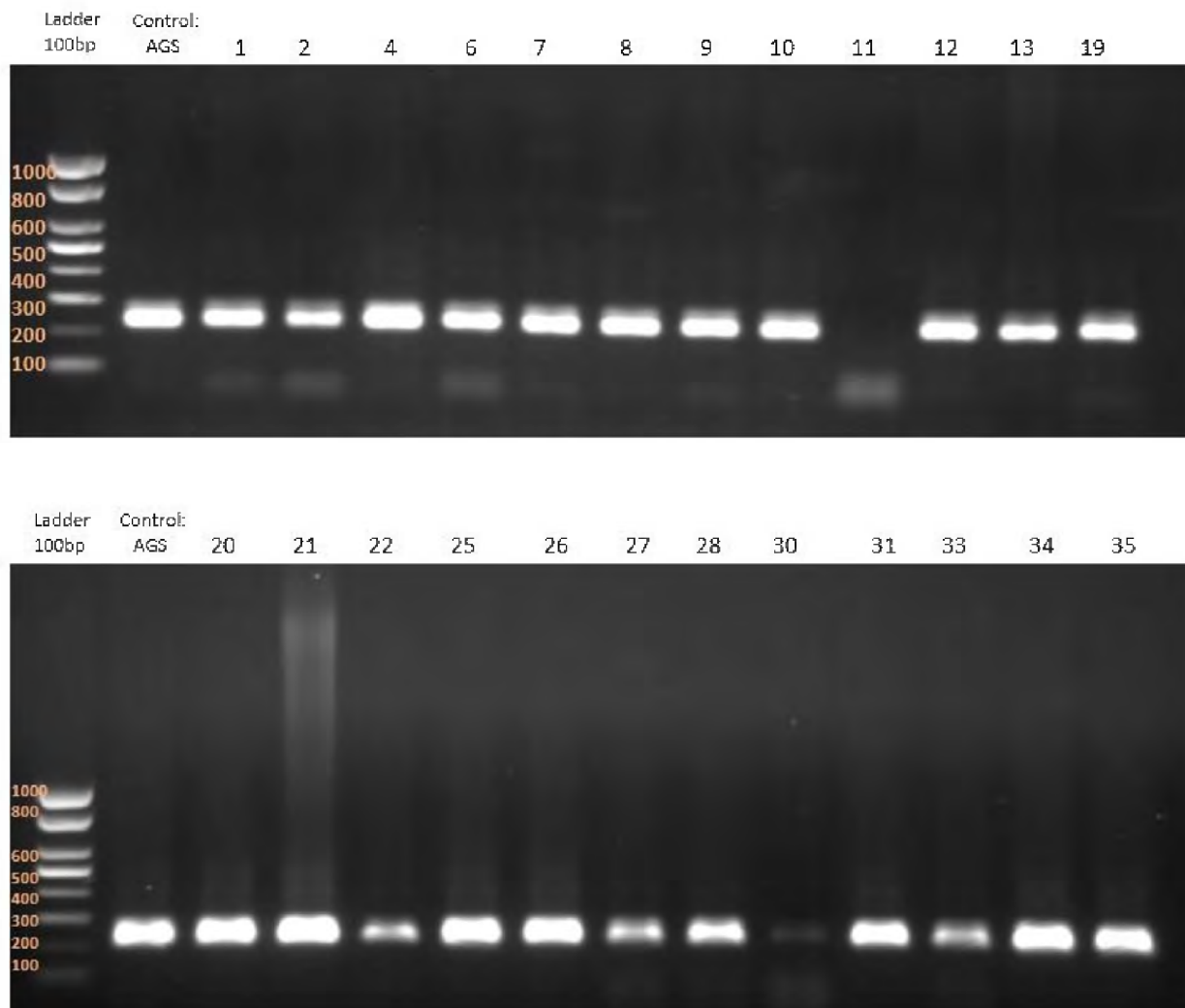
Στα αποτελέσματα της παραπάνω PCR, φαίνεται ένα διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης στους κλώνους 22 και 31, που σημαίνει πως ίσως εκεί δούλεψε το εργαλείο knock-out, δίνοντας προϊόν στις 250 βάσεις. Επίσης παρατηρήθηκε μια ζώνη, κοντά στις 200 βάσεις, η οποία εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα.

