

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ – ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Στοχευμένη μεταλλαξογένεση σε ρυθμιστικά στοιχεία ενισχυτή σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα με τεχνολογία CRISPR nickase Cas9»

«Targeted mutagenesis of enhancer regulatory elements in gastric cancer cells by CRISPR nickase Cas9 technology»

*Πτυχιακή εργασία για την απόκτηση τίτλου σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

Καραλή Αικατερίνη του Ιωάννη
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής
Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Λάρισα 2024

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής:

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

Μέλη:

Μπαλατσός Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δήμας Κωνσταντίνος, Καθηγητής στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Γιακουντή Αντώνιο για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμβάλλω κι εγώ στις έρευνες του εργαστηρίου ως μέλος του και για την οργανωμένη καθοδήγηση και συμβουλές που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου. Επιθυμώ, επίσης, να ευχαριστήσω και τους καθηγητές, κύριο Μπαλατσό Νικόλαο και κύριο Δήμα Κωνσταντίνο, για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Οφείλω, ακόμα, να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μπεγγόλι Ροντιόλα-Ελένη για την βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο, καθώς και για το ιδιαίτερα ευχάριστο και φιλικό κλίμα που διαμόρφωσε εντός του εργαστηρίου και σε διαπροσωπικό επίπεδο. Τέλος, οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου, ιδιαίτερα στους γονείς μου, για την πίστη τους σε μένα και την συμπαράσταση και την στήριξη που μου δίνουν σε κάθε βήμα μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Γαστρικός καρκίνος	7
1.1.2 Μοριακή Ταξινόμηση	9
1.1.3 Μέθοδοι διάγνωσης	11
1.2 Long non-coding RNAs	12
1.2.1 Ρόλος στον καρκίνο και στην διάγνωσή του	13
1.3 Ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδιώματος	16
1.4 Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNP)	19
1.5 Σύστημα CRISPR/Cas9	20
1.5.1 CRISPR nickase Cas9	22
1.5.2 CRISPR/Cas9 εφαρμογές	24
2. Ερευνητική υπόθεση και σκοπός	27
3. Υλικά – Μέθοδοι	28
3.1 Υλικά	28
3.1.1 Κυτταρικές σειρές	28
3.1.2 Πλασμιδιακός φορέας για την γενετική τροποποίηση των κυττάρων	28
3.1.3 Συσκευές και εργαλεία	29
3.2 Μέθοδοι	29
3.2.1 Γενετική τροποποίηση κυτταρικής σειράς AGS με την χρήση λιποσφαιριδίων παρουσία πλασμιδίου με ενσωματωμένο σύστημα CRISPR/hCas9	29
3.2.2 Απομόνωση DNA	31
3.2.3 Διαγνωστική PCR	31
3.2.4 Πέψη PCR δειγμάτων DNA με ένζυμο περιορισμού	32
3.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης και οπτικοποίηση στο UV	33
3.2.6 PCR clean up kit	34
3.2.7 Αλληλούχηση DNA κατά Sanger	35
3.2.8 Απομόνωση RNA και cDNA σύνθεση	35
3.2.9 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR)	37
4. Αποτελέσματα	39
5. Συζήτηση	50
Βιβλιογραφία	55

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια την επιστημονική κοινότητα εξαιτίας της αυξημένης συχνότητας εμφάνισής του και των μεγάλων ποσοστών θνησιμότητας με γεωγραφική διακύμανση, όπως προκύπτει από επιδημιολογικά δεδομένα. Η σοβαρότητα και η επικινδυνότητα της ασθένειας ωθεί στην διευρυμένη προσπάθεια κατηγοριοποίησής της σε διαφορετικούς υποτύπους με βάση και τα μοριακά χαρακτηριστικά της. Η πρόγνωση της νόσου πρόκειται για ιδιαίτερα επίπονη για τον ασθενή διαδικασία, ενώ η διάγνωση του γαστρικού καρκίνου συνήθως πραγματοποιείται σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας και έτσι καθίσταται δύσκολη η επιλογή αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Για αυτούς τους λόγους κρίνεται απαραίτητη η εύρεση μη επεμβατικών μοριακών βιοδεικτών με κύριο στόχο την έγκαιρη διάγνωση της νόσου σε πρώιμο καρκινικό στάδιο. Ερευνητικά αποδεικνύεται ότι σε αυτήν την κατηγορία μορίων, λόγω των χαρακτηριστικών τους, της διαφορικής έκφρασης και του λειτουργικού τους ρόλου στα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβάνονται τα μακρά-μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNAs - lncRNAs). Τα γονίδια των lncRNAs υπόκειται σε μεταγραφική ρύθμιση από ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος, όπως είναι οι υποκινητές και οι ενισχυτές. Σημειακές ή εκτεταμένες αλλαγές στην αλληλουχία αυτών των περιοχών του γονιδιώματος έχουν συσχετιστεί με γεγονότα καρκινογένεσης, όπως στην περίπτωση των σχετιζόμενων με νόσο Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphism - SNP). Έτσι, η μελέτη των ρυθμιστικών αλληλουχιών των lncRNAs με προσεγγίσεις όπως η τεχνολογία CRISPR/Cas9 και παραλλαγές της γίνονται συχνά επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποσκοπεί στην μελέτη του ενισχυτή του lncRNA RECUR1 σε κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος μέσω στοχευμένης μεταλλαξογένεσης με τεχνολογία CRISPR/nickase Cas9 με στόχο την αλλαγή του εναλλακτικού αλληλομόρφου σε μια πολυμορφική θέση SNP σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS. Παράλληλα ελέγχεται η επίδραση της συγκεκριμένης αλλαγής στην γονιδιακή έκφραση τόσο του RECUR1 όσο και γειτονικών του γονιδίων, που επίσης συσχετίζονται με την εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου.

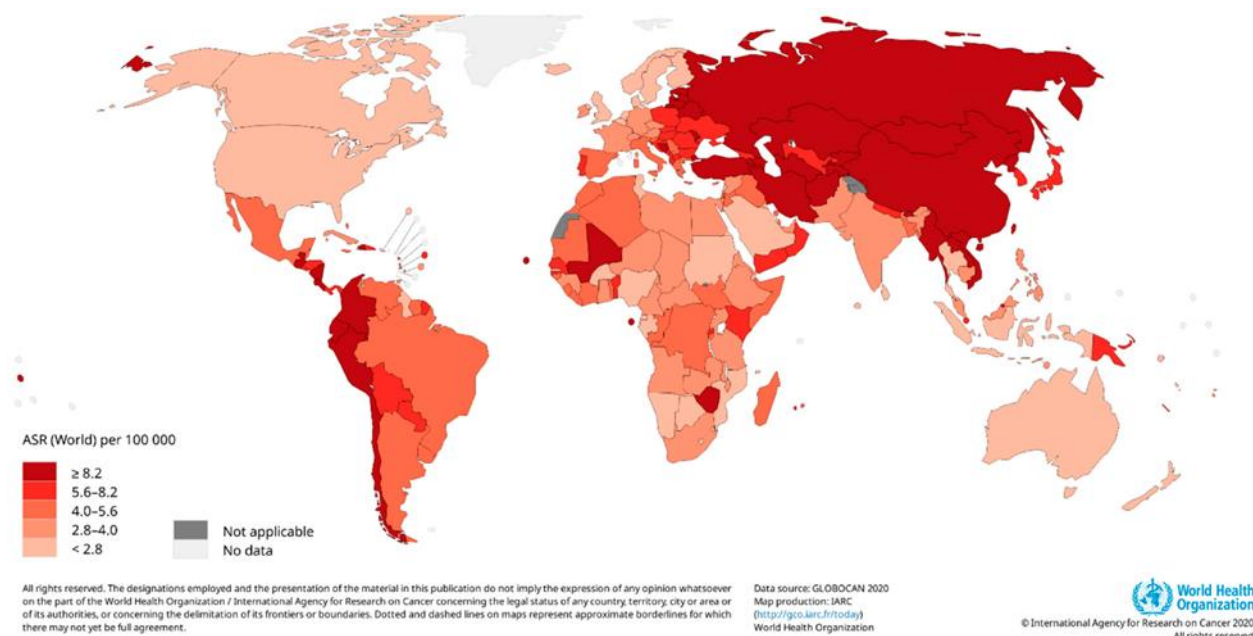
Abstract

Gastric cancer has been of particular concern to the scientific community in recent years due to its increased incidence and high mortality rates with geographical variation, as shown by epidemiological data. The severity and risk of the disease has led to an expanded effort to categorise it into different sub-types based on its molecular characteristics. The prognosis of the disease is a particularly painful process for the patient, and the diagnosis of gastric cancer is usually made at an advanced stage of the disease, making it difficult to choose effective therapeutic approaches. For these reasons, it is necessary to find non-invasive molecular biomarkers with the main objective of early diagnosis of the disease at an early cancerous stage. Research has shown that this class of molecules, due to their characteristics, differential expression and functional role in cancer cells, includes long non-coding RNAs (lncRNAs). The genes of lncRNAs are subject to transcriptional regulation by genome regulators such as promoters and enhancers. Punctuated or extensive sequence changes in these regions of the genome have been associated with carcinogenic events, as in the case of disease-associated Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Thus, the study of the regulatory sequences of lncRNAs using approaches such as CRISPR/Cas9 technology and its variants often become a focus of research interest. This thesis aims to study the lncRNA enhancer RECUR1 in gastric adenocarcinoma cells through targeted mutagenesis using CRISPR/nickase Cas9 technology for introducing the alternative allele of a polymorphic SNP in AGS gastric cancer cells. In addition, the effect of this modification on the gene expression of both RECUR1 and its neighboring genes, which are also associated with gastric cancer progression, is tested.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γαστρικός καρκίνος

Ο καρκίνος του στομάχου ταξινομείται ως ο τέταρτος πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως και είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου που σχετίζεται με την ασθένεια. Είναι μια επιθετική μορφή της νόσου, η διάγνωση της οποίας γίνεται συνήθως σε προχωρημένα στάδια, με ποσοστό πενταετούς επιβίωσης μικρότερο από 30%. Η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων γεωγραφικών περιοχών, ετερογένεια για την οποία είναι υπεύθυνοι ποικίλοι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων μολυσματικών, περιβαλλοντικών και γενετικών χαρακτηριστικών. Πάνω από το 50% των νέων περιπτώσεων εμφανίζονται στις αναπτυσσόμενες χώρες και ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου διαφέρει έως και 20 φορές μεταξύ των πληθυσμών υψηλότερου και χαμηλότερου κινδύνου. Στις περιοχές με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης περιλαμβάνονται η Ανατολική Ασία (Κίνα και Ιαπωνία), η Ανατολική Ευρώπη και η Κεντρική και Νότια Αμερική. Αντίθετα, στις περιοχές με χαμηλότερο κίνδυνο συγκαταλέγονται η Νότια Ασία, η Βόρεια και Ανατολική Αφρική, η Βόρεια Αμερική, η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία (1). Στην **Εικόνα 1** παρουσιάζονται και τα επίπεδα θνησιμότητας για το 2020 από γαστρικό καρκίνο με γεωγραφική διακύμανση, με τα δεδομένα να υποστηρίζουν τον εντοπισμό του μεγαλύτερου ποσοστού θνησιμότητας στην Ανατολική Ασία και στην Κίνα (2). Η συχνότητα του γαστρικού καρκίνου συνήθως συνοδεύεται από αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας, γεγονός που αντανακλά την μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης και φανερώνει την μεγάλη σημασία της πρόληψης των περιπτώσεων ή της έγκαιρης διάγνωσης (3).



