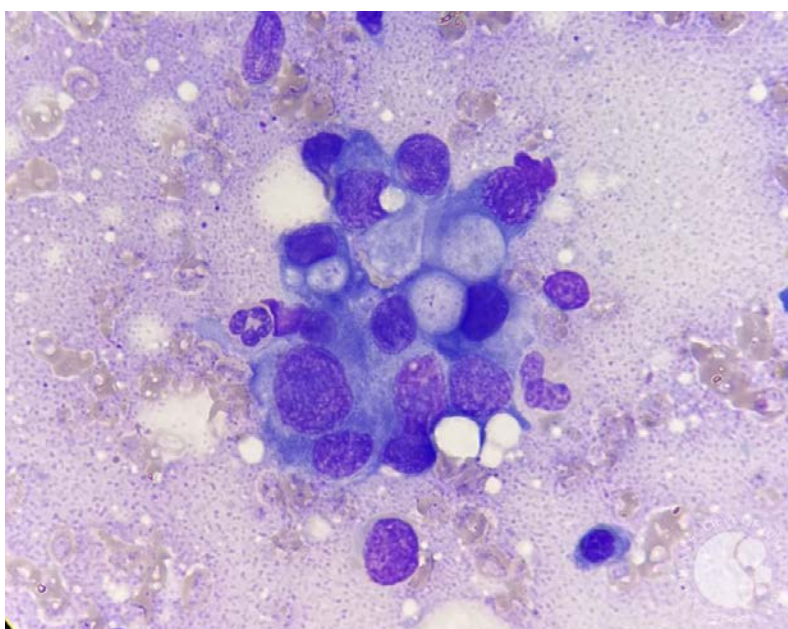


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

- **Πτυχιακή Εργασία Αποστόλου Κλεάνθη (του Ιωάννη)**
- **Υπεύθυνος Καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος**



«Γενετική μηχανική γαστρικών καρκινικών σειρών με στόχο την κατασκευή συστημάτων επαγόμενης καταστολής RNAi για γονίδια στόχους μεταγραφικών παραγόντων»

“Genetic engineering of gastric cancer lines to construct RNAi inducible silencing systems for transcription factor target genes”

ΛΑΡΙΣΑ, 2024

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων:

Κος Γιακουντής Αντώνιος (Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

Μέλη Επιτροπής:

Κος Μπαλατσός Νικόλαος (Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

Κος Δήμας Κωνσταντίνος (Καθηγητής Φαρμακολογίας στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

Ευχαριστίες

Η **πτυχιακή μου εργασία** ήταν μία από τις πιο ιδιαίτερες και όμορφες εμπειρίες κατά την διάρκεια της προπτυχιακής μου πορείας στο Τμήμα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής και καθέναν ξεχωριστά για την πανέμορφη συνεργασία και την ανελλιπή ομαδικότητα καθ' όλη την διάρκεια παραμονής μου εκεί. Ιδιαίτερα ευχαριστώ στον υπεύθυνο καθηγητή μου Γιακουντή Αντώνιο, ο οποίος με επέλεξε, με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία και την καθοδήγηση στον απαιτητικό κόσμο της Μοριακής Βιολογίας. Φυσικά ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Ελένη Ροντιόλα Μπεγκόλλι, η οποία δεν έλειψε λεπτό από δίπλα μου γεμάτη όρεξη για οδηγίες με περίσσεια υπομονή και συμπαράσταση σε ερευνητικό και προσωπικό επίπεδο. Από τις ευχαριστίες δεν λείπει η συμφοιτήτρια μου Καραλή Αικατερίνη για την άριστη συνεργασία και κοινή πορεία.

Τέλος, ένα από τα μεγαλύτερα ευχαριστώ ανήκουν στους φίλους, στην οικογένεια και στους γονείς μου που πάντα πίστευαν σε εμένα και με αγαπούν ανιδιοτελώς, περήφανοι για οποιοδήποτε βήμα μου. Χωρίς αυτούς δεν θα ήταν τίποτα εφικτό.

Περιεχόμενα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή.....	2
Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	6
Abstract	7

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Καρκίνος του Στομάχου (Gastric Cancer)	
1.1 Γενικά Στοιχεία και Επιδημιολογία της νόσου.....	8
1.2 Γενετική Βάση και Μοριακή ταξινόμηση.....	9
1.3 Διάγνωση και Θεραπεία Γαστρικού Καρκίνου.....	11
2. Long-non Coding RNAs (lncRNAs)	
2.1 Βασικά Στοιχεία.....	12
2.2 Ταξινόμηση lncRNA	
2.2.1 Με βάση τον υποκυτταρικό εντοπισμό.....	13
3. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων KLF και GATA	
3.1 Οικογένεια KLF.....	13
3.2 Οικογένεια GATA.....	14

ΥΛΙΚΑ

1. Κυτταρική Σειρά.....	16
2. Πλασμίδια.....	16
3. Όργανα-Μετρήσεις.....	17

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση RNA (RNA extraction).....	18
2. Κατεργασία με DNάση (DNase treatment).....	19
3. Σύνθεση cDNA (cDNA treatment).....	20
4. Real Time Quantitative PCR (Real Time qPCR)	21
5. Δοκιμασία Λουσιφεράσης (Luciferase Reporter Assay).....	22
6. Στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση.....	24

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σε κύτταρα MKN45 έπειτα από συνδυαστική σίγηση μεταγραφικών παραγόντων (GATA4/ GATA6 και KLF5)	
1.1 Αποτελέσματα επιλεγμένων lncRNA στόχων.....	25
1.2 Αποτελέσματα επιλεγμένων mRNA στόχων.....	32
2. Επιβεβαίωση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων στόχων σε κλινικά δείγματα ασθενών από την βάση GEPIA.....	53
3. MKN-Tet Κύτταρα (RNA extraction και έκφραση TetR γονιδίου) {Επαγόμενη Καταστολή RNAi}.....	58
4. Δοκιμασίες Λουσιφεράσης.....	62

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Σύγκριση με άλλες μεθόδους γονιδιακής σίγησης.....	66
2. Προσπάθειες γονιδιακής καταστολής στον γαστρικό καρκίνο.....	68

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Σύστημα Tet Knockdown.....	70
----------------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72
--------------------------	-----------

Περίληψη

Ο **γαστρικός καρκίνος** αποτελεί έναν από τους ιδιαίτερα συχνούς τύπους καρκίνου και κατατάσσεται στην δεύτερη θέση ως προς τα ποσοστά θνησιμότητας που τον συνοδεύουν. Ποικίλλει τόσο μορφολογικά όσο και μοριακά καθιστώντας την διερεύνηση ιδιαίτερα πολύπλοκη εξαιτίας και της έντονης πολυπαραγοντικότητάς του (τρόπος ζωής, περιβάλλον, γενετικό υπόβαθρο κτλ). Ως εκ τούτου, κρίνεται αναγκαία η έγκαιρη διάγνωσή του με νέους βιοδείκτες διότι με τις υφιστάμενες διαγνωστικές μεθόδους η νόσος γίνεται αντιληπτή στα τελευταία στάδια, μειώνοντας τις πιθανότητες επιβίωσης του ασθενούς. Σε αυτή την πτυχιακή εργασία, έγινε η προσπάθεια δημιουργίας ενός εργαλείου γενετικής μηχανικής σε **κύτταρα MKN45** που αφορούν μεταστατική γαστρική καρκινική σειρά αξιοποιώντας την **τεχνολογία επαγόμενης σίγησης TetR** με σκοπό την επαγόμενη καταστολή RNAi για ελεγμένα γονίδια στόχους που έχουν άμεση σχέση με την εξέλιξη της νόσου. Παράλληλα, σε περιβάλλον πάλι MKN45 κυττάρων στα οποία έχει επιτευχθεί παλαιότερα σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων **GATA4**, **GATA6** και **KLF5** ελέγχθηκε η ρύθμιση κωδικοποιητικών και μη γονιδίων-στόχων ώστε να προκύψουν λειτουργικές συσχετίσεις μεταξύ της δράσης αυτών των μεταγραφικών παραγόντων και της έκφρασης των υποψήφιων γονιδίων σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα.

Abstract

Gastric cancer is one of the most common types of cancer and ranks second in terms of mortality rates. It varies both morphologically and molecularly, making the investigation particularly complex due to the intense multifactoriality during its induction (lifestyle, environment, genetic background, etc.). Therefore, early diagnosis with new biomarkers is necessary because with existing diagnostic methods the disease is perceived in the last stages, reducing the patient's chances of survival. In this thesis, an attempt was made to create a genetic engineering tool in **MKN45 cells** involving metastatic gastric cancer line utilizing **TetR induced silencing technology** for the purpose of induced suppression of RNAi for tested target genes that are directly related to disease progression. At the same time, in an MKN45 cell environment which silencing of transcription factors **GATA4, GATA6** and **KLF5** has been previously achieved, the regulation of coding and non-coding target genes was tested to establish functional associations between the action of these transcription factors and the expression of candidate genes in gastric cancer cells.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

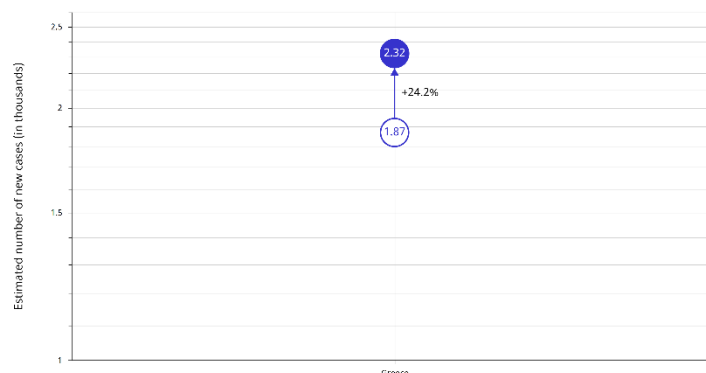
1. Καρκίνος του στομάχου (Gastric Cancer)

1.1 Γενικά Στοιχεία και Επιδημιολογία της νόσου

Ο **Γαστρικός Καρκίνος** αποτελεί μια μορφή της νόσου με μείζονα κλινική σημασία, όντας ο 5^{ος} τύπος καρκίνου σε συχνότητα εμφάνιση που ποικίλλει γεωγραφικά. Ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά εκδήλωσης και θνησιμότητας έχουν παρατηρηθεί σε περιοχές της Ανατολικής Ασίας, Ευρώπης καθώς και της Νότιας Αμερικής. Βέβαια, τα τελευταία χρόνια, χώρες με περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, όπως η Ιαπωνία και η Κορέα, έχουν αναπτύξει ιδιαίτερα δαπανηρά προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου, οδηγώντας το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης κοντά στο 90%(*Stock & Otto, 2005*)Αυτό επιτυγχάνεται μέσω έγκαιρης ενδοσκοπικής διάγνωσης και εκτομής του όγκου. Από την άλλη, σε χώρες της Ευρώπης το ίδιο ποσοστό κυμαίνεται μόλις στο 10-30%. Επίσης, η συχνότητα του γαστρικού καρκίνου διαφέρει στα δύο φύλα, με αποτέλεσμα να είναι δύο φορές μεγαλύτερη στους άνδρες απ' ότι στις γυναίκες.(*Sitarz et al., 2018*)

Επιπρόσθετα, παρατηρείται μία αύξηση επίπτωσης σε νεότερους ανθρώπους από χώρες υψηλού εισοδήματος, υποδηλώνοντας αλλαγή στους παράγοντες ρίσκου εμφάνισης αλλά και στα δεδομένα της επιδημιολογίας της νόσου. Σύμφωνα με το **Global Cancer Observatory (Εικ. 1)** σε συνδυασμό με τα στοιχεία από την επιστημονική κοινότητα, φαίνεται ότι μέχρι το 2050, ότι τόσο στην Ευρώπη(28,5%) όσο και στην Ελλάδα(24,2%), θα υπάρξει μία αύξηση περιπτώσεων καρκίνου του στομάχου περίπου στο 20-30% σε ηλικίες ασθενών 30-85 ανεξαρτήτως φύλου. Όλα αυτά τα στοιχεία, υπογραμμίζουν την ανάγκη έγκαιρης ανίχνευσης της νόσου για την επιτυχή αντιμετώπισή της .

Estimated number of new cases from 2022 to 2050, Both sexes, age [30-85+]
Stomach



Cancer Tomorrow | IARC <https://gco.iarc.who.int/tomorrow>
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2024



Estimated number of new cases from 2022 to 2050, Incidence, Both sexes, age [30-85*]
Stomach

Population	Annual population		Number		Change in number	Change in number of cases due to population	Change in number of cases due to risk
	2022	2050	2022	2050			
Greece	7 385 237	6 874 396	1 869	2 322	+24.2%	+24.2%	-

Εικόνα 1 Πρόβλεψη περιστατικών καρκίνου στομάχου σε ασθενείς στην Ελλάδα

Πάνω: Διαγραμματική Απεικόνιση / Κάτω: Δεδομένα σε μορφή πίνακα (δημογραφικά στοιχεία) [Global Cancer Observatory-Cancer Tomorrow] <https://gco.iarc.fr/>

1.2 Γενετική Βάση και Μοριακή ταξινόμηση

Η έντονη ετερογένεια της νόσου οφείλεται στην πολυπλοκότητα των παραγόντων που την επηρεάζουν. Εκτός από το περιβάλλον, εξίσου σημαντική είναι η γενετική και η μοριακή της βάση. Όσο αφορά τους **γενετικούς παράγοντες**, οι κληρονομικές μορφές γαστρικού καρκίνου υποδιαιρούνται σε 3 κατηγορίες, την διάχυτη κληρονομικού τύπου (HDGC) (*La Vecchia et al.*), όπου αποτελεί το <1% όλων των περιπτώσεων (αυτοσωμική επικρατής), τον οικογενή γαστρικό καρκίνο (*Lauwers et al., 2014*) του εντέρου (αυτοσωμικός επικρατής) και το γαστρικό αδеноκαρκίνωμα με εγγύς πολύποδα του στομάχου (αυτοσωμικό επικρατές). Η πρώτη κατηγορία είναι η εκτενέστερα μελετημένη, 30-40% των ασθενών με HDGC φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο CDH1 (*Bass et al., 2014*), το οποίο κωδικοποιεί την E-καδερίνη (μετάλλαξη στα βλαστικά κύτταρα) που προσδίδει επιθηλιακό χαρακτήρα και περιορίζει τον μεσεγχυματικό τους χαρακτήρα. Ωστόσο, στο 70% των ασθενών με HDGC η γενετική αλλαγή είναι προς το παρόν άγνωστη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει στην **μοριακή βάση** διαφόρων υποτύπων του γαστρικού καρκίνου (**Εικ.2**), σύμφωνα με την οποία οι γαστρικοί όγκοι διακρίνονται σε υπότυπους, ως εξής:

✓ Θετικός στον ιό Epstein-Barr (EBV+)

Το 9% των καρκίνων του στομάχου σχετίζεται με την μόλυνση από τον λοιμογόνο ιό Epstein-Barr (EBV). Μόλυνση από EBV, (*Bertuccio et al. 2009*) συνεπικουρεί στην εμφάνιση γαστρικής νεοπλασίας κυρίως σε άνδρες. Μοριακά, έχει παρατηρηθεί ότι όλοι οι θετικοί σε EBV όγκοι έχουν έντονα προφίλ μεθυλίωσης σε νησίδες CpG (*Toyota et al., n.d*) συγκριτικά με τους υπόλοιπους υποτύπους γαστρικού καρκίνου. Έπειτα από γονιδιωματική ανάλυση των όγκων, παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση με ταυτόχρονη αποσιώπηση στον υποκινητή του γονιδίου CDKN2a

που εκφράζει την πρωτεΐνη p16 (*Geddert et al., 2010*), η οποία μειώνει τον συνεχή πολλαπλασιασμό και οδηγεί μέσω απόπτωσης στην ογκοκαταστολή. Επιπλέον, σε αυτό τον υπότυπο, παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στην PI3-κινάση (PI3KCA), η οποία έχει άμεση σχέση με την μιτογόνο δράση, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική ανάπτυξη.

✓ Μικροδορυφορικός Ασταθής (MSI)

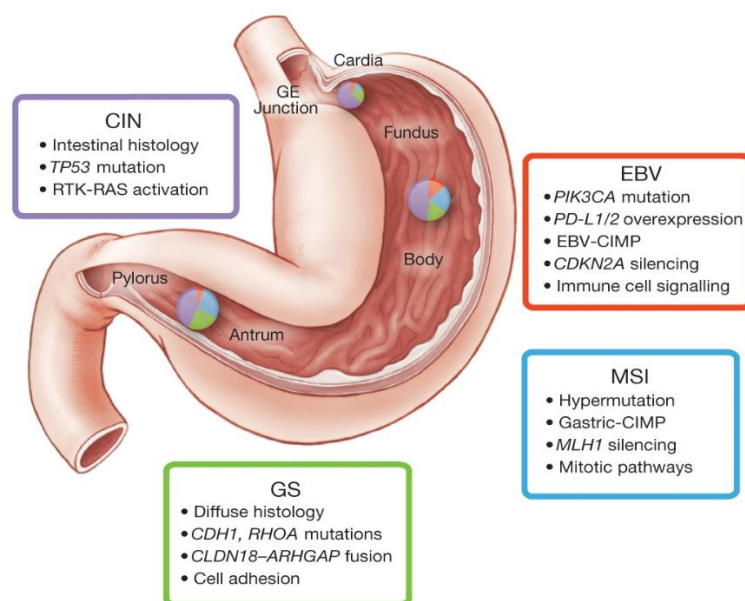
Οι όγκοι MSI, παρατηρήθηκαν στην πλειονότητά τους σε γυναίκες ασθενείς και αφορούν πολλαπλές μεταλλάξεις γονιδίων που έχουν άμεση σχέση με μιτογόνο δράση και πολλαπλασιασμό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αφορούν τα γονίδια: TP53, KRAS, PTEN3, PIK3CA (*Lei et al., 2013*) κ.α. Επιπλέον, δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις μεταλλάξεων σε γονίδια συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I , όπως HLA-B και B2M. Σε αυτούς τους MSI-όγκους μειώνεται η έκφραση των συμπλεγμάτων HLA τάξης 1 (*Bernal et al. 2012*), οδηγώντας στην ελαχιστοποίηση της αντιγονοπαρουσίασης με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού.

✓ Γονιδιωματικά Σταθεροί (GS)

Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι παρατηρήθηκαν σε μικρότερες ηλικίες ασθενών. Μοριακά, φαίνεται ότι σε αυτό τον υπότυπο παρατηρούνται μεταλλάξεις στο CDH1 (όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην E-καδερίνη, *Graziano et al., 2003*) στα σωματικά κύτταρα. Επιπλέον, μία από τις πιο χαρακτηριστικές μεταλλάξεις αφορά το RHOA (*Aznar et al., 2001*), το οποίο σε ενεργή-GTP μορφή ελέγχει μέσω τελεστών την ακτίνη της μυοσίνης και την κινητικότητα των κυττάρων (μεσεγχυματικός χαρακτήρας) καθώς και ενεργοποιεί το STAT3, ενισχύοντας την ογκογένεση.

✓ Χρωμοσωμικά Ασταθείς (CIN)

Στον συγκεκριμένο υπότυπο παρατηρείται έντονη χρωμοσωμική αστάθεια με βάση τα επίπεδα παρεκκλίσεων των αντίγραφων στον αριθμό γονιδίων σε σωματικά κύτταρα (SCNAs). Αυτό το φαινόμενο έγκειται στο γεγονός μη σωστής κατανομής των μικροσωληνίσκων κατά τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Τα κύρια χαρακτηριστικά αυτών των όγκων αφορούν την συχνή υπερμετάλλαξη του γονιδίου TP53 (περίπου το 71%) που κωδικοποιεί την βασική αποπτωτική πρωτεΐνη p53 (*Lawrence et al., 2013*) , και την συχνή εμφάνιση ανευπλοειδίας που την συνοδεύει.



Εικόνα 2 Σύνοψη των Μοριακών Υποτύπων του Γαστρικού Καρκίνου και η συχνότητά τους σε συγκεκριμένα σημεία του στομάχου (βάση διαγραμμάτων)

(Bass et al., 2014, [1])

<https://doi.org/10.1038/nature13480>

1.3 Διάγνωση και Θεραπεία Γαστρικού Καρκίνου

Κλινικά, ο γαστρικός καρκίνος διαγιγνώσκεται ιστολογικά με την βοήθεια ενδοσκοπικής βιοψίας. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά *Lauren*, οι διακριτοί ιστολογικοί υπότυποι διακρίνονται στον **γαστρικό εντερικό** (ο πιο συχνός-54%-), τον **διάχυτο** (αυξημένος ρυθμός διηθητικότητας) και ο **μεικτό υποτύπο**. Όσο αφορά τον χαρακτηρισμό του σταδίου, χρησιμοποιείται η αξονική τομογραφία, ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα, PET (τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων) και λαπαροσκόπηση. (Smyth et al., 2020)

Το κομμάτι της **θεραπείας** είναι ιδιαίτερα περίπλοκο αφού κατά μέσο όρο ο χρόνος επιβίωσης μετά την διάγνωση δεν υπερβαίνει το ένα έτος (καθώς οι όγκοι είναι ιδιαίτερα επιθετικοί και δεν αντιμετωπίζονται χειρουργικά, *Gholami et al.* 2017). Γενικά, η κύρια θεραπεία για τον πρώιμο καρκίνο του στομάχου είναι η **ενδοσκοπική εκτομή** ενώ ο καρκίνος όψιμου σταδίου I ή αρχικού σταδίου II του στομάχου αντιμετωπίζεται με χειρουργική επέμβαση, η οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει λεμφαδενεκτομή. Παράλληλα, η **περιεγχειρητική ή επικουρική χημειοθεραπεία** βελτιώνει την επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο σταδίου 1B ή υψηλότερου. Συνήθως, ο **προχωρημένος καρκίνος του στομάχου** αντιμετωπίζεται με διαδοχικές σειρές **χημειοθεραπείας**. Οι στοχευμένες θεραπείες (*Korea et al.*, 2010) που έχουν λάβει άδεια για τη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου περιλαμβάνουν την trastuzumab (πρώτη γραμμή ασθενών με θετικούς HER2-υποδοχέας ανθρώπινου

επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2-), τη ramucirumab (αντιαγγειογενετική δεύτερη γραμμή) και το nivolumab ή το pembrolizumab (τρίτη γραμμή κατά του PD-1-programmed cell death).

2 Long-non Coding RNAs (lncRNAs)

Γενικότερα, λόγω της απουσίας συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, οι υφιστάμενοι τρόποι διάγνωσης είναι επεμβατικοί και συνοδεύονται από αυξημένο κόστος, χαρακτηριστικά που αποτρέπουν την χρήση τους ως μεθόδους προληπτικής διάγνωσης ρουτίνας. Γι' αυτό το ενδιαφέρον στρέφεται σε μοριακούς βιοδείκτες με αυξημένη καρκινοειδική έκφραση και παρουσία σε σωματικά υγρά ασθενών ώστε να αξιοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία χαμηλού κόστους και επεμβατικότητας για τον ασθενή και το ασφαλιστικό σύστημα. Τα **μακρα-μη κωδικοποιητικά RNA** (Mattick 2001) συνδυάζουν πολλά από αυτά τα χαρακτηριστικά και για αυτό συμπεριλαμβάνονται στην προσπάθεια διευκρίνησης της διαγνωστικής εργαλειοθήκης για τον γαστρικό καρκίνο.

2.1 Βασικά Στοιχεία

Τα **lncRNAs** αφορούν μη μεταφραζόμενα μετάγραφα με μήκος μεγαλύτερο των 200nt. Παλαιότερα θεωρούνταν ως μεταγραφικός «θόρυβος» χωρίς να μελετάται η λειτουργία τους. Σήμερα έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν βασικό ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Taft *et al.*, 2010), συμβάλλοντας στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Έχουν πολλά κοινά με τα mRNAs, αφού διαθέτουν 5'καλύπτρα, 3'πολυαδενυλιωμένη ουρά και υπόκεινται σε μάτισμα, πολλές φορές με εναλλακτικά μοτίβα. Βέβαια, είναι μικρότερα σε μέγεθος και δεν περιέχουν ισάριθμα εξόνια σε σχέση με τα mRNA. Συνήθως, μεταγράφονται σε χαμηλά επίπεδα, εξειδικεύοντας σε μεγάλο βαθμό την έκφραση τους ανάλογα τον ιστό και το στάδιο ανάπτυξης συγκριτικά με τα mRNA (Begolli *et al.*, 2019). Γενικότερα, τα lncRNAs παίζουν ρόλο σε εξειδικευμένες φυσιολογικές λειτουργίες, οι οποίες εάν διαταραχθούν σχετίζονται πολλές φορές με παθολογίες όπως ο καρκίνος.

2.2 Ταξινόμηση lncRNA

2.2.1 Με βάση τον υποκυτταρικό εντοπισμό

Έχουν βρεθεί lncRNA τόσο στο **κυτταρόπλασμα** όσο και στον χώρο του **πυρήνα**. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της δράσης τους στο κυτταρόπλασμα αφορά την χρήση τους ως «μοριακά δολώματα» ενάντια στην δράση των miRNAs, τα οποία έχουν ως σκοπό την αναστολή δράσης συγκεκριμένων στόχων. Η πυρηνική τους δράση μπορεί να εκδηλώνεται είτε *in cis*, δηλαδή σε γειτονικά τους γονίδια, είτε *in trans* δηλαδή σε απομακρυσμένες θέσεις και άρα γονίδια στόχους στο γονιδίωμα, ενώ συνήθως δρουν ως ρυθμιστές μεταγραφικών παραγόντων ή ως επιγενετικοί τροποποιητές που καθορίζουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (*Sun W. et al., 2017*). Επιπροσθέτως στον πυρήνα τα lncRNA μπορούν να διαδραματίσουν ρόλους «οδηγού», σταθεροποιητή ή και ικρίωματος διότι αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες και ελέγχουν την ανοιχτή και κλειστή διαμόρφωση της χρωματίνης (*Engreitz J.M. et al. 2016*) με βάση κάθε φορά τις ανάγκες της γονιδιακής έκφρασης (επιλεκτικότητα). Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί η συμμετοχή των lncRNAs στον επιγενετικό μηχανισμό του Xist, το οποίο καθοδηγεί τις μεθυλοτρανσφεράσες ιστόνης με σκοπό την τυχαία αδρανοποίηση ενός αντιγράφου από τα 2 χρωμοσώματα στα θηλυκά άτομα μέσω μεθυλίωσης (*Wutz A et al., 2002*). Επιπρόσθετα η δράση των lncRNA έχει συσχετιστεί με επιγενετικές τροποποιήσεις που συνδέονται με τον **καρκίνο** (*Jones P.A et al., 2002*) είτε μέσω άμεσων είτε μέσω έμμεσων φυσικών τους αλληλεπιδράσεων με επιγενετικούς ρυθμιστές της μεταγραφής. Για αυτό και θεωρούνται ιδιαίτερα **εξειδικευμένοι και ακριβείς ως προς την δράση τους βιοδείκτες** στους περισσότερους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού.