Παράλληλα με την παραπάνω ανάλυση, έγινε μια επίσης PCR με primers που ανιχνεύουν την ακτίνη, ένα γονίδιο ιδιοσύστατης λειτουργίας του κυττάρου, με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Samples: AGS PX333 RECUR 1 PM

Clones #: 1,2,4,6,7,8,9,10,11,12,13,19,20,21,22,25,26,27,28,30,31,33,34,35

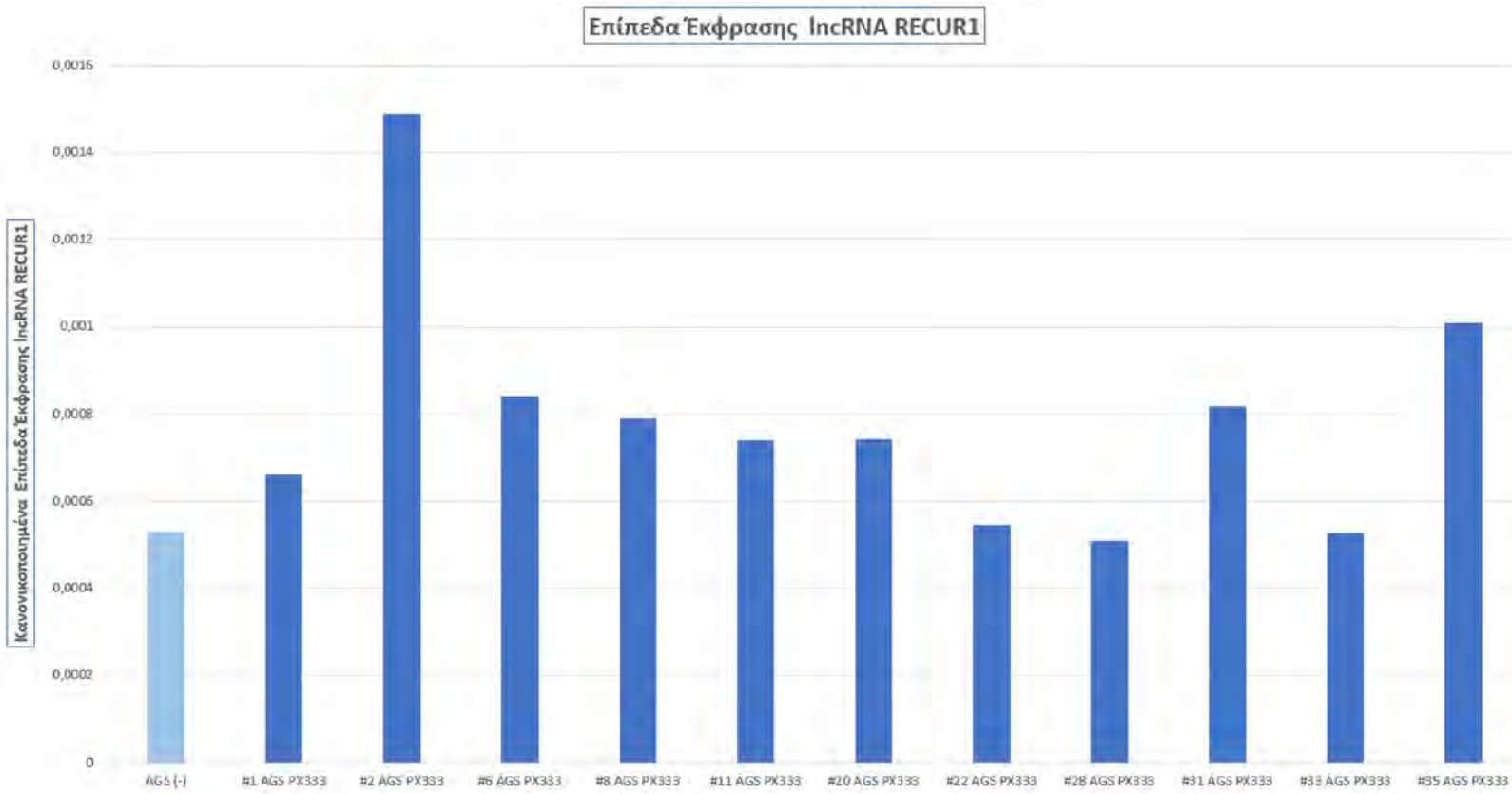
Primers: Actin F1/R1



Εικόνα 21: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης ύστερα από PCR. Οι primers της αντίδρασης ήταν Actin F1/R1. Μάρτυρας αρνητικού ελέγχου: μη τροποποιημένα κύτταρα AGS. Η ακτίνη, όταν χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA, αναμένεται να δώσει προϊόν στις 280pb.

Από την PCR για την ανίχνευση της ακτίνης, φαίνεται πως ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε σωστά, αφού όλα τα δείγματα εμφανίζουν ζώνη προϊόντος στις 280bp, όπου και αναμένεται να ανιχνευθεί η ακτίνη.

Οι κλώνοι 1,2,6,8,11,20,22,28,31,33,35 επιλέχθηκαν και ακολούθησε διερευνητική qRT-PCR, με σκοπό να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου RECUR1, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται ακολούθως.