Εικόνα 1: Εκτιμώμενα ποσοστά θνησιμότητας από γαστρικό καρκίνο παγκοσμίως το έτος 2020 (τυποποιημένα για την ηλικία) (2).

Γενικότερα, υπάρχουν ορισμένοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου εξαιτίας των επιδράσεών τους στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, οι διατροφικές συνήθειες και ο τρόπος ζωής του ατόμου συγκαταλέγονται στους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου, με ιδιαίτερες παραλλαγές μεταξύ των διαφορετικών ηπειρών και πιθανότατα να συμβάλλουν σημαντικά στην επιβάρυνση της ασθένειας, ενώ παραλλαγές στη χρήση καπνού και αλκοόλ μπορεί επίσης να τροποποιήσουν τα προφίλ κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μεταξύ των διαφορετικών περιοχών. Μελέτες που εξέτασαν τον κίνδυνο ανάπτυξης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου σε μετανάστες, από χώρες υψηλής σε χώρες χαμηλής συχνότητας, αποκάλυψαν μια φθίνουσα τάση στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου σε διαδοχικές γενιές, τεκμηριώνοντας περαιτέρω τον ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων στην καρκινογένεση και την διαφοροποίησή της σε παγκόσμιο επίπεδο. Μεταξύ των γενετικών παραγόντων κινδύνου, κυριότερες θεωρούνται οι μεταλλάξεις και συγκεκριμένα οι πολυμορφισμοί που τροποποιούν την γονιδιακή έκφραση, για παράδειγμα γνωστοί πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε μη κωδικοποιητικές και ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος, όπως ενισχυτές και υποκινητές έχουν συσχετιστεί με τον γαστρικό καρκίνο (4).

Γενικά, η καταπολέμηση του καρκίνου είναι μια οικονομικά δαπανηρή πρόκληση για τους ασθενείς και τις οικογένειές τους, καθώς το μέσο κόστος όλων των απαιτούμενων για την φροντίδα και την ενδεχόμενη αποκατάσταση ενός καρκινοπαθούς αυξάνεται ραγδαία την τελευταία δεκαετία και θα συνεχίσει να αυξάνεται. Η δεδομένη πραγματικότητα αφορά το λεγόμενο «out-of-pocket costs (OOP)», δηλαδή το κόστος προσωπικών εξόδων και πώς επηρεάζει την ποιότητα ζωής των ασθενών με καρκίνο οι οποίοι επιβαρύνονται οικονομικά. Ο ορισμός του OOP στην ιατρική, είναι «Το χρηματικό ποσό που πληρώνει ένας ασθενής για ιατρικά έξοδα που δεν καλύπτονται από ένα πρόγραμμα ασφάλισης υγείας. Το OOP περιλαμβάνει εκπτώσεις, συνασφάλιση, συμπληρωματικές πληρωμές και κόστη για μη καλυπτόμενες υπηρεσίες υγειονομικής περίθαλψης (*Ορισμός του OOP-NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute, 2011*)». Οι ασθενείς που έχουν υψηλό κόστος OOP είναι πιο πιθανό να σταματήσουν την αποδοχή χορήγησης προσωρινά ανακουφιστικών θεραπειών. Λαμβάνοντας υπόψιν και τις χώρες με τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου με βάση την παραπάνω επιδημιολογική τοποθέτηση αναφέρεται ότι στην Κίνα, το εκτιμώμενο κόστος OOP που υφίστανται οι ασθενείς σε 69 νοσοκομεία μπορεί να υπερβαίνει κατά 3-13 φορές το μέσο διαθέσιμο ετήσιο εισόδημα της επαρχίας, ενώ στην Νότια Αμερική, ο ρυθμός ανάπτυξης των αντικαρκινικών φαρμάκων ήταν περισσότερο από 3 φορές υψηλότερος από την αύξηση των δαπανών για τη δημόσια υγεία (5).

1.1.1 Μοριακή Ταξινόμηση

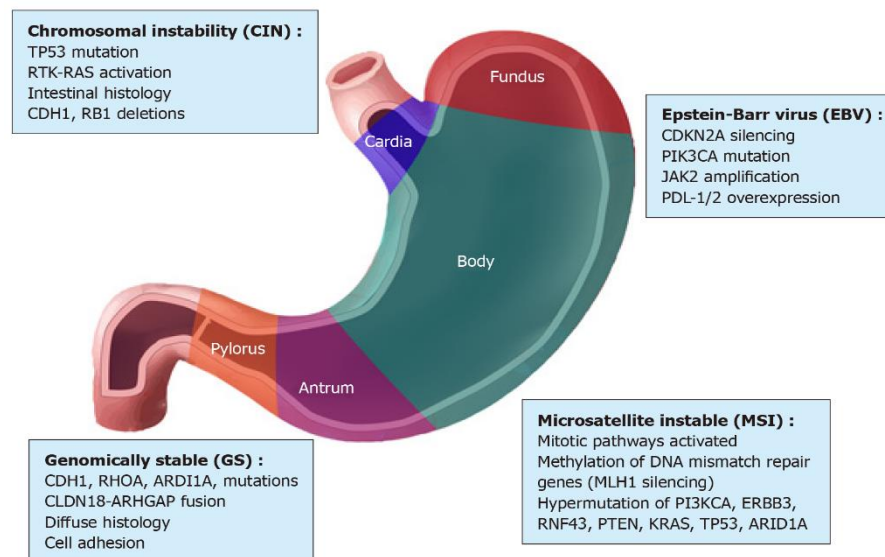
Η ερευνητική κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA) έχει χαρακτηρίσει εκτενώς το γονιδιωματικό προφίλ του γαστρικού καρκίνου με στόχο τον προσδιορισμό μοριακών υποτύπων της νόσου, καθώς και άμεσα συνδεδεμένων με αυτόν απορρυθμισμένων μονοπατιών και πιθανών θεραπευτικών στόχων (6). Με βάση, λοιπόν, την κατανομή από το TCGA ο γαστρικός καρκίνος ταξινομείται μοριακά σε τέσσερις διακριτές ομάδες (**Εικόνα 2**):

α) όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (EBV),

β) όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια,

γ) γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι και

δ) όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια.



Εικόνα 2: Ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου με βάση το ερευνητικό σχέδιο The Cancer Genome Atlas (4 μοριακοί υπο-τύποι) (6).

Σχετικά με τους όγκους που είναι **θετικοί για τον ιό Epstein-Barr** επισημαίνεται ότι ο συγκεκριμένος ιός εντοπίζεται περίπου στο 9% των περιπτώσεων γαστρικού αδενοκαρκινώματος παγκοσμίως, ενώ κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η υπερμεθυλίωση του DNA και οι γονιδιωματικές μεταλλάξεις σε σωματικά κύτταρα. Η υπερμεθυλίωση – που μπορεί να προκληθεί από λανθάνουσες ιικές πρωτεΐνες του Epstein-Barr στην προκειμένη περίπτωση - αφορά νησίδες CpG σε υποκινητές γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και προάγει την περαιτέρω χρωμοσωμική αστάθεια. Επιπλέον, γονίδια όπως το PD-L1 και το PD-L2 (είναι αναστολέας σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού) αυξορρυθμίζονται συχνά σε αυτόν τον υπότυπο. Παράλληλα, μεταλλάξεις που αφορούν την κινάση PI3K οδηγούν σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR/PI3K, το οποίο είναι συνυφασμένο με την προώθηση της κυτταρικής αύξησης και του μεταβολισμού (7).

Αναφορικά με τους όγκους που ανοίγουν στον υπότυπο με **μικροδορυφορική αστάθεια** από την γονιδιωματική τους ανάλυση προκύπτει ότι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την μικροδορυφορική αστάθεια προκαλούνται συνήθως από μεθυλίωση του υποκινητή γονιδίων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, καθώς, προφανώς, επηρεάζεται π.χ. ο αριθμός των επαναλήψεων σε περιοχές μικροδορυφόρων λόγω αδυναμίας του επιδιορθωτικού μηχανισμού. Δηλαδή, υπάρχει άμεση συσχέτιση της μικροδορυφορικής αστάθειας με το ελαττωματικό στον όγκο σύστημα επιδιόρθωσης, γνωστό ως DNA mismatch repair. Υπό αυτές τις συνθήκες τα επιδιορθωτικά γονίδια είτε έχουν υποστεί επιγενετική σίγηση (δηλαδή τροποποιήσεις χρωματίνης που προκαλούν αποσιώπηση της γονιδιωματικής περιοχής) ή είτε μεταλλάξεις απενεργοποίησης. Μεταξύ των συγκεκριμένων γονιδίων περιλαμβάνονται και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια TP53 και PTEN, ενώ απορρυθμίζεται και το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF- β που σχετίζεται με την μετάβαση από την επιθηλιακή στην μεσεγχυματική κατάσταση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανοσο-επιτήρηση (7).

Όσον αφορά την **χρωμοσωμική αστάθεια**, οι αλλαγές αριθμού σωματικών αντιγράφων (Somatic Copy Number Alterations) περιλαμβάνουν δομικές παραλλαγές στο DNA, που πιθανόν να προκαλούνται από την γονιδιωματική αστάθεια. Τα SCNA μπορεί να περιλαμβάνουν γονιδιωματικές ή ευρείες χρωμοσωμικές περιοχές του DNA και μπορεί να αφορούν αύξηση ή απώλεια αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων γονιδίων. Έχουν, μάλιστα, συσχετιστεί με γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου, όπως γονίδια που συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης RTK/RAS/MAPK, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και σε γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Οι μεταγραφικοί παράγοντες συνδέονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα, τα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων – για τα οποία έχει βρεθεί ότι λειτουργούν ως ογκογονίδια για την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού *in vivo* και *in vitro* και συμμετέχουν στην βλαστοκυτταρικότητα και στην γενικότερη εξέλιξη του όγκου - KLF5, GATA4 και GATA6 έχει αναφερθεί ότι αυξορρυθμίζονται στον γαστρικό καρκίνο (8).

Η απώλεια ετεροζυγωτίας είναι επίσης ένας δείκτης χρωμοσωμικής αστάθειας και παρατηρείται συχνά στον γαστρικό καρκίνο. Συγκεκριμένα, η απώλεια ετεροζυγωτίας σε ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το TP53 (δηλαδή η απουσία του αλληλομόρφου που κωδικοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο και η επικράτηση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου σε ομοζυγωτία) εντοπίζεται συνήθως σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα σε συχνότητα μεγαλύτερη από 30%. Οι μετατοπίσεις, οι διπλασιασμοί χρωμοσωμικών περιοχών και η αναδιάταξη χρωμοσωμάτων είναι φαινόμενα που σχετίζονται με την σύντηξη γονιδίων. Οι συγκεκριμένες γονιδιωματικές αλλαγές σχετίζονται άμεσα και με την μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (φαινόμενο EMT) που είναι ενδεικτική της καρκινογένεσης (8).

Τέλος, οι **γονιδιωματικά σταθεροί** όγκοι έχουν ως κύρια μοριακά χαρακτηριστικά την ομόλογη μετάλλαξη RAS και την σύντηξη της Claudin-18 με την πρωτεΐνη ενεργοποίησης της Rho GTPase. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη σύντηξη εμπλέκεται στη ρύθμιση των φυσιολογικών κύκλων κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην απώλεια του επιθηλιακού κυτταρικού τύπου (EMT), στο σχηματισμό ενός ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος στον όγκο και στην προσκόλληση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (8).