3 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων KLF και GATA

3.1 Οικογένεια KLF

Ο μεταγραφικός παράγοντας **KLF5** αποτελεί μέλος της οικογένειας παραγόντων τύπου Krüppel (*Tetreault et al., 2013*). Πιο συγκεκριμένα, είναι μέλος μιας ομάδας 17 μεταγραφικών παραγόντων (TFs) που έχουν άμεση σχέση με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση (*Yang, Y. et al., 2011*) και την ανάπτυξη των κυττάρων. Κοινό τους χαρακτηριστικό αφορούν οι συντηρημένες περιοχές δέσμευσης DNA που αποτελούνται από 3 δακτύλους ψευδαργύρου (Zn) στο C-τελικό άκρο προσδίδοντας δέσμευση σε μια αλληλουχία DNA CACCC-box εννέα ζευγών βάσεων. Τα μοτίβα στο αμινοτελικό άκρο διαφοροποιούνται με βάση τον τομέα ενεργοποίησης ή καταστολής. Αυτές οι αποκλίσεις είναι σημαντικές για τις φυσιολογικές λειτουργίες των KLF, π.χ., οι διαφορές στο N-άκρο διευκολύνουν τη

σύνδεση συνενεργοποιητών, ή άλλων συμπαραγόντων που με τη σειρά τους ενισχύουν τη λειτουργική ποικιλομορφία μεταξύ των μελών της KLF οικογένειας (Fawcett, J. et al.). Επίσης διαφορετικά KLF μέλη μπορεί να εκφράζονται συνδυαστικά στον ίδιο τύπο κυττάρων. Για παράδειγμα ο KLF5 συνεκφράζεται με τους KLF2, KLF4 στα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, προσδίδοντας έντονη βλαστικότητα παράλληλα με την έκφραση πολυδύναμων γονιδίων, όπως τα Nanog που αναστέλλουν την διαφοροποίηση σε πρωτογενές ενδόδερμα. Αυτή η τριάδα σχηματίζει ένα μεταγραφικό σύμπλοκο που επαναπρογραμματίζει τα σωματικά κύτταρα σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs). Συγκεκριμένα, η ακετυλίωση του KLF5 συμβάλλει στην αυτοανανέωση και διαφοροποίηση του ESC. Επιπλέον, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση του KLF5 συμβάλλει θετικά στην ενίσχυση της απόπτωσης. Στην νόσο, η οικογένεια KLF μπορεί να ελέγξει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ελέγχοντας για παράδειγμα την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα ο KLF5, στοχεύει γονίδια που κωδικοποιούν κυκλίνες, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και αναστολείς CDK για τον έλεγχο της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Τέλος, διάφορα μέλη της KLF οικογένειας επηρεάζουν επίσης τη μεταγραφή αρκετών αναστολέων CDK ρυθμίζοντας και πάλι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Zakeri et al., 2022) Γενικότερα, η απορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των KLF έχει άμεση σχέση με διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιομυοπαθειών, των μεταβολικών ασθενειών και της ογκογένεσης, για αυτό και η μελέτη τους είναι μείζονος σημασίας.

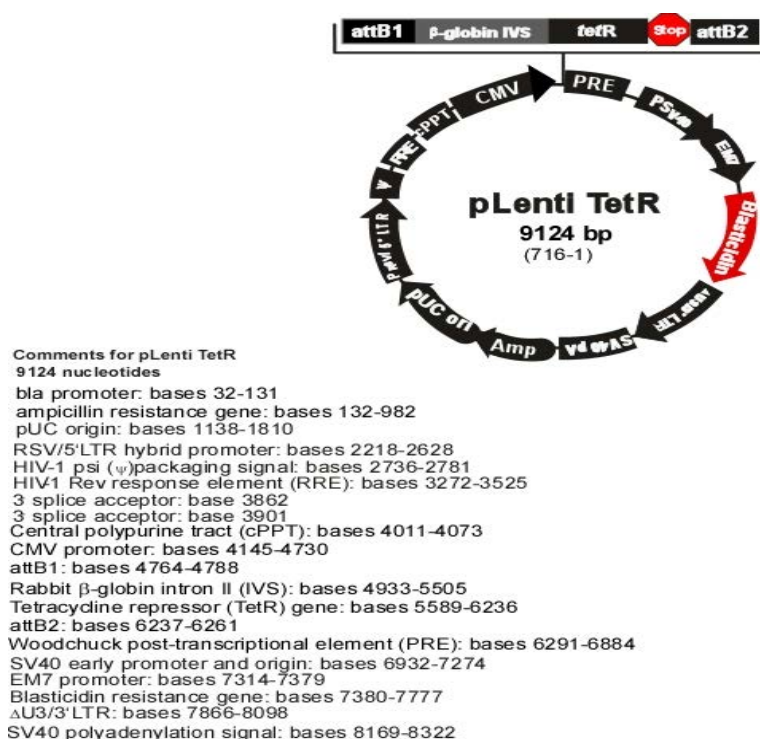
1.2 Οικογένεια GATA

Αυτή η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων πήρε το όνομά της από συγκεκριμένο μοτίβο αλληλουχίας DNA (T/A)GATA(A/G), στο οποίο συνδέονται με μεγάλη εξειδίκευση και συγγένεια. Κάθε παράγοντας GATA περιέχει 2 επικράτειες δακτύλους ψευδαργύρου που μεσολαβούν για την υψηλής συγγένειας δέσμευση στο DNA σταθεροποιώντας τις αλληλεπιδράσεις με την χρωματίνη. Τα μέλη της οικογένειας GATA που ανακαλύφθηκαν είναι 6 και χωρίζονται σε 2 κατηγορίες. Τα **GATA1, GATA2 και GATA3** (αιμοποιητικοί παράγοντες GATA) εκφράζονται κυρίως στο αιμοποιητικό σύστημα (Orkin SH, 1995) ενώ τα GATA2, -3 ανιχνεύονται κατά ένα ποσοστό και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Εκτός του αιμοποιητικού συστήματος, τα **GATA4, GATA5 και GATA6** (καρδιακοί παράγοντες GATA) εκφράζονται στον καρδιακό, γαστρεντερικό, γοναδικό και κεντρικό νευρικό ιστό (Molkentin JD, 2000). Η στοχευμένη σίγηση των μεμονωμένων γονιδίων GATA σε έρυνες με ποντίκια οδηγεί σε βαθιές αναπτυξιακές ανωμαλίες, επιβεβαιώνοντας την κομβική σημασία έκφρασής τους. (Bresnick et al., 2012)

Όσο αφορά τους **GATA4-GATA6** παράγοντες, έχει αποδειχθεί ότι έχουν άμεση σχέση με την ρύθμιση και την κακή έκβαση της νόσου στην περίπτωση του

αδενοκαρκινώματος του παγκρεατικού πόρου (PDAC, *O’Kane et al. 2020, Jiang W. et al. 2021*). Γενικότερα, φαίνεται ότι η παρουσία του ενός ρυθμίζει την έκφραση του άλλου αν και κατά κύριο λόγο αυτό ισχύει για τον GATA6 που ελέγχει την έκφραση του GATA4. Επιπλέον, οι δύο παράγοντες αποτελούν θετικούς ρυθμιστές της μετάστασης όπως στους λεμφαδένες όταν οι όγκοι τους υπερεκφράζουν. (*Heredia-Soto et al., 2023*). Τόσο ο GATA6 όσο και ο GATA4 έχουν ιδιαίτερο ρόλο στην ρύθμιση του γαστρικού καρκίνου και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως προγνωστικοί ή διαγνωστικοί βιοδείκτες, ωστόσο η φυσιολογική τους δράση σε άλλους ιστούς αποτρέπει την άμεση αξιοποίηση και στόχευσή τους. Για τον σκοπό αυτό έχουν προταθεί εναλλακτικοί οι καθοδικοί τους στόχοι με εξειδικευμένα και καρκινοειδική έκφραση και δράση, όπως τα **μόρια lncRNA** που αναφέρθηκαν προηγουμένως καθώς και διάφορα άλλα μεταγραφόμενα γονίδια στόχοι.

Επιπλέον, παρακάτω αναγράφεται αναλυτικά η περιοχή εισαγωγής του γονιδίου TetR και η κατανομή των βάσεων με τις κατάλληλες αλληλουχίες και ρυθμιστικά στοιχεία για την επιθυμητή έκφραση.



Εικόνα 7: Αναλυτική κατανομή των γονιδίων και των βάσεων στον πλασμιδιακό φορέα
<https://www.addgene.org/17492/>

Να σημειωθεί ότι το πλασμίδιο αυτό προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της **αμπικιλίνης**(Amp) και της **θλαστικιδίνης**(Blast), καθώς και ο ανασυνδυασμός του TetR πραγματοποιείται μέσω των αλληλουχιών **AttB** εκατέρωθεν του επιθυμητού στόχου (Ποικιλότητα φαινοτύπων).

3. Όργανα-Μετρήσεις

Όλες οι μετρήσεις συγκεντρώσεων τόσο RNA όσο DNA πραγματοποιήθηκαν από το φασματοφωτόμετρο **Quawell3000**. Όσο αφορά την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα **BioRad** ενώ η δημιουργία του πρωτοκόλλου καθώς και τα αποτελέσματα κάθε αντίδρασης έγιναν με την βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού **CFX Manager Bio Rad Version 3.1** (Bio Rad Laboratories). Επιπλέον, για την μέτρηση των δειγμάτων στην δοκιμασία λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε το λουμινόμετρο **Lumat3 (LB 9508)** της εταιρείας Berthold Technologies και τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν μέσω του λογισμικού **Instrument Control and Evaluation (ICE)**.

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου TetR για τον έλεγχο της επιτυχίας του συστήματος επαγόμενης σίγησης μέσω γενετικής τροποποίησης με λεντιούς σε κύτταρα MKN45, απομονώθηκαν τα τροποποιημένα κύτταρα-κλώνοι από 6-well plates, με αρχικό βήμα την απομόνωση του RNA. Συγκεκριμένα, σε καθένα από τα τρυβλία («πηγαδάκια») ανάπτυξης των κυττάρων προστέθηκε 1 ml αντιδραστηρίου TRI (Trizol, MRC), ακολούθησε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, μέχρι την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης RNA. Η διαδικασία απομόνωσης του RNA ξεκίνησε με την προσθήκη 200μl χλωροφορμίου (σε επαγωγό) και πολύ καλή ανάδευση των δειγμάτων (το λιγότερο 30''). Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν στις μέγιστες στροφές για 5 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C). Αμέσως μετά, απομακρύνεται το υπερκείμενο με ιδιαίτερη προσοχή για να μην διαταραχθεί η μεσόφαση ώστε να αποφευχθεί η ανάμειξη με τις πρωτεΐνες και γενικά με τα κυτταρικά θραύσματα που έχουν συσσωρευτεί στην κάτω φάση. Το κάθε υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο των 1,5ml στο οποίο προστέθηκαν 500μl ισοπροπανόλης και ανακινήθηκε το περιεχόμενο καλά 1-2 φορές, σταματώντας την διαλυτοποίηση και οδηγώντας στην δημιουργία ιζήματος, αφού τα δείγματα μπήκαν στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν για ένα τέταρτο πάλι στις μέγιστες στροφές (στους 4°C). Να σημειωθεί ότι πριν την ισοπροπανόλη, προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 2μl γλυκογόνου για περαιτέρω βοήθεια και πιο ξεκάθαρη εικόνα του ιζήματος καταβύθισης. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με μία κίνηση και προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 500μl 70% ice cold αιθανόλη για περαιτέρω καθαρισμό, έπειτα αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν πάλι στις μέγιστες στροφές για 10 λεπτά (στους 4°C). Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε η ποσότητα αιθανόλης που είχε απομείνει με ιδιαίτερη προσοχή και χειρισμό. Στο τέλος του πρωτοκόλλου προστέθηκαν 50μl RNase free H₂O για επαναδιάλυση, το κάθε δείγμα θερμάνθηκε στους 65°C για 5 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

2. Κατεργασία με DNάση (DNase treatment)

Η διαδικασία της απομόνωσης RNA συνεχίστηκε μέσω της πλήρους αποικοδόμησης όλων των μορίων DNA που μπορεί να έχουν απομείνει από την εξαγωγή του RNA. Αρχικά, μετρήθηκε η συγκέντρωση σε μηχανήμα Quawell για να επιβεβαιωθεί ότι έχει απομονωθεί επαρκής ποσότητα νουκλεϊκών οξέων (επιθυμητές οι τιμές >100ng/μl). Για να ξεκινήσει το πρωτόκολλο του DNase treatment χρησιμοποιήθηκαν **25μl δείγματος** (nucleic acid sample) και το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε στους -80°C. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε **μείγμα αντιδραστηρίων** για n+1 δείγματα σε κάθε περίπτωση με τις παρακάτω ποσότητες για το κάθε δείγμα με τελικό όγκο 30μl (**Vτελ=30μl**):

Master Mix (1x)	Όγκος (μl)
DNase Buffer (10x) -Thermo-	3μl
DNase enzyme(1 U/μl) -Thermo-	1 μl
RNase out(40 U/μl) -Invitrogen-	0,5μl
WFI (water for injection)	0,5 μl

Πίνακας 1: Ποσότητες μείγματος αντιδραστηρίων στην κατεργασία με DNase

Ακολούθησε ελαφριά ανάδευση του μείγματος και από αυτό προστέθηκαν 5 μl σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, ακολούθησε απευθείας επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα. Ακολούθησε προσθήκη 40μl οξικού νατρίου (δηλαδή το 1/10 του τελικού όγκου-συγκέντρωση 3M και pH 5,6-) και 330μl WFI και αμέσως μετά προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα φαινόλης-χλωροφορμίου (400μl), αναδεύοντας για 30'' το ελάχιστο με 1 λεπτό, προχωρώντας σε φυγοκέντρηση στην ψυχόμενη φυγόκεντρο πάλι στις μέγιστες στροφές και την ίδια θερμοκρασία.

Μετά την φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί ή να αναμιχθεί με την κάτω φάση και προστέθηκε σε νέο σωληνάριο στον πάγο για το κάθε δείγμα χωριστά. Για πιο έντονη κατακρήμνιση προστέθηκε 1ml 100% αιθανόλη ice cold καθώς και 2μl γλυκογόνου, αναδεύοντας 4-5 φορές με προσοχή και κατευθείαν τα νέα tubes αποθηκεύτηκαν στους -80°C για τουλάχιστον 1h.

Μετά την καταβύθιση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν κατευθείαν για μισή ώρα στην ψυχόμενη φυγόκεντρο με μέγιστες στροφές και με το πέρας του μισάωρου, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με μία μόνο κίνηση. Στην συνέχεια, η πλύση συνεχίστηκε με την προσθήκη 500μl αιθανόλης 70% ice cold και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά με ίδιες συνθήκες. Για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης από το κάθε ίζημα, απομακρύνθηκε με πολύ προσοχή όλη η αιθανόλη χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα και τα υπολείμματα εξατμίστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά ώστε να «στεγνώσουν» πλήρως. Η επαναδιάλυση πραγματοποιήθηκε με 30μl WFI, με θέρμανση στους 60°C για 5 λεπτά, έντονη ανάδευση και spin. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3. Σύνθεση cDNA (cDNA treatment)

Το επόμενο βήμα ήταν η **σύνθεση cDNA** από το απομονωμένο RNA των δειγμάτων. Για να επιβεβαιωθεί ότι έχει πετύχει η απομόνωση και υψηλό ποσοστό καθαρότητας RNA (λόγος απορρόφησης 260nm/280nm, ιδιαίτερα υψηλή καθαρότητα όταν ο λόγος κυμαίνεται >1,8) μετρήθηκε η συγκέντρωση RNA του κάθε δείγματος στο φασματοφωτόμετρο Quawell3000. Η συγκέντρωση πάνω κάτω πρέπει να κυμαίνεται >100ng/μl, για να είναι η ποσότητα του RNA υποστρώματος ίση με 1000ng καθώς και ο τελικός όγκος Vτελ=10μl αυστηρά. Οι ποσότητες δειγμάτων που απέμειναν αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Στη συνέχεια, για την δημιουργία cDNA παρασκευάστηκαν **δύο μείγματα αντιδραστηρίων**, το 1^ο για την στόχευση του RNA κλώνου και το 2^ο για την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT). Πιο συγκεκριμένα:

Master Mix 1 (1x)	Ποσότητες Αντίδρασης (μl)
dNTPs (10mM)	1μl
Random hexamers (100mM) -Takara-	1μl
ΕΠΩΑΣΗ ΓΙΑ 5'	ΣΤΟΥΣ 65°C
Master Mix 2 (1x)	Ποσότητες Αντίδρασης (μl)
Buffer 5x first strand -Invitrogen-	4μl
dTT 0,1M (500 U/ μL) -Invitrogen-	2μl
MMLV enzyme (200 U/ μL) -Invitrogen-	1μl
RNase out -Invitrogen-	0,5μl

WFI	0,5μl
Ντελ (1x)	20μl

Πίνακας 2: Ποσότητες μειγμάτων αντιδραστηρίων για την σύνθεση cDNA

Από το πρώτο μείγμα αντιδραστηρίων προστέθηκαν 2 μl σε κάθε δείγμα και θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στο heatblock στους 65 °C. Με το πέρας του πενταλέπτου, προστέθηκαν 8μl από το Master Mix 2, με μία απαλή ανάδευση σε κάθε σωληνάριο και για 2 ώρες στο υδατόλουτρο για επώαση στους 37°C. Μόλις τελείωσε η επώαση, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 380μl ddH₂O και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

4. Real Time Quantitative PCR (Real Time qPCR)

Για την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου τα πρωτόκολλα και οι αντιδράσεις έγιναν με τη βοήθεια του λογισμικού CFX Manager Bio Rad και του αντίστοιχου θερμοκυκλοποιητή. Όσο αφορά τις ποσότητες του μείγματος αντιδραστηρίων, του κάθε δείγματος και γενικά τις συνθήκες του πρωτοκόλλου που έχει ρυθμιστεί στο λογισμικό του Bio Rad, αναφέρονται παρακάτω:

Συστατικά qPCR	Ποσότητες (μl)
Primer (Forward and Reverse-10μM) -Eurofins-	2μl
SYBR MIX: KAPA SYBR FAST UNIVERSAL 2x	10μl
WFI (ddH₂O)	4μl
+ cDNA-template	4μl
Ντελ	20μl

Πίνακας 3: Ποσότητες ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

Συνθήκες	Αντίδρασης	qPCR
Στάδιο Αντίδρασης	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη	95°C	20 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	58°C	2 min
Επιμήκυνση	72°C	15 sec

Πίνακας 4: Πρωτόκολλο – Συνθήκες ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

Τα αποτελέσματα από την qPCR αναλύθηκαν στο περιβάλλον Microsoft Excel, υπολογίζοντας τις ποσοτικοποιημένες τιμές με τον τύπο $\frac{1}{2}^{\Delta Cq_{mean}}$ έπειτα από κανονικοποίηση ως προς τις τιμές του ιδιοσυστάτου γονιδίου GAPDH. Με βάση αυτές τις τιμές σχεδιάστηκαν ιστογράμματα που αποδεικνύουν την έκφραση (υπερ- ή υπό-) των γονιδίων-στόχων ή mRNA protein coding ή lncRNA ανάλογα την περίπτωση.

5. Δοκιμασία Λουσιφεράσης (Lusiferase reporter assay)

Παράλληλα με τις αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκε και **δοκιμασία λουσιφεράσης** για να ελεγχθεί η λειτουργικότητα του αναστολέα TetR σε εκχυλίσματα θετικών MKN45 κλώνων, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι έχει επιτύχει η επαγόμενη καταστολή μέσω του Tet-συστήματος.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο τριών θετικών κλώνων MKN-Tet κυττάρων βάση αποτελεσμάτων από την ποσοτική PCR στα οποία είχε εμφανιστεί ελάχιστα περισσότερη έκφραση του γονιδίου TetR σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε και στην 2^η προσπάθεια γενετικά τροποποιημένων κυττάρων MKN45 για να επιβεβαιωθεί και σε επίπεδα έκφρασης ο αναστολέας TetR και έμμεσα η επιτυχία της επαγόμενης σίγησης σε αρκετούς κλώνους.

Όσο αφορά τον πειραματικό σχεδιασμό, στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε τρυβλίο 12 θέσεων, όπου ανά θέση επωάστηκαν περίπου 180.000 κύτταρα μέσο όρο. Στο πείραμα πέρα από τους 3 κλώνους (3/5 και 14) προστέθηκαν ο θετικός (AGTR13+) και αρνητικός μάρτυρας (MKN WT). Τόσο οι κλώνοι όσο και οι μάρτυρες, υπεβλήθησαν σε 2 συνθήκες, παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού (**CON και**

DOX). Την 1^η ημέρα προστέθηκαν 2 μl αντιβιοτικό DOX ενώ την 3^η ημέρα πραγματοποιήθηκε ο παροδικός μετασχηματισμός (transfection) με την προσθήκη 3 διαφορετικών πλασμιδίων -έπειτα από την επιθυμητή αραίωση με **τελικό όγκο 60μl** και με το πέρας της διαδικασίας προστέθηκαν άλλα 2μl αντιβιοτικού DOX. Πριν την αραίωση, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων στο μηχάνημα Quawell3000. Όσο αφορά τα πλασμίδια και τις ποσότητες που προστέθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω αντίστοιχο πίνακα:

Εισαγόμενα πλασμίδια	Τελικές C (ng/μl)	Ποσότητες
pTO-LUC	100ng/μl	50ng
RENILLA	10ng/μl	20ng
pBluescript (stuffer plasmid)	250ng/μl	500ng

Πίνακας 5: Πλασμίδια δοκιμασίας *Lusiferase*

Τελευταίο στάδιο αποτελεί η μέτρηση στο λουμινόμετρο έπειτα από την λύση στα κύτταρα-κλώνους. Πιο συγκεκριμένα, μετά την απομάκρυνση θρεπτικού προστίθεται 300 μl 1x PBS σε θερμοκρασία δωματίου σε κάθε well για πλύση και απομακρύνεται απευθείας. Έπειτα, προστίθεται 100μl Lysis Buffer PTO Luc και για 30 λεπτά πραγματοποιείται ανάδευση των κυττάρων υπό χαμηλές στροφές. Για την μέτρηση, χρησιμοποιούνται τα υποστρώματα λουσιφεράσης (L) και Renilla (R) (αφορά την κανονικοποίηση για τους σωστούς υπολογισμούς σε δεύτερο επίπεδο). Οι μετρήσεις έγιναν με χρήση του λουμινόμετρου Lumat3 (LB 9508) της Berthold Technologies και του λογισμικού Instrument Control and Evaluation (ICE).

Να σημειωθεί ότι το πλασμίδιο της **Renilla** (προέρχεται από ένα θαλάσσιο είδος της οικογένειας Renillidae) χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση ενώ το πλασμίδιο **Bluescript** χρησιμοποιείται για να διατηρηθεί η αναλογία 4:1 λιποφιλικού παράγοντα (PPEI) που προστίθεται και συνολικής ποσότητας DNA αντίστοιχα όταν πραγματοποιείται ο παροδικός μετασχηματισμός.

Ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο ίσχυσε για τους κλώνους Tet σε MKN45 κύτταρα στην δεύτερη προσπάθεια επαγόμενης σίγησης (**LUC20 experiment**). Να σημειωθεί ότι η αραίωση κάθε πλασμιδίου αυτή την φορά πραγματοποιήθηκε σε **τελικό όγκο 50μl**. Σε αυτή την προσπάθεια οι κλώνοι ήταν 6 (14/16/17/18/21 και 23) πάλι παρουσία ή απουσία του επαγωγέα δοξυκυκλίνης (DOX και CON).

6. Στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση

Όσο αφορά τα αποτελέσματα από τις αντιδράσεις qPCRs πραγματικού χρόνου, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον Excel, ποσοτικοποιώντας τις τιμές κάθε επανάληψης των δειγμάτων μέσω του τύπου: **Quantification=1/2^{Cqmean}** (η τιμή της οποίας είχε ήδη προκύψει ως δεδομένο από το λογισμικό του θερμοκυκλοποιητή με το πέρας κάθε αντίδρασης). Στη συνέχεια οι τιμές για κάθε γονίδιο στόχο σε κάθε δείγμα **κανονικοποιήθηκαν** με το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH. Επιπλέον, υπολογίστηκε το **ποσοστό έκφρασης** σε κάθε περίπτωση με βάση τις σιγήσεις των GATA4/GATA6 και KLF5. Αυτό συνέβη σε σύγκριση με τον μάρτυρα **PLL3** (όπου δεν έχει συμβεί καμία γενετική τροποποίηση), μέσω του λόγου της κανονικοποιημένης τιμής που προέκυψε σε κάθε δείγμα προς την κανονικοποιημένη τιμή του μάρτυρα (το οποίο ορίζεται με την τιμή 1), πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα επί 100%. Τέλος, με βάση τις τιμές που προέκυψαν απεικονίστηκαν με **ιστογράμματα** τα επίπεδα έκφρασης κάθε στόχου, όπως θα αναφερθούν αναλυτικά στα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

Παράλληλα μέσω των δεδομένων του ιστότοπου **GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis)**, με βάση συγκεκριμένες ρυθμίσεις [**Log₂FC=1**, **pValue=0.01**], σχηματίσαμε ορισμένα θηκογράμματα έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος σε παρακαρκινικές και καρκινικές βιοψίες ασθενών από καρκίνο ανώτερου ή κατώτερου πεπτικού συστήματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

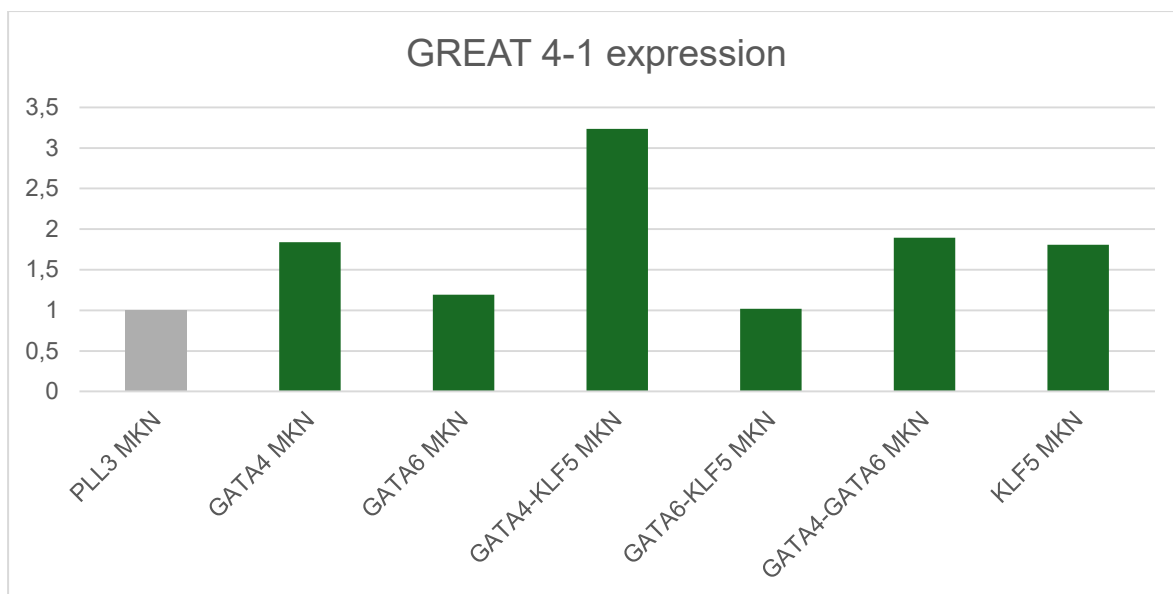
1. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σε κύτταρα MKN45 έπεται από συνδυαστική σίγηση μεταγραφικών παραγόντων (GATA4/ GATA6 και KLF5)

Στα πλαίσια προηγούμενης μεταπτυχιακής διατριβής του εργαστηρίου είχε επιτευχθεί **στοχευμένη σίγηση** σε **MKN45 κύτταρα** των μεταγραφικών παραγόντων **GATA4, GATA6 και KLF5**, τόσο χωριστά όσο και συνδυαστικά. Σε αυτή την πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε συγκεκριμένους κωδικοποιητικούς και μη στόχους (lncRNA, mRNA) που έχουν άμεση και έμμεση σχέση με τον καρκίνο, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την μεταστατικότητα, την βλαστικότητα, τον κυτταρικό κύκλο και γενικά τις ιδιότητες-σταθμούς για την ανάπτυξη ή την αντιμετώπιση της νόσου.