Δείγματα

Διάγραμμα 4: Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του RECUR, ύστερα από qRT-PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα AGS, με primers ως προς την ανίχνευση του μεταγράφου του RECUR1. Δείγμα αρνητικού ελέγχου: μη τροποποιημένα κύτταρα AGS.

Ο αρνητικός μάρτυρας εδώ είναι μη τροποποιημένα AGS κύτταρα, τα οποία εκφράζουν κανονικά το lncRNA RECUR1. Από το διάγραμμα φαίνεται πως σε όλα τα δείγματα, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου RECUR1 των δειγμάτων είναι αντίστοιχα ή και ξεπερνούν τα επίπεδα έκφρασης του αρνητικού μάρτυρα. Το πείραμα ήταν knock out σίγηση γονιδίου, επομένως το αναμενόμενο αποτέλεσμα ήταν τα επίπεδα έκφρασης να εμφανίζουν σημαντική μείωση. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται εδώ, επομένως συμπεραίνεται ότι το εργαλείο δε λειτούργησε και η σίγηση δεν πέτυχε.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μία από τις κορυφαίες αιτίες θανάτου από καρκίνο, σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου είναι περισσότερο περιβαλλοντικοί και σπανιότερα γενετικοί. Ένας ανθυγιεινός τρόπος ζωής, η προσβολή από παθογόνα, όπως ο ιός EBV και το *H. Pylori*, η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, αλλά και ένα επιβαρυνόμενο οικογενειακό ιστορικό, αποτελούν τις συχνότερες αιτίες εμφάνισης της νόσου [81,82]. Μείζον πρόβλημα αποτελεί η καθυστερημένη ανίχνευση της νόσου, καθότι τα συμπτώματα στα πρώιμα στάδια της νόσου δεν είναι διακριτά, και οι διαθέσιμοι βιοδείκτες δεν είναι αρκετά ευαίσθητοι ή αρκετά ειδικοί [83]. Οι εκτενείς έρευνες στο πεδίο της μεταγραφωμικής, έχουν υποδείξει την συμμετοχή των μακρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA στις κυτταρικές λειτουργίες και τη γονιδιακή ρύθμιση. Τα lncRNAs δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά συμμετέχουν τα ίδια σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών διεργασιών και στη ρύθμιση ογκοκατασταλτικών και ογκοεπαγωγικών γονιδίων. Ο ρόλος τους σε συνδυασμό με την ιστοειδικότητά τους, τα καθιστά ιδανικά μόρια για χρήση ως βιοδείκτες στην ανίχνευση ασθενειών και ειδικότερα του γαστρικού καρκίνου [84]. Προκειμένου όμως να αξιοποιηθούν οι δυνατότητές τους, είναι απαραίτητος ο λειτουργικός χαρακτηρισμός τους. Για το σκοπό αυτό, χρειάζεται η ανάπτυξη εργαλείων που θα προσφέρουν τη δυνατότητα παρατήρησης της λειτουργίας των lncRNA. Η παρούσα διπλωματική, ως συνέχεια στο συνολικό ερευνητικό έργο του εργαστηρίου, είχε ως στόχο την κατασκευή εργαλείων για τη μελέτη της λειτουργίας lncRNAs στόχων που πιθανώς η δράση τους σχετίζεται με το γαστρικό καρκίνο.