Συμπερασματικά, αξίζει να επισημανθεί ότι η μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου με βάση κυρίως τα γενετικά χαρακτηριστικά που ποικίλλουν είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, διότι παρέχει την ευκαιρία καλύτερης κατανόησης των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου και εύρεσης και ανάπτυξης προηγμένων και κυρίως εξατομικευμένων βιοδεικτών για την πρόγνωση και την διάγνωση, καθώς και την εξειδικευμένη θεραπευτική προσέγγιση του γαστρικού καρκίνου.

1.1.2 Μέθοδοι διάγνωσης

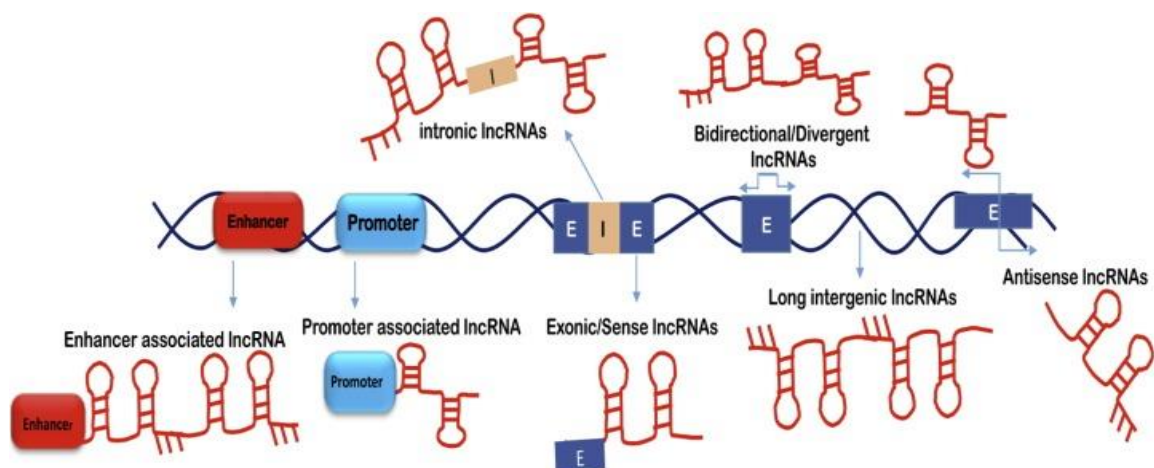
Εξαιτίας της σοβαρότητας της νόσου, της θέσης της στην παγκόσμια κατάταξη, της αργοπορημένης εμφάνιση συμπτωμάτων και τα αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας κρίνεται εξαιρετικά σημαντική η έγκαιρη διάγνωσή του, καθώς και ο προ-συμπτωματικός έλεγχός. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου αφορούν κυρίως την ανώτερη ενδοσκόπηση (οισοφαγογαστρο-δωδεκαδακτυλοσκόπηση) (EGD) την οποία μπορεί να ακολουθήσει η βιοψία, το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα, αξονική τομογραφία στομάχου, αλλά και εργαστηριακές εξετάσεις αιματολογικής (προσδιορισμός κυττάρων αίματος) ή γονιδιωματικής φύσεως (έλεγχος μεταλλάξεων σχετικών με τον γαστρικό καρκίνο), με την δεύτερη περίπτωση να είναι περισσότερο εξειδικευμένη (9).

Οι πιο συχνόι βιοχημικοί βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για σχετικά έγκαιρη ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου μέσω ανάλυσης δειγμάτων ορού περιλαμβάνουν το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), τα υδατανθρακικά αντιγόνα (CA) π.χ. CA125, καθώς και πεψινογόνο και α-εμβρυοπρωτεΐνη (AFP) (10). Ωστόσο, η εξειδίκευση και η ευαισθησία αυτών των βιοδεικτών ορού είναι περιορισμένες αφού τα συγκεκριμένα μόρια αξιοποιούνται στην διάγνωση και άλλων τύπων καρκίνου. Για αυτό τον λόγο κρίνεται απαραίτητη η καλύτερη κατανόηση μοριακών παραγόντων που εμπλέκονται στον γαστρικό καρκίνο με απώτερο σκοπό τον εντοπισμό νέων μη επεμβατικών βιοδεικτών, οποίοι μπορεί να εντοπίζονται στο γαστρικό υγρό ή στο περιφερειακό αίμα, για την έγκαιρη διάγνωση σε πρώιμο καρκινικό στάδιο ή πρόγνωση και παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην εφαρμοζόμενη θεραπεία (11).

1.2 Long non-coding RNAs

Όπως προαναφέρθηκε, ακριβώς επειδή η περίπτωση του γαστρικού καρκίνου αποτελεί πρόκληση ως μια ιδιαίτερα επιθετική νόσο με δύσκολη διάγνωση και πρόγνωση, η ανάπτυξη βιοδεικτών μπορεί να διευκολύνει αυτές τις διαδικασίες. Τα τελευταία χρόνια, έρευνες έχουν αποδείξει ότι συγκεκριμένα μόρια RNA λειτουργούν και εκφράζονται με παρεκκλίνοντα τρόπο στον καρκίνο συγκριτικά με φυσιολογικούς ή καρκινικούς ιστούς και άρα μπορούν να αξιοποιηθούν τόσο στην διάγνωση όσο και στην πρόγνωση του γαστρικού καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου και για αυτόν τον λόγο κρίνεται σημαντική η μελέτη των χαρακτηριστικών, της λειτουργίας και της διαφορικής τους έκφρασης στην νόσο (12).

Πιο συγκεκριμένα, το γονιδίωμα μεταγράφεται εκτενώς δημιουργώντας χιλιάδες μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA), τα οποία ορίζονται ως μετάγραφα μήκους μεγαλύτερου από 200 νουκλεοτίδια που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Όσον αφορά την βιογένεσή τους, τα lncRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, συχνά είναι πολυαδενυλιωμένα, ενώ μπορεί να προέρχονται και από το εναλλακτικό μάτισμα των mRNA καθώς και από αλληλουχίες ψευδογονιδίων ή από μεταθετών στοιχείων (13). Σε κάθε περίπτωση, η μεταγραφή τους είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται από διάφορα στοιχεία DNA όπως ενισχυτές, υποκινητές και μονωτές, με αποτέλεσμα η έκφραση τους να εξειδικεύεται ως προς τον κυτταρικό τύπο αλλά και αναπτυξιακό στάδιο συντελώντας στην ρύθμιση πολλών λειτουργικών διεργασιών, όπως διαφοροποίηση και κυτταρική ανάπτυξη (14). Σε πολύπλοκες νόσους όπως ο καρκίνος, η έκφραση τους συχνά είναι καρκινοειδική με παρουσία σε σωματικά υγρά ασθενών και γι' αυτό έχουν προταθεί ως εξειδικευμένοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες. Ως προς την φορά μεταγραφής αυτή μπορεί να προέρχεται από τον νοηματικό ή αντινοηματικό κλώνο εντός κωδικοποιητικών γονιδίων ή ακόμα και από ιντρονικές αλληλουχίες, όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 3**. Έχουν γενικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ οι αλληλουχίες των εξονίων τους παρουσιάζουν χαμηλή συντήρηση μεταξύ των ειδών (14).



Εικόνα 3: Επισκόπηση της βιογένεσης των lncRNAs (13).

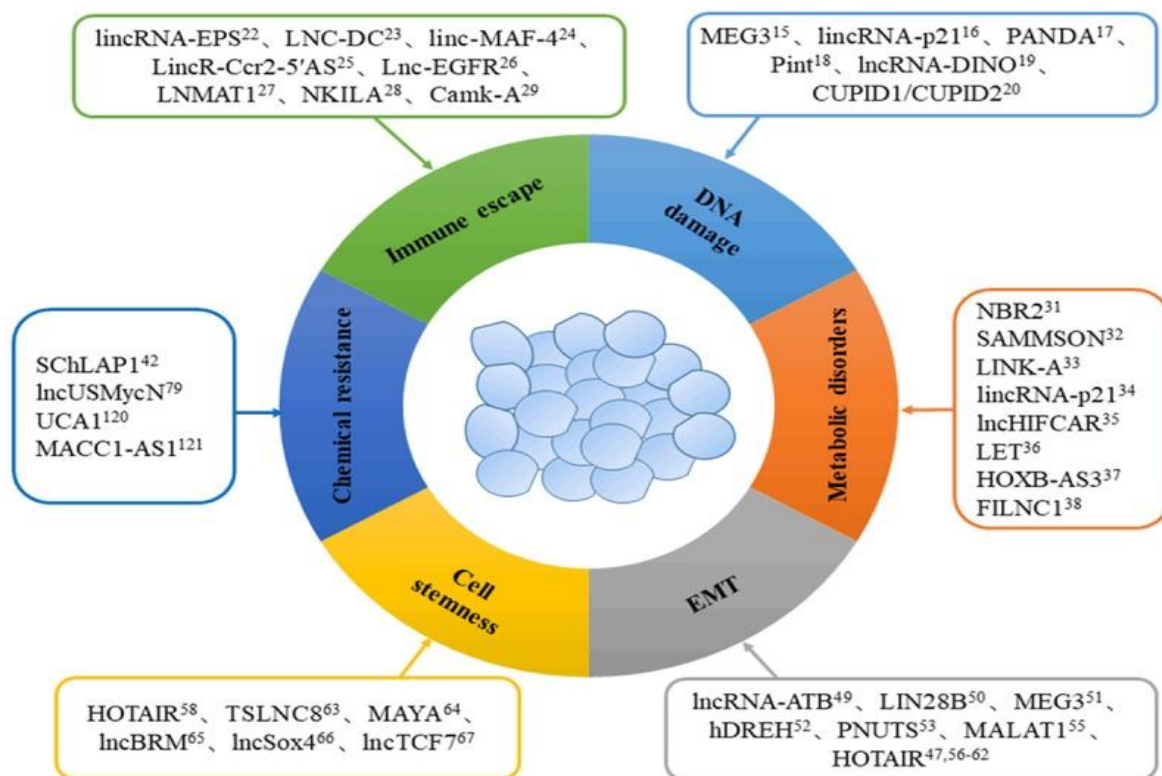
Σε γενικές γραμμές, οι τέσσερις μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNAs αφορούν τις λειτουργίες τους ως σηματοδοτικά μόρια, μόρια-οδηγοί, «δολώματα» και ικριώματα. Κατά τον πρώτο μηχανισμό δράσης, η μεταγραφική ρύθμιση στην οποία συμβάλλουν τα lncRNAs, τα οποία λειτουργούν ως σήματα, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τα αναπτυξιακά στάδια, ο επαναπρογραμματισμός των κυττάρων και η κατάσταση του κυττάρου που διαμορφώνεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και μπορεί να είναι συνδεδεμένα σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Ως οδηγοί, τα lncRNAs συνδέονται με πρωτεΐνες και τις κατευθύνουν σε συγκεκριμένες τοποθεσίες ή καθοδηγούν miRNAs σε mRNA-στόχους. Δρώντας ως «μιμητές» ενδογενών στόχων που συνδέονται με ενδιάμεσες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, RNA, μόρια DNA, τα lncRNAs μπορούν επίσης να ρυθμίσουν τη μεταγραφή και αποτρέποντας την πρόσβαση αυτών των μορίων στις κανονικές θέσεις-στόχους τους (15). Σχετικά με την δράση τους ως ικριώματα, πολλά lncRNAs χρησιμεύουν ως δομικά στηρίγματα στα οποία συνδέονται πρωτεΐνες-τελεστές και μόρια DNA/RNA για να σχηματίσουν ένα λειτουργικό σύμπλεγμα και στη συνέχεια κατευθύνονται στον κατάλληλο κυτταρικό εντοπισμό του συμπλόκου ώστε αυτό να επιτελέσει τη λειτουργία του (16).