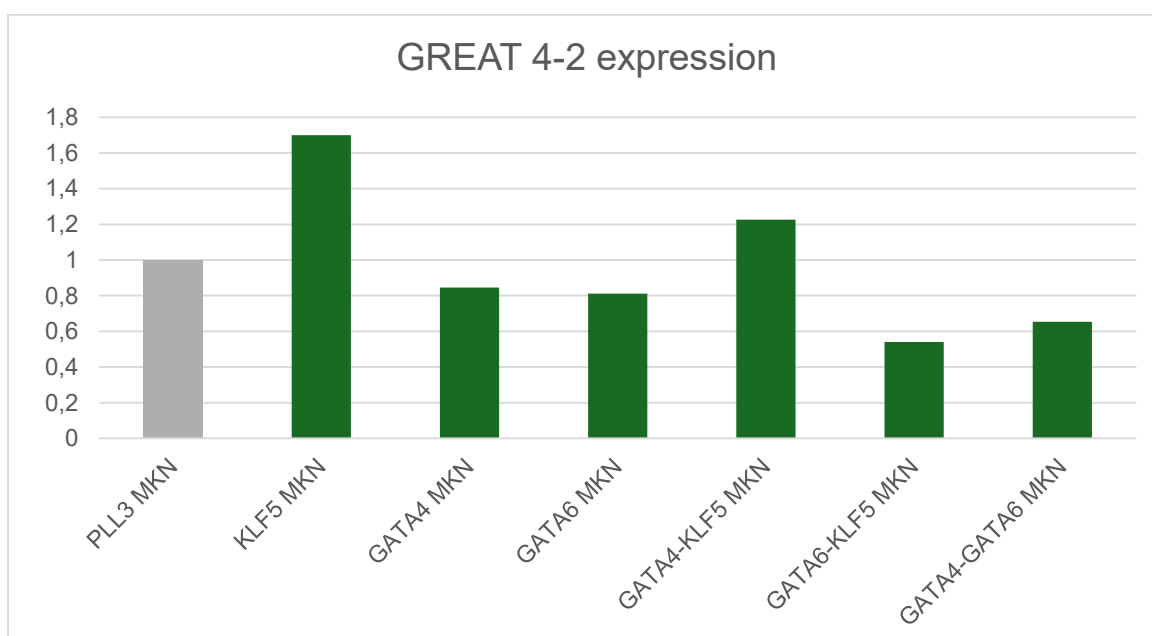
1.1 Αποτελέσματα επιλεγμένων lncRNA στόχων

✓ GREAT4-1 και GREAT4-2

Από προηγούμενες μελέτες ανοσοκατακρύμνισης χρωματίνης του εργαστηρίου σε AGS κύτταρα έχουν εντοπιστεί τα lncRNAs **GREAT4-1** και **GREAT4-2** στην ρύθμιση των οποίων φαίνεται να συμμετέχει ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 (εξού και το όνομά τους). Με βάση τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR στα κύτταρα MKN45, αποδεικνύεται αλλαγή της έκφρασής τους κατά την καταστολή του GATA4 (**Εικ. 1**, στο GREAT4-1 αύξηση έκφρασης ενώ στο GREAT4-2 μείωση έκφρασης → αντίθετη ρύθμιση μεταξύ των 2 lncRNA-στόχων). Όμως, η μεγαλύτερη αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης αφορούν στην περίπτωση του GREAT4-1, όπου η έκφραση αυξήθηκε περίπου 2,5 φορές παραπάνω από τον μάρτυρα, στην περίπτωση σίγησης του GATA4 σε συνδυασμό με τον KLF5. Από την άλλη, στην περίπτωση του GREAT4-2 εμφανίζεται αύξηση κατά 70% στην περίπτωση σίγησης μόνο του KLF5 ενώ σε συνδυασμό με τον GATA4 παρατηρείται αύξηση κατά 20% (πολύ μικρότερη διαφορά, **Εικ.2**). Επιπλέον, σε αντίθεση με το GREAT4-1, μειώνεται η έκφραση του GREAT4-2 απουσία GATA4 και GATA6 (περίπου κατά 20%) ακόμα και συνδυαστικά. Συμπερασματικά με βάση τα παρακάτω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτή η σημαντική συνδρομή του KLF5 σε συνδυασμό φυσικά με τον GATA4 στην αύξηση της έκφρασής των συγκεκριμένων lncRNA στόχων.



Εικόνα 1:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA GREAT4-1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45)

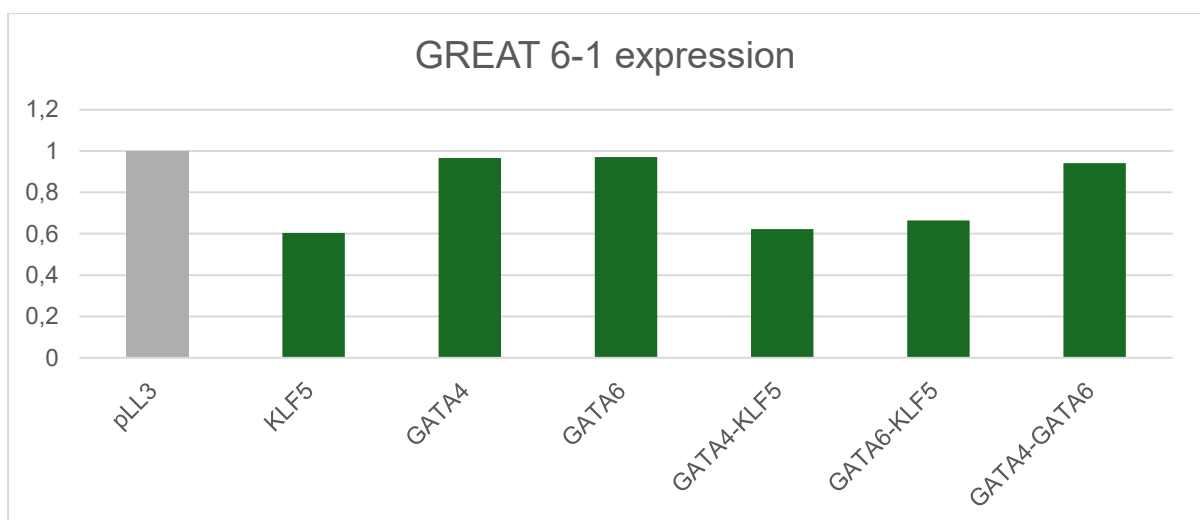


Εικόνα 2:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA GREAT4-2 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

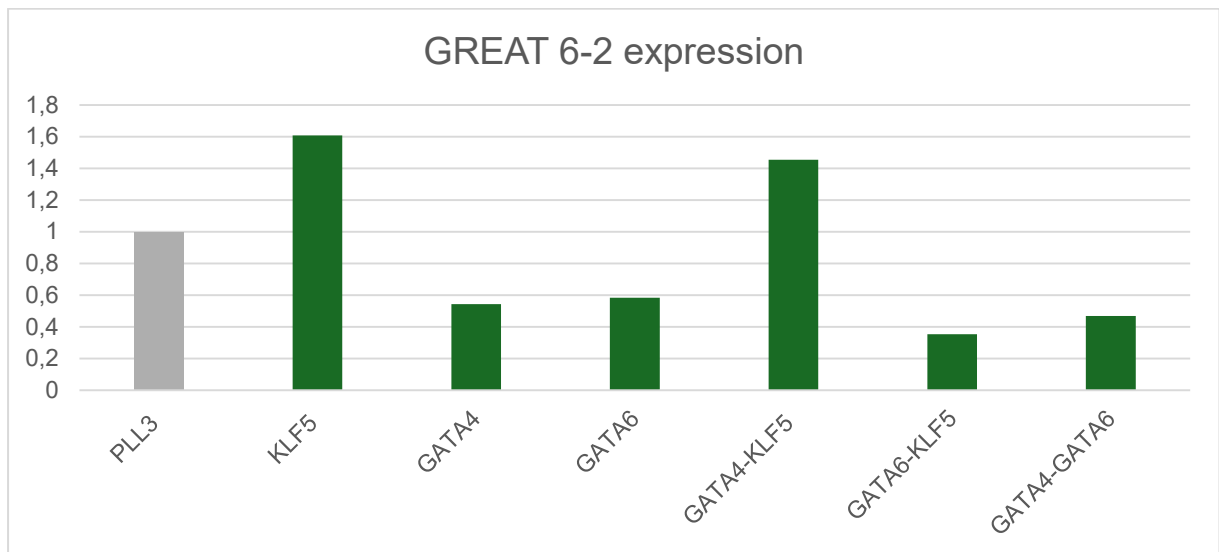
✓ GREAT6-1 και GREAT6-2

Παράλληλα με τους προηγούμενους lncRNA στόχους, μελετήθηκαν και άλλα δύο υποψήφια lncRNA, για τα οποία είχε σχηματιστεί η υπόθεση ότι ρυθμίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον μεταγραφικό παράγοντα GATA6 (εξού και το όνομά τους). Όντως, σε περιβάλλον ΜΚΝ45 κυττάρων η αρχική υπόθεση επιβεβαιώνεται στην περίπτωση του **GREAT6-2**, όπου απουσία GATA6 παρατηρείται μείωση της έκφρασης κατά 40% ενώ σε συνδυασμό με απουσία του KLF5 φτάνει η μείωση κοντά στο 70% (**Εικ.4**). Από την άλλη όταν παρατηρείται σίγηση μόνο του KLF5 η έκφραση αυξάνεται κατά 60% (αποδεικνύοντας ένα είδος καταστολής της έκφρασης του GREAT6-2 μέσω του KLF5), δείχνοντας πόσο έντονη είναι η συμβολή του GATA6 στην έκφραση του lncRNA, ελαχιστοποιώντας την δράση του KLF5. Κάτι τέτοιο δεν συναντάται απουσία και GATA4 και KLF5 παρά την σχεδόν ίδια ποσοστιαία μείωση έκφρασης που παρατηρείται είτε μόνο απουσία GATA6 είτε μόνο GATA4. Άρα η συμβολή του μεταγραφικού παράγοντα GATA6 στην έκφραση του GREAT6-2 φανερώνει εξειδίκευση της ρύθμισης του τελευταίου.

Από την άλλη, στο lncRNA **GREAT6-1** δεν φαίνεται ότι στην περίπτωση απουσίας του GATA6 (ή του GATA4) επηρεάζεται η έκφρασή του σε κύτταρα ΜΚΝ45. Ωστόσο, η έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA επηρεάζεται σημαντικά κατά την σίγηση του KLF5 διότι μειώνεται κατά 40% περίπου ακόμα και με συνδυαστική απουσία του με GATA4 είτε GATA6 (**Εικ.3**). Έτσι, γίνεται αντιληπτός ο σημαντικός του ρόλος καθώς και η εξειδικευμένη ρύθμιση αυτού του lncRNA σχεδόν αποκλειστικά από τον KLF5 σε σύγκριση με τους υπόλοιπους παράγοντες που ερευνώνται.



Εικόνα 3:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA GREAT6-1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα ΜΚΝ45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 ΜΚΝ45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

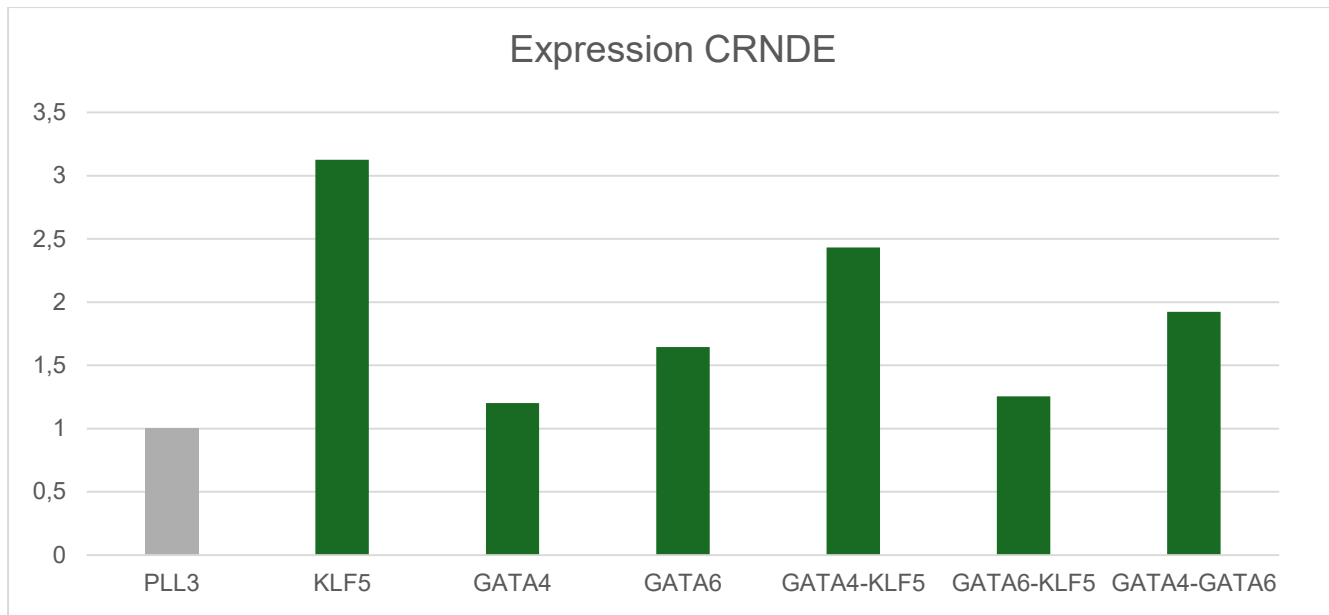


Εικόνα 4:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA GREAT6-2 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45 επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ CRNDE

Οι παρακάτω **lncRNA-στόχοι** έχουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο (πολλαπλασιασμό, απόπτωση, αγγειογέννεση κτλ). Παρά τις διαφοροποιήσεις στις αυξομειώσεις της έκφρασής τους παρατηρείται ένα κοινό μοτίβο. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται σε όλες τις περιπτώσεις αύξηση έκφρασης στην ταυτόχρονη σίγηση των GATA4 και KLF5 σε μικρότερο ή υψηλότερο επίπεδο ανά περίπτωση.

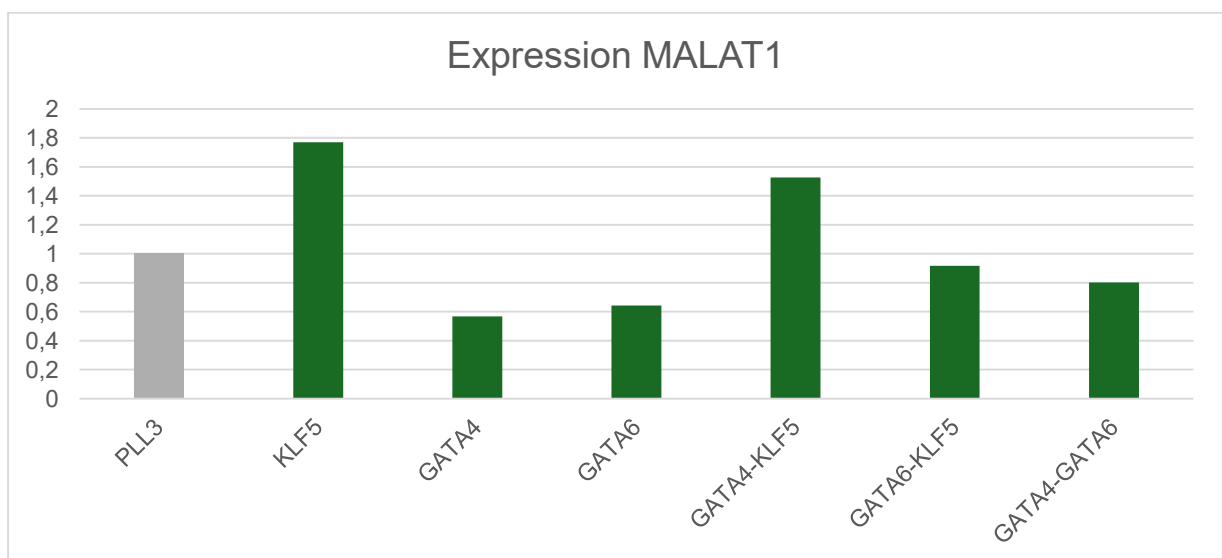
Σύμφωνα με τα δεδομένα (**Εικ.5**) φαίνεται ότι στο **CRNDE**(ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό) αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασής του σε πολύ μεγάλο βαθμό (3 φορές περισσότερο σε σύγκριση με τα κύτταρα control) όταν σιγείται ο παράγοντας KLF5, δείχνοντας την έντονη ανασταλτική του δράση στη ρύθμιση έκφρασης του συγκεκριμένου στόχου (έντονη ρυθμιστική εξειδίκευση).



Εικόνα 5:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA CRNDE έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45 επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ MALAT1

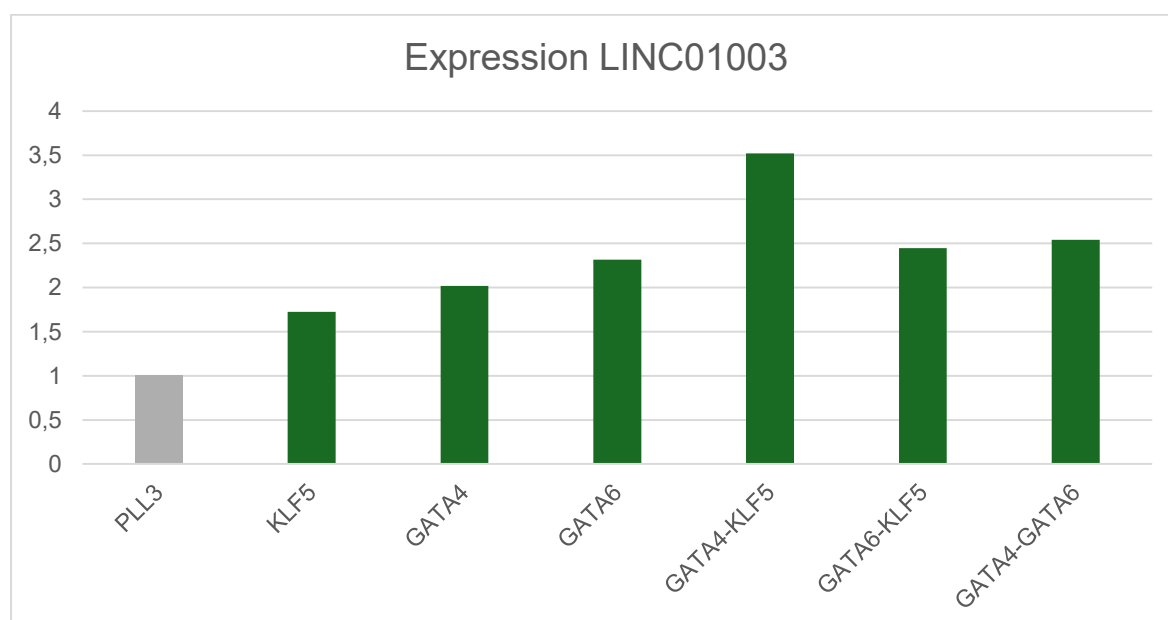
Στα lncRNAs του **MALAT1** (κατά 80% αύξηση, **Εικ.6**, προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, της κυτταρική προσκόλληση, την νεοαγγειογέννεση και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου) και **CRNDE** (3 φορές αύξηση σύγκριση με το control, **Εικ.5**) παρατηρείται η μεγαλύτερη αύξηση έκφρασης απουσία του παράγοντα KLF5 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες σιγήσεις.



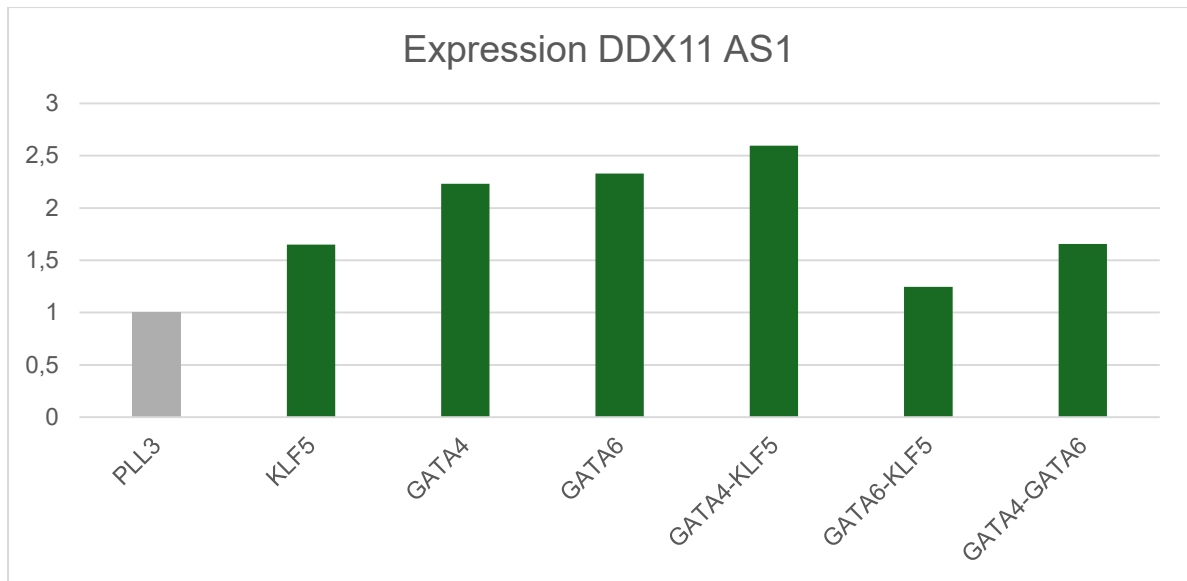
Εικόνα 6:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA MALAT1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ LINC01003 και DDX11-AS1

Από την άλλη, στα lncRNAs **LINC01003** (χρησιμοποιείται ως μοριακό σφουγγάρι με στόχο το miR-33a-5p καταστέλλοντας τη βιωσιμότητα και την προσκόλληση των κυττάρων καθώς και προωθεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, **Εικ.7**) και **DDX11-AS1** (αντιονηματικό μετάγραφο του DDX11, άμεση σχέση με πολλαπλασιασμό και κυτταρικό κύκλο, **Εικ.8**) παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο, δηλαδή αύξηση έκφρασης κατά 50% περίπου απουσία του KLF5 και ακόμα μεγαλύτερη έκφραση περίπου 2-2,5 φορές περισσότερο από το control απουσία τόσο GATA4 ή GATA6.



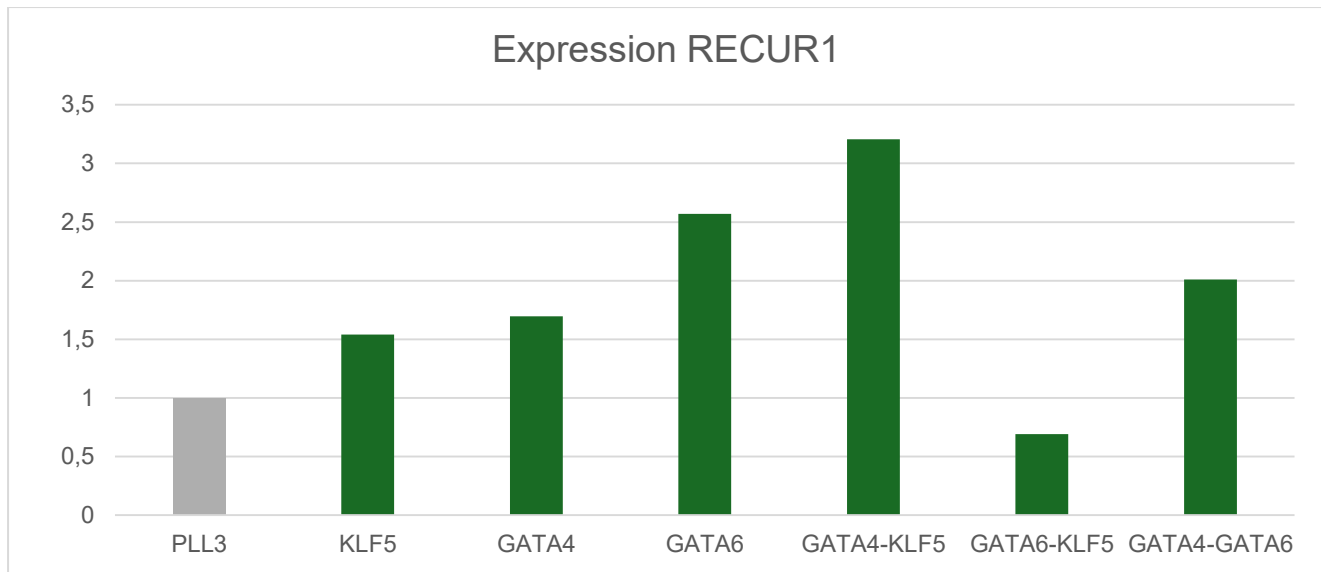
Εικόνα 7:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA LINC01003 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)



Εικόνα 8:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA DDX11-AS1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ RECUR1

Από τα αποτελέσματα της αντίδρασης qPCR, φαίνεται ότι ο lncRNA στόχος **RECUR1** ρυθμίζεται πολύ έντονα από τον συνδυασμό των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και KLF5 (με την ταυτόχρονη σίγησή τους η έκφραση του RECUR1 αυξάνεται 3 φορές περισσότερο από τον μάρτυρα PLL3). Από την άλλη, με ταυτόχρονη σίγηση GATA6 και KLF5, τα επίπεδα έκφρασης πέφτουν κατακόρυφα κοντά στο 50% (**Εικ.9**) υποδηλώνοντας ότι μάλλον αυτοί οι 2 παράγοντες είναι απαραίτητοι για την έκφραση του lncRNA και πιθανόν ο ένας να αντικαθιστά την δράση του άλλου στις περιπτώσεις που σιγείται για αυτό και εμφανίζεται αυτό το παράδοξο.