CRISPRi: Εργαλείο επιγενετικής τροποποίησης dCas9-KRAB

Από τη βιβλιογραφία, έχει δειχθεί πως ένα σύστημα σίγησης, βασισμένο στο σύμπλοκο dCas9-KRAB, είναι εφικτό να λειτουργήσει, πετυχαίνοντας ικανοποιητικά επίπεδα σίγησης. Σε πειράματα κατασκευής και βελτίωσης του εργαλείου CRISPRi, οι ερευνητές δοκίμασαν να ενισχύσουν την ικανότητα σίγησης της dCas9 προσδένοντας σε αυτό παράγοντες σίγησης της γονιδιακής έκφρασης, όπως είναι οι επικράτειες VP64 και KRAB. Μετασχημάτισαν κύτταρα HEK293 με το συγκεκριμένο εργαλείο κι επιβεβαίωσαν την ικανότητα των κυττάρων να εκφράζουν το σύμπλοκο dCas9-KRAB/dCas9-VP64 και να πετυχαίνουν παροδική σίγηση του γονιδίου στόχου, παρουσία του sgRNA [73]. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια λεντικών φορέων, μετασχημάτισαν επιτυχώς κυτταρικές σειρές οι οποίες εξέφραζαν σταθερά το εργαλείο dCas9-KRAB. Ύστερα μετασχημάτισαν τις ίδιες κυτταρικές σειρές, ώστε να εκφράζουν και το sgRNA για το γονίδιο στόχο. Στα αποτελέσματα φάνηκε πως τα κύτταρα εξέφραζαν όλα τα στοιχεία του μηχανισμού σίγησης, σταθερά, και σε διάστημα έξι ημερών, είχε επιτευχθεί σίγηση του γονιδίου στόχου σε επίπεδο 75% [73]. Σε άλλο πείραμα επιγενετικής τροποποίησης, οι ερευνητές στόχευσαν τον ενισχυτή HS2, ο οποίος εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης πολλαπλών γονιδίων των σφαιρινών, αξιοποιώντας το εργαλείο dCas9-KRAB. Στα αρχικά πειράματα, πέτυχαν παροδική σίγηση του γονιδίου στόχου, εισάγοντας το σύμπλοκο dCas9-KRAB και το sgRNA με τη βοήθεια λεντικών φορέων [85]. Το αποτέλεσμα ήταν να επαχθεί τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9 της ιστόνης 3 (H3K9me3) στον ενισχυτή, μειώνοντας τη δυνατότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στο γενετικό τόπο. Σε επόμενο στάδιο, μετασχημάτισαν κύτταρα ερυθροειδούς λευχαιμίας K562, ώστε να εκφράζουν σταθερά το σύστημα dCas9-KRAB και εισήγαγαν sgRNAs που στόχευαν περιοχές της αλληλουχίας του ενισχυτή. Το αποτέλεσμα ήταν να επιτευχθεί η μεθυλίωση του ενισχυτή HS2 και η στερική παρεμπόδιση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στο γενετικό τόπο. Κατ' επέκταση μειώθηκε σημαντικά η έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών για διάστημα έως και έξι ημερών. Επίσης φάνηκε πως η πρόσδεση του συμπλόκου dCas9-KRAB συνδεόταν στον στόχο με μεγάλη ειδικότητα [85].

Στην παρούσα πτυχιακή, μελετήθηκε η ικανότητα κυττάρων AGS να εκφράζουν το εργαλείο γονιδιακής σίγησης CRISPRi- dCas9-KRAB-MeCP2. Τα κύτταρα αυτά υπέστησαν μετασχηματισμό με τη χρήση λεντιών, οι οποίοι έφεραν πλασμίδιο με το ένθεμα dCas9-KRAB-MeCP2. Οι επικράτειες KRAB και MeCP2 είναι μεταγραφικοί παράγοντες με έντονη δράση αναστολής της μεταγραφής. Η ενδονουκλεάση Cas9 του συμπλόκου, είναι καταλυτικά ανενεργή, φέροντας δύο σημειακές μεταλλάξεις που της επιτρέπουν μεν να συνδέεται στο γονιδίωμα βάσει του sgRNA, αλλά δεν είναι ικανή να προκαλέσει δίκλωνη ρήξη. Ο στόχος του πειράματος ήταν η εισαγωγή στο γονιδίωμα και η σταθερή έκφραση του συμπλόκου dCas9-KRAB-MeCP2, με σκοπό την δημιουργία μιας σταθερής κυτταρικής σειράς που θα χρησιμοποιηθεί για το λειτουργικό χαρακτηρισμό των lncRNAs. Στις μοναδιαίες αποικίες που συλλέχθηκαν, έγινε απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και εν τέλει qRT-PCR, ώστε να μελετηθεί αρχικά αν τα κύτταρα εκφράζουν σταθερά την dCas9. Από τα πειράματα ελέγχου φάνηκε πως ένας μόνο κλώνος είχε την ικανότητα να εκφράζει σταθερά το mRNA του συμπλόκου dCas9-KRAB-MeCP2. Στο συγκεκριμένο κλώνο έγινε έλεγχος της έκφρασης σε πρωτεϊνικό επίπεδο, με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης Western Blot, όπου φάνηκε πως, παρά την ύπαρξη μετάγραφου, δεν υπήρχε παραγωγή πρωτεΐνης, επομένως η κατασκευή του εργαλείου δεν ήταν επιτυχής.