Αρκετά lncRNA ελέγχουν την έκφραση γειτονικών τους γονιδίων επηρεάζοντας την διαμόρφωση της χρωματίνης καθώς και λειτουργίες που σχετίζονται με αυτήν, όπως η αντιγραφή του DNA ή η απόκριση στη βλάβη και επιδιόρθωση του DNA. Άλλα lncRNA επιδρούν ρυθμιστικά σε απομακρυσμένους γενετικούς τόπους. Οι λειτουργίες τους μπορεί να είναι δομικής ή/και ρυθμιστικής φύσης και περιλαμβάνουν διαφορετικά στάδια της ζωής του mRNA, συμπεριλαμβανομένου του ματίσματος, της μετάφρασης, καθώς και των οδών σηματοδότησης. Κατά συνέπεια, τα lncRNA επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες ενώ η αλλαγή της έκφρασής τους συχνά αποτελεί αφετηρία αρκετών ασθενειών (17).

1.2.1 Ρόλος των lncRNA στην εξέλιξη και την διάγνωση του καρκίνου

Στον γαστρικό καρκίνο, τα lncRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την ανάπτυξή του μέσω μιας ποικιλίας διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της επεξεργασίας RNA, της μετάφρασης, της σταθερότητας του mRNA, των επιγενετικών τροποποιήσεων και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Γενικότερα, τα lncRNA έχουν συσχετιστεί και με την αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την μετάσταση, λειτουργώντας είτε ως ογκοκαταστολείς είτε ως ογκογονίδια στην ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου ενώ συμβάλλουν στην απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανοσοαπόκριση μέσω των ρυθμιστικών τους δράσεων στο DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες, όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 4**. Παραδείγματος χάριν, έχει τεκμηριωθεί ότι πολλά lncRNAs εμπλέκονται και στο φαινόμενο της λεγόμενης ανοσοδιαφυγής, η

οποία συμβάλλει στην εξέλιξη της ογκογένεσης, ρυθμίζοντας τη λειτουργία των ανοσοκυττάρων. Για παράδειγμα, ένα lncRNA που αλληλεπιδρά με τον παράγοντα NF-κΒ (NKILA) μπορεί να ενισχύει την ευαισθησία των Τ-κυττάρων στον επαγόμενο ενεργοποιημένο κυτταρικό θάνατο, μέσω αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-κΒ(12) .

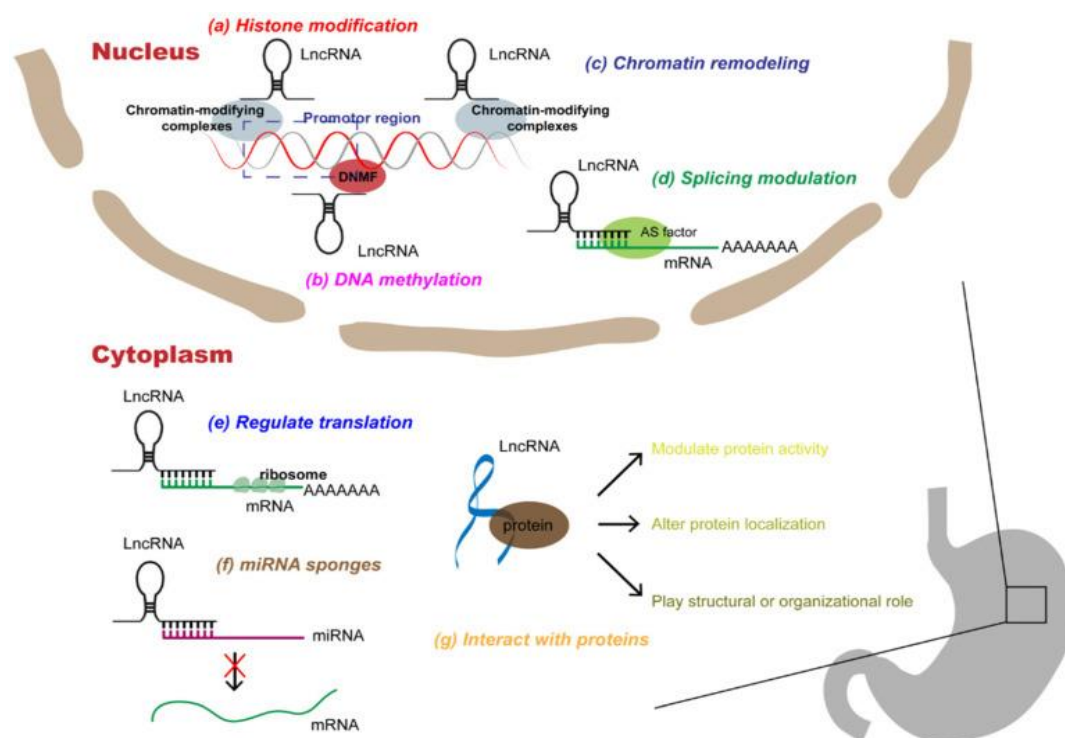


Εικόνα 4: Ρόλος των lncRNAs στην ογκογένεση και την μετάσταση (ανοσοδιαφυγή, EMT, μεταβολικές διαταραχές, χημική αντίσταση, βλάβες στο DNA (12).

Τα lncRNAs έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε κυτταρικές διεργασίες που επηρεάζονται στον γαστρικό καρκίνο. Όπως προαναφέρθηκε, οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNAs στον γαστρικό καρκίνο υπόκεινται σε δεδομένη κατηγοριοποίηση, ενώ πολλοί από αυτούς αφορούν στην απορρύθμιση της έκφρασης των ίδιων των lncRNAs (18). Πιο συγκεκριμένα, πρώτον υπάρχουν lncRNAs που ανταγωνίζονται microRNAs (miRNAs) για την δέσμευση των αντίστοιχων mRNA στόχων. Ορισμένα από αυτά αυξορρυθμίζονται στον γαστρικό καρκίνο και σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Το lncRNA H19 ανταγωνίζεται το miR-675 για σύνδεση και αποτροπή της έκφρασης ογκοκατασταλτικού γονιδίου με αποτέλεσμα την προώθηση της εμφάνισης της ασθένειας (19). Δεύτερον, lncRNAs επηρεάζουν την σταθερότητα των mRNAs. Για παράδειγμα, το TINCR υπερ-εκφράζεται σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με κύτταρα φυσιολογικού ιστού και το γεγονός αυτό περιορίζει την δυνατότητα πρόγνωσης της νόσου. Επιδρά στην σταθερότητα του mRNA της πρωτεΐνης KLF2 που ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (20). Τρίτον, η απορρύθμιση των lncRNAs στον γαστρικό καρκίνο μπορεί να οφείλεται στην δυσλειτουργία και την μη φυσιολογική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων.

Δεσμευόμενοι στον υποκινητή καθοδικών lncRNAs, παράγοντες, όπως ο p53, μπορεί να οδηγήσουν σε ανώμαλη έκφραση lncRNAs στον γαστρικό καρκίνο (21).

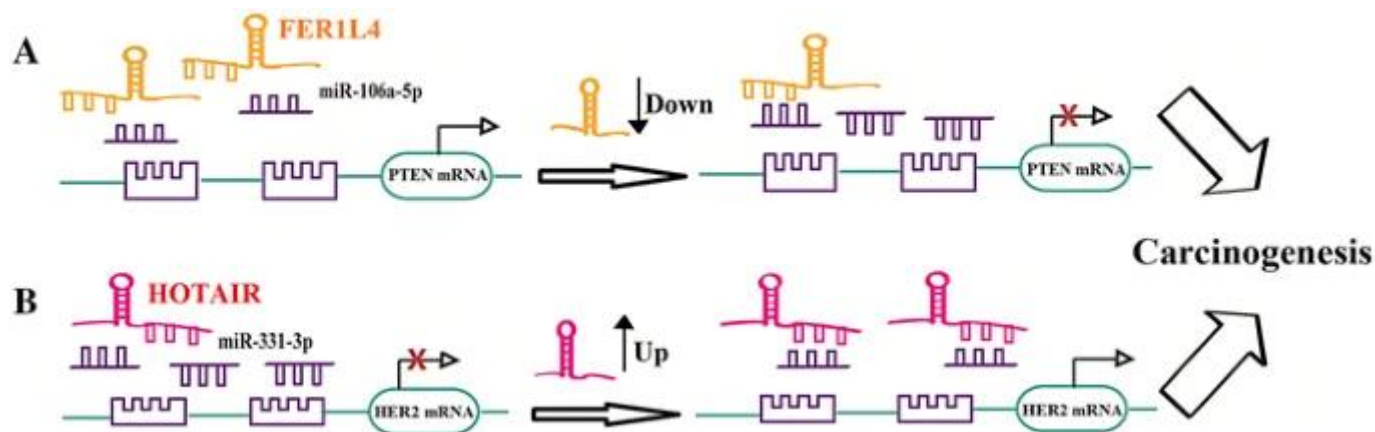
Όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 5**, οι πολύ-λειτουργικοί ρόλοι των lncRNAs που αφορούν στην εμφάνιση γαστρικού καρκίνου, σχετίζονται κατά κύριο λόγο με την επιγενετική τροποποίηση των ιστονών και τις αναδιατάξεις της χρωματίνης, με την προσαρμογή του εναλλακτικού ματίσματος μέσω καθοδήγησης των σχετικών ενζύμων σε συγκεκριμένες περιοχές ματίσματος λόγω συμπληρωματικότητας των βάσεων του lncRNA με το αντίστοιχο mRNA, την ρύθμιση της μετάφρασης και την ανταγωνιστική σχέση που έχουν με τα miRNAs στο κυτταρόπλασμα (22).



Εικόνα 5: Πολυ-λειτουργικοί ρόλοι των lncRNAs στον γαστρικό καρκίνο (22).

Παραδείγματα μελετημένων lncRNA γονιδίων που έχουν άμεση συσχέτιση με γαστρικό καρκίνο είναι τα γονίδια BOK-AS1, FAM215A και FEZF1-AS1, που αυξορρυθμίζονται και μπορεί να λειτουργούν σαν ογκογόνοι παράγοντες (23), το lncRNA APTR που μειορρυθμίζεται στον γαστρικό καρκίνο (24), καθώς και τα γονίδια HOTAIR, H19, PTENP1 και GAS5 που συμμετέχουν στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου μετά από μόλυνση από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (25). Πιο συγκεκριμένα, το αντινοσηματικό μετάγραφο RNA Hox (HOTAIR) προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αναστέλλει την απόπτωση. Τα επίπεδα του HOTAIR στο πλάσμα του αίματος είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση HOTAIR έχει συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια όγκου και μετάσταση (11). Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται ο μηχανισμός δράσης του HOTAIR (και του lncRNA FER1L4), σύμφωνα με τον οποίο το συγκεκριμένο lncRNA παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση miRNA με

ογκογονίδιο, με αποτέλεσμα την θετική ρύθμιση του συγκεκριμένου γονιδίου και εν τέλει την προώθηση της καρκινογένεσης.