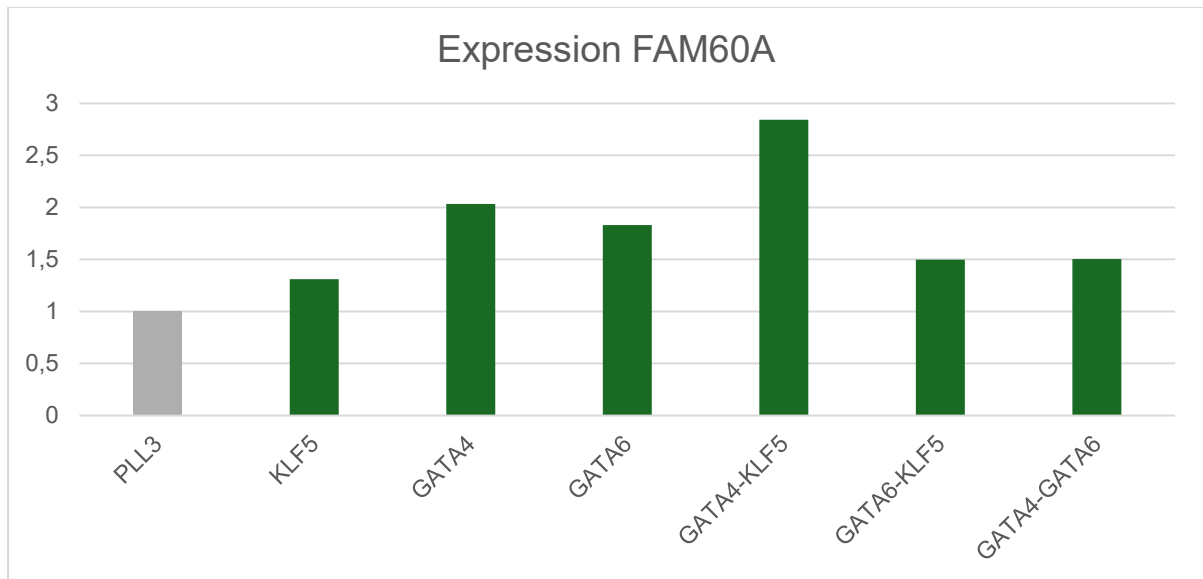


Εικόνα 9:Κανονικοποιημένη έκφραση του lncRNA RECUR1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

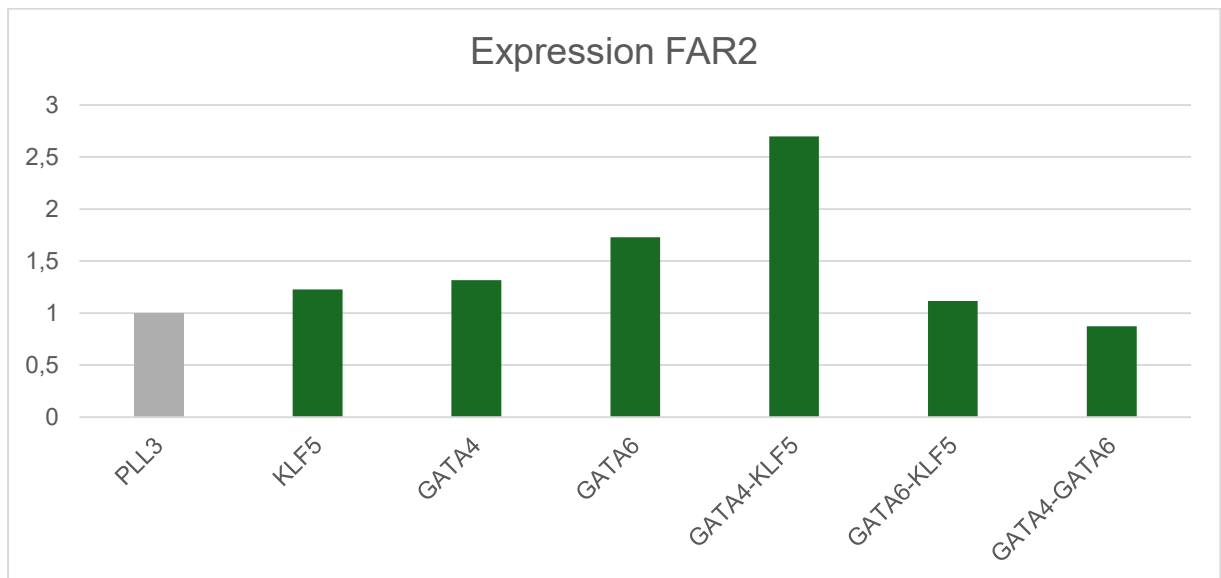
1.2 Αποτελέσματα επιλεγμένων mRNA στόχων

✓ FAM60A, FAR2 και DDX11

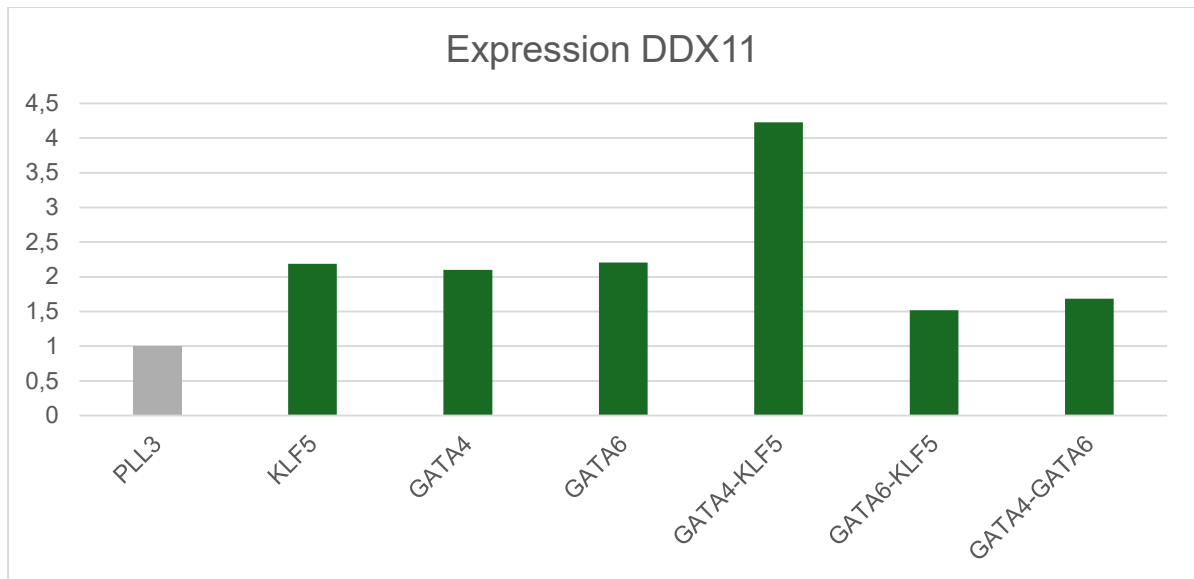
Εκτός από υποψήφια lncRNA, μελετήθηκε και η έκφραση κωδικοποιητικών στόχων που εμπλέκονται στον έλεγχο καρκινοειδικών διεργασιών. Πιο συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων **FAM60A** (μεταβάλλει στον κυτταρικό κύκλο το σύμπλεγμα δεακετυλάσης ιστόνης SIN3-HDAC1, **Εικ.10**), **FAR2** (ανήκει στην υπεροικογένεια αφυδρογονάσης/αναγωγάσης βραχείας αλυσίδας, άμεση σχέση με μεταβολισμό και συγκεκριμένα βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, **Εικ.11**), **DDX11** (άμεση σχέση με κυτταρική διαίρεση αφού ρυθμίζει την έκφραση της ελικάσης ChIR1, **Εικ.12**) παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης. Στην περίπτωση σίγησης των GATA4, GATA6 και KLF5 ξεχωριστά τα επίπεδα έκφρασης (φανερώνουν ήπια υπερέκφραση κάθε στόχου έναντι του μάρτυρα). Έτσι φαίνεται ότι αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν από κοινού στην ρύθμιση έκφρασης του κάθε στόχου. Από την άλλη, στην περίπτωση ταυτόχρονης σίγησης των KLF5 και GATA4 τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται απότομα σε σύγκριση με τις άλλες περιπτώσεις, άρα προκύπτει το συμπέρασμα ότι πιθανόν αυτοί οι 2 παράγοντες έχουν την μεγαλύτερη συνδυαστική ρυθμιστική επίδραση.



Εικόνα 10:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου FAM60A έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)



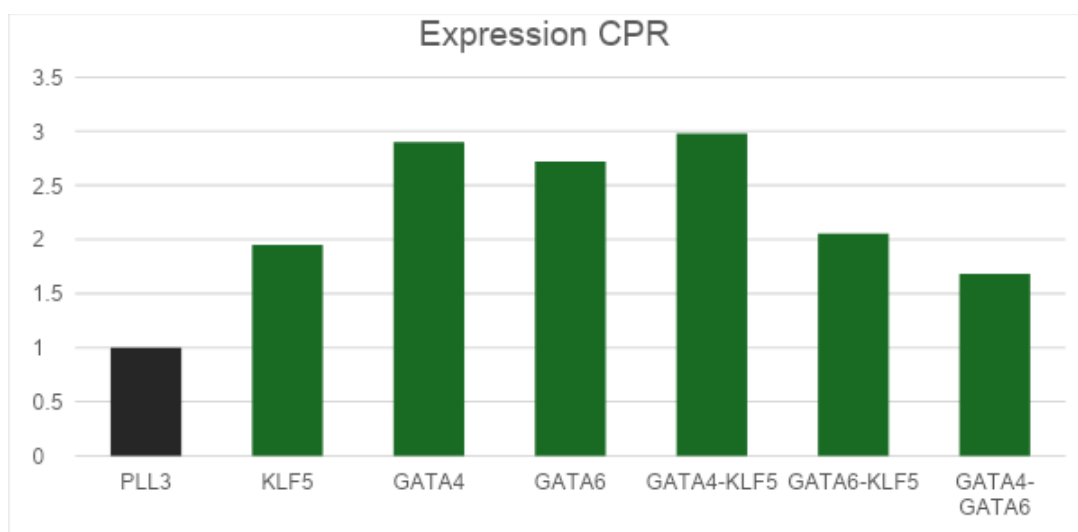
Εικόνα 11:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου FAR2 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)



Εικόνα 12:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου DDX11 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ CPR και IPO8

Παρατηρείται το ίδιο μοτίβο έκφρασης των στόχων **CPR** (αναγωγή κυτοχρώματος P450, **Εικ.13**) και **IPO8** (συνδέεται με το σύμπλεγμα πυρηνικών πόρων και, μαζί με το RanGTP και το RANBP1, αναστέλλει τη διέγερση GAP της Ran GTPase -μιορτίνη-, **Εικ.14**), όπου απουσία GATA4 (αύξηση επί 3 φορές περίπου) ή GATA6 (αύξηση επί 2-2,5 φορές) αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης πολύ σημαντικά, καθώς εξίσου και στην περίπτωση ταυτόχρονης σίγησης των GATA4 και KLF5 (αύξηση επί 3 φορές περίπου)!



Εικόνα 13:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου CPR έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα

αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **μαύρο χρώμα**)

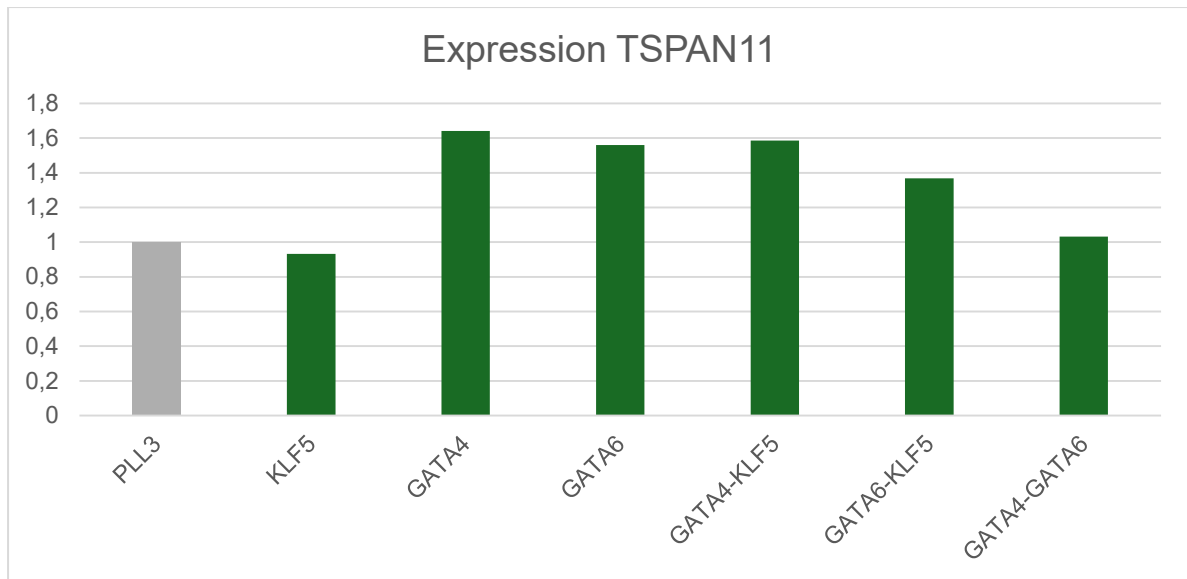
✓ IPO8



Εικόνα 14:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου IPO8 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ TSPAN11

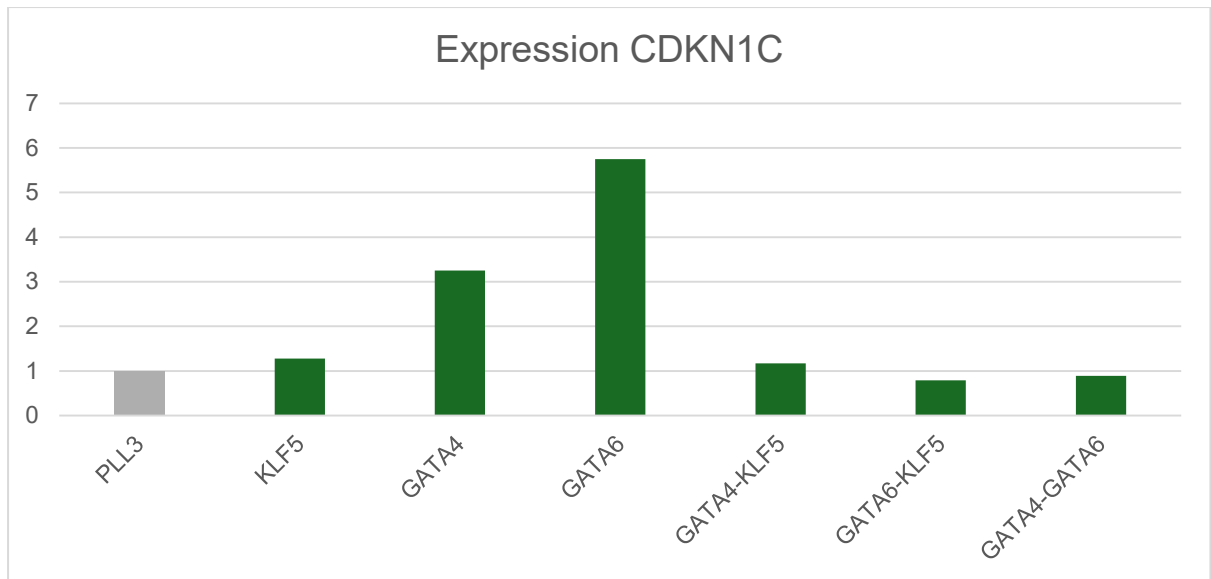
Παρατηρείται ότι όταν σιγούνται τα GATA4 GATA6 ακόμα και σε συνδυασμό με τον KLF5 προκύπτει αύξηση της έκφρασης του **TSPAN11** (προωθεί την μεταστατικότητα και την εξέλιξη του όγκου) κατά 60% περίπου σε κάθε περίπτωση. Από την άλλη, όταν σιγούνται ταυτόχρονα οι 2 παράγοντες η έκφραση σε σύγκριση με τον μάρτυρα παραμένει παρόμοια (**Εικ.15**), υπακούοντας σε ένα πιο περίπλοκο μοτίβο ρύθμισης.



Εικόνα 15:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου TSPAN11 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ CDKN1C

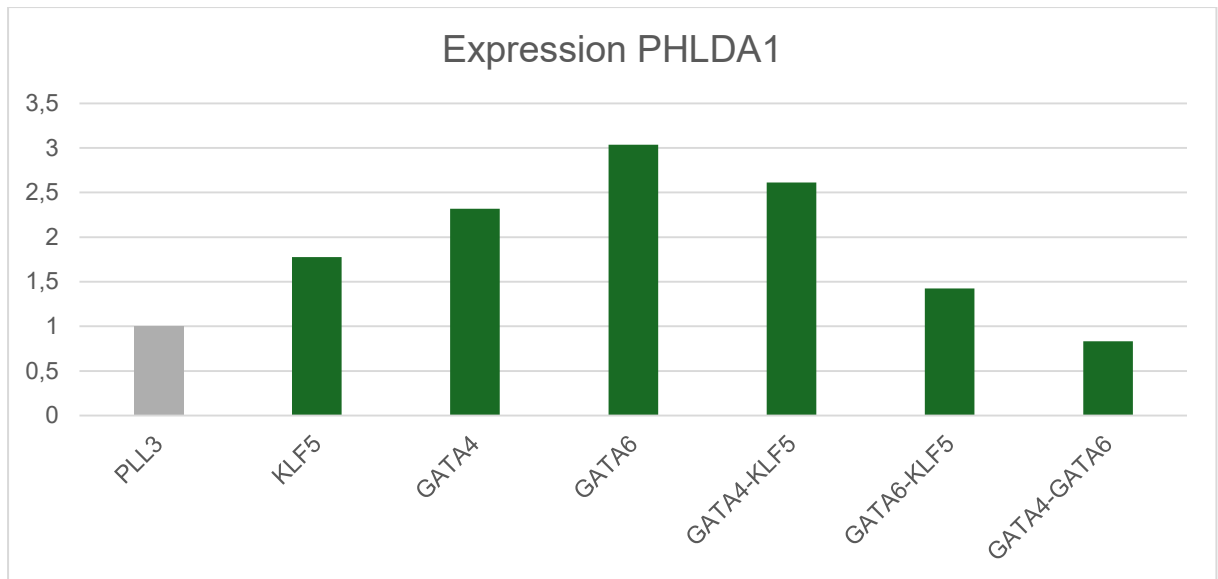
Τα αποτελέσματα του **CDKN1C** (σημαντικός παράγοντας ρύθμισης και ελέγχου κυτταρικού πολλαπλασιασμού) είναι πολύ ιδιαίτερα. Συγκεκριμένα, όταν σιγείται αποκλειστικά ο GATA6 τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται 6 φορές περισσότερο συγκριτικά με τον μάρτυρα ενώ κατά την σίγηση του GATA4 η έκφραση αυξάνεται επί 3 φορές (**Εικ.16**). Παραδόξως, κατά την απουσία και των δύο παραγόντων δεν παρατηρείται αλλαγή στην έκφραση.



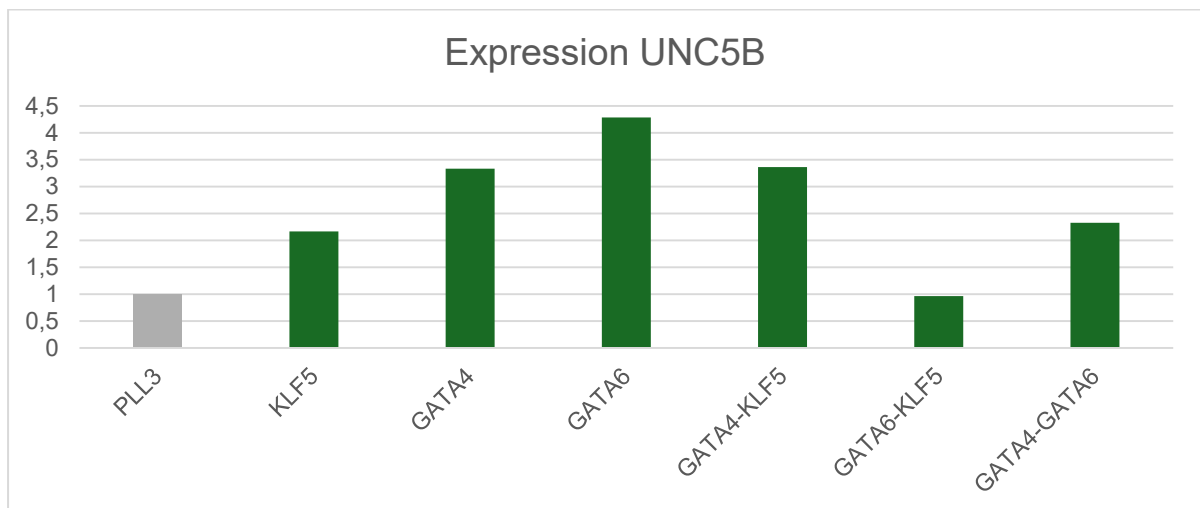
Εικόνα 16:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου CDKN1C έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45 επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**,)

✓ PHLDA1, UNC5B και MKI67

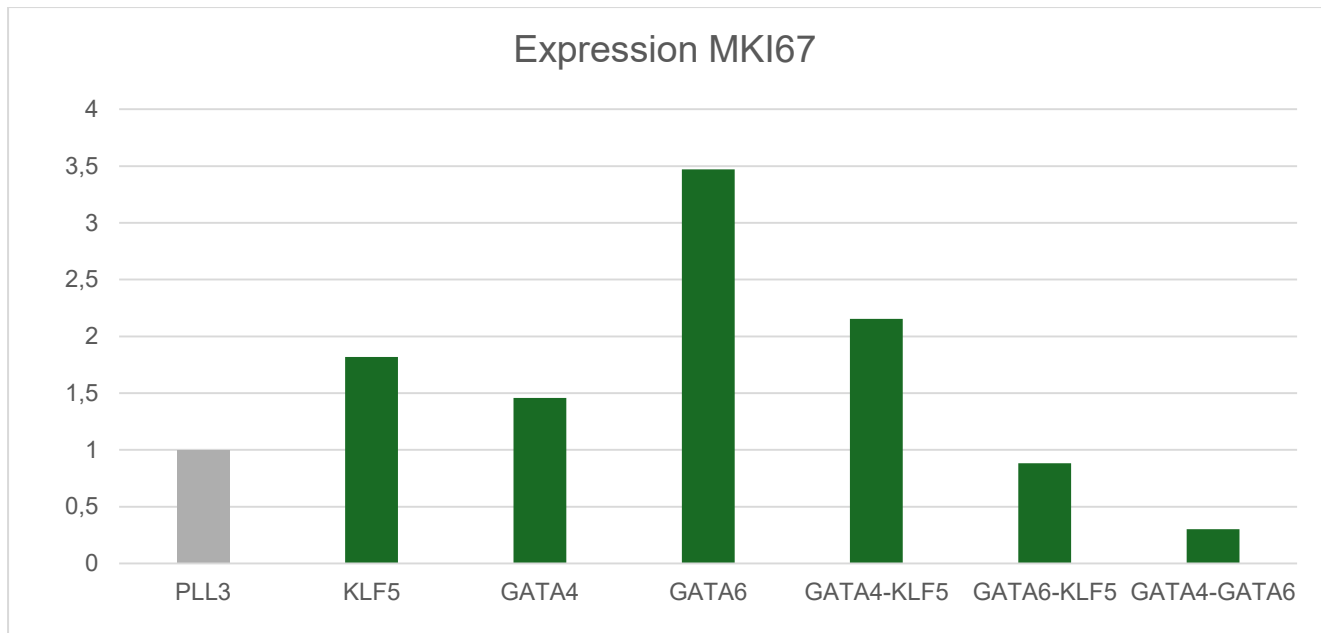
Από τα αποτελέσματα των δεδομένων για τους τρεις παρακάτω στόχους **PHLDA1** (έχει άμεση σχέση με την αυτοφαγία, την απόπτωση, την αναστολή της κυτταρικής προσκόλλησης και της μεταστατικότητας του όγκου, **Εικ.17**), **UNC5B** (έχει σχέση με την αγγειογένεση του όγκου, προάγει τη γήρανση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της οδού P53 που διαμεσολαβείται από ROS και αναστέλλει την κυτταρική προσκόλληση, **Εικ.18**) και **MKI67** (συμμετέχει στη ρύθμιση του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων και της μιτωτικής πυρηνικής διαίρεσης, **Εικ.19**), παρατηρείται το ίδιο μοτίβο έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, κατά την σίγηση του GATA6, τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται έντονα (υπερέκφραση επί 3-4 φορές σε σύγκριση με τον μάρτυρα). Επιπλέον, προκύπτει υψηλή έκφραση όταν σιγούνται ταυτόχρονα οι GATA4 και KLF5, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πιθανόν η έκφραση των στόχων ρυθμίζεται αρνητικά περισσότερο από αυτούς τους 2 παράγοντες



Εικόνα 17:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου PHLDA1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)



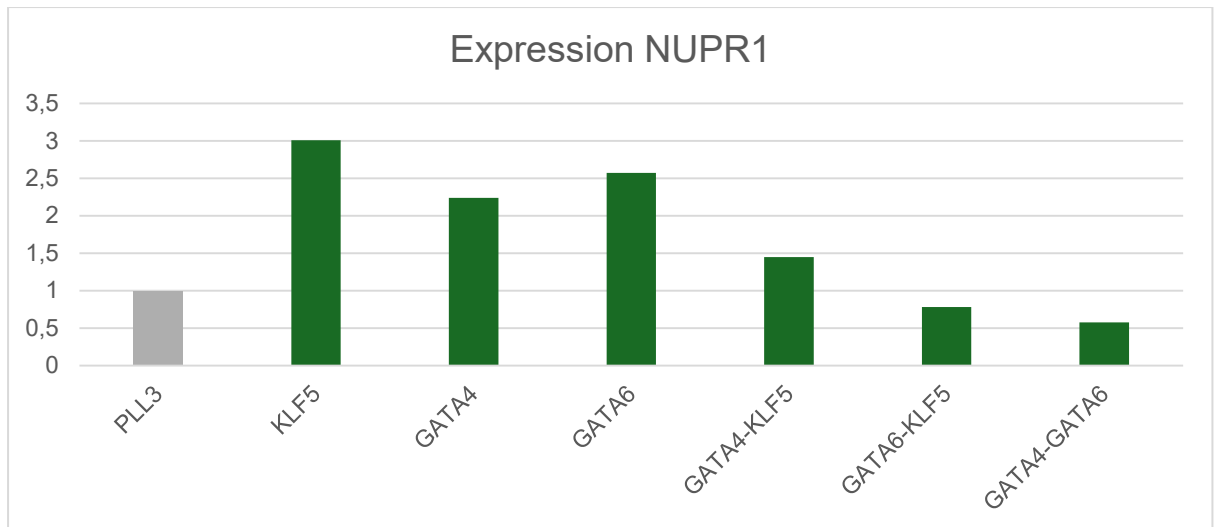
Εικόνα 18:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου UNC5B έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)



Εικόνα 19:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου MKI67 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ NUPR1

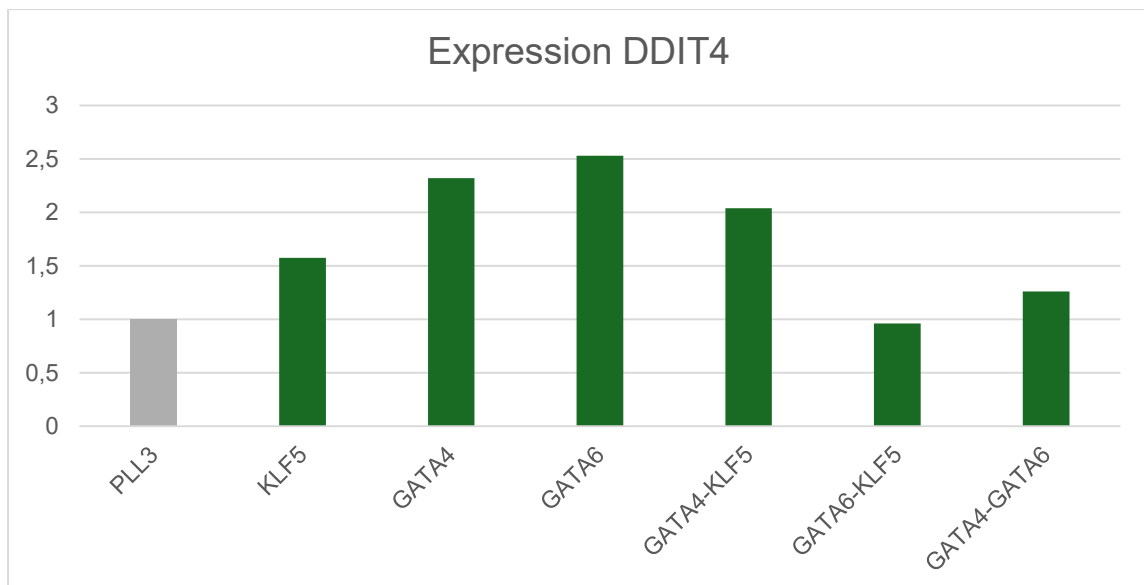
Παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο μεταξύ των στόχων **MKI67 (Εικ.19)** και **NUPR1** (δρα ως γονιδιακός τροποποιητής της επίδρασης της επαγόμενης από kRas γήρανσης, ελέγχει τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA παίζοντας σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος), όπου απουσία GATA6 τα επίπεδα έκφρασης εκφράζονται αυξάνονται σημαντικά (στο MKI67 περίπου 3,5 φορές και στο NUPR1 περίπου 2,5 φορές. Όμως, όταν σιγούνται ταυτόχρονα KLF5 και GATA6 η έκφραση μειώνεται περίπου κατά 30% (**Εικ.20**) σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η διαφορά υποδηλώνει ένα πιθανό σενάριο σύμφωνα με το οποίο οι παράγοντες GATA6 και KLF5 μάλλον αντικαθιστούν ο ένας την δράση του άλλου σε περίπτωση σίγησης του ενός για αυτό και εμφανίζονται τόσο αυξημένα επίπεδα έκφρασης του στόχου όταν σιγείται ο KLF5 ή ο GATA6 ξεχωριστά.



Εικόνα 20:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου NUPR1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ DDIT4

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται έντονη αύξηση της έκφρασης του **DDIT4** (εκφράζεται ως απόκριση στην υποξία μέσω του Hif-1 στο στρες ή σε βλάβη του DNA και παίζει ρόλο στην αυτοφαγία και στον πολλαπλασιασμό), 2,5 φορές παραπάνω από τον μάρτυρα, όταν σιγείται ο GATA4 ή GATA6 ξεχωριστά αλλά όταν σιγούνται ταυτόχρονα η αύξηση έκφρασης είναι αμελητέα (**Εικ.21**). Βάση αυτών των αποτελεσμάτων, ένας υποθετικός τρόπος δράση των GATA4 και GATA6 θα μπορούσε να περιλαμβάνει την ανασταλτική τους δράση συνεργατικά με τον KLF5.