CRISPR-KO: Εργαλείο knock-out σίγησης PX333

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η knock-out σίγηση γονιδίου μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9, έχει πολλαπλές εφαρμογές στη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων, επιτρέποντας την εύκολη και ακριβή στόχευση γενετικών τόπων στο γονιδίωμα. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει τη γενετική τροποποίηση κυττάρων με πρόκληση μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας (loss-of-function) σε γονίδια στόχους, επιτρέποντας τη δημιουργία κυτταρικών σειρών που φέρουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις και την παρατήρηση του φαινότυπου [86]. Φυσιολογικά, μια δίκλωνη ρήξη στο γονιδίωμα επιδιορθώνεται μέσω ενός εκ των δύο μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του κυττάρου. Ο πρώτος είναι ο Μηχανισμός εξαρτώμενος από τον ομόλογο ανασυνδυασμό (homology directed repair, HDR), και συνήθως ενεργοποιείται σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται στη φάση του πολλαπλασιασμού. Διαφορετικά το κύτταρο ενεργοποιεί το μηχανισμό σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (non-homologous end joining, NHEJ), ο οποίος όμως είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone), εισάγοντας μεταλλάξεις στο σημείο της επιδιόρθωσης (διαγραφές/προσθήκες νουκλεοτιδίων), οι οποίες μπορούν να μετατοπίσουν το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου ή να δημιουργήσουν πρώιμα κωδικόνια λήξης [87]. Από αναφορές στην βιβλιογραφία, το σύστημα γενετικής τροποποίησης CRISPR/Cas9-KO είναι ικανό να μετασχηματίσει ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών σειρών. Για τις ανάγκες δημιουργίας ενός πρότυπου πρωτοκόλλου, ερευνητές μετασχημάτισαν επιτυχώς βλαστικά κύτταρα λιπώδους ιστού (Adipose Stem Cells, ASCs) με τη βοήθεια λεντιικών φορέων, στοχεύοντας στην knock-out σίγηση ενός γονιδίου στόχου μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9 [88]. Από τα αποτελέσματά τους, προκύπτει συμπερασματικά πως η αποδοτικότητα της μεθόδου σχετίζεται άμεσα με τον τύπο κυττάρων προς μετασχηματισμό, τον τρόπο μετασχηματισμού (λεντιικοί, πλασμιδιακοί φορείς) καθώς και με την αλληλουχία του γονιδίου στόχου. Σε διαφορετικό πείραμα μετασχηματισμού, η ερευνητική ομάδα είχε ως στόχο το λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου PDEF, το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με την ογκογένεση και την κυτταρική λειτουργία στο γαστρικό καρκίνο [89]. Έπειτα από αξιολόγηση του ρόλου του PDEF σε 30 διαφορετικές περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού, προέβησαν σε καταστολή της λειτουργίας του γονιδίου σε κύτταρα AGS, μέσω CRISPR-Cas9-KO, για να μελετήσουν τη λειτουργία του.

Στην παρούσα διπλωματική, με το εργαλείο CRISPR-Cas9 έγινε προσπάθεια knock out σίγησης του γονιδίου RECUR1, με στόχευση στον υποκινητή του γονιδίου. Το guideRNA σχεδιάστηκε με σκοπό να οδηγήσει την ενδονουκλεάση Cas9 στον υποκινητή του γονιδίου RECUR1, προκαλώντας δίκλωνη ρήξη στο σημείο. Ο υποκινητής επιλέχθηκε διότι τυχόν μετάλλαξη στο σημείο αυτό, ύστερα από την επιδιόρθωση της ρήξης μέσω του μηχανισμού σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (NHEJ), δε θα επιτρέψει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και την πρόσδεση της DNA πολυμεράσης,

αναστέλλοντας έτσι την εκκίνηση της μεταγραφής. Το πλασμίδιο με το σύστημα Cas9-gRNA εισήχθη στα κύτταρα με τη βοήθεια λεντικών φορέων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και οδηγήθηκαν για απομόνωση DNA προκειμένου να διαπιστωθεί αν τελικά πέτυχε η σίγηση. Ακολούθησε PCR ενίσχυσης των προϊόντων και ύστερα ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα της PCR ήταν ανάμεικτα. Σε όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του αρνητικού μάρτυρα, παρατηρήθηκε μια ζώνωση στα 240bp περίπου. Από τη στιγμή που ζώνωση αυτή εμφανίζεται και στον αρνητικό μάρτυρα, τότε δεν πρόκειται για το επιθυμητό προϊόν από το knock out σύστημα.