Εικόνα 6: Δύο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα lncRNAs (*FER1L4*, *HOTAIR*) που δρουν ως ανταγωνιστικά ενδογενή RNA στον γαστρικό καρκίνο (26).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα lncRNA που συσχετίζεται με κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με γαστρικό καρκίνο αποτελεί το LINC00152, το οποίο εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα στο γαστρικό υγρό ασθενών έναντι υγιών ατόμων (26). Η ιστοειδικότητα των lncRNAs και η ικανότητα ανίχνευσής τους στα σωματικά υγρά, όπως στα κυκλοφορούντα εξωσώματα, στον ορό, στο πλάσμα και στα ούρα, τα καθιστούν εξαιρετικά σημαντικούς μη επεμβατικούς βιοδείκτες. Μπορεί, επίσης, να ανιχνεύονται στο γαστρικό υγρό των ασθενών με γαστρικό καρκίνο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το lncRNA ZNFX1-AS1 το οποίο εκφράζεται διαφορετικά στο πλάσμα των ασθενών με γαστρικό καρκίνο συγκριτικά με δείγματα ελέγχου υγιών ατόμων, και συγκεκριμένα εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο περιφερικό αίμα των ασθενών με γαστρικό καρκίνο, αφού απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μέσω εξωσωμάτων (18).

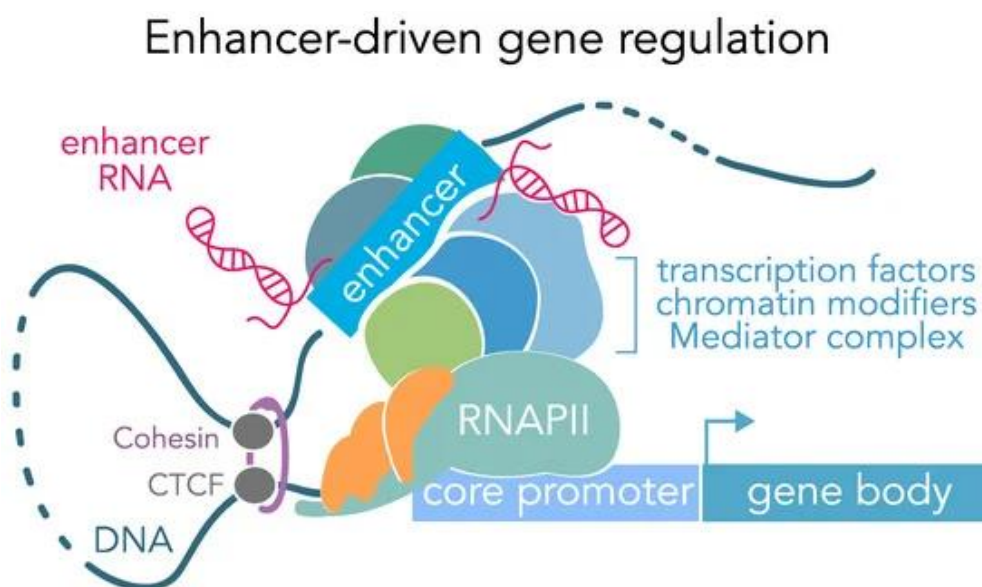
Συνεπώς, δεδομένης της καρκινοειδικής τους έκφρασης αλλά και της διαγνωστικής σημασίας τους στην νόσο, τα lncRNA έχουν πλέον μπει στο στόχαστρο μελετών προκειμένου να μελετηθούν και τα ρυθμιστικά τους στοιχεία που εξειδικεύουν την παρουσία τους στην νεοπλασία.

1.3 Ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδιώματος

Η απορρύθμιση των ρυθμιστικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης σε ένα κύτταρο είναι χαρακτηριστικό του καρκίνου, ενώ συχνά παρατηρούμενη έκτοπη γονιδιακή έκφραση στον καρκίνο μπορεί να πυροδοτηθεί από γεγονότα απορρύθμισης σε οποιοδήποτε ρυθμιστικό επίπεδο (μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό). Παρόλο που η πλειονότητα των μελετών έχει επικεντρωθεί στις μεταλλάξεις που βρίσκονται σε περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι περισσότερες παραλλαγές που σχετίζονται με επαγωγή της νόσου εντοπίζονται στο μη κωδικοποιητικό τμήμα του

ανθρώπινου γονιδιώματος, όπου τα ρυθμιστικά στοιχεία (ενισχυτές και υποκινητές) λειτουργούν ως γενετικοί διακόπτες για να διασφαλιστεί ότι η γονιδιακή έκφραση λαμβάνει χώρα την σωστή στιγμή και με την κατάλληλη ένταση σε συγκεκριμένα κύτταρα εντός του ιστού (27).

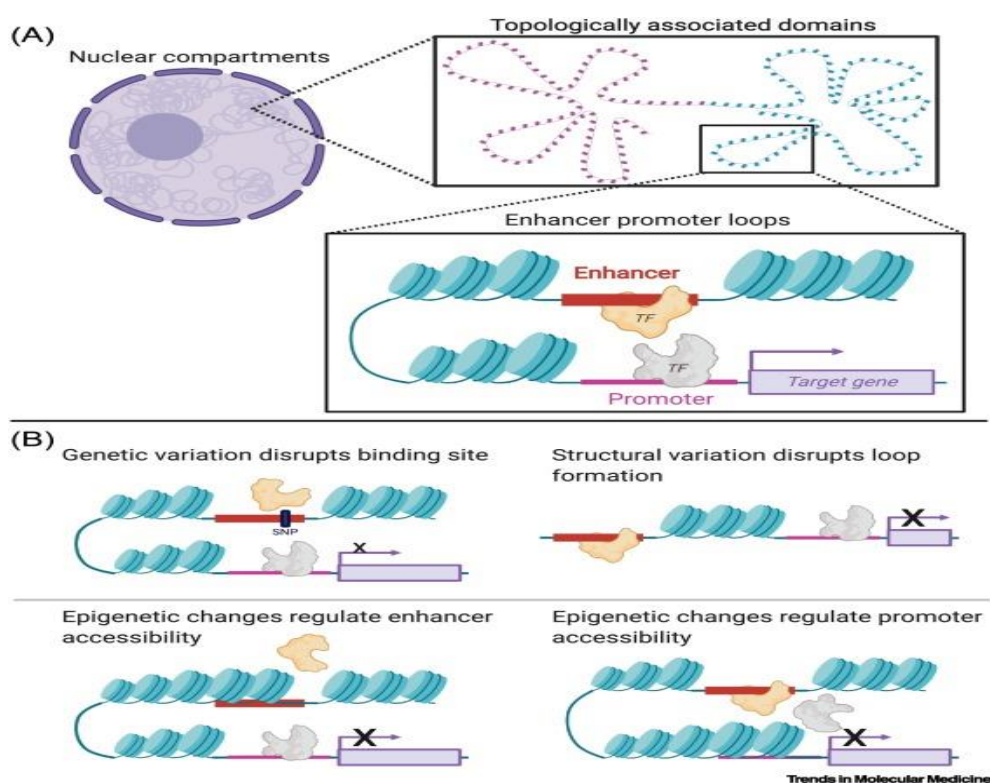
Σε αντίθεση με τους υποκινητές γονιδίων, οι ενισχυτές μπορούν να ρυθμίσουν την μεταγραφή σε μεγάλες αποστάσεις, στρατολογώντας το σύμπλοκο της μεταγραφής σε απομακρυσμένους υποκινητές. Χαρακτηρίζονται από ανοιχτή δομή χρωματίνης, με υπερευαίσθησία στην επίδραση DNAάσης, ειδικές επιγενετικές τροποποιήσεις, καθορισμένες μοριακές αλληλεπιδράσεις, ενώ μπορεί να εντοπίζονται ανοδικά ή καθοδικά ενός γονιδίου το οποίο ρυθμίζουν. Συνεργάζονται άμεσα με τον αντίστοιχο υποκινητή ενός γονιδίου και αυτή η αλληλεπίδραση επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού βρόχου χρωματίνης, ο οποίος επιτρέπει την άμεση προσέγγιση μεταξύ ενισχυτή και υποκινητή γεφυρώνοντας την ενδιάμεση απόσταση μεταξύ τους. Μεταγραφικοί μονωτές, με κυριότερο τον CTCF, σταθεροποιούν τον βρόχο αλληλεπίδρασης παρουσία του πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος του μεσολαβητή (mediator) (28), (29). Τα παραπάνω, σχετικά με την δομή του χρωμοσωμικού βρόχου ενισχυτή-υποκινητή, την μεσολάβηση του παράγοντα CTCF και συνολικά το προ-εναρκτήριο μεταγραφικό σύμπλοκο που σχηματίζεται, απεικονίζονται στην **Εικόνα 7**.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του χρωμοσωμικού βρόχου ενισχυτή – υποκινητή με την μεσολάβηση του παράγοντα CTCF και της πρωτεΐνης κοεζίνης (29).

Σχετικά με τις αλληλουχίες και την επιγενετική βάση ενός ενισχυτή, επισημαίνεται ότι η ανοιχτή δομή χρωματίνης στην περιοχή των νουκλεοσωμάτων γύρω από τον ενισχυτή (και τον υποκινητή) έχει το επιγενετικό «σημάδι» $H_3K_{27}Ac$, δηλαδή είναι ακετυλιωμένη η λυσίνη (K) στην αμινοξική θέση 27 της ιστόνης 3 (H_3), ενώ παράλληλα, η χαρακτηριστική για έναν ενισχυτή επιγενετική επισήμανση είναι $H_3K_4me_1$, δηλαδή είναι μονο-μεθυλιωμένη η λυσίνη στην αμινοξική θέση 4 της ιστόνης 3. Όταν υπάρχει ανοιχτή δομή χρωματίνης είναι δυνατή η στρατολόγηση

μεταγραφικών παραγόντων, συν-ενεργοποιητών και αναδιαμορφωτών χρωματίνης στην περιοχή του ενισχυτή. Αξίζει να σημειωθεί ότι η λειτουργία του ενισχυτή μπορεί να επηρεαστεί από την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ή τροποποιήσεις του DNA ως επιγενετικές αλλαγές, π.χ. λόγω διαφορεικής μεθυλίωσης των ιστονών, που μπορεί να περιορίζουν και την προσβασιμότητα στον σχετιζόμενο υποκινητή (30), όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 8**. Παράλληλα, αξίζει να σημειωθεί ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις στις γονιδιωματικές περιοχές ενισχυτών και υποκινητών που επηρεάζουν την ενεργότητα αυτών των ρυθμιστικών στοιχείων, όπως η περίπτωση της μεθυλίωσης του DNA στις CpG νησίδες, σχετίζονται με την ρύθμιση της έκφρασης των αντίστοιχων lncRNAs. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι οι υποκινητές των lncRNAs χαρακτηρίζονται από χαμηλά ποσοστά CpG νησίδων και αυτό έχει επίδραση στα ποσοστά έκφρασής τους (31).



Εικόνα 8: Αναπαράσταση βρόχου ενισχυτή και τρόποι διατάραξης της συγκεκριμένης δομής (27).