Εικόνα 21:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου DDIT4 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα

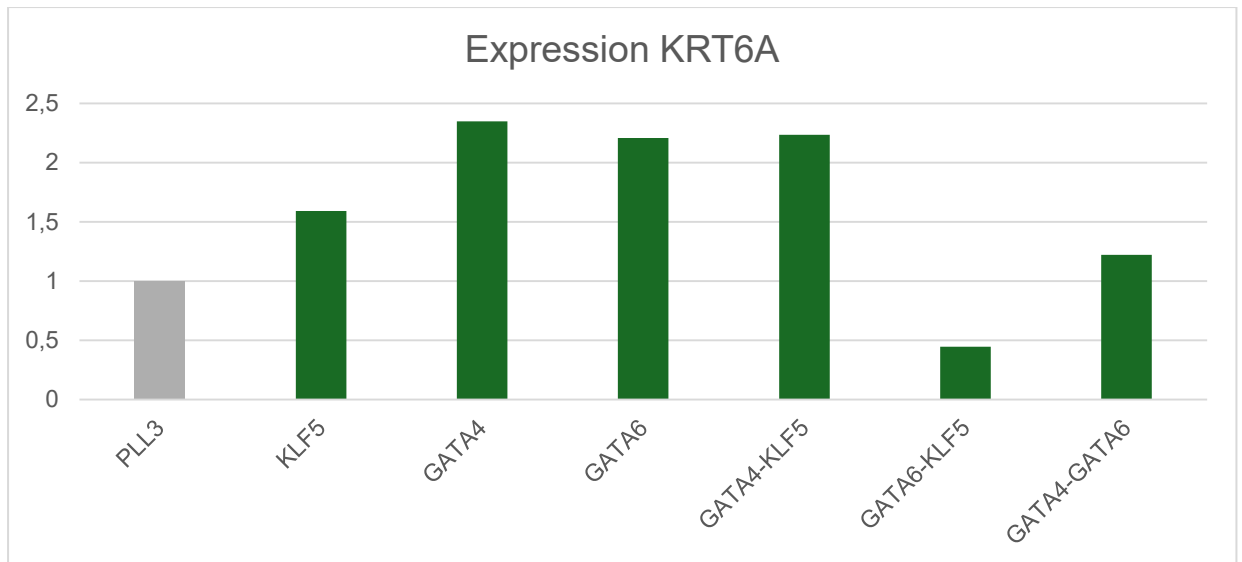
αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ ARHGEF2 και KRT6A

Τα δεδομένα δείχνουν ότι απουσία όλων των παρατηρούμενων μεταγραφικών παραγόντων η έκφραση των στόχων **ARHGEF2** (ρυθμίζει τον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και είναι απαραίτητο για την αιμοποίηση, σχετίζεται με κακή πρόγνωση μέσω της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος) και **KRT6A** (συμμετέχει στη ρύθμιση της μετανάστευσης του επιθηλίου αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης SRC κατά την αποκατάσταση του τραύματος, αποτελεί επίσης και δομικό συστατικό του κυτταροσκελετού) αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό. Στην περίπτωση ταυτόχρονης σίγησης GATA4 και KLF5 αυξάνεται 3,5 (**Εικ.22**) και 2 φορές παραπάνω (**Εικ.23**) η έκφραση αντίστοιχα και απουσία μόνο του GATA6 η αύξηση υπολογίζεται και στις δύο περιπτώσεις 2.5 φορές παραπάνω περίπου. Η μόνη εξαίρεση θεωρείται η περίπτωση σίγησης των GATA6 και KLF5, όπου τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται κατά 50% περίπου. Αυτό υποδηλώνει ότι οι παράγοντες GATA6 και KLF5 ρυθμίζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την έκφραση των συγκεκριμένων στόχων.



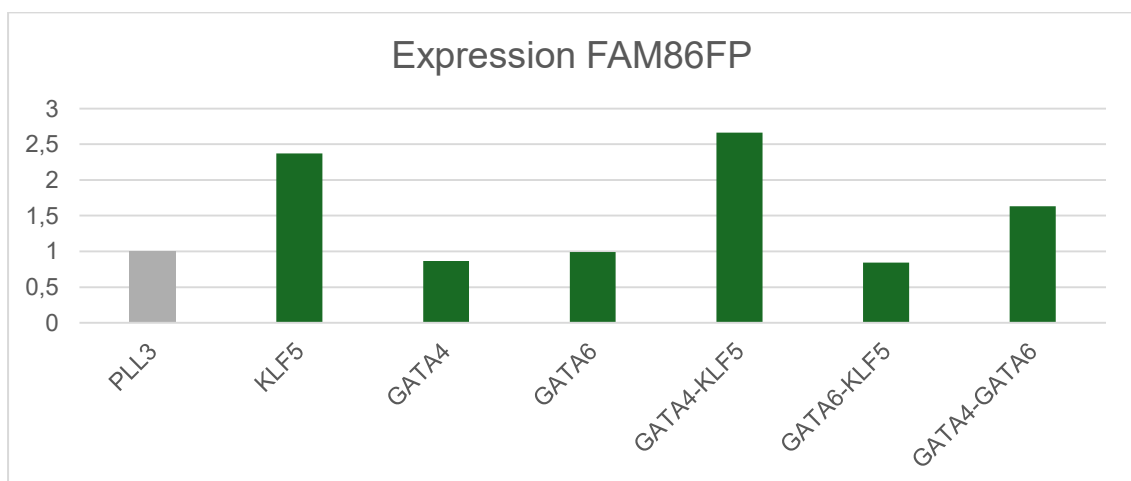
Εικόνα 22:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου ARHGEF2 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45 επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**),



Εικόνα 23:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου KRT6A έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ FAM86FP

Ο στόχος **FAM86FP** (αποτελεί σημείο πρόσδεσης ή στόχος διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων καθώς και εμπλέκεται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου), ακόμα και στην τροποποίηση ιστονών επηρεάζεται περισσότερο απουσία KLF5 ή απουσία συνδυαστική των KLF5-GATA4 αφού αυξάνεται η έκφρασή του κατά 2,5 φορές περίπου. Κατά την ταυτόχρονη σίγηση GATA6-KLF5, τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν αμετάβλητα συγκριτικά με τα επίπεδα του μάρτυρα (**Εικ.24**). Αυτό αποδεικνύει ότι ο παράγοντας GATA4 απουσία KLF5 (πιθανότατα αναστέλλει την δράση του κατά μεγάλο βαθμό) οδηγεί στην υπερέκφραση του FAM86FP.

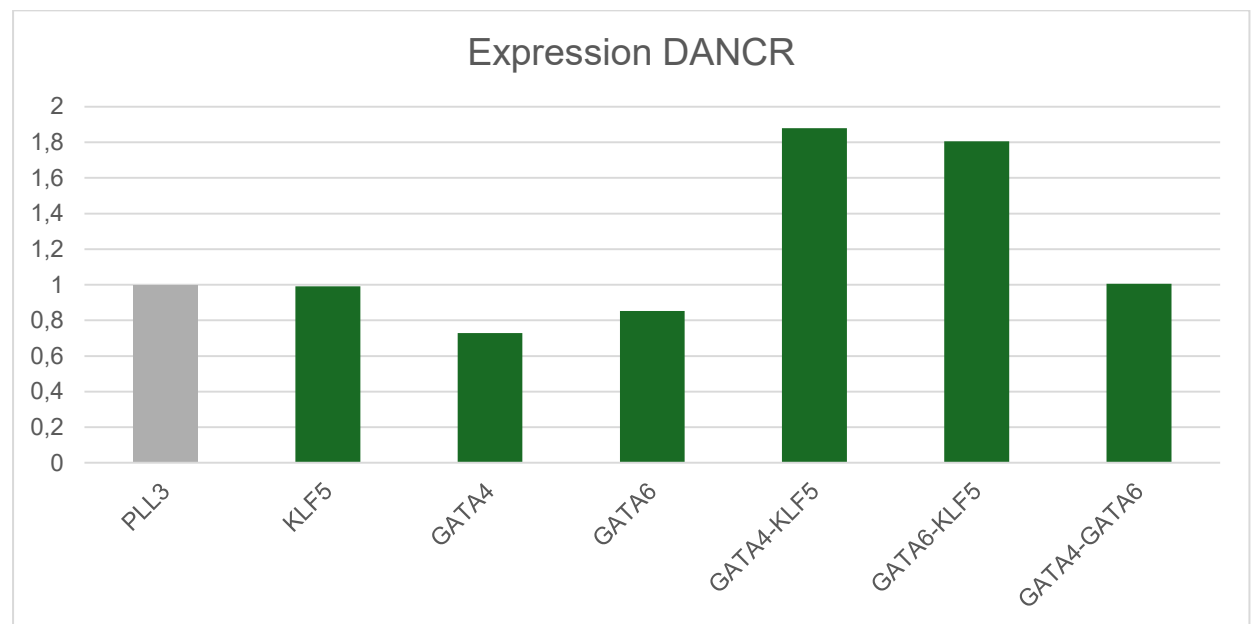


Εικόνα 24:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου FAM86FP έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης

κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ DANCER

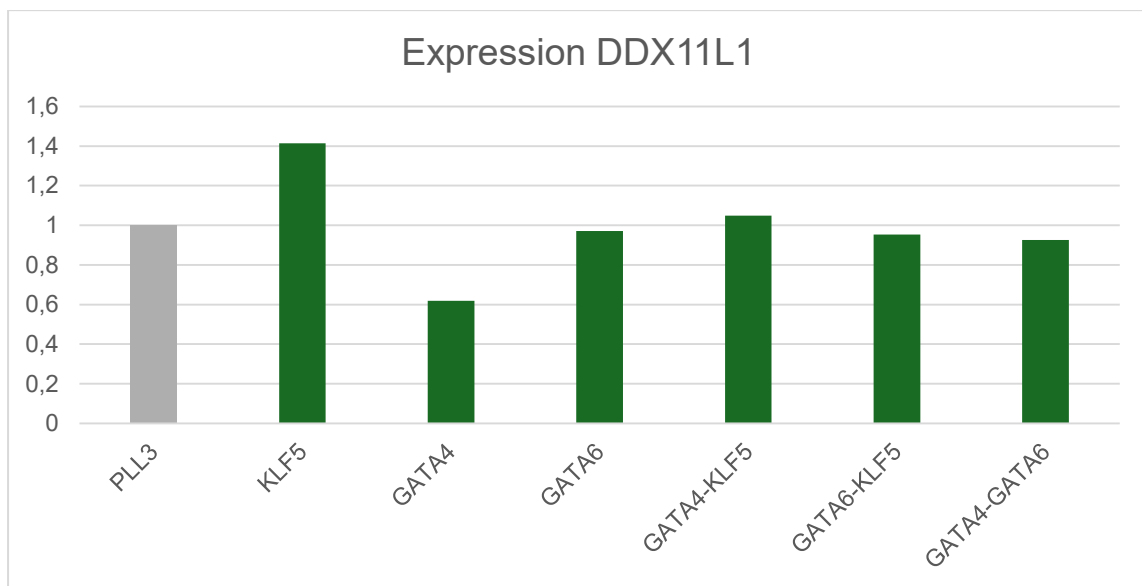
Στον στόχο **DANCER** (προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων) παρατηρείται κάτι παράδοξο. Στην περίπτωση σίγησης είτε GATA4 είτε GATA6, τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται περίπου κατά 20% ενώ με ταυτόχρονη σίγηση GATA4 (ή GATA6) με τον KLF5 η έκφραση αυξάνεται κατά 80% περίπου (**Εικ.25**). Από αυτό το γεγονός φαίνεται ότι η παρουσία του KLF5 εμποδίζει την έκφραση του DANCER ανεξαρτήτως παρουσίας ή απουσίας των GATA4 GATA6 , τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση κατά έναν βαθμό χωρίς να θεωρούνται κομβικής σημασίας ρυθμιστικοί παράγοντες συγκριτικά με τον KLF5.



Εικόνα 25:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου DANCER έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45 επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ DDX11L1

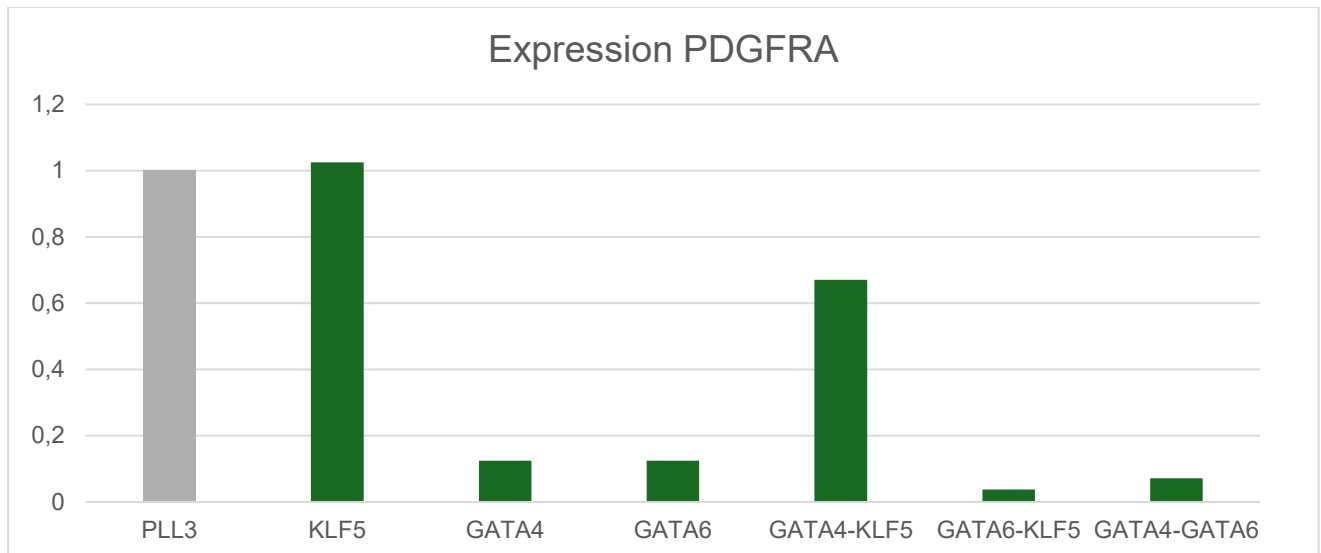
Από ότι φαίνεται ο στόχος **DDX11L1** (υψηλή ομολογία με την ελικάση DDX11 και παίζει ρόλο στην εξασθένηση του φαινομένου καταστροφής των τελομερών, προωθώντας την αθανασία των καρκινικών κυττάρων) δεν ρυθμίζεται ιδιαίτερα από τους υπό εξέταση παράγοντες. Μόνο στην περίπτωση απουσίας του KLF5 αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης κατά 40% ενώ απουσία του GATA4 μειώνεται κατά το ίδιο ποσοστό αντίστοιχα (**Εικ.26**). Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις τα επίπεδα βρίσκονται κοντά στα επίπεδα του μάρτυρα.



Εικόνα 26:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου DDX11L1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ PDGFRA

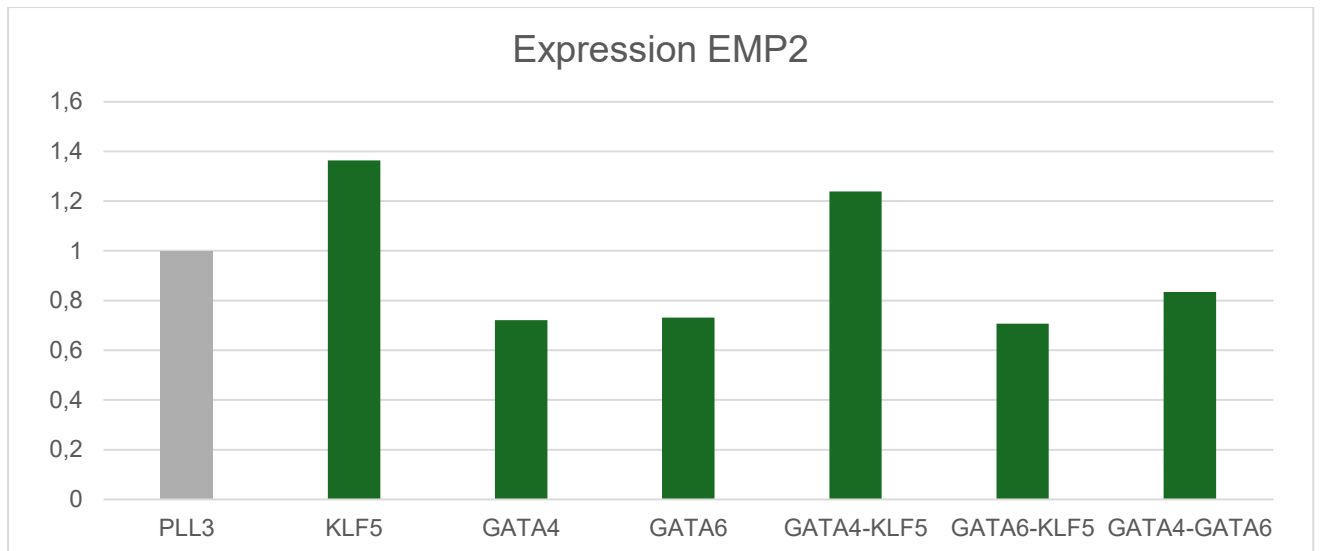
Στον συγκεκριμένο στόχο, **PDGFRA** (έχει σχέση με την κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμό), φαίνεται η πολύ έντονη ρύθμισή του από τους GATA4 και GATA6 αφού η έκφραση απουσία τους μειώνεται κατά σχεδόν 90%. Κατά την σίγηση το GATA6 σε συνδυασμό με τον KLF5 τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν το ίδιο χαμηλά ενώ στην περίπτωση συνδυαστικής σίγησης GATA4 και KLF5 τα επίπεδα έκφρασης του στόχου εμφανίζουν πιο ήπια μειορρύθμιση (**Εικ.27**)



Εικόνα 27:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου PDGFRA έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ EMP2

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων ποσοτικής PCR κατά την σίγηση είτε του GATA4 είτε του GATA6 τα επίπεδα έκφρασης του **EMP2** (ρυθμίζει τη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και έχει συσχετιστεί με διάφορες λειτουργίες όπως η ενδοκυττάρωση, η κυτταρική σηματοδότηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική η κυτταρική προσκόλληση και ο κυτταρικός θάνατος) είναι παρόμοια (μείωση κατά 30% περίπου). Ο συνδυασμός σίγησης KLF5 και GATA4 αυξάνει την έκφραση του EMP2 κατά 20% ενώ με συνδυασμό σίγησης KLF5 και GATA6 τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν μειωμένα (**Εικ.28**) όπως στην 1^η περίπτωση. Από αυτή την παρατήρηση μπορεί να προκύψει η υπόθεση ότι η ανασταλτική ιδιότητα στην έκφραση του EMP2 από τον παράγοντα KLF5 είναι πιο έντονη παρουσία μόνο του GATA4 ενώ παρουσία του GATA6 η αναστολή περιορίζεται, υποδηλώνοντας εξειδίκευση ρύθμισης του στόχου από τον GATA6.



Εικόνα 28:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου EMP2 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ TPM3P9

Στον στόχο **TPM3P9** (ψευδογονίδιο 9 τροπομοσίνης 3), εκτός από την περίπτωση σίγησης του KLF5 (μείωση έκφρασης κατά 20%), σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα η μείωση έκφρασης κυμαίνεται κοντά στο 60% (**Εικ.29**), δείχνοντας ότι πιθανότατα για την ρύθμιση έκφρασης του στόχου παίζουν σημαντικό ρόλο εξίσου και ο GATA4 και GATA6 (μπορεί να δρουν συνεργατικά για την ικανοποιητική έκφραση του TPM3P9).

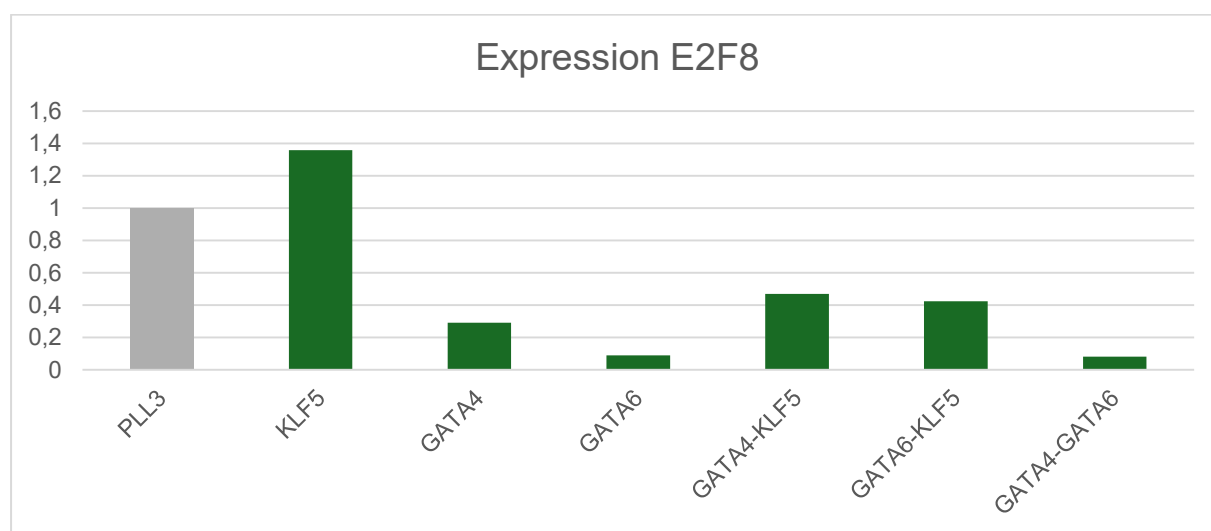


Εικόνα 29:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου TPM3P9 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης

κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ E2F8

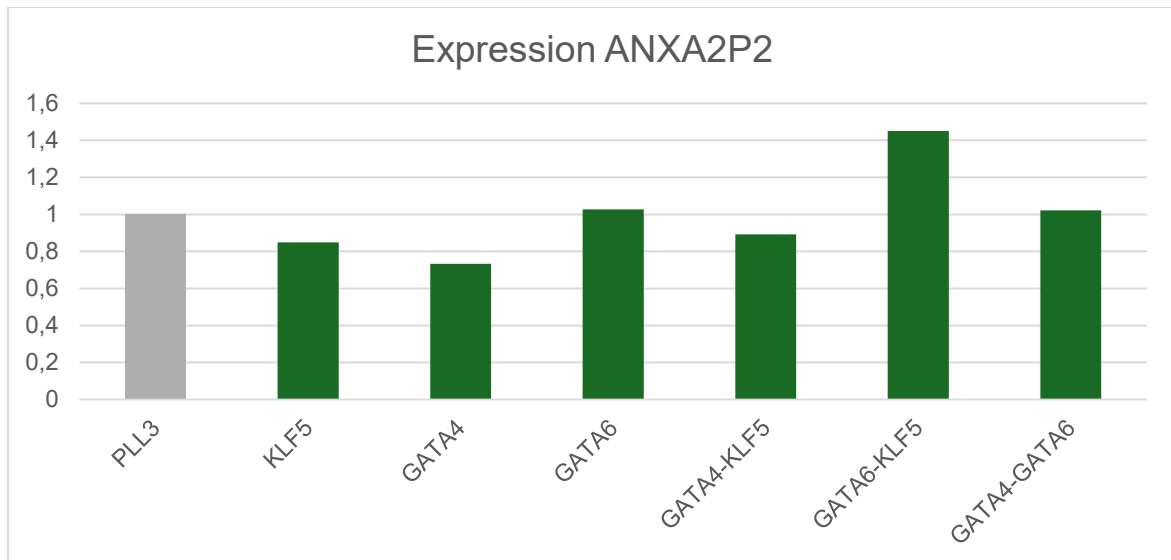
Ιδιαίτερη περίπτωση ο συγκεκριμένος στόχος **E2F8** (ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που απαιτούνται για την εξέλιξη στον κυτταρικό κύκλο και την μετάβαση από τη φάση G1 στη S, διασφαλίζοντας ότι ο πυρήνας διαιρείται την κατάλληλη στιγμή), όπου γενικότερα έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου. Συγκεκριμένα, από τα δεδομένα, παρατηρείται ιδιαίτερη μείωση έκφρασης ακόμα και κατά 90% (**Εικ.30**) περίπου απουσία του GATA6 (παρόμοιο μοτίβο με **PDGFRA**, **Εικ.27**). Η ίδια ποσοστιαία μείωση παρατηρείται και στην ταυτόχρονη σίγηση GATA4 GATA6, επιβεβαιώνοντας την συνεργατική τους πιθανότητα δράση στην έκφραση του E2F8.



Εικόνα 30:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου E2F8 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ ANXA2P2

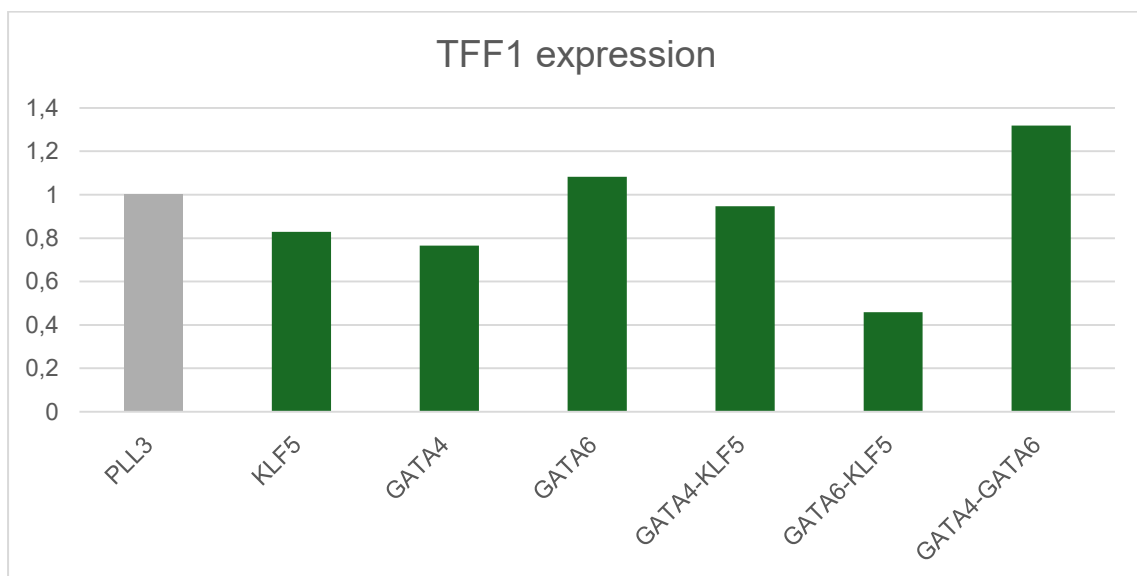
Σύμφωνα με τα δεδομένα, μία σχετικά σημαντική αλλαγή στην έκφραση του στόχου **ANXA2P2** (εμπλέκεται στη διαμεμβρανική μεταφορά ιόντων ασβεστίου, στη δράση δέσμευσης φωσφολιπιδίων, αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα και ενεργοποιεί την δραστηριότητα του αναστολέα της φωσφολιπάσης A2) παρατηρείται στην περίπτωση ταυτόχρονης σίγησης των GATA6 και KLF5 (αύξηση των επιπέδων έκφρασης κατά 50% περίπου, **Εικ.31**)



Εικόνα 31:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου ANXA2P2 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ TFF1

Στην περίπτωση του στόχου **TFF1** (προστασία κυττάρων από επαγόμενη απόπτωση), εμφανίζεται μία ιδιαιτερότητα. Συγκεκριμένα, απουσία GATA6 μόνο δεν υπάρχει σημαντική διαφορά έκφρασης του TFF1, ενώ κατά την ταυτόχρονη σίγηση GATA6 και KLF5 η έκφραση μειώνεται κατακόρυφα περίπου κατά 60%. Από την άλλη, όταν σιγούνται ταυτόχρονα οι παράγοντες GATA4 και GATA6 η έκφραση του στόχου παραδόξως αυξάνεται κατά 30% (**Εικ.32**) σε σχέση με τον μάρτυρα.



Εικόνα 32:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου TFF1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα

αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ HES1

Στο παραπάνω ιστόγραμμα απεικονίζεται ότι απουσία GATA4(μειώνεται η έκφραση του στόχου κατά 30%) ή GATA6(μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης του στόχου κατά 55% περίπου) η έκφραση του **HES1** (έχει έντονο βλαστικό χαρακτήρα όταν υπερεκφράζεται μέσω σηματοδότησης Notch) μειώνεται. Φαίνεται ότι ο στόχος ρυθμίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον παράγοντα GATA6 σε σύγκριση με τον GATA4. Αυτό επιβεβαιώνεται στα επίπεδα έκφρασης στην περίπτωση συνδυαστικής σίγησης του KLF5 με τον GATA6 (μείωση έκφραση του HES1 κατά 35% περίπου) καθώς και της συνδυαστικής σίγησης KLF5 και GATA4 (μείωση επιπέδων έκφρασης HES1 κατά 25% περίπου, **Εικ.33**).