Μια υπόθεση για την αποτυχία του πειράματος είναι πως θα μπορούσε να πρόκειται για επιμόλυνση ή για παραπροϊόν της αντίδρασης PCR, το οποίο τυχαίνει να βρίσκεται στην ίδια ζώνη με το επιθυμητό προϊόν. Τα μόνα δείγματα που εμφάνισαν ένα διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης, ήταν οι κλώνοι 22 και 31, καθότι σε αυτούς φαίνεται μια ζώνη στα 672bp, καθώς και μία ζώνη στα 250-280bp. Για να διαπιστωθεί τι πραγματικά βρίσκεται σε αυτή τη ζώνη, τότε τα δείγματα θα έπρεπε να πάνε για αλληλούχηση, ώστε να φανεί αν υπάρχει το κομμένο τμήμα του υποκινητή. Εναλλακτικά οι κλώνοι 22 και 31 που ξεχώρισαν, οδηγήθηκαν για qRT-PCR, ώστε να ερευνηθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου RECUR1. Εφόσον ο στόχος του εργαλείου ήταν η γονιδιακή σίγηση, αναμενόταν να υπάρξει πτώση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα της qRT-PCR, όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, φάνηκαν να έχουν επίπεδα έκφρασης ισοδύναμα ή και υψηλότερα από τον μάρτυρα. Αυτό υποδεικνύει πως η knock out σίγηση δεν πέτυχε. Εναλλακτικά, θα μπορούσε η σίγηση να έχει πετύχει, αλλά να πρόκειται για ετεροζυγωτία, με αποτέλεσμα τα επίπεδα έκφρασης από το δεύτερο αλληλόμορφο του κυττάρου μπορεί να καλύψει την δράση της knock out σίγησης στο άλλο αλληλόμορφο. Για να διαπιστωθεί εάν όντως υπήρξε knock out, θα έπρεπε να γίνει αλληλούχηση στα προϊόντα της PCR. Σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, η αποτελεσματικότητα ενός συστήματος CRISPR/Cas9-KO περιορίζεται από την αποτελεσματικότητα της μεθόδου μετασχηματισμού [86]. Στη μέθοδο μετασχηματισμού με χρήση διπλού πλασμιδιακού φορέα, τα κύτταρα πρώτα μετασχηματίζονται με τη χρήση λεντιών με σκοπό την ένθεση της ενδονουκλεάσης Cas9. Γίνεται διαλογή των κλώνων που εκφράζουν σταθερά την Cas9 και ύστερα ακολουθεί δεύτερος μετασχηματισμός με τα sgRNAs που θα στοχεύσουν τα επιθυμητά γονίδια. Η πολλαπλή ένθεση στοιχείων στο γονιδίωμα ωστόσο, μπορεί να δημιουργήσει ανεπιθύμητες μεταλλάξεις. Η διαρκής έκφραση της Cas9 στα κύτταρα, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε έκτοπες μεταλλάξεις [90]. Στην περίπτωση χρήσης ενός πλασμιδιακού φορέα, το μέγεθος του διαγονιδίου (dCas9-gRNA) μπορεί να φτάνει τα όρια της μεθόδου μετασχηματισμού με λεντιούς, μειώνοντας την απόδοση της μεθόδου [88]. Τέλος, σύμφωνα με αναφορές στη βιβλιογραφία, η αποδοτικότητα της μεθόδου μπορεί να επηρεαστεί από την αλληλουχία του γονιδίου στόχου. Τα πειράματα πραγματοποιούνται σε κύτταρα ανθρώπου τα οποία έχουν προέλθει από δότες. Ένας σημαντικός παράγοντας που αυξάνει την ποικιλομορφία στο ανθρώπινο γονιδίωμα, είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphism – SNP), οι οποίοι είναι ικανοί να μειώσουν την δραστικότητα του μηχανισμού CRISPR-Cas9 [88, 91].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Peters, J.M. and F.J. Gonzalez, *The Evolution of Carcinogenesis*. Toxicol Sci, 2018. **165**(2): p. 272-276.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17036.
4. Ferlay, J., et al., *Cancer statistics for the year 2020: An overview*. Int J Cancer, 2021.
5. Ajani, J.A., et al., *Gastric Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl ComprCancNetw, 2022. **20**(2): p. 167-192.
6. Ajani, J.A., et al., *Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, Version 2.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl ComprCancNetw, 2023. **21**(4): p. 393-422.
7. Sonnenberg, A., *Time trends of mortality from gastric cancer in Europe*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(4): p. 1112-8.
8. Thrift, A.P., T.N. Wenker, and H.B. El-Serag, *Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention*. Nat Rev Clin Oncol, 2023. **20**(5): p. 338-349.
9. Karimi, P., et al., *Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(5): p. 700-13.
10. Decourtye-Espiard, L. and P. Guilford, *Hereditary Diffuse Gastric Cancer*. Gastroenterology, 2023. **164**(5): p. 719-735.
11. van der Post, R.S., et al., *Accuracy of Hereditary Diffuse Gastric Cancer Testing Criteria and Outcomes in Patients With a Germline Mutation in CDH1*. Gastroenterology, 2015. **149**(4): p. 897-906 e19.
12. Sugano, K., et al., *Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis*. Gut, 2015. **64**(9): p. 1353-67.
13. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
14. Kim, J., et al., *Gene-diet interactions in gastric cancer risk: a systematic review*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9600-10.
15. Yang, L., et al., *Gastric cancer: Epidemiology, risk factors and prevention strategies*. Chin J Cancer Res, 2020. **32**(6): p. 695-704.
16. Berlth, F., et al., *Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(19): p. 5679-84.
17. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
18. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
19. Chia, N.Y. and P. Tan, *Molecular classification of gastric cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(5): p. 763-9.
20. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.