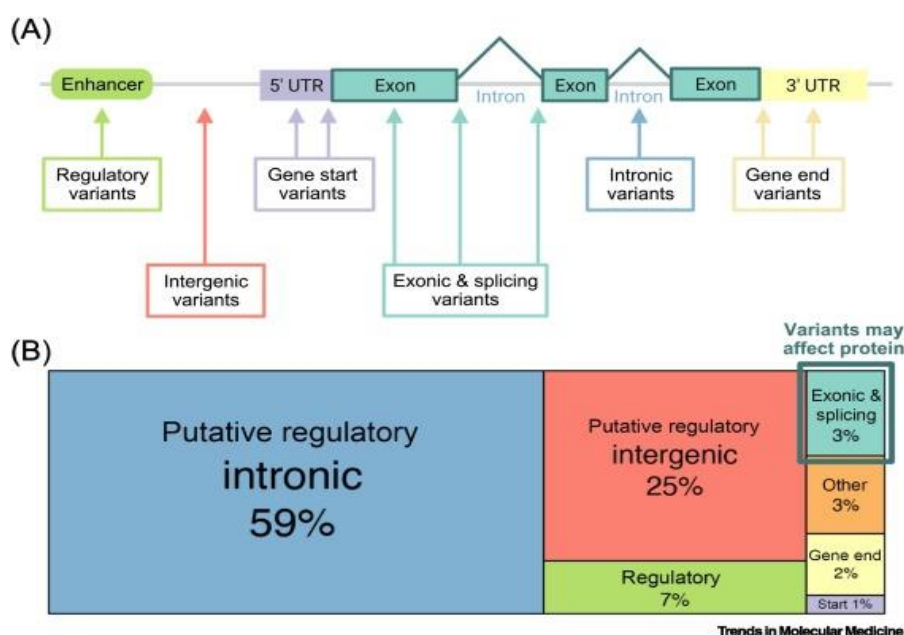
Μεταξύ των συμβάντων τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την λειτουργικότητα και την αποτελεσματικότητα ενός ενισχυτή συμπεριλαμβάνεται και η περίπτωση των μονονουλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs). Με βάση την ανάλυση GWAS, πολλά SNPs εντός ενισχυτών – συχνά ειδικών για συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο – έχουν συσχετιστεί με ογκογένεση και δυσπλασίες, μιας και αλλαγές στην αλληλουχία του ενισχυτή συνδέονται άμεσα με επιρροή της γονιδιακής έκφρασης. Βέβαια τα φαινόμενα νόσου δεν ενισχύονται αποκλειστικά από μία παραλλαγή, αλλά από έναν συνδυασμό πολλαπλών γενετικών παραλλαγών σε ενισχυτές (27) .

Η συνεργασία υποκινητή και ενισχυτή και ο ρόλος της στις αλλαγές της γονιδιακής έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση. Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στον καρκίνο συχνά

τροποποιούν τους ενισχυτές. Αυτή η εσφαλμένη ρύθμιση μπορεί να προκύψει από ποικίλους μηχανισμούς, όπως η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων ή των επιγενετικών ρυθμιστών που ελέγχουν τη δραστηριότητα του ενισχυτή, ή μπορεί να προκληθεί από μεταλλάξεις εντός της αλληλουχίας του ενισχυτή που μεταβάλλουν τη δραστηριότητα του ή την εξειδίκευση του ως προς το γονίδιο-στόχο (32). Ακριβώς επειδή οι αλλαγές στις ρυθμιστικές αλληλουχίες των ενισχυτών μπορεί να είναι πηγή καρκινογένεσης, και δεδομένης της καρκινοειδικής έκφρασης των lncRNA, κρίνεται σημαντική η μελέτη του αντίκτυπου αλλαγών SNPs και κρίσιμων περιοχών ενισχυτών π.χ. μέσω αποσιώπησης ή διαγραφής ενδογενών στοιχείων ενισχυτή προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση που θα έχουν αυτές οι τροποποιήσεις στην γονιδιακή έκφραση lncRNA γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη του καρκίνου (28).

1.4 Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs)

Γενικότερα, η αποκωδικοποίηση της λειτουργίας των SNP αποτελεί ιδιαίτερα ξεχωριστή πρόκληση ειδικότερα για περιπτώσεις γονιδίων και ρυθμιστικών τους περιοχών που μπορεί να αποτελούν κλινικούς στόχους θεραπευτικών προσεγγίσεων. Περίπου το 90% των SNP που σχετίζονται με ασθένειες και προσδιορίζονται από μελέτες ανισορροπίας σύνδεσης σε όλο το γονιδίωμα (GWAS) εδρεύουν σε μη κωδικοποιητικές περιοχές. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι SNP σε μη-κωδικές περιοχές του γονιδιώματος εντός πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση απομακρυσμένων γονιδίων μέσω μεγάλης εμβέλειας αλληλεπιδράσεων στο γονιδίωμα, γεγονός που ενισχύει τις υποθέσεις ύπαρξης πολύπλοκων ρυθμιστικών μηχανισμών μεταξύ των SNP και της γονιδιακής έκφρασης (27).



Εικόνα 8: Ενδεικτική ταξινόμηση SNPs με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα (ιντρονικά, μεσογονιδιακά, ρυθμιστικά, εξονικά, αρχής και τέλους γονιδίου κ.α. (27).

Πιο συγκεκριμένα, SNPs μπορεί να εντοπίζονται στην περιοχή ματίσματος, εντός ιντρονίου, στις 3΄ και 5΄ αμετάφραστες περιοχές γονιδίων, σε μεσογονιδιακά διαστήματα, σε ρυθμιστικές περιοχές δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων σε ενισχυτές και υποκινητές, αλλά και σε αλληλουχίες εξονίων. Ενώ μια μειοψηφία από αυτές τις παραλλαγές αφορά κωδικοποιητικές περιοχές, η πλειονότητα (91% όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8**) εντοπίζεται σε μη κωδικοποιητικές περιοχές μακριά από υποκινητές, υποδηλώνοντας έναν ρυθμιστικό ρόλο με τη μεσολάβηση του ενισχυτή.

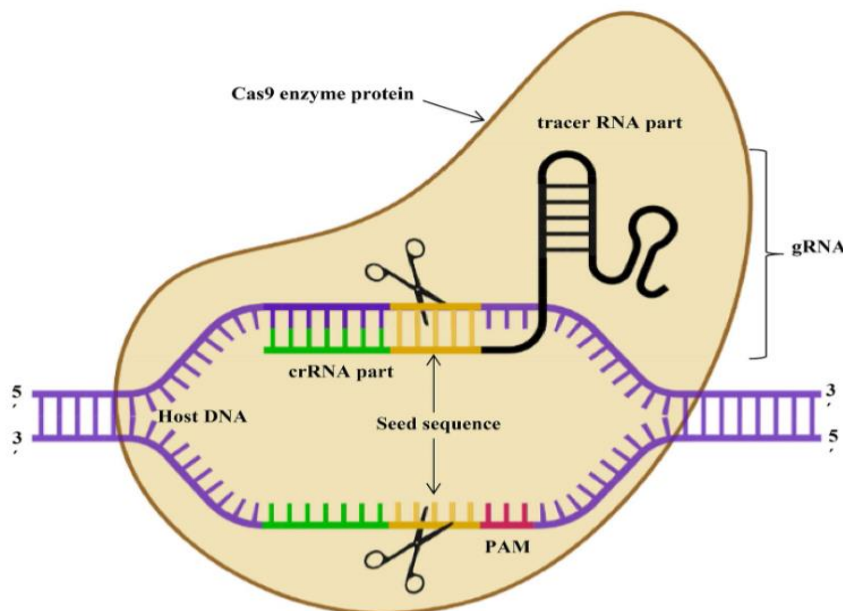
Τα SNPs γενικότερα επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση και απορρύθμιση και συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου, αλλά και στην πρόγνωση (18). Συγκεκριμένη μελέτη δείχνει ότι οι ασθενείς με παρουσία του rs2839698 SNP είχαν σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας και σημαντικά αυξημένη επιβίωση. SNPs έχουν προσδιοριστεί και σε περιοχές lncRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα και έχουν συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το SNP rs920778 στο lncRNA HOTAIR που αποτελεί παράγοντα κινδύνου εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Μάλιστα, στην περίπτωση εντοπισμού του SNP rs3737589 στο γενετικό τόπο του lncRNA TP73-AS1 αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, ενώ ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός μπορεί να αποτελεί πιθανό ειδικό βιοδείκτη για την πρόγνωση επιβίωσης των ασθενών με γαστρικό καρκίνο (33). Εξαιτίας, λοιπόν, της σημαντικότητας τόσο των ρυθμιστικών στοιχείων όσο και των πολυμορφισμών σε γονιδιωματικές περιοχές, - μεταξύ των οποίων και τα lncRNAs- και της συμβολής αυτών στην εξέλιξη του καρκίνου κρίνεται απαραίτητη και η μελέτη και οι θεραπευτικές και διαγνωστικές προσεγγίσεις μέσω π.χ. συστημάτων επεξεργασίας του γονιδιώματος, όπως είναι το σύστημα CRISPR/Cas9.

1.5 Σύστημα CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) έχει χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία διαφόρων περιοχών του γονιδιώματος με στόχο την καταστολή ή την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων ή την επισήμανση συγκεκριμένων τόπων στο γονιδίωμα ζωντανών κυττάρων ή οργανισμών, προκειμένου να διερευνηθούν οι μηχανισμοί ανάπτυξης, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η συμπεριφορά των ζώων υπό τις διαμορφωμένες από το σύστημα συνθήκες. Δηλαδή, το σύστημα χρησιμοποιείται για την στοχευμένη τροποποίηση όχι μόνο κωδικοποιητικών γονιδίων αλλά και άλλων γενετικών τόπων, όπως ρυθμιστικών αλληλουχιών ενισχυτών ή υποκινητών (34).

Το CRISPR-Cas σύστημα προσδιορίστηκε αρχικά ως ένας ενδογενής μηχανισμός προσαρμοστικής ανοσίας σε βακτήρια και αρχαία που ενεργοποιείται κατά την εισβολή ξένου μολυσματικού DNA (κυρίως ιικού, όπως στην περίπτωση εισόδου βακτηριοφάγου). Στην φύση, μια

μεταβλητή αλληλουχία οδηγός που ονομάζεται crRNA μαζί με μια δευτέρα, σταθερή αλληλουχία RNA που παίζει δομικό ρόλο και ονομάζεται tracrRNA συντήκονται για να σχηματίσουν ένα small-guideRNA (sgRNA), το οποίο κατευθύνει την ενδονουκλεάση Cas9 στην επιθυμητή θέση και το ένζυμο τελικά καταλύει αποτελεσματικά τη διάσπαση και των δύο κλώνων DNA (δίκλωνη ρήξη), όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 9** (35).



Εικόνα 9: Το σύστημα CRISPR/Cas9: σύμπλοκο της Cas9 με το gRNA (tracrRNA+crRNA) – παρουσία αλληλουχίας PAM στην γονιδιωματική περιοχή του ξενιστή (36).