Εικόνα 33:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου HES1 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ VILL

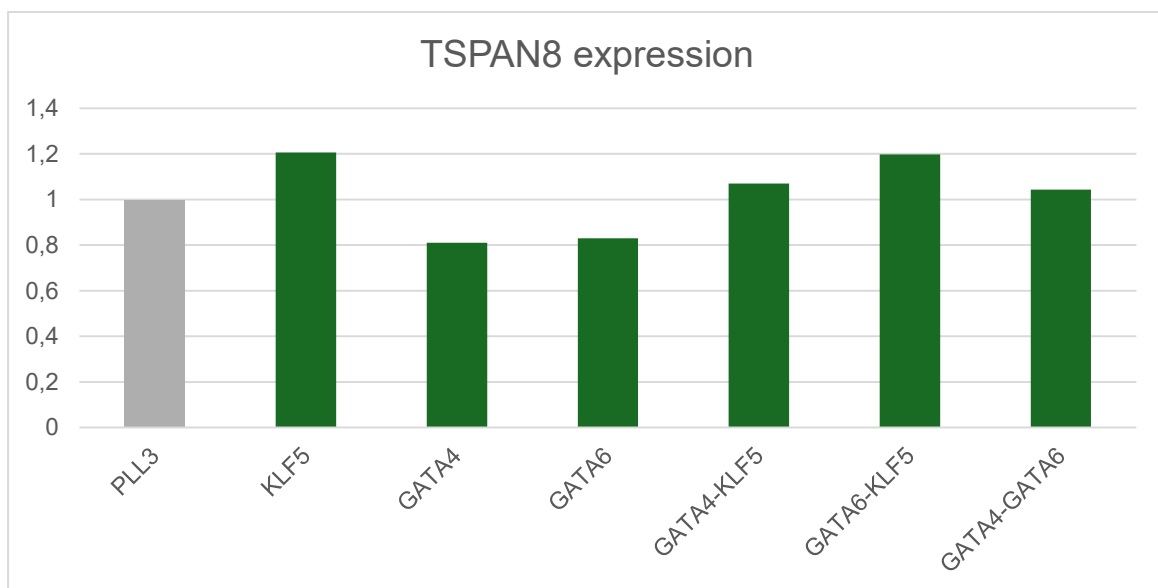
Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι όλες οι σιγήσεις αυξάνουν ήπια τα επίπεδα έκφρασης του **VILL** (**Εικ.34**) χωρίς ιδιαίτερες αυξομειώσεις (βοηθά στον πολλαπλασιασμό κυττάρων στην πρόσδεση ακτίνης και στη δημιουργία κυτταροσκελετού)



Εικόνα 34:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου VILL έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ TSPAN8

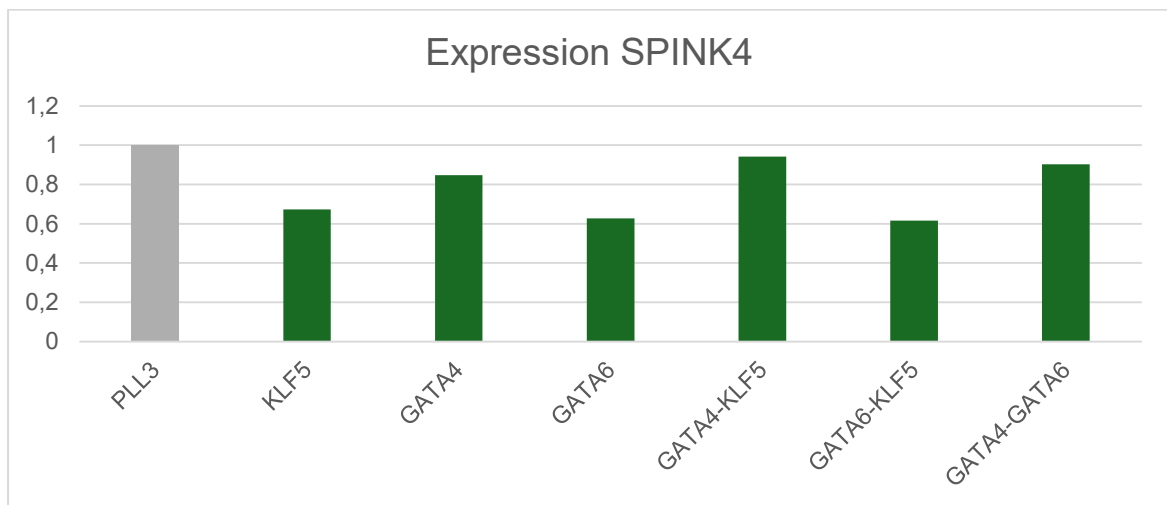
Στον συγκεκριμένο στόχο **TSPAN8** (βοηθά στην μεταστατικότητα και στην εξέλιξη του όγκου μέσω σηματοδότησης Sonic-Hedgehog), η σίγηση του GATA4 ή GATA6, οδηγεί σε μείωση έκφρασης κατά 20% ενώ η σίγηση του KLF5 σε αύξηση της έκφρασης κατά το ίδιο ποσοστό (**Εικ.35**). Πιθανόν, ο TSPAN8 ρυθμίζεται θετικά από τους GATA4 GATA6 και αρνητικά από τον KLF5.



Εικόνα 35:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου TSPAN8 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ SPINK4

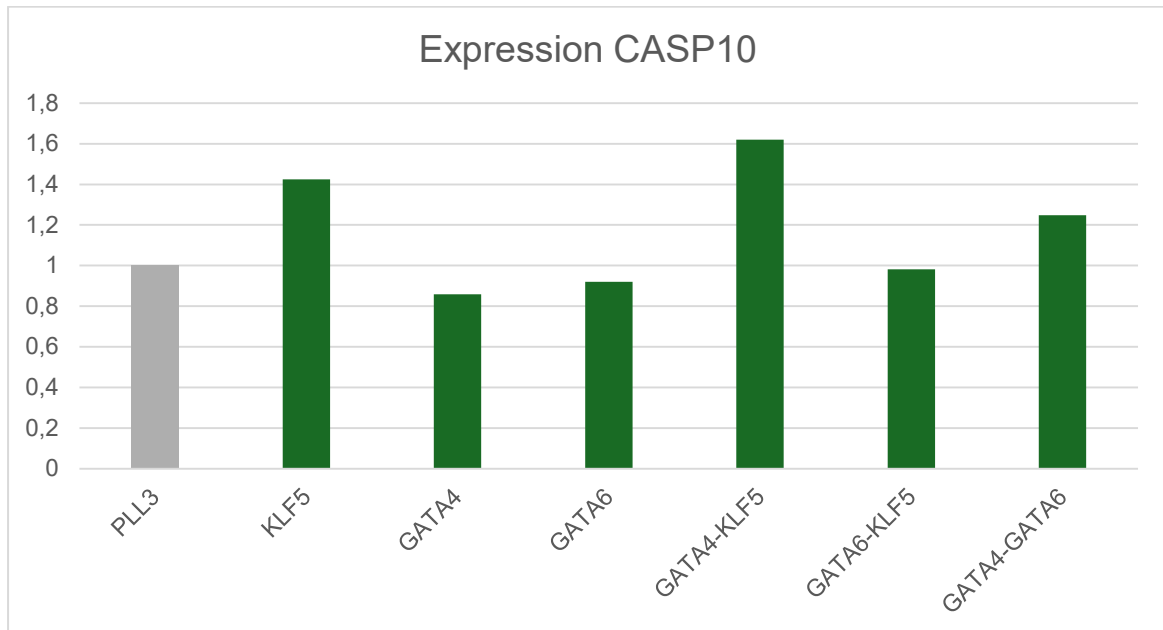
Στην περίπτωση του **SPINK4** (ενεργοποιεί την δραστηριότητα αναστολέα ενδοπεπτιδάσης) , φαίνεται ξεκάθαρα η μείωση επιπέδων έκφρασης σε μεγαλύτερο βαθμό απουσία KLF5 και GATA6 είτε χωριστά είτε συνδυαστικά (το ποσοστό δεν διαφοροποιείται σημαντικά). Βέβαια με την ταυτόχρονη σίγηση GATA4 GATA6, η μείωση έκφρασης είναι μικρότερη, όπως και σε κάθε περίπτωση που παρατηρείται απουσία GATA4 (**Εικ.36**). Λόγω αυτών των δεδομένων, μπορεί να προκύψει η υπόθεση ότι οι παράγοντες KLF5 και GATA6 ασκούν πιο έντονη ρυθμιστική δράση στην έκφραση του συγκεκριμένου στόχου.



Εικόνα 36:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου SPINK4 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

✓ CASP10

Στον στόχο **CASP10** (σημαντικό ρόλο στην απόπτωση διασπά και ενεργοποιεί τις κασπάσες 3 και 7), δεν παρατηρείται κάποιο ιδιαίτερο μοτίβο επιπέδων έκφρασης με βάση τις στοχευμένες σιγήσεις των παραγόντων εκτός από την αύξηση της έκφρασης κατά την μεμονωμένη σίγηση του KLF5 ή την συνδυαστική του σίγηση με το GATA4 (**Εικ.37**)



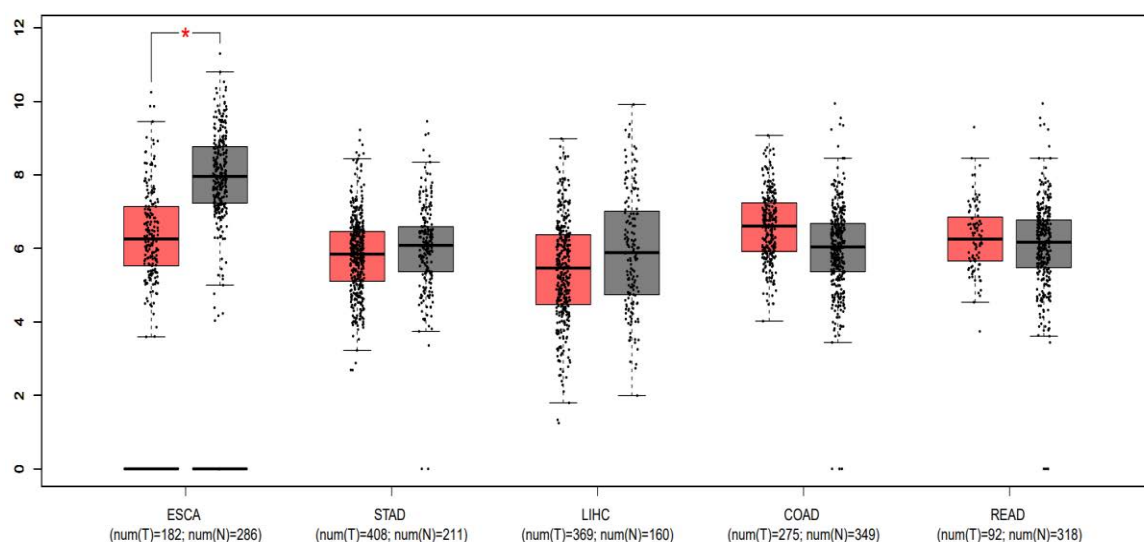
Εικόνα 37:Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου CASP10 έπειτα από μεμονωμένη και συνδυαστική σίγηση των GATA4, GATA6 και KLF5 σε κύτταρα MKN45. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως κανονικοποιημένο ποσοστό έκφρασης κατά την σίγηση έναντι του αρνητικού μάρτυρα (PLL3 MKN45, επισημαίνεται με **γκρι χρώμα**)

[Να σημειωθεί ότι οι βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν τις **λειτουργίες των γονιδίων στόχων** προέρχονται από τον ιστότοπο NCBI (Nation Institutes of Health-NIH), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>]

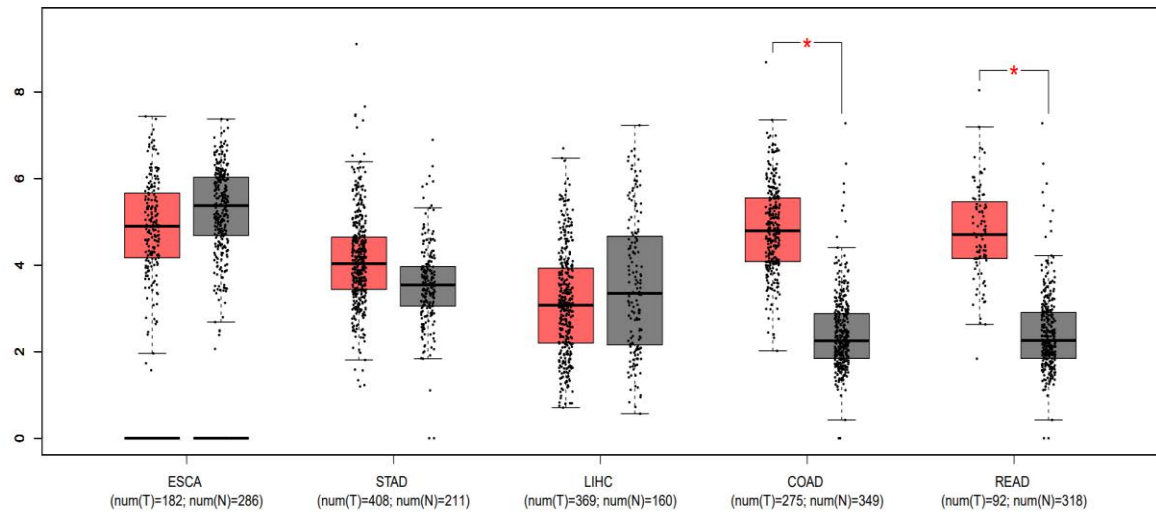
2. Επιβεβαίωση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων στόχων σε κλινικά δείγματα ασθενών από την βάση GEPIA

Σε επόμενο στάδιο αξιοποιήθηκαν τα δεδομένα από τον ιστότοπο **GEPIA** για να ελεγχθεί η έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στόχων από τα πειράματα της ποσοτικής PCR σε φυσιολογικές και καρκινικές βιοψίες ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του ανώτερου ή κατώτερου γαστρεντερικού συστήματος.

Ως προς την λειτουργία τους τα γονίδια-στόχοι χωρίστηκαν στις εξής βιολογικές διεργασίες: **απόπτωση, αγγειογένεση, κυτταρική προσκόλληση, πολλαπλασιασμός, βλαστικότητα και μεταβολισμός** και με βάση και τις λειτουργίες τους προέκυψαν ορισμένα συμπεράσματα. Για παράδειγμα, τα γονίδια **DDIT4**, **PHLDA1** και **UNC5B** έχουν το ίδιο μοτίβο επιπέδων έκφρασης κατά την σίγηση των μεταγραφικών παραγόντων όπου παρατηρείται ιδιαίτερα έντονη αύξηση της έκφρασης απουσία του παράγοντα GATA6 ενώ και στα δεδομένα **GEPIA** τα **DDIT4** (**Εικ.38**) και **PHLDA1** (**Εικ.39**) χαρακτηρίζονται ως ογκοκατασταλτικά γονίδια στον καρκίνο του οισοφάγου αφού η έκφραση τους μειώνεται στους όγκους συγκριτικά με τα παρακαρκινικά επίπεδα, σε συμφωνία με την βιολογική τους δράση αφού και τα δύο ενεργοποιούν την **απόπτωση και την αυτοφαγία**.



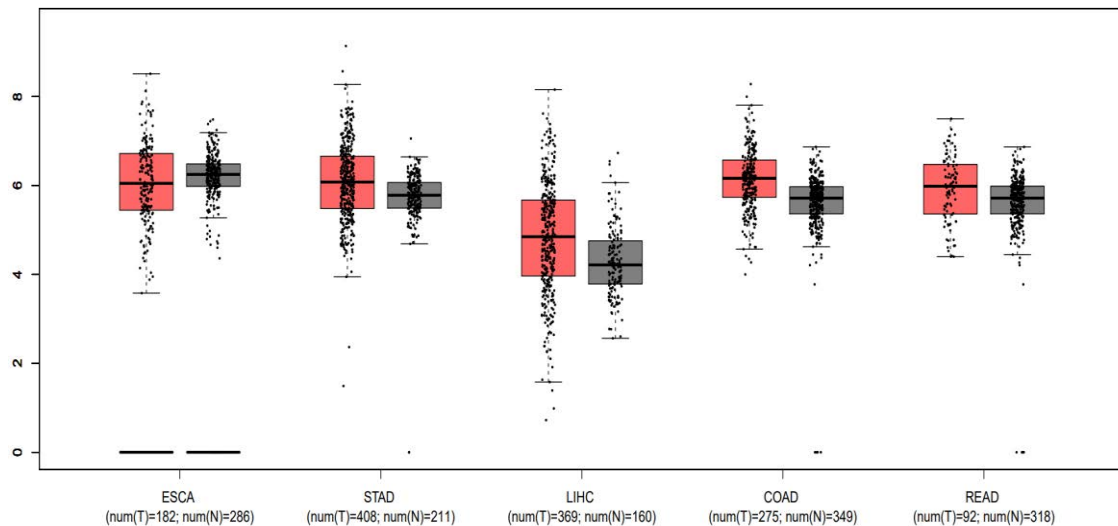
Εικόνα 38: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **DDIT4**(τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του στομάχου[**STAD**], του ήπατος[**LIHC**], του παχέως εντέρου[**COAD**] και του ορθού[**READ**] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $\text{pValue}=0.01$])



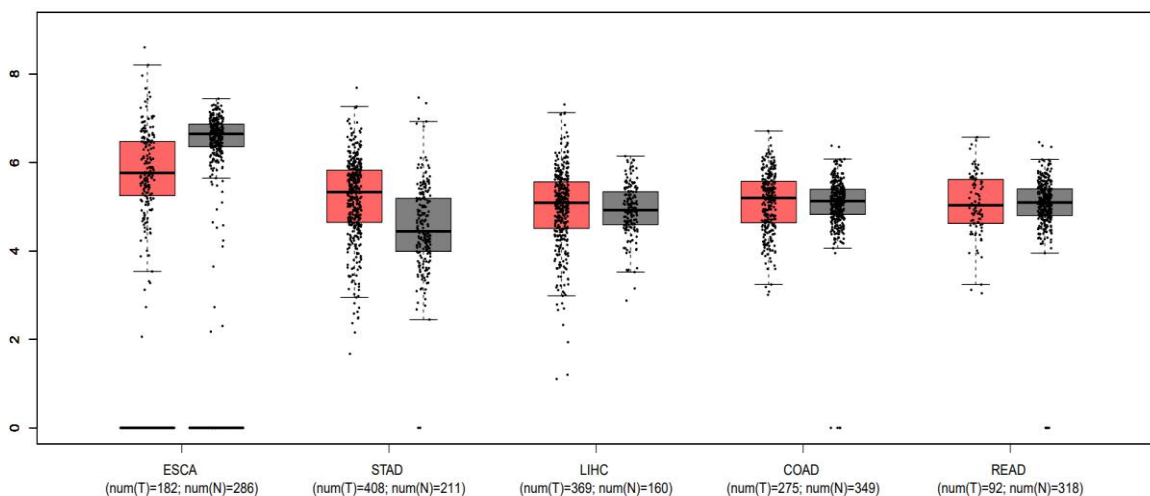
Εικόνα 39: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **PHLDA1** (τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του στομάχου[**STAD**], του ήπατος[**LIHC**], του παχέως εντέρου[**COAD**] και του ορθού[**READ**] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $p\text{Value}=0.01$])

Να σημειωθεί ότι το γονίδιο **PHLDA1** θεωρείται ογκοεπαγωγικό στους τύπους καρκίνου του παχέως εντέρου (**COAD**), του ορθού (**READ**) και του στομάχου (**STAD**) διότι ενώ γενικά η μειωμένη του έκφραση έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου, ταυτόχρονα διατηρεί σε κάποιες περιπτώσεις ενεργή την Ras, οδηγώντας σε ανάπτυξη των κυττάρων. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται σε πολλές περιπτώσεις δηλώνοντας την πολυπλοκότητα της νόσου και την ανάγκη εύρεσης σε κάθε τύπο καρκίνου την ρύθμιση και την τάση έκφρασης του κάθε στόχου.

Άλλο ένα παράδειγμα αφορά τα γονίδια **DANCR** (Εικ.40) και **EMP2** (Εικ.41), όπου προάγουν την **κυτταρική μετανάστευση** και την λεμφική διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Όσο αφορά την ρύθμιση έκφρασής τους στα πειράματα σίγησης, ακολουθούν το ίδιο μοτίβο, δηλαδή αύξηση επιπέδων έκφραση με ταυτόχρονη σίγηση GATA4 και KLF5 αλλά μείωση απουσία των GATA4-GATA6 ταυτόχρονα ή ξεχωριστά. Η έκφρασή τους στα κλινικά δείγματα είναι και πάλι παρόμοια με ήπια αύξηση στους όγκους χωρίς στατιστική σημαντικότητα με εξαίρεση στον **οισοφαγικό τύπο καρκίνου (ESCA)** όπου παρατηρείται αύξηση των παρακαρκινικών επιπέδων.

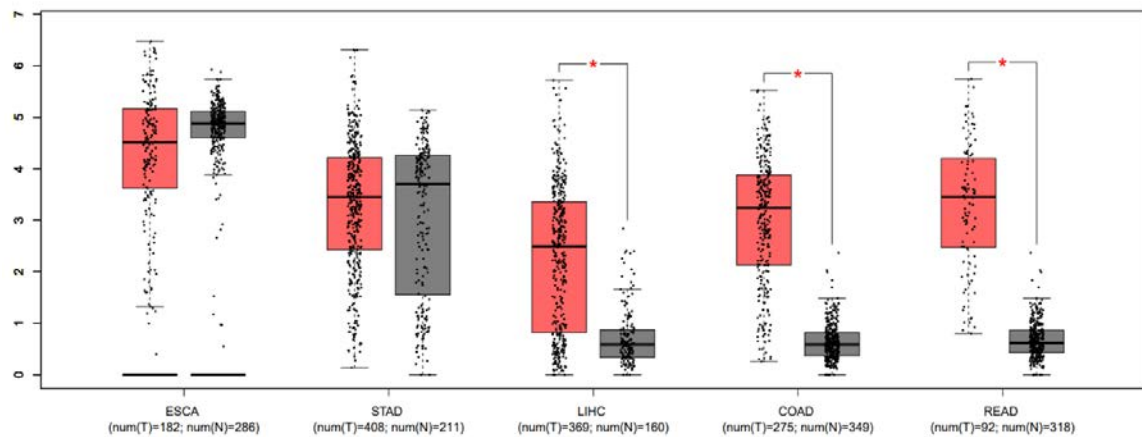


Εικόνα 40: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **DANCER** (τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του στόμαχου[**STAD**], του ήπατος[**LIHC**], του παχέως εντέρου[**COAD**] και του ορθού[**READ**] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $p\text{Value}^*=0.01$])

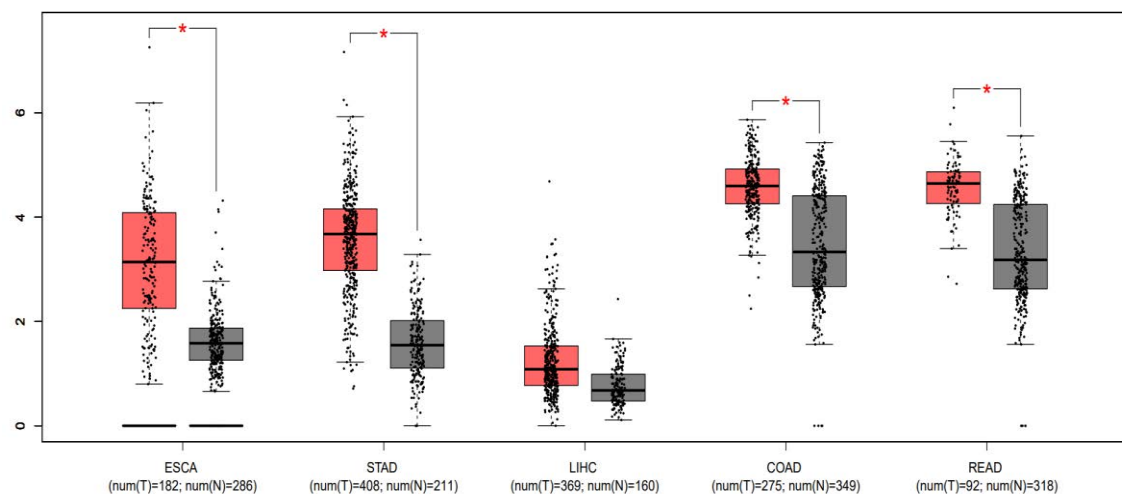


Εικόνα 41: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **EMP2** (τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του στόμαχου[**STAD**], του ήπατος[**LIHC**], του παχέως εντέρου[**COAD**] και του ορθού[**READ**] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $p\text{Value}^*=0.01$])

Το lncRNA **CRNDE** (Εικ.42) και το γονίδιο **FAR2** (Εικ.43) έχουν άμεση και κομβική σχέση με τον **μεταβολισμό**. Όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης τους, φαίνεται ότι και οι δύο στόχοι ρυθμίζονται έντονα από τους GATA4-KLF5 συνδυαστικά. Με βάση τα αποτελέσματα από τα κλινικά δείγματα οι παρατηρήσεις αυτές συνάδουν αφού η έκφραση των δύο γονιδίων υποδηλώνει έναν ογκοεπαγωγικό χαρακτήρα, επιβεβαιώνοντας την πολύ στενή σχέση μεταβολισμού και καρκινικής νόσου.



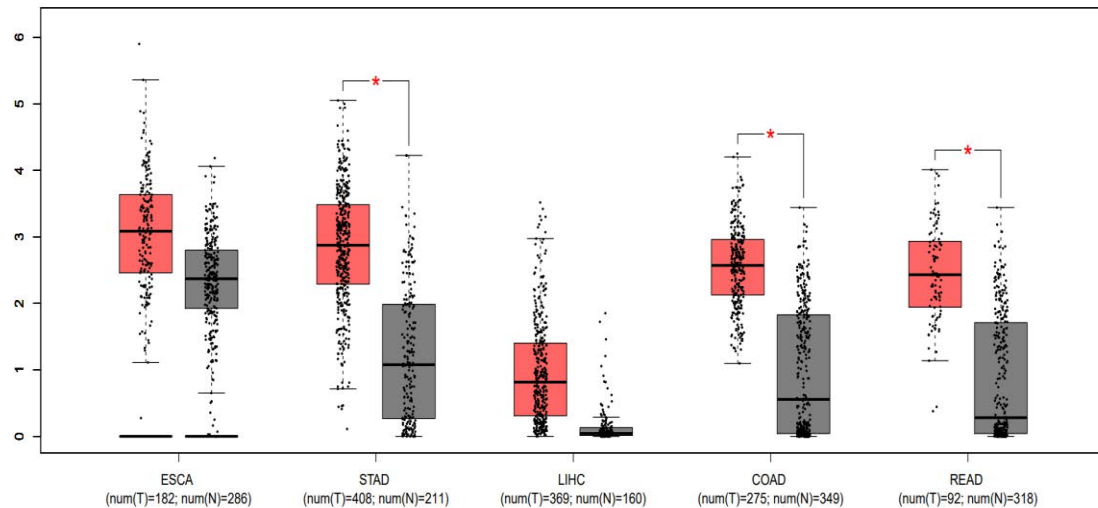
Εικόνα 42: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **CRNDE**(τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του στόμαχου[**STAD**], του ήπατος[**LIHC**], του παχέως εντέρου[**COAD**] και του ορθού[**READ**] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $p\text{Value}^*=0.01$])



Εικόνα 43: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **FAR2**(τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του στόμαχου[**STAD**], του ήπατος[**LIHC**], του παχέως εντέρου[**COAD**] και του ορθού[**READ**] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $p\text{Value}^*=0.01$])

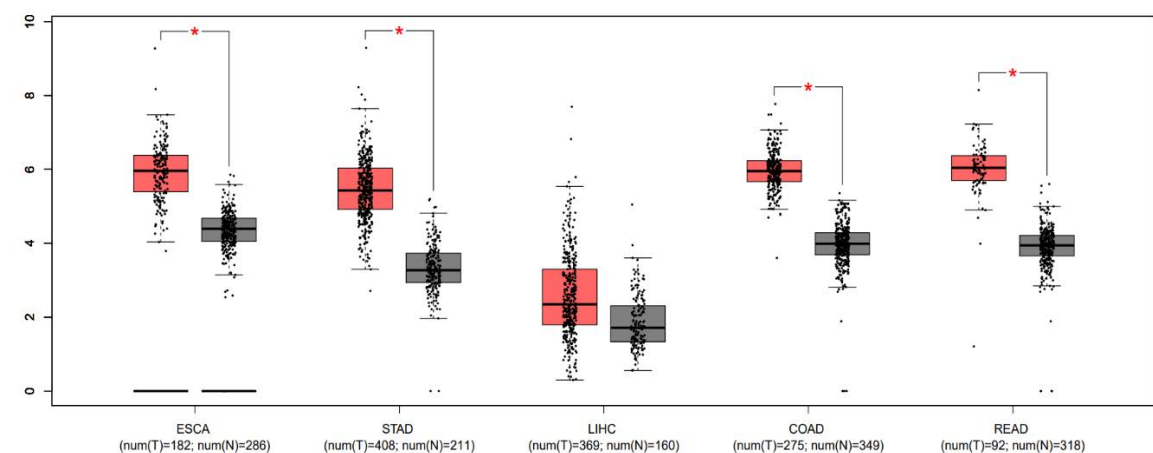
Τέλος, πολλά από τα επιλεγμένα γονίδια-στόχοι εμπλέκονται στον **κυτταρικό πολλαπλασιασμό**, μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες του καρκίνου. Ένα από τα πιο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αφορά το γονίδιο **E2F8**, το οποίο θεωρείται ως κύριος παράγοντας για την μετάβαση από την G1 στην S φάση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αυτό αποτυπώνεται απόλυτα στα δεδομένα GEPIA (**Εικ.44**) όπου σε όλους τους τύπους γαστρικού καρκίνου το γονίδιο E2F8 υπερεκφράζεται στους

όγκους, δείχνοντας τον σημαντικό ρόλο του στην εξέλιξη της νόσου υπογραμμίζοντας παράλληλα της σημασία των αποτελεσμάτων ρύθμισης της έκφρασής του από τα GATA4 και GATA6 (περίπου 80-90% μείωση της έκφρασης απουσία των δύο παραγόντων).