21. Sanjeevaiah, A., et al., *Gastric Cancer: Recent Molecular Classification Advances, Racial Disparity, and Management Implications*. J Oncol Pract, 2018. **14**(4): p. 217-224.
22. Zhang, W., *TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics*. Chin J Cancer, 2014. **33**(10): p. 469-70.
23. Jiao, Y., Y. Feng, and X. Wang, *Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications*. Biochemistry (Mosc), 2018. **83**(11): p. 1289-1298.
24. Gomez, K., et al., *Genomic landscape of virus-associated cancers*. medRxiv, 2023.
25. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
26. Matsuoka, T. and M. Yashiro, *Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(26): p. 2818-2832.
27. Hamashima, C., et al., *The Japanese guidelines for gastric cancer screening*. Jpn J Clin Oncol, 2008. **38**(4): p. 259-67.
28. Morris, K.V. and J.S. Mattick, *The rise of regulatory RNA*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(6): p. 423-37.
29. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 629-41.
30. Spizzo, R., et al., *Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research?* Oncogene, 2012. **31**(43): p. 4577-87.
31. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
32. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
33. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(12): p. 861-74.
34. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm*. Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
35. Gao, N., et al., *Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 598817.
36. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
37. Wang, Y., et al., *The long noncoding RNA IncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(4): p. 413-25.
38. Ketab, F.N.G., et al., *Dual biomarkers long non-coding RNA GAS5 and its target, NR3C1, contribute to acute myeloid leukemia*. Exp Mol Pathol, 2020. **114**: p. 104399.
39. Yuan, J.H., et al., *The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing FXN expression through the alternative splicing of lncRNA-FXN-AS1*. Nat Cell Biol, 2017. **19**(7): p. 820-832.
40. Hu, G., Z. Lou, and M. Gupta, *The long non-coding RNA GAS5 cooperates with the eukaryotic translation initiation factor 4E to regulate c-Myc translation*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107016.

41. Li, C., et al., *LncRNA-LOC101928316 contributes to gastric cancer progression through regulating PI3K-Akt-mTOR signaling pathway*. Cancer Med, 2019. **8**(9): p. 4428-4440.
42. Zeng, L., et al., *Long Non-Coding RNA XLOC_006753 Promotes the Development of Multidrug Resistance in Gastric Cancer Cells Through the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway*. Cell PhysiolBiochem, 2018. **51**(3): p. 1221-1236.
43. Shi, Y. and H. Sun, *Down-regulation of lncRNA LINC00152 Suppresses Gastric Cancer Cell Migration and Invasion Through Inhibition of the ERK/MAPK Signaling Pathway*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 2115-2124.
44. Yang, B., et al., *LINC00665 induces gastric cancer progression through activating Wnt signaling pathway*. J Cell Biochem, 2020. **121**(3): p. 2268-2276.
45. Zhou, X., et al., *Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11516.
46. Li, L., et al., *Long non-coding RNA MIF-AS1 promotes gastric cancer cell proliferation and reduces apoptosis to upregulate NDUFA4*. Cancer Sci, 2018. **109**(12): p. 3714-3725.
47. Wu, Q., et al., *FOXD1-AS1 regulates FOXD1 translation and promotes gastric cancer progression and chemoresistance by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway*. Mol Oncol, 2021. **15**(1): p. 299-316.
48. Xu, G., et al., *LncRNA CCHE1 in the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(9): p. 2631-2637.
49. Dong, X., et al., *lncRNA BG981369 Inhibits Cell Proliferation, Migration, and Invasion, and Promotes Cell Apoptosis by SRY-Related High-Mobility Group Box 4 (SOX4) Signaling Pathway in Human Gastric Cancer*. Med Sci Monit, 2018. **24**: p. 718-726.
50. Lin, Z., et al., *Long noncoding RNA gastric cancer-related lncRNA1 mediates gastric malignancy through miRNA-885-3p and cyclin-dependent kinase 4*. Cell Death Dis, 2018. **9**(6): p. 607.
51. Wang, C., A.C. Panayi, and M. Xin, *Opinions on the Swine Model for the Surgical Prevention of Lymphedema*. J Surg Res, 2019. **237**: p. 115.
52. Zhao, J., et al., *LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer*. Oncogene, 2018. **37**(30): p. 4094-4109.
53. Zhang, J.X., et al., *LINC01410-miR-532-NCF2-NF-kB feedback loop promotes gastric cancer angiogenesis and metastasis*. Oncogene, 2018. **37**(20): p. 2660-2675.
54. Wang, S., et al., *Long Noncoding RNA ROR Regulates Proliferation, Invasion, and Stemness of Gastric Cancer Stem Cell*. Cell Reprogram, 2016. **18**(5): p. 319-326.
55. Xiao, Y., et al., *LncRNA MALAT1 increases the stemness of gastric cancer cells via enhancing SOX2 mRNA stability*. FEBS Open Bio, 2019. **9**(7): p. 1212-1222.
56. 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.
57. Feng, W., et al., *Abnormally expressed long noncoding RNA B3GALT5-AS1 may serve as a biomarker for the diagnostic and prognostic of gastric cancer*. J Cell Biochem, 2020. **121**(1): p. 557-565.
58. Ghafouri-Fard, S. and M. Taheri, *Long non-coding RNA signature in gastric cancer*. Exp Mol Pathol, 2020. **113**: p. 104365.