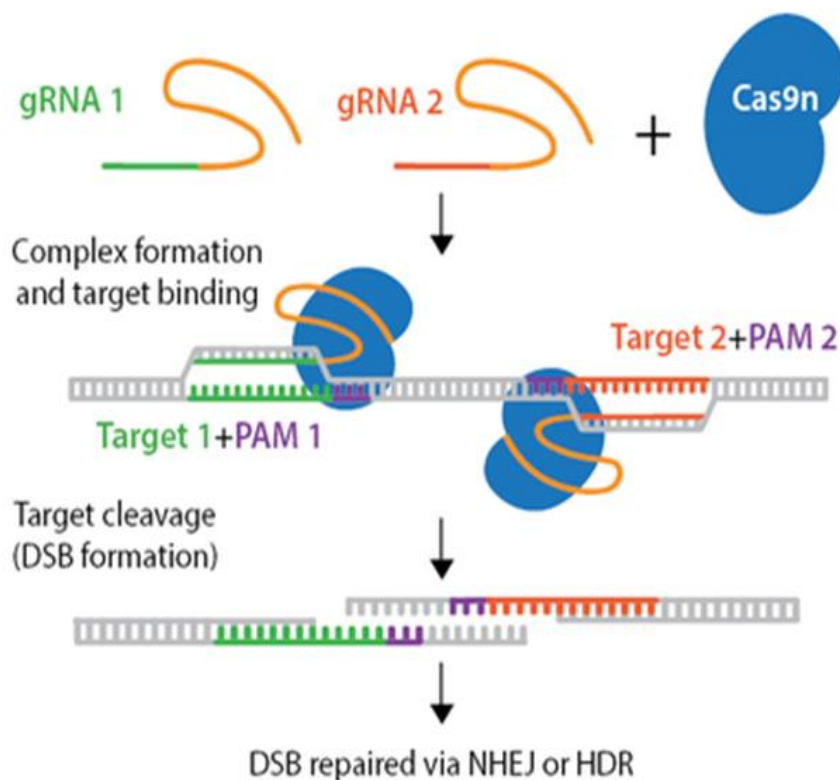
Όσον αφορά στον καρκίνο, πρόκειται για μια πολυπαραγοντική ασθένεια της οποίας χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η σταδιακή συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων που οδηγεί τελικά σε ογκογένεση και στην δημιουργία ενός διακριτού περιβάλλοντος στα καρκινικά κύτταρα του όγκου ή μεμονωμένων ατόμων. Η επεξεργασία του γονιδιώματος με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δίνει την δυνατότητα στόχευσης των γονιδιωματικών περιοχών στις οποίες εντοπίζονται μεταλλάξεις για την επιλεκτική προσέγγιση κακοηθών κυττάρων (37). Σημειακές αλλαγές σε γονίδια όπως το KRAS και το EGFR, τα οποία διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην καρκινογένεση, υπόκεινται σε εναλλακτικές μορφές του συστήματος CRISPR/Cas9 με στόχο την τροποποίηση των επίμαχων βάσεων και κατ' επέκταση τον επαναπρογραμματισμό των συγκεκριμένων γονιδίων για να μην συμμετέχουν σε γεγονότα ογκογένεσης (38), (39).

Παράλληλα, υπάρχουν διάφοροι τρόποι προσέγγισης και των lncRNAs στην θεραπεία του καρκίνου, μεταξύ των οποίων και το σύστημα CRISPR/Cas9 (40). Πιο συγκεκριμένα, το CRISPR/Cas9 μπορεί να αποσιωπήσει με επιτυχία τη μεταγραφή χρωμοσωματικών περιοχών που μεταγράφουν lncRNA, στοχεύοντας τον υποκινητή του γονιδίου με σκοπό την μεταγραφική σίγηση. Μελέτες έχουν βρει ότι περισσότεροι από 16.000 υποκινητές lncRNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα θα μπορούσαν να στοχευθούν με guideRNAs που σχεδιάζονται κατάλληλα για την εφαρμογή του

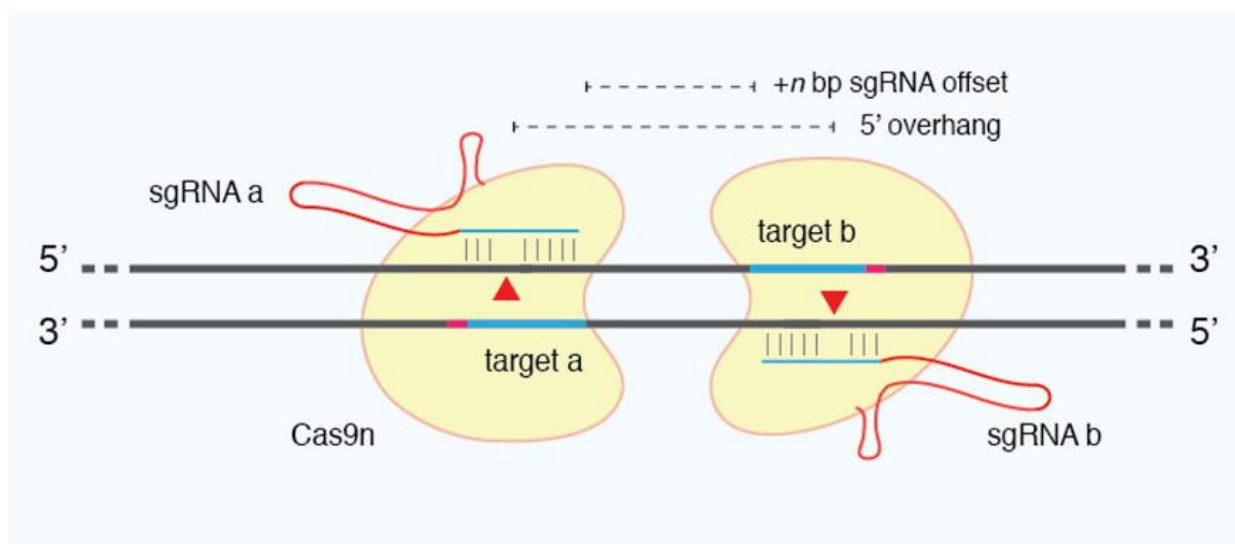
συστήματος CRISPR/Cas9 σε αυτούς (41). Αν και το CRISPR/Cas9 έχει ευρεία προσαρμοστικότητα και εξειδίκευση στόχου ως τεχνική επεξεργασίας του γονιδιώματος θεωρητικά, γεγονότα διάσπασης εκτός στόχου (off-target effects) είναι δυνατόν να υφίστανται σε πρακτικές εφαρμογές που περιλαμβάνουν την στόχευση καρκινοειδικών lncRNA και γενικότερα άλλων περιοχών του γονιδιώματος (42). Για αυτόν τον λόγο κρίνεται απαραίτητη η μελέτη τέτοιων προσεγγίσεων, ώστε να διερευνηθεί η χρήση του συστήματος CRISPR για στοχευμένη αντι-καρκινική θεραπεία .

1.5.1 CRISPR nickase Cas9

Για να περιοριστεί η πιθανότητα μεταλλαξογένεσης εκτός του επιλεγμένου DNA στόχου (off-target effects) από την Cas9 αγρίου τύπου και να ενισχυθεί η εξειδίκευση στόχευσης, η κατευθυνόμενη τροποποίηση των καταλυτικών περιοχών της Cas9 οδήγησε στην παραγωγή ενζύμων «νικάσης» (nCas9) ικανών να προκαλέσουν μονόκλωνες ρήξεις αντί για δίκλωνες. Από την δράση της νικάσης δεν προκαλούνται προσθήκες ή αφαιρέσεις τμημάτων DNA στην υπό επεξεργασία περιοχή του γονιδιώματος, δεδομένου ότι οι μονόκλωνες εγκοπές επιδιορθώνονται γενικά με υψηλή πιστότητα σε ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω της δράσης λιγασών. Συνεπώς μια νικάση Cas9 μπορεί να αξιοποιηθεί με σκοπό την υψηλής πιστότητας εξειδίκευση της επεξεργασίας του γονιδιώματος, που θα ενεργοποιεί την επιδιόρθωση ρήξεων στο DNA μέσω ομόλογου (HDR) ή μη ομόλογου ανασυνδυασμού (NHEJ) (43).



Εικόνα 10: Χρήση ενζύμου νικάσης nCas9 για βελτιστοποίηση του συστήματος CRISPR (<https://www.addgene.org/guides/crispr/>).



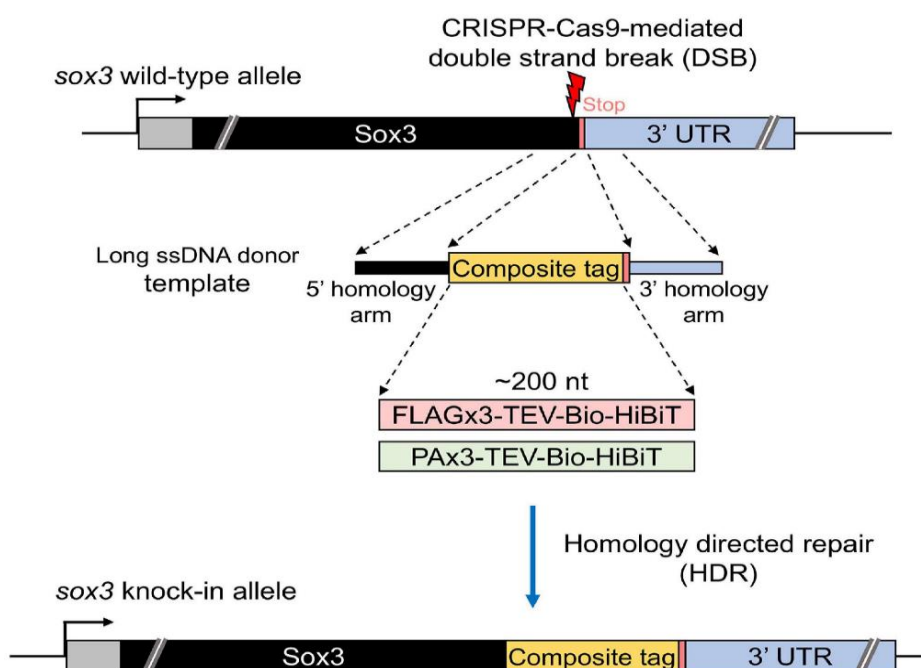
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση δίκλωνων ρήξεων σε γονιδιωματικό DNA με την χρήση ζεύγους sgRNAs το οποίο καθοδηγεί την νικάση Cas9 D10A (nCas9) (44).

Σε εφαρμογές που περιλαμβάνουν την χρήση νικάσης, ένα ζεύγος κατάλληλα σχεδιασμένων sgRNA σε σύμπλοκο με την nCas9 μπορεί να κόψει και τους δύο κλώνους ταυτόχρονα, όπως φαίνεται και στις εικόνες **Εικόνα 10** και **Εικόνα 11** στις οποίες παρουσιάζονται δύο ένζυμα nCas9 να κατευθύνονται από ένα ζεύγος sgRNAs, τα μέλη του οποίου στοχεύουν σε διαφορετικό κλώνο της περιοχής-στόχου το καθένα, με αποτέλεσμα την δίκλωνη ρήξη συνολικά, με ελαχιστοποιημένη την επίδραση - μεταλλαξογένεση εκτός στόχου (off-target effect). Δηλαδή, η χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ενισχύει την εξειδίκευση στόχευσης στις επιθυμητές περιοχές του γονιδιωματικού DNA. Επιπλέον, οι δίκλωνες ρήξεις μπορούν να διεγείρουν την κατευθυνόμενη από ομολογία επιδιόρθωση (HDR – Homologous DNA Repair) το σύστημα εφαρμόζεται με παράλληλη, εισαγωγή μονόκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου (ssODN) ως οδηγό – πρότυπο επιδιόρθωσης HDR που λειτουργεί ως καθοδηγητής της επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό, λόγω ομολογίας του ολιγονουκλεοτιδίου με την υπό επιδιόρθωση αλληλουχία. Σημειώνεται ότι όταν η νικάση Cas9 – D10A εκφράζεται παράλληλα με δύο gRNA που στοχεύουν σε αντίθετους κλώνους στο DNA και σε κοντινή απόσταση εντός αυτού, συνήθως δημιουργείται δίκλωνη ρήξη, ενώ στην περίπτωση χρήσης μεμονωμένου gRNA το σύστημα προκαλεί μονόκλωνη ρήξη που επιδιορθώνεται με πιστότητα (45). Συμπερασματικά, η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω αποτελεί απόδειξη της αυξημένης αξιοπιστίας όσον αφορά την ενίσχυση των πιθανοτήτων επιτυχούς επεξεργασίας του γονιδιώματος με την χρήση του συστήματος CRISPR/nCas9 (44).