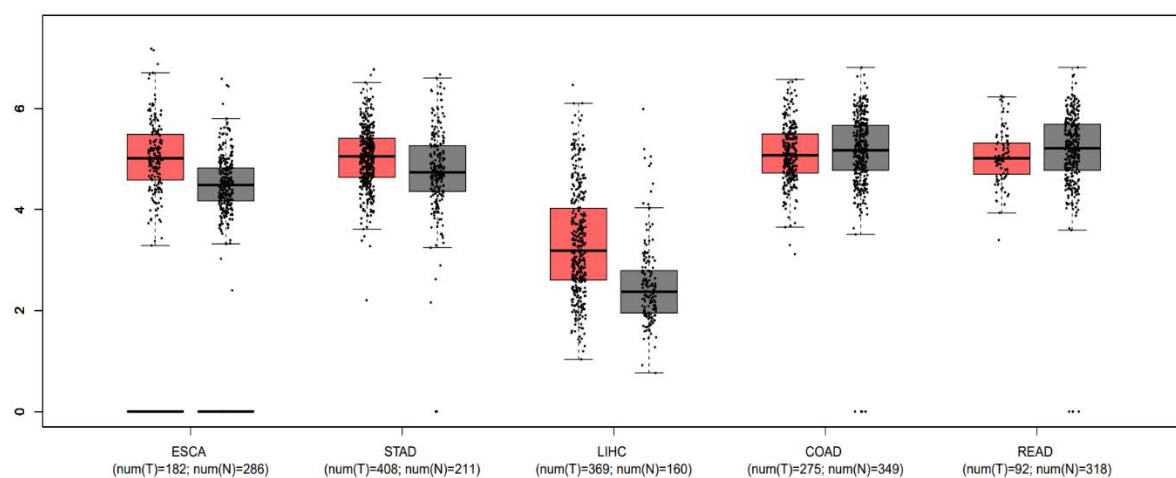
Εικόνα 44: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **E2F8**(τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του στομάχου[**STAD**], του ήπατος[**LIHC**], του παχέως εντέρου[**COAD**] και του ορθού[**READ**] με $|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $p\text{Value}=0.01$)

Άλλο παράδειγμα γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι τα γονίδια **FAM60A** (Εικ.45) και **ARHGEF2** (Εικ.46). Και τα δύο ρυθμίζονται έντονα από τα GATA4 και KLF5 ενώ τα δεδομένα GEPIA και πάλι υπογραμμίζουν τον ογκοεπαγωγικό τους χαρακτήρα στους τύπους καρκίνου ESCA, STAD και LIHC, αφού παρατηρείται υπερέκφραση στους όγκους.



Εικόνα 45: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **FAM60A**(τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[**ESCA**], του

στόμαχου[STAD], του ήπατος[LIHC], του παχέως εντέρου[COAD] και του ορθού[READ] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $\text{pValue}^*=0.01$)

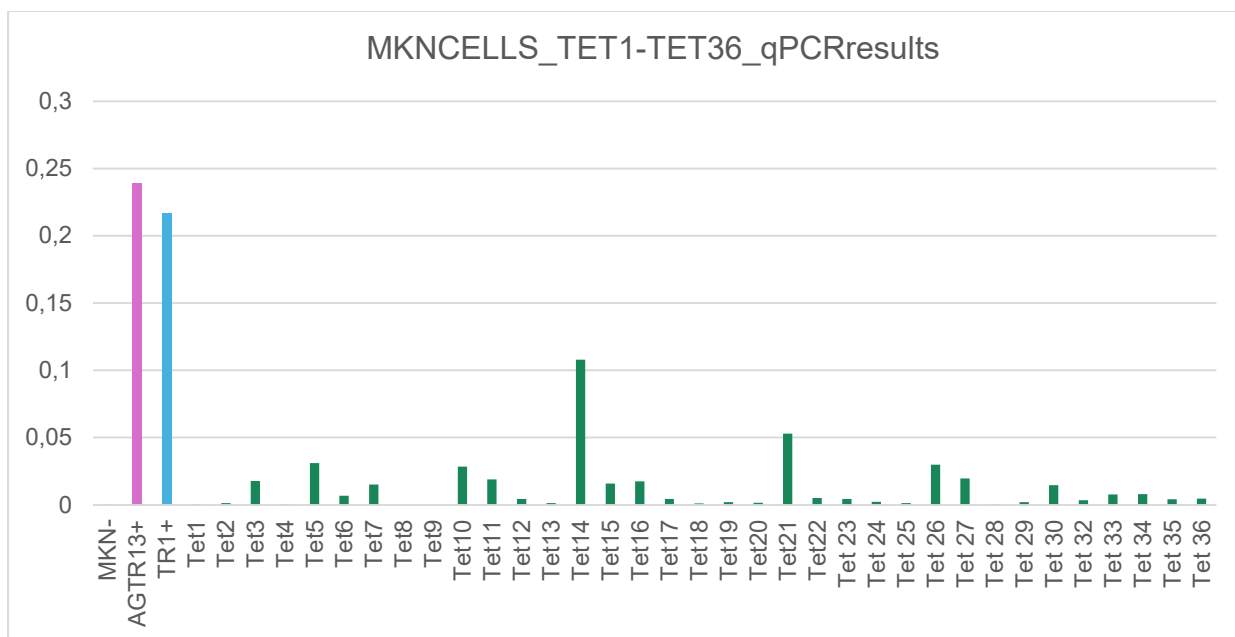


Εικόνα 46: Κλινικά δεδομένα από βιοψίες ασθενών μέσω των δεδομένων GEPIA για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου **ARHGEF2**(τα δεδομένα αφορούν τους εξής τύπους καρκίνου: καρκίνος του οισοφάγου[ESCA], του στόμαχου[STAD], του ήπατος[LIHC], του παχέως εντέρου[COAD] και του ορθού[READ] με [$|\text{Log}_2\text{FC}|=1$, $\text{pValue}^*=0.01$)

Συμπερασματικά προκύπτει ότι οι παράγοντες **GATA4**, **GATA6** και **KLF5** συμμετέχουν στην ρύθμιση γονιδίων που όχι μόνο απορρυθμίζονται σε όγκους του γαστρεντερικού συστήματος αλλά παράλληλα συμμετέχουν στον έλεγχο βιολογικών διεργασιών που προάγουν την νόσο.

3. MKN-Tet Κύτταρα (RNA extraction και έκφραση TetR γονιδίου) {Επαγόμενη Καταστολή RNAi}

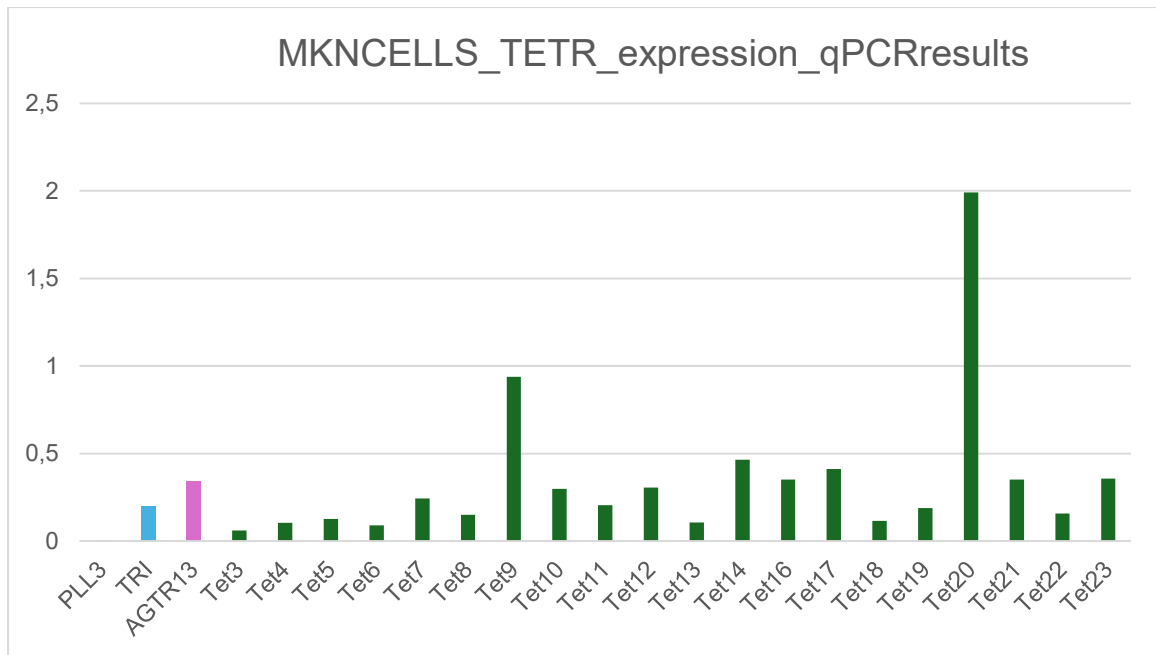
Τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν από πειράματα διαμόλυνσης με λεντιούς, τα οποία συχνά συνοδεύονται με κυτταρικό στρες. Για να γίνει πιο αξιόπιστη μελέτη της ρύθμισης αυτών των γονιδίων πραγματοποιήθηκε προσπάθεια γενετικής τροποποίησης MKN45 κυττάρων με στόχο την παρασκευή σταθερών θυγατρικών κλώνων για επαγόμενη RNAi σίγηση μέσω του συστήματος TetR. **Κατά την 1^η προσπάθεια**, η διαδικασία ολοκληρώθηκε αλλά τα αποτελέσματα ελέγχου των τροποποιημένων κλώνων δεν ήταν τα επιθυμητά διότι η έκφραση του TetR δεν ήταν μεγαλύτερη από τον θετικό μάρτυρα AGTR13+ (αφορά το ίδιο σύστημα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS που έχει παρασκευαστεί επιτυχώς στο εργαστήριο). Παρακάτω, σημειώνονται τα αποτελέσματα από την αντίδραση qPCR για έλεγχο επιτυχούς εισαγωγής του γονιδίου TetR στους κλώνους MKN (Εικ.47):



Εικόνα 47: Αποτελέσματα qPCR για έλεγχο έκφρασης του TetR σε 36 κλώνους. [Επισημαίνονται τα επίπεδα έκφρασης TetR των **κλώνων-Tet** με **πράσινο χρώμα**. **Αρνητικός Μάρτυρας:** **MKN-**, δείγμα από μη γενετικά τροποποιημένα MKN45 κύτταρα, **Θετικοί Μάρτυρες:** **AGTR13+**(απεικόνιση επιπέδων έκφρασης με **ροζ χρώμα**), αφορά το ίδιο σύστημα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS που έχει παρασκευαστεί επιτυχώς στο εργαστήριο και **TR1+**(απεικόνιση επιπέδων έκφρασης με **μπλε χρώμα**)]

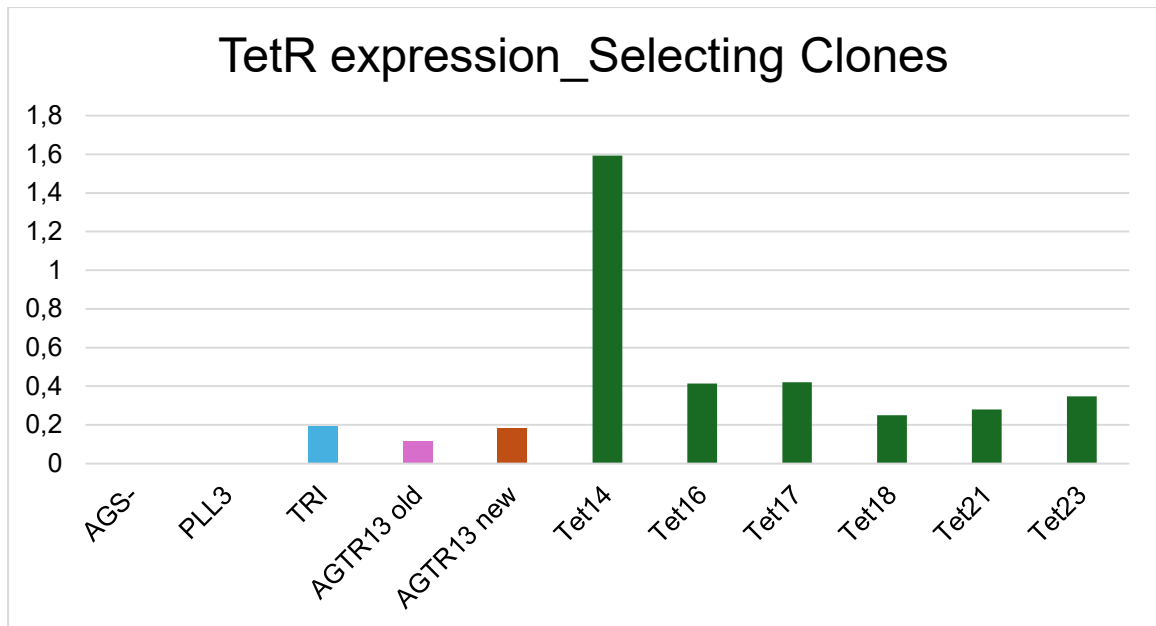
Κατά την **2^η προσπάθεια** τα κύτταρα δεν επιβίωσαν πιθανότατα λόγω αυξημένου ιικού φορτίου που θανάτωσε τα κύτταρα κατά την διαδικασία διαμόλυνσης.

Κατά την **3^η και τελευταία προσπάθεια** προέκυψαν πολλοί θετικοί κλώνοι. Συνολικά, ελέγχθηκαν τα επίπεδα του TetR μεταγράφου μέσω ποσοτικής PCR σε 20 κλώνους και στην συνέχεια μέσω της δοκιμασίας της λουσιφεράσης επιβεβαιώθηκαν οι καλύτεροι βάση της λειτουργικότητας του καταστολέα TetR. Παρακάτω αναγράφονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν από την qPCR πραγματικού χρόνου (**Εικ.48**).



Εικόνα 48: Αποτελέσματα qPCR για έλεγχο έκφρασης του TetR σε 20 κλώνους [Επισημαίνονται τα επίπεδα έκφρασης TetR των **κλώνων-Tet** με **πράσινο χρώμα**. **Αρνητικός Μάρτυρας:** PLL3, δείγμα από μη γενετικά τροποποιημένα MKN45 κύτταρα, **Θετικοί Μάρτυρες:** **AGTR13+** (απεικόνιση επιπέδων έκφρασης με **ροζ χρώμα**), αφορά το ίδιο σύστημα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS που έχει παρασκευαστεί επιτυχώς στο εργαστήριο και **TR1+** (απεικόνιση επιπέδων έκφρασης με **μπλε χρώμα**).

Τελικά, διατηρήθηκαν τα κύτταρα των κλώνων **14, 16, 17, 18, 21 και 23** για την δοκιμασία λουσιφεράσης. Για να είμαστε σίγουροι ότι τα ποσοστά έκφρασης είναι ικανοποιητικά, ξαναέγινε μία τελική επιβεβαιωτική qPCR με νέα δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Αποδείχθηκε τελικά ότι ο **κλώνος 14** ήταν ο πιο υποσχόμενος, όπως φαίνεται παρακάτω (**Εικ. 49**):



Εικόνα 49: Αποτελέσματα qPCR για την έκφραση του TetR στους κλώνους που επιλέχθηκαν με νέο AGTR13+control

[Επισημαίνονται τα επίπεδα έκφρασης TetR των **κλώνων-Tet** με **πράσινο χρώμα**. **Αρνητικοί Μάρτυρες:** **PLL3**, δείγμα από μη γενετικά τροποποιημένα MKN45 κύτταρα και **AGS-**, δείγμα από μη γενετικά τροποποιημένα AGS κύτταρα, **Θετικοί Μάρτυρες:** **AGTR13+**(απεικόνιση επιπέδων έκφρασης με **ροζ χρώμα**), αφορά το ίδιο σύστημα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS που έχει παρασκευαστεί επιτυχώς στο εργαστήριο-το παλιό δείγμα-, **AGTR13+**(νέο δείγμα θετικού μάρτυρα για πλήρη επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, απεικόνιση επιπέδων έκφρασης με **πορτοκαλί χρώμα**) και **TR1+**(απεικόνιση επιπέδων έκφρασης με **μπλε χρώμα**)]

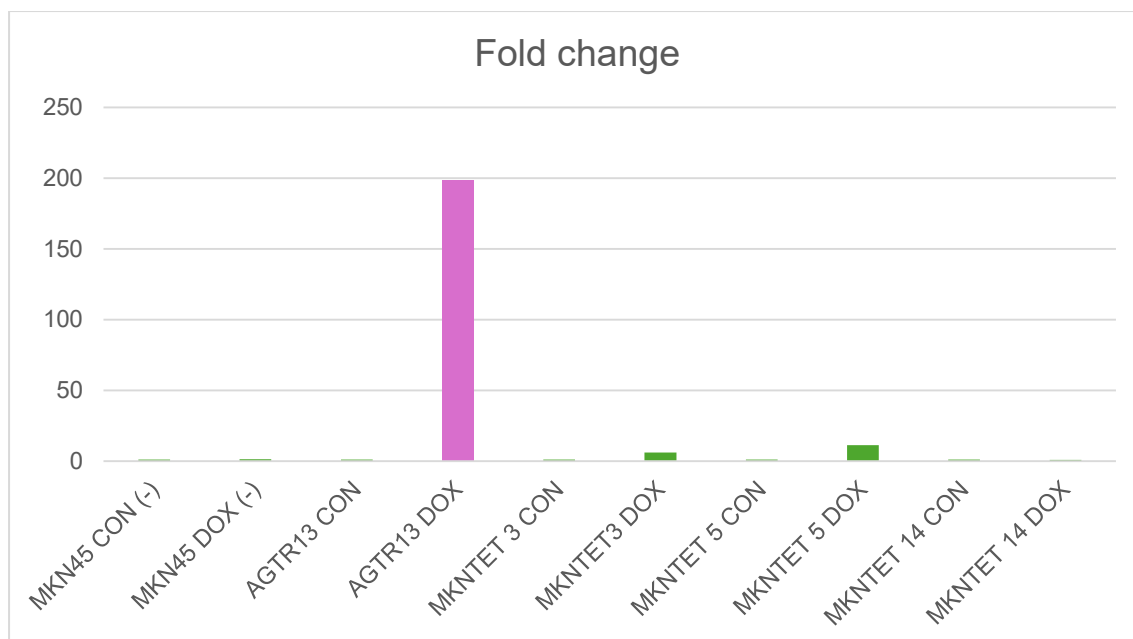
4. Δοκιμασίες Λουσιφεράσης

Οι **δοκιμασίες Λουσιφεράσης** πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την επιβεβαίωση της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης- αναστολέα TetR στα MKN45 κύτταρα, που αποτελεί προϋπόθεση επιτυχίας του συστήματος επαγόμενης σίγησης.

Κατά την **1^η προσπάθεια**, οι κλώνοι που ελέγχθηκαν ήταν οι **Tet3, Tet5** και **Tet14**, οι οποίοι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qPCR βρίσκονταν πιο κοντά στα επίπεδα έκφρασης του θετικού μάρτυρα, χωρίς βέβαια να περιμέναμε κάποιο ιδιαίτερα θετικό αποτέλεσμα. Στον **Πίνακα 6** παρατίθενται οι τιμές των δειγμάτων τόσο στον μάρτυρα (CON) όσο και κατά την προσθήκη δοξυκυκλίνης (DOX) (τιμές εκπομπής Luciferase και Renilla), ενώ στην **Εικόνα 50** απεικονίζεται η ενεργότητα του συστήματος TetR που απεικονίζει την έκφραση της πρωτεΐνης TetR έπειτα από διαμόλυνση με έναν επαγόμενο φορέα υπερέκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης (έπειτα από κανονικοποίηση με τα επίπεδα της Renilla):

MKN(-) CON	MKN(-) DOX	AGTR13 (+) CON	AGTR13 (+) DOX	TET3 CON
L 544611	L 352727	L 39276	L 4707233	L 46810
R 3947426	R 2128134	R 53040447	R 32054858	R 3396359
TET3 DOX	TET5 CON	TET5 DOX	TET14 CON	TET14 DOX
L 150806	L 72076	L 439408	L 1260456	L 432218
R 1837359	R 9729057	R 5238724	R 11075716	R 5109576

Πίνακας 6: Τιμές εκπομπής Luciferase και Renilla των δειγμάτων σε μάρτυρα (CON) και κατά την προσθήκη δοξυκυκλίνης (DOX)



Εικόνα 50: Κανονικοποιημένες τιμές εκπομπής λουσιφεράσης δειγμάτων τόσο μάρτυρα (CON) όσο και μετά την προσθήκη δοξυκυκλίνης(DOX)

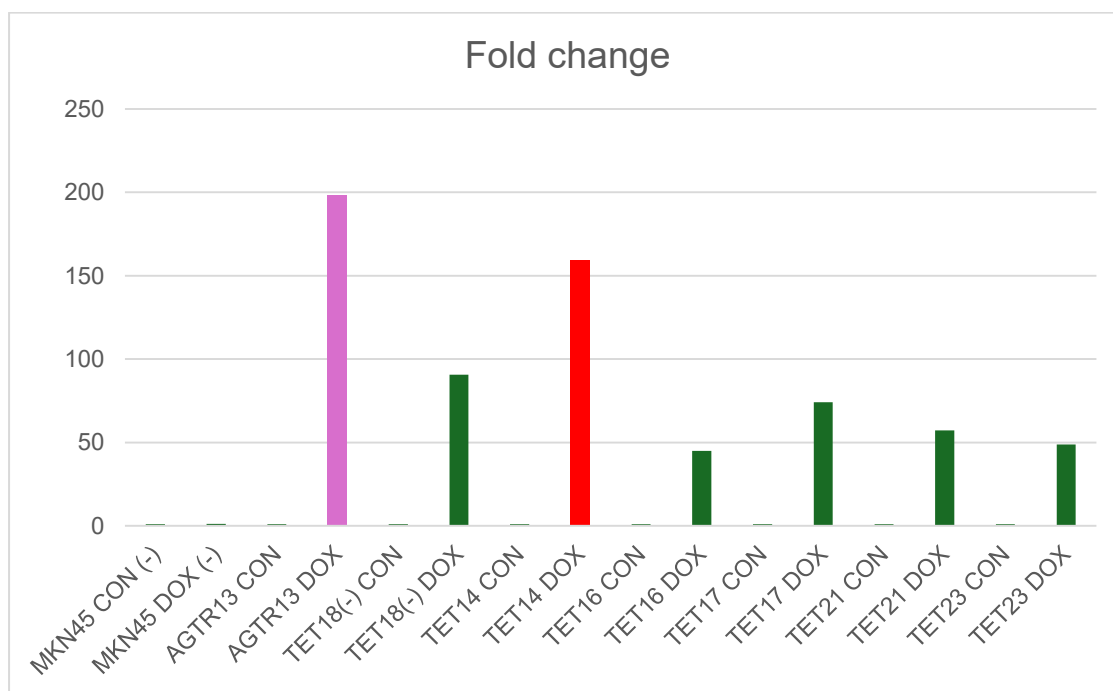
[**Αρνητικός Μάρτυρας: MKN45-**, δείγμα από μη γενετικά τροποποιημένα MKN45, **Θετικός Μάρτυρας: AGTR13+** (η κανονικοποιημένη τιμή εκπομπής λουσιφεράσης μετά την προσθήκη δοξυκυκλίνης επισημαίνεται με **ροζ χρώμα**) αφορά το ίδιο σύστημα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS που έχει παρασκευαστεί επιτυχώς στο εργαστήριο]

Συμπερασματικά, επιβεβαιώθηκε ότι το πείραμα δεν πέτυχε αφού κανένας κλώνος **δεν εμφανίζει ενεργή δράση Tet** συγκριτικά με τον θετικό μάρτυρα και άρα δεν μπορεί να εφαρμοστεί η επαγόμενη καταστολή RNAi μέσω του Tet-συστήματος σε αυτούς.

Κατά την **3^η προσπάθεια**, επαναλήφθηκε η δοκιμασία λουσιφεράσης στους κλώνους Tet18 (χαμηλή έκφραση TetR), Tet14, Tet16, Tet17, Tet21 και Tet23. Η διαδικασία και το πρωτόκολλο παρέμεινε ίδιο με την 1^η προσπάθεια και στον **Πίνακα 7** παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν:

TET18(-) CON	TET18(-) DOX	TET14 CON	TET14 DOX	TET16 CON	TET16 DOX
L 17152	L 1298142	L 328791	L 39748585	L 15861	L 451673
R 3663861	R 3058170	R160896004	R122269942	R 1728300	R 1096428
TET17 CON	TET17 DOX	TET21 CON	TET21 DOX	TET23 CON	TET23 DOX
L 27459	L 1143619	L 23833	L 712097	L 20301	L 949471
R 4372603	R 2457220	R 3608383	R 1881608	R 3726128	R 3572071

Πίνακας 7: Τιμές εκπομπής Luciferase και Renilla των δειγμάτων σε μάρτυρα (CON) και κατά την προσθήκη δοξυκυκλίνης (DOX)



Εικόνα 51: Κανονικοποιημένες τιμές εκπομπής λουσιφεράσης δειγμάτων τόσο μάρτυρα (CON) όσο και μετά την προσθήκη δοξυκυκλίνης(DOX)[**Αρνητικός Μάρτυρας: MKN45-**, δείγμα από μη γενετικά τροποποιημένα MKN45, **Θετικός Μάρτυρας: AGTR13+** (η κανονικοποιημένη τιμή εκπομπής λουσιφεράσης μετά την προσθήκη δοξυκυκλίνης επισημαίνεται με **ροζ χρώμα**) αφορά το ίδιο σύστημα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS που έχει παρασκευαστεί επιτυχώς στο εργαστήριο. Επιπλέον η κανονικοποιημένη τιμή εκπομπής λουσιφεράσης μετά την προσθήκη δοξυκυκλίνης στον καλύτερο **κλώνο Tet14** επισημαίνεται με **κόκκινο χρώμα**]

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα (**Εικ.51**), ο καλύτερος κλώνος είναι ο **Tet14** αφού η κανονικοποιημένη του τιμή εμφανίζει 200 φορές αύξηση συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα CON ο οποίος παραμένει στα επίπεδα των μη μετασχηματισμένων κυττάρων MKN45. Επιπροσθέτως, η παρατηρούμενη αύξηση είναι εφάμιλλη αυτής του θετικού μάρτυρα AGTR13, ο οποίος χρησιμοποιείται επιτυχώς σε πειράματα επαγόμενης σίγησης του εργαστηρίου. Επίσης, παρόλο που είχαμε προσδιορίσει τον κλώνο Tet18 ως κλώνο με χαμηλά επίπεδα έκφρασης TetR, τελικά βάση ενεργότητας Tet εμφανίστηκε ως ο δεύτερος καλύτερος κλώνος, αποδεικνύοντας ότι μπορεί να υπάρχει απόκλιση των αποτελεσμάτων της qPCR από την τελική δοκιμασία λουσιφεράσης διότι στην τελευταία περίπτωση ελέγχεται η ύπαρξη λειτουργικών πρωτεϊνών TetR και όχι απλά η έκφραση του γονιδίου. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να ελέγχεται η επιτυχία του πειράματος και με την δοκιμασία λουσιφεράσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Σύγκριση με άλλες μεθόδους γονιδιακής σίγησης

Παρόλο που το **Tet Σύστημα** είναι μία πολύ ελπιδοφόρα μέθοδος γονιδιακής σίγησης με **υψηλά ποσοστά επιτυχίας** γενικά δεν είναι επιθυμητή η μακροχρόνια έκθεση σε τελεστές-αντιβιοτικά (*Gossen et al. 1995*). Για αυτό το λόγο, συνήθως χρησιμοποιείται όταν υπάρχει η ανάγκη ταχείας γονιδιακής επαγωγής ή απενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο (*Mohammadi, S et al. 1997*).