59. Liu, X., et al., *Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 Is Overexpressed in Breast Cancer and Predicts Poor Prognosis for Breast Cancer Patients*. Med Sci Monit, 2021. **27**: p. e931102.
60. Yang, J., et al., *HOTAIR as a diagnostic and prognostic biomarker of gastrointestinal cancers: an updated meta-analysis and bioinformatics analysis based on TCGA data*. Biosci Rep, 2023. **43**(3).
61. Elsayed, E.T., et al., *Plasma long non-coding RNA HOTAIR as a potential biomarker for gastric cancer*. Int J Biol Markers, 2018: p. 1724600818760244.
62. Chu, C., J. Quinn, and H.Y. Chang, *Chromatin isolation by RNA purification (ChIRP)*. J Vis Exp, 2012(61).
63. Gaj, T., et al., *Genome-Editing Technologies: Principles and Applications*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(12).
64. Hu, J.H., K.M. Davis, and D.R. Liu, *Chemical Biology Approaches to Genome Editing: Understanding, Controlling, and Delivering Programmable Nucleases*. Cell Chem Biol, 2016. **23**(1): p. 57-73.
65. Barman, H.K., et al., *Gene editing tools: state-of-the-art and the road ahead for the model and non-model fishes*. Transgenic Res, 2017. **26**(5): p. 577-589.
66. Joung, J.K. and J.D. Sander, *TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 49-55.
67. Jiang, F. and J.A. Doudna, *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. Annu Rev Biophys, 2017. **46**: p. 505-529.
68. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 2014. **346**(6213): p. 1258096.
69. Adli, M., *The CRISPR tool kit for genome editing and beyond*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1911.
70. Qi, L.S., et al., *Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression*. Cell, 2013. **152**(5): p. 1173-83.
71. Larson, M.H., et al., *CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2180-96.
72. Margolin, J.F., et al., *Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4509-13.
73. Gilbert, L.A., et al., *CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes*. Cell, 2013. **154**(2): p. 442-51.
74. Yeo, N.C., et al., *An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation*. Nat Methods, 2018. **15**(8): p. 611-616.
75. Omachi, K. and J.H. Miner, *Comparative analysis of dCas9-VP64 variants and multiplexed guide RNAs mediating CRISPR activation*. PLoS One, 2022. **17**(6): p. e0270008.
76. Maeder, M.L., et al., *CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes*. Nat Methods, 2013. **10**(10): p. 977-9.
77. Mali, P., et al., *CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 833-8.
78. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
79. Chavez, A., et al., *Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming*. Nat Methods, 2015. **12**(4): p. 326-8.
80. Konermann, S., et al., *Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex*. Nature, 2015. **517**(7536): p. 583-8.

81. Vogelaar, I.P., et al., *Unraveling genetic predisposition to familial or early onset gastric cancer using germline whole-exome sequencing*. *Eur J Hum Genet*, 2017. **25**(11): p. 1246-1252.
82. Durazzo, M., et al., *Helicobacter pylori and Respiratory Diseases: 2021 Update*. *Microorganisms*, 2021. **9**(10).
83. Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer*. *Lancet*, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
84. Herrera-Pariente, C., et al., *Biomarkers for Gastric Cancer Screening and Early Diagnosis*. *Biomedicines*, 2021. **9**(10).
85. Thakore, P.I., et al., *Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements*. *Nat Methods*, 2015. **12**(12): p. 1143-9.
86. Giuliano, C.J., et al., *Generating Single Cell-Derived Knockout Clones in Mammalian Cells with CRISPR/Cas9*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2019. **128**(1): p. e100.
87. Ghassemi, B., et al., *Pipeline for the generation of gene knockout mice using dual sgRNA CRISPR/Cas9-mediated gene editing*. *Anal Biochem*, 2019. **568**: p. 31-40.
88. Mandl, M., et al., *CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in human adipose stem/progenitor cells*. *Adipocyte*, 2020. **9**(1): p. 626-635.
89. Zhang, Y.Q., et al., *CRISPR/Cas9-mediated knockout of the PDEF gene inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells*. *Biomed Pharmacother*, 2019. **111**: p. 76-85.
90. Ellis, J., *Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors*. *Hum Gene Ther*, 2005. **16**(11): p. 1241-6.
91. Lessard, S., et al., *Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(52): p. E11257-E11266.