Γενικά το **RNAi (επαγόμενο ή μη)** είναι επί του παρόντος η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση αντίστροφης γενετικής για τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας σε κύτταρα θηλαστικών (*Wilson RC et al. 2013*). Μπορεί να στοχεύσει οποιοδήποτε γονίδιο και μέσω της σίγησης να βρεθεί η λειτουργία του είτε μέσω φαινοτύπου, είτε έμμεσα από εκφράσεις άλλων γονιδίων, σηματοδοτικών μονοπατιών κτλ. Βέβαια απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί το γεγονός να είναι γνωστή η αλληλουχία του υπό μελέτη γονιδίου.

Βέβαια, στις περισσότερες περιπτώσεις προκαλείται μη ειδική σίγηση mRNA με μερική ομολογία ως προς τον πραγματικό στόχο, τα οποία δεν αποτελούν το επιθυμητό αποτέλεσμα (λόγω περιορισμένης συμπληρωματικότητας με την 3'-UTR περιοχή). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται υπομορφικοί φαινότυποι που δεν αντικατοπτρίζουν αποκλειστικά την σίγηση του γονιδίου στόχου (*Carthew et al. 2013*) και τα αποτελέσματα που προκύπτουν πιθανόν να μην έχουν την απόλυτη αντιστοίχιση με την θεωρητική προσέγγιση, οδηγώντας πολλές φορές σε λανθασμένα συμπεράσματα.

Επιπλέον, η συνεχής εισαγωγή εξωγενών αλληλουχιών στο σύστημα RISC μπορεί να προκαλέσει εκτόπιση των ενδογενών στόχων miRNAs, διαταράσσοντας την ισορροπία των μεταγράφων και τις λειτουργίες των miRNAs, οδηγώντας σε φαινοτύπους εκτός στόχου. Τέλος, ο μηχανισμός RNAi είναι επί το πλείστον ενεργός στο κυτταρόπλασμα, για αυτό τα πυρηνικά μετάγραφα (όπως τα lncRNAs) είναι δυσκολότερο να στοχευθούν αποτελεσματικά (*Derrien T et al. 2012*). Αυτή καθώς και οι παραπάνω πρακτικές προειδοποιήσεις ενθάρρυναν τους επιστήμονες να αναπτύξουν συμπληρωματικά εργαλεία αντίστροφης γενετικής, όπως η μέθοδος CRISPR.

Το πιο δημοφιλές σύστημα επεξεργασίας γονιδιώματος στα κύτταρα θηλαστικών είναι το **σύστημα τύπου II CRISPR/Cas9** από το *Streptococcus pyogenes*. Στην φύση, το sgRNA αποτελείται από δύο ξεχωριστά εκφραζόμενα RNA, ένα CRISPR RNA (crRNA) και ένα trans-ενεργοποιημένο crRNA (tracrRNA), τα οποία

υποβάλλονται σε επεξεργασία από τον ενδογενή βακτηριακό μηχανισμό για να προκύψει το ώριμο gRNA (Chylinski K et al. 2014). Εργαστηριακά έχουν δημιουργηθεί συστήματα που αποτελούνται από ένα μόνο χιμαιρικό sgRNA το οποίο είναι ικανό να δρα ως ώριμο sgRNA *in-vitro*, χωρίς την ανάγκη περαιτέρω επεξεργασίας, κρατώντας μια σταθερή περιοχή που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με το Cas9 και μια μεταβλητή περιοχή που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με τη γονιδιωματική θέση στόχο ανά περίπτωση, εισάγοντας μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την λειτουργία του.

Μεταγενέστερα του CRISPR-Cas9, δημιουργήθηκε και η παραλλαγή **CRISPRi**, όπου αφορά μια ενζυματικά ανενεργή έκδοση του Cas9 (deadCas9 ή dCas9) η οποία συντήκεται με έναν καταστολέα (π.χ. KRAB), δημιουργώντας μία χιμαιρική πρωτεΐνη που επάγει την μεταγραφική σίγηση γονιδίου μέσω ετεροχρωματινοποίησης του ενδογενούς υποκινητή, χωρίς την εισαγωγή μεταλλάξεων στην αλληλουχία του DNA και χωρίς την αποικοδόμηση του αντίστοιχου μεταγράφου. (Boettcher & McManus, 2015)

Γενικότερα, γίνεται αντιληπτό ότι όλες αυτές οι τεχνικές (τόσο το σύστημα Tet που προσεγγίσαμε, όσα και τα RNAi-CRISPRi) αποτελούν **τεχνικές γονιδιακής καταστολής**, αφού επιτρέπουν στους ερευνητές να μελετήσουν βασικά γονίδια, όπου σε άλλη περίπτωση η καθολική σίγηση των οποίων θα ήταν θανατηφόρα για τα κύτταρα (Gilbert LA et al., 2014). Επιπρόσθετα, μπορούν να βοηθήσουν σε εφαρμογές όπως η ανακάλυψη στόχων φαρμάκου διότι μπορεί να ωφεληθούν από φαινοτυπικές υπομορφές, καθώς ένα knockdown RNAi ή CRISPRi - αντί για knock-out - μπορεί να μιμηθεί πιο στενά τα αποτελέσματα ενός ανασταλτικού φαρμάκου (Xue W et al. 2014). Τέλος, εξίσου σημαντικό αποτελεί το γεγονός του χρόνου εφαρμογής αλλά και της διάρκειας δράσης αφού όλες οι αναφερόμενες τεχνικές μπορούν να αξιοποιηθούν για στοχευμένη σίγηση με συγκεκριμένη διάρκεια.

Συνολικά, παρά τον ενθουσιασμό γύρω από τις προσεγγίσεις που βασίζονται στο CRISPR, το RNAi συνδυαστικά με το επαγώγιμο Tet σύστημα εξακολουθούν να διατηρούν μια ισχυρή θέση σε πολλά πειραματικά πρωτόκολλα ως μία εύκολη, αντιστρέψιμη και μη κοστοβόρα τεχνική με πολλές προοπτικές και συνεχή εξέλιξη.

2. Προσπάθειες γονιδιακής καταστολής στον γαστρικό καρκίνο

Γενικά, η τεχνική γονιδιακής καταστολής χρησιμοποιείται σε διάφορες περιπτώσεις μελέτης του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού. Συνήθως, εφαρμόζεται για την εύρεση νέων διαγνωστικών δεικτών μέσω άμεσου ή έμμεσου ελέγχου ρύθμισης διαφόρων καρκινοειδικών στόχων ακόμα και νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Συγκεκριμένα σε αυτό τον τύπο καρκίνου, μία ενδεικτική προσπάθεια από μία ομάδα ερευνητών, αφορά το γονίδιο **KR17**(κερατίνη 17) μέσω επιμόλυνσης με siRNAs, διότι είχε βρεθεί ότι η γονιδιακή της έκφραση αυξάνεται νωρίς κατά την ογκογέννεση και κατά την εξέλιξη του όγκου. Πιο συγκεκριμένα μέσω της σίγησης μελετήθηκαν οι βιολογικές λειτουργίες του KRT17 στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα καθώς και την πιθανή χρήση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως μοριακού στόχου για αντικαρκινική θεραπεία.(Chivu-Economescu et al., 2017)

Άλλο παράδειγμα RNAi σίγησης, αφορά το γονίδιο **Tenascin-c**, το οποίο εκφράζει μία εξωκυτταρική πρωτεΐνη, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται έπειτα από έντονη εκδήλωση του αγγειοποιητικού μιμητισμού που περιβάλλει τον όγκο κατά την ανάπτυξή του στον γαστρικό καρκίνο. Επίσης, αποδείχθηκε ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας αυξάνει την επίδραση του μονοπατιού ERK, αφού το ενεργοποιεί σε μεγάλο ποσοστό, επάγοντας έτσι την μεταβίβαση των κυττάρων από την επιθηλιακό στον μεσεγχυματικό χαρακτήρα (EMT), εξελίσσοντας την νόσο .(Kang et al., 2021). Η σίγηση της Tenascin-c (μέσω της siRNA καταστολής) μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για μία νέα θεραπευτική προσέγγιση, διότι αν μειωθεί ο αγγειοποιητικός μιμητισμός θα παρουσιάζονται μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας στην θεραπεία.

Επιπλέον, δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις σίγησης διάφορων lncRNA , όπου έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος τους στην εξέλιξη του όγκου και γενικά στην ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου. Για παράδειγμα, το **lncRNA XIST** είναι προϊόν του γονιδίου XIST, κύριου ρυθμιστή της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X στα θηλαστικά. Έχει αποδειχθεί ότι η απενεργοποίησή του έχει ογκοκατασταλτικά αποτελέσματα ενώ η απορρύθμιση του οδηγεί στην αλλοίωση της γονιδιακής έκφρασης καθώς και σε αστάθεια της ετεροχρωματίνης. Μέσω της shRNA σίγησης του XIST με λεντιούς, αποδείχθηκε ότι όταν το XIST εκφράζεται σε μεγάλα επίπεδα προκαλεί την απενεργοποίηση της δράσης του miRNA 101, το οποίο με την σειρά του προσδένεται στον ενισχυτή (μεθυλοτρανσφεράση) μιας πρωτεΐνης της ομάδας Polycomb, στο EZH2, σταματώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ογκογέννεση και την μετάσταση(Chen et al., 2016). Επομένως, η καταστολή του lncRNA μεταγράφου, αυξάνει την δράση του miRNA101 και οδηγεί στην ογκοκαταστολή αποτελώντας μία εν δυνάμει νέα θεραπευτική προσέγγιση.

Τέλος, έχουν υπάρξει ορισμένες **προσπάθειες επαγόμενης σίγησης με παρεμβολή RNA (RNAi)** σε διάφορους τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα στον

καρκίνο του τραχήλου λόγω των έντονων μεταλλάξεων και της γονιδιωματικής αστάθειας εξαιτίας της συνεχούς μόλυνσης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HIV) παρατηρείται η αδρανοποίηση σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και η έντονη ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης βλάβης στο DNA. Ο μεσολαβητής του σημείου ελέγχου βλάβης DNA 1 (MDC1) είναι μια σημαντική πρωτεΐνη του συστήματος ATM που προωθεί την εξέλιξη της νόσου. Για αυτό το λόγο έγινε μία προσπάθεια με επαγόμενη αλλαγή της συγκέντρωσης της σισπλατίνης, του πιο κοινού χημειοθεραπευτικού φαρμάκου για τη θεραπεία καρκίνων του τραχήλου της μήτρας σε προχωρημένο στάδιο, σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας που είχε επιτευχθεί η καταστολή μέσω RNAi της έκφρασης του γονιδίου MDC1 (Singh, N et al., 2020) και διερευνήθηκε η επίδραση της αλλαγής της έκφρασης του στην ευαισθησία στη σισπλατίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε φορά, υπολογίζοντας την κυτταρική βιωσιμότητα.

Πολλές τέτοιες προσεγγίσεις συναντώνται και στον **γαστρικό καρκίνο**. Ένα παράδειγμα επαγόμενης σίγησης μέσω RNAi αφορά το γονίδιο της υπεροξειδεδοξίνης V (Prx V) που διαδραματίζει κρίσιμους ρόλους στην κυτταρική απόπτωση και στον πολλαπλασιασμό καθώς και ρυθμίζει τα επίπεδα κυτταρικών αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Έγινε η προσπάθεια του ελέγχου των πιθανών επιδράσεων του Prx V στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη (DOX) κυτταρική απόπτωση και τους μηχανισμούς της στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος (κύτταρα AGS, Jin, Y. Z et al. 2021). Η δοξορουβίνη είναι ένα κυτταροτοξικό αντιβιοτικό τύπου ανθρακυκλίνης που λαμβάνεται από τον *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* και δρα πολλές φορές συνεργατικά με ουσίες της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής με σκοπό την αυξημένη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Για αυτό το λόγο κατασκευάστηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές με shRNA για σίγηση του PrxV καθώς και ψευδείς φουρκέτες με κανένα αποτέλεσμα καταστολής του γονιδίου. Με την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης παρατηρήθηκε ο προστατευτικός ρόλος της υπεροξειδεδοξίνης V στην εξισορρόπηση των επιπέδων ROS και στον κυτταρικό θάνατο. Αυτή η τεχνική βοήθησε στην κατανόηση της λειτουργίας του Prx V στη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου.

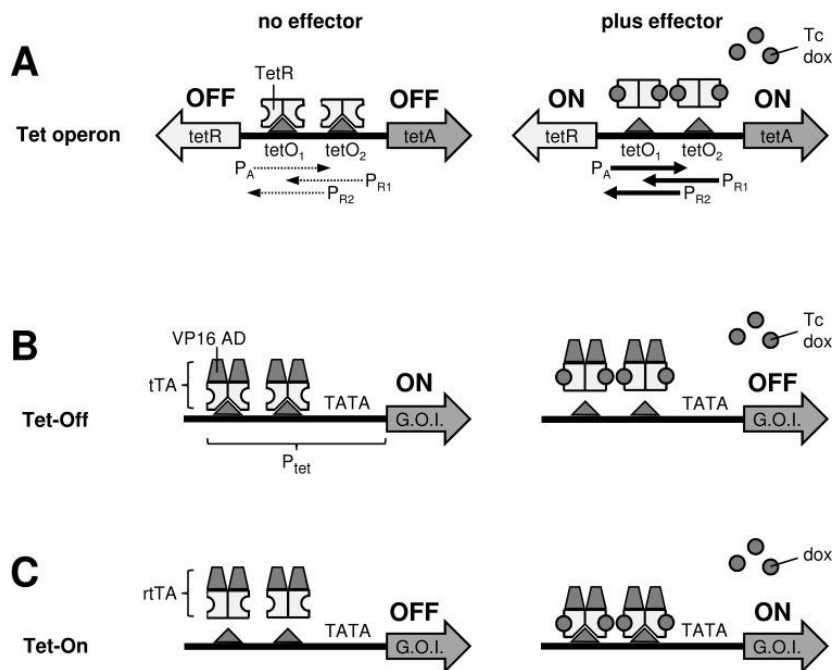
Φαίνεται ότι η επαγόμενη σίγηση με παρεμβολή RNA (RNAi) είναι μία τεχνική με πολλές προοπτικές σε διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο. Εάν αυτή η επαγόμενη σίγηση βασίζεται και σε σύστημα Tet είναι ιδιαίτερα καινοτόμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για νέες πειραματικές προσεγγίσεις όσο αφορά την κατανόηση ρύθμισης και ρόλου διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που διαθέτουν μία βασική θέση στην εξέλιξη της νόσου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Σύστημα Tet- Knockdown

Το **σύστημα Tet** αφορά ένα σύστημα επαγόμενης, από το αντιβιοτικό *δοξυκυκλίνη (DOX)*, καταστολής της γονιδιακής έκφρασης. Εφαρμόζεται σε ευκαρυωτικά κύτταρα και οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, των φυτών και των εντόμων ανάλογα τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Γενικά, αυτό το σύστημα βασίζεται στα ρυθμιστικά στοιχεία του οπερονίου ανθεκτικότητας της τετρακυκλίνης(Tc) στα βακτήρια, δηλαδή στην πρωτεΐνη καταστολέα Tet (TetR) και στον χειριστή tet (tetO) που ελέγχουν το οπερόνιο αντίστασης Tn10 στο αντιβιοτικό του *Escherichia coli* (Gossen et al. 1992) Να σημειωθεί ότι στον άνθρωπο χρησιμοποιείται η δοξυκυκλίνη ως παράγωγο της τετρακυκλίνης με πλήρη λειτουργικότητα στο σύστημα Tet. Γενικά ο καταστολέας TetR σχηματίζει διμερές το οποίο δεσμεύει το DNA του χειριστή tetO με υψηλή συγγένεια και μεγάλη εξειδίκευση γεγονός που συνεπάγεται ότι το TetR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ρυθμίσει επιλεκτικά την έκφραση διαγονιδίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο σχηματισμός αυτού του διμερούς σταματά την μεταγραφή των γονιδίων **TetR** και **TetA** (στα βακτήρια αποτελεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη) αφού δεν υπάρχει το αντιβιοτικό στο περιβάλλον. Παρουσία, όμως, DOX και Tc το διμερές έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το αντιβιοτικό και αποσπάται από την ρυθμιστική αλληλουχία των 2 γονιδίων, απελευθερώνοντας την περιοχή και ενεργοποιώντας την μεταγραφή και την γονιδιακή έκφραση. (Das et al., 2016)

Το συγκεκριμένο σύστημα, στηρίζεται στο **εργαλείο Tet στους ευκαρυώτες**, δηλαδή απουσία DOX ενεργοποιείται η δράση του καταστολέα TetR και προσδένεται σε συγκεκριμένες περιοχές (Tet motif), σταματώντας παροδικά την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Όταν στο περιβάλλον τους προστίθεται DOX, οι ισορροπίες αλλάζουν και ο TetR αλληλεπιδρά με τα μόρια του αντιβιοτικού και απομακρύνεται από την περιοχή του υποκινητή, ενεργοποιώντας έτσι την έκφραση του διαγονιδίου. Πέρα από το κλασσικό σύστημα, υπάρχει το **Tet-off** όπου σε αυτή την περίπτωση έχει συντηχθεί το TetR στην περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης VP16 του ιού του απλού έρπητα (VP16 AD). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον ελεγχόμενο από Tc μεταγραφικό ενεργοποιητή (tTA). Η δέσμευση τετρακυκλίνης ή δοξυκυκλίνης προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στον τομέα TetR του tTA, που εμποδίζει τη δέσμευση tetO και απενεργοποιεί την έκφραση γονιδίου (Das, A. et al. 2016). Από την άλλη στην περίπτωση **Tet-on** εμφανίζεται ο αντίστροφος φαινότυπος, όπου ο ανάστροφος μεταγραφικός ενεργοποιητής ελεγχόμενος από τετρακυκλίνη (rtTA) δεν δεσμεύεται στον χειριστή tetO απουσία δοξυκυκλίνης (Εικ.52).



Εικόνα 52 Κλασσικό Tet σύστημα(A) καθώς και οι παραλλαγές του Tet-off (B) Tet-on(C)

(Das, A.et al. 2016)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Clic%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5070417_CGT-16-156_F1.jpg

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bass, A. J., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, S. M., Miller, M., Bernard, B., Hinoue, T., Laird, P. W., Curtis, C., Shen, H., Weisenberger, D. J., Schultz, N., Shen, R., Weinhold, N., Kelsen, D. P., Bowlby, R., Chu, A., Kasaian, K., Mungall, A. J., ... Liu, J. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
2. Begolli, R., Sideris, N., & Giakountis, A. (2019). Lncrnas as chromatin regulators in cancer: From molecular function to clinical potential. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101524>
3. Boettcher, M., & McManus, M. T. (2015). Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. In *Molecular Cell* (Vol. 58, Issue 4, pp. 575–585). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.028>
4. Chen, D. L., Ju, H. Q., Lu, Y. X., Chen, L. Z., Zeng, Z. L., Zhang, D. S., Luo, H. Y., Wang, F., Qiu, M. Z., Wang, D. S., Xu, D. Z., Zhou, Z. W., Pelicano, H., Huang, P., Xie, D., Wang, F. H., Li, Y. H., & Xu, R. H. (2016). Long non-coding RNA XIST regulates gastric cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-101 to modulate EZH2 expression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0420-1>
5. Chivu-Economescu, M., Dragu, D. L., Necula, L. G., Matei, L., Enciu, A. M., Bleotu, C., & Diaconu, C. C. (2017). Knockdown of KRT17 by siRNA induces antitumoral effects on gastric cancer cells. *Gastric Cancer*, 20(6), 948–959. <https://doi.org/10.1007/s10120-017-0712-y>
6. Das, A. T., Zhou, X., Metz, S. W., Vink, M. A., & Berkhout, B. (2016). Selecting the optimal Tet-On system for doxycycline-inducible gene expression in transiently transfected and stably transduced mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 11(1), 71–79. <https://doi.org/10.1002/biot.201500236>
7. Kang, X., Xu, E., Wang, X., Qian, L., Yang, Z., Yu, H., Wang, C., Ren, C., Wang, Y., Lu, X., Xia, X., Guan, W., & Qiao, T. (2021). Tenascin-c knockdown suppresses vasculogenic mimicry of gastric cancer by inhibiting ERK- triggered EMT. *Cell Death and Disease*, 12(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04153-1>
8. Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G. J. A., Maciejewski, R., & Polkowski, W. P. (2018). Gastric cancer: Epidemiology, prevention, classification, and treatment. In *Cancer Management and Research* (Vol. 10, pp. 239–248). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>
9. Smyth, E. C., Nilsson, M., Grabsch, H. I., Ct Van Grieken, N., & Lordick, F. (2020). Gastric cancer Epidemiology and risk factors. In *www.thelancet.com* (Vol. 396). www.thelancet.com

10. Taft, R. J., Pang, K. C., Mercer, T. R., Dinger, M., & Mattick, J. S. (2010). Non-coding RNAs: Regulators of disease. In *Journal of Pathology* (Vol. 220, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/path.2638>
11. Zakeri, S., Aminian, H., Sadeghi, S., Esmailzadeh-Gharehdaghi, E., & Razmara, E. (2022). Krüppel-like factors in bone biology. In *Cellular Signalling* (Vol. 93). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110308>
12. Bresnick, E. H., Katsumura, K. R., Lee, H. Y., Johnson, K. D., & Perkins, A. S. (2012). Master regulatory GATA transcription factors: Mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 40, Issue 13, pp. 5819–5831). <https://doi.org/10.1093/nar/gks281>
13. Cantor, A. B., & Orkin, S. H. (2005). Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(1), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.10.006>
14. Heredia-Soto, V., Gutiérrez-Sainz, L., Ghanem, I., Guerra, L., Palacios, E., de Uribe, M., Trilla-Fuertes, L., de Miguel, M., Cejas, P., Medina, L., Calderón, J. M., Viñal, D., Mendiola, M., & Feliu, J. (2023). The Relationship between the Expression of GATA4 and GATA6 with the Clinical Characteristics and Prognosis of Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Biomedicines*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020252>
15. Ilsley, M. D., Gillinder, K. R., Magor, G. W., Huang, S., Bailey, T. L., Crossley, M., & Perkins, A. C. (2017). Krüppel-like factors compete for promoters and enhancers to fine-tune transcription. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6572–6588. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx441>
16. Stock, M., & Otto, F. (2005). Gene deregulation in gastric cancer. In *Gene* (Vol. 360, Issue 1, pp. 1–19). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.06.026>
17. Korea, S., Bang, Y.-J., Bang, Y.-J., Cutsem, E. van, Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E., Hill, J., Lehle, M., Rüschoff, J., & Kang, Y.-K. (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 376, 687–697. <https://doi.org/10.1016/S0140>
18. Bertuccio, P., Chatenoud, L., Levi, F., Praud, D., Ferlay, J., Negri, E., Malvezzi, M., & la Vecchia, C. (2009). Recent patterns in gastric cancer: A global overview. In *International Journal of Cancer* (Vol. 125, Issue 3, pp. 666–673). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ijc.24290>
19. Toyota, M., Ahuja, N., Suzuki, H., Itoh, F., Ohe-Toyota, M., Imai, K., Baylin, S. B., & Issa, J.-P. J. (n.d.). *Aberrant Methylation in Gastric Cancer Associated with the CpG Island Methylator Phenotype 1*. <http://www.med.jhu.edu/methylation>.

20. Bernal, M., Ruiz-Cabello, F., Concha, A., Paschen, A., & Garrido, F. (2012). Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. In *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Vol. 61, Issue 9, pp. 1359–1371). <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1321-6>
21. Lei, Z., Tan, I. B., Das, K., Deng, N., Zouridis, H., Pattison, S., Chua, C., Feng, Z., Guan, Y. K., Ooi, C. H., Ivanova, T., Zhang, S., Lee, M., Wu, J., Ngo, A., Manesh, S., Tan, E., Teh, B. T., So, J. B. Y., ... Rozen, S. G. (2013). Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to pi3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology*, 145(3), 554–565. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.010>
22. Graziano, F., Humar, B., & Guilford, P. (2003). The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: From the laboratory to clinical practice. In *Annals of Oncology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 1705–1713). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg486>
23. Geddert, H., Hausen, A. zur, Gabbert, H. E., & Sarbia, M. (2010). EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1. *Analytical Cellular Pathology*, 33(3–4), 143–149. <https://doi.org/10.3233/ACP-CLO-2010-0540>
24. Aznar, S., Valeró, P. F., Victoria, S., Rincon, D., Fernández Pérez, L., Perona, R., & Lacal, J. C. (2001). Simultaneous Tyrosine and Serine Phosphorylation of STAT3 Transcription Factor Is Involved in Rho A GTPase Oncogenic Transformation. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 12).
25. Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. v., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Roberts, S. A., Kiezun, A., Hammerman, P. S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A. H., Pugh, T. J., Stransky, N., Helman, E., ... Getz, G. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499(7457), 214–218. <https://doi.org/10.1038/nature12213>
26. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer*. 1992;70(1):50–55.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1606546/>
27. Lauwers, G.Y.; Mullen, J.T.; Schreiber, K.E.C.; Chung, D.C. Familial Gastric Cancers. *Pathol. Case Rev*. **2014**, 19, 66–73
<https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC4679084&blobtype=pdf>
28. Gholami, S.; Cassidy, M.R.; Strong, V.E. Minimally Invasive Surgical Approaches to Gastric Resection. *Surg. Clin. North Am*. **2017**, 97, 249–264.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039610916521938?via%3Dihub>
29. Mattick, J. S. (2001). Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. In *EMBO reports* (Vol. 2, Issue 11).

30. Wutz A., Rasmussen T.P., Jaenisch R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. *Nat. Genet.* 2002;30:167–174. doi: 10.1038/ng820.
31. Engreitz J.M., Ollikainen N., Guttman M. Long non-coding RNAs: Spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016;17:756–770. doi: 10.1038/nrm.2016.126.
32. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3:415–428. doi: 10.1038/nrg816.
33. Sun W., Yang Y., Xu C., Guo J. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs on gene expression in cancers. *Cancer Genet.* 2017;216–217:105–110. doi: 10.1016/j.cancergen.2017.06.003.
34. Yang, Y. et al. Loss of transcription factor KLF5 in the context of p53 ablation drives invasive progression of human squamous cell cancer. *Cancer Res* 71, 6475–6484, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1702 (2011)
35. Tetreault, M. P., Yang, Y. & Katz, J. P. Kruppel-like factors in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 701–713, doi:10.1038/nrc3582 (2013).
36. Fawcett, J. W., & Verhaagen, J. (2018). Intrinsic Determinants of Axon Regeneration. *Developmental Neurobiology*, 78(10), 890–897. <https://doi.org/10.1002/dneu.22637>
37. Orkin SH. Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem.* 1995;**270**:4955–4958
38. Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 2000;**275**:38949–38952.
39. O’Kane, G.M.; Grunwald, B.T.; Jang, G.H.; Masoomian, M.; Picardo, S.; Grant, R.C.; Denroche, R.E.; Zhang, A.; Wang, Y.; Lam, B.; et al. GATA6 Expression Distinguishes Classical and Basal-like Subtypes in Advanced Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2020**, 26, 4901–4910.
40. Jiang, W.; Chen, C.; Huang, L.; Shen, J.; Yang, L. GATA4 Regulates Inflammation-Driven Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, 9, 640391.
41. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G. et al., Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995, **268**, 1766–1769.
42. Mohammadi, S., Alvarez-Vallina, L., Ashworth, L. J., Hawkins, R. E., Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues. *Gene Ther.* 1997, **4**, 993–997.
43. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs:

analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*. 2012;22:1775–1789.

44. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*. 2013;42:217–239

45. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136:642–655.

46. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*. 2014;42:6091–6105.

47. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 2014

48. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007;445:656–660.

49. Gossen, M., Bujard, H., Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, **89**, 5547–5551.

50. Das, A. T., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016)., Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression, *SCIENCE BENTHAM*.

51. Singh, N., Bhakuni, R., Chhabria, D., & Kirubakaran, S. (2020). MDC1 depletion promotes cisplatin induced cell death in cervical cancer cells. *BMC Research Notes*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04996-5>

52. Jin, Y. Z., Gong, Y. X., Liu, Y., Xie, D. P., Ren, C. X., Lee, S. J., Sun, H. N., Kwon, T., & Xu, D. Y. (2021). Peroxiredoxin V silencing elevates susceptibility to doxorubicin-induced cell apoptosis via ROS-dependent mitochondrial dysfunction in AGS gastric cancer cells. *Anticancer Research*, 41(4), 1831–1840. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14949>