1.5.2 CRISPR/Cas9 εφαρμογές

Οι στρατηγικές για γονιδιακή επιδιόρθωση ταξινομούνται γενικά σε εξαρτώμενες από ομολογία και ανεξάρτητες από ομολογία. Οι προσεγγίσεις επιδιόρθωσης που κατευθύνονται από ομολογία αλληλουχίας απαιτούν την παρουσία τόσο του συστήματος CRISPR/Cas9 όσο και ενός

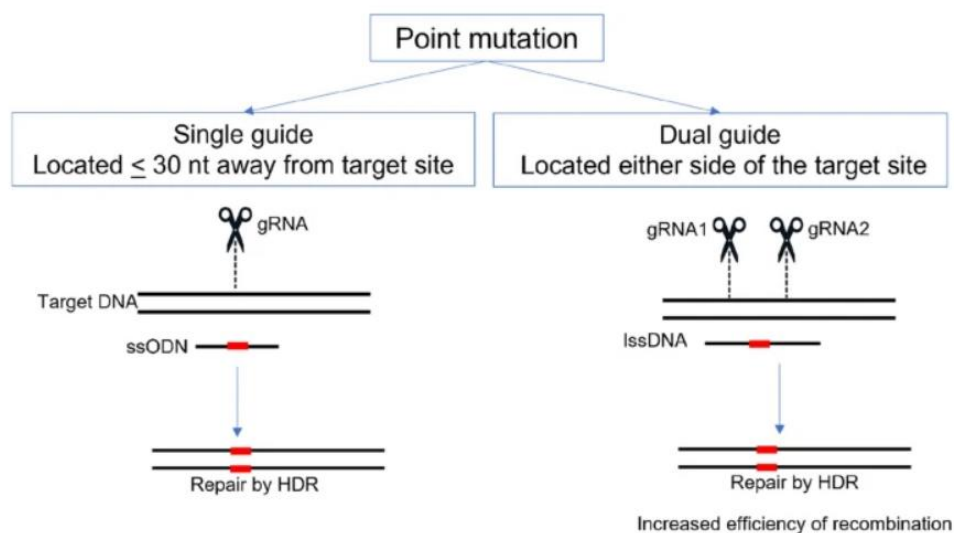
DNA-δότη που λειτουργεί ως πρότυπο επιδιόρθωσης. Η ssODN αλληλουχία DNA-δότη μπορεί να έχει τις εξής μορφές: δίκλωνο κυκλικό πλασμιακό DNA, μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, γραμμικά δίκλωνα τμήματα αντίδρασης PCR ή η ομόλογη αλληλουχία της άθικτης αδερφής χρωματίδας του χρωμοσώματος στο οποίο εφαρμόζεται το knock-in και εισάγονται στα κύτταρα με ιικούς ή μη-ιικούς φορείς. Συνήθως, ακολουθεί κατευθυνόμενη από ομολογία επιδιόρθωση του DNA (HDR). Για παράδειγμα, σε συγκεκριμένη μελέτη που εξετάστηκε, το ssODN περιλαμβάνει περιοχή αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού με βάση την οποία θα γίνει η επιδιόρθωση στην περιοχή των ρήξεων. Σε άλλες περιπτώσεις, η αλληλουχία του ssODN που εισάγεται μπορεί να διαφέρει μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο από την περιοχή που πρόκειται να επιδιορθωθεί και έτσι με επιτυχή επεξεργασία να γίνει εισαγωγή ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) (44). Αντίθετα, στην αντίστοιχη στρατηγική που είναι ανεξάρτητη από ομολογία, η γονιδιακή επιδιόρθωση επιτυγχάνεται με CRISPR/Cas9 απουσία δότη- DNA. Σε αυτή την περίπτωση, η επιρρεπής σε σφάλματα οδός επιδιόρθωσης μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ) χρησιμοποιείται συνήθως για την επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων που προκαλούνται από το CRISPR και για την ενσωμάτωση μιας αλληλουχίας στην προκείμενη γονιδιωματική περιοχή (45).



Εικόνα 12: Σχέδιο εφαρμογής σύνθετης ετικέτας knock-in μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Παρουσιάζεται και ο δότης-DNA ως μονόκλωνο long ssDNA (46).

Τώρα πιο συγκεκριμένα, για την γονιδιακή επιδιόρθωση μέσω ομολογίας με DNA οδηγό το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο CRISPR/Cas9 εισάγεται στα κύτταρα ταυτόχρονα με την αλληλουχία DNA-δότη (47). Υπάρχουν παραδείγματα που συνδυάζουν το σύστημα CRISPR/Cas9 με μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο ως DNA-δότη και συγκεκριμένα περιπτώσεις στις οποίες συνδυάζονται δύο guideRNAs – τα οποία κόβουν μια συγκεκριμένη περιοχή στο γονιδιωματικό DNA

– και μια μονόκλωνη ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία που συμβάλλει στην ένωση των κομμένων άκρων στην γονιδιωματική περιοχή που τροποποιείται από το σύστημα CRISPR (48). Στην **Εικόνα 12** απεικονίζεται ο σχεδιασμός μιας σύνθετης ετικέτας (tag) knock-in μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Η ετικέτα πλαισιώνεται από δύο βραχίονες ομολογίας (περιοχές εκατέρωθεν της ετικέτας, οι οποίες έχουν ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές της γονιδιωματικής θέσης-στόχου στο DNA). Οι βραχίονες ομολογίας πρακτικά, πρόκειται για τον μονόκλωνο ολιγονουκλεοτιδικό δότη-DNA, απλά στην συγκεκριμένη εφαρμογή η προς εισαγωγή αλληλουχία (tag) εντοπίζεται εντός του δότη. Ο δότης DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την επαγωγή του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλάβης DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR), ο οποίος έπεται της ρήξης που προκαλεί το σύστημα CRISPR/Cas9 (46).



Εικόνα 13: Δημιουργία σημειακής μετάλλαξης με knock-in προσέγγιση παρουσία ενός ή δύο sgRNAs (49).

Στην **Εικόνα 13**, παρουσιάζεται η δημιουργία στοχευμένης σημειακής μετάλλαξης σε γονιδιωματικό DNA-στόχο τόσο με την χρήση ενός guide-RNA (gRNA) όσο και με την χρήση διπλού gRNA παρουσία μονόκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου DNA, που προκαλούν την ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR) (49).

Συνδυάζοντας, λοιπόν, το περιεχόμενο όλων των προηγούμενων υποενοτήτων καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι είναι ιδιαίτερη σημαντική η μελέτη και η εύρεση μοριακών βιοδεικτών με στόχο την πρόγνωση και την διάγνωση της κρίσιμης για τον παγκόσμιο πληθυσμό νόσου του γαστρικού καρκίνου. Η έρευνα σχετικά με βιοδείκτες, όπως τα long non-coding RNAs, μπορεί να συντελεστεί σε πολλά επίπεδα μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται και ο έλεγχος ρυθμιστικών περιοχών του γονιδιώματος, όπως των ενισχυτών, που έχουν άμεση σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής τους, δίνοντας έμφαση σε αλλαγές στην αλληλουχία των δεδομένων περιοχών που ενδέχεται να

επηρεάσουν την γονιδιακή έκφραση και τις λειτουργίες των lncRNAs προδιαθέτοντας γενετικά τον πληθυσμό για εμφάνιση γαστρικού καρκίνου.

2 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Ο γαστρικός καρκίνος εξαιτίας του βαθμού επικινδυνότητάς του και των δυσκολιών που παρουσιάζει στην πρόγνωση και την διάγνωσή του χρήζει απαραίτητων ερευνητικών προσεγγίσεων με στόχο την εύρεση και τον προσδιορισμό ειδικών μοριακών βιοδεικτών που να επιτρέπουν την έγκαιρη διαπίστωση εμφάνισης της νόσου για την καλύτερη και πιο αποτελεσματική αντιμετώπισή της. Τα long non-coding RNAs, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην εμφάνιση, την ανάπτυξη και την εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου. Βέβαια, για να επιβεβαιωθεί και να εξακριβωθεί η συγκεκριμένη ιδιότητα ορισμένων lncRNAs χρειάζεται να μελετηθούν περαιτέρω οι μηχανισμοί ρύθμισης των επιπέδων τους, ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζεται η έκφραση γονιδίων - σχετιζόμενων με τον γαστρικό καρκίνο - που ελέγχεται από τα σχετικά lncRNAs, και γενικότερα, η λειτουργία των lncRNAs και των ρυθμιστικών τους στοιχείων.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας αποτελεί η μελέτη του ενισχυτή του lncRNA RECUR1 προκειμένου να ελεγχθεί αν μία σημειακή αλλαγή SNP στην αλληλουχία αυτής της ρυθμιστικής περιοχής επιφέρει αλλαγές, τόσο στα επίπεδα του RECUR1 όσο και στην έκφραση άλλων γειτονικών του γονιδίων που ρυθμίζονται από τον δεδομένο ενισχυτή και έχουν άμεση σχέση με τον γαστρικό καρκίνο. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκε επεξεργασία CRISPR/hCas9 σε κύτταρα AGS γαστρικού αδενοκαρκινώματος, που περιλάμβανε την νικάση Cas9 και δύο μόρια RNA-οδηγών (sgRNAs) τα οποία είναι συμπληρωματικά και στοχεύουν εντός της περιοχής του ενισχυτή. Η επίδραση του συγκεκριμένου συστήματος έχει στόχο την τροποποίηση της αλληλουχίας με αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου, που ορίζεται ως πολυμορφισμός SNP, ενώ για να επιτευχθεί η συγκεκριμένη αλλαγή επιτυχώς μέσω του μονοπατιού επιδιόρθωσης γονιδιωματικού DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό, προστέθηκε μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο (ssODN) ως DNA-δότης που έχει ίδια αλληλουχία με την αντίστοιχη περιοχή του ενισχυτή αλλά περιλαμβάνει το εναλλακτικό αλληλόμορφο στην πολυμορφική βάση, ώστε να καθοδηγήσει την συγκεκριμένη τροποποίηση μέσω της επιδιόρθωσης αμέσως μετά την δράση του συστήματος CRISPR/hCas9. Τέλος, επιδιώχθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του lncRNA και γειτονικών του ενισχυτή γονιδίων, έπειτα από την γενετική τροποποίηση ακρίβειας, για να διαπιστωθεί αν τελικά η δεδομένη τροποποίηση επιφέρει αλλαγές στην έκφραση αυτών των γονιδίων και άρα, επηρεάζει την λειτουργία τους και τις πιθανές συνέπειες αυτών στην εξέλιξη του καρκίνου.

3 ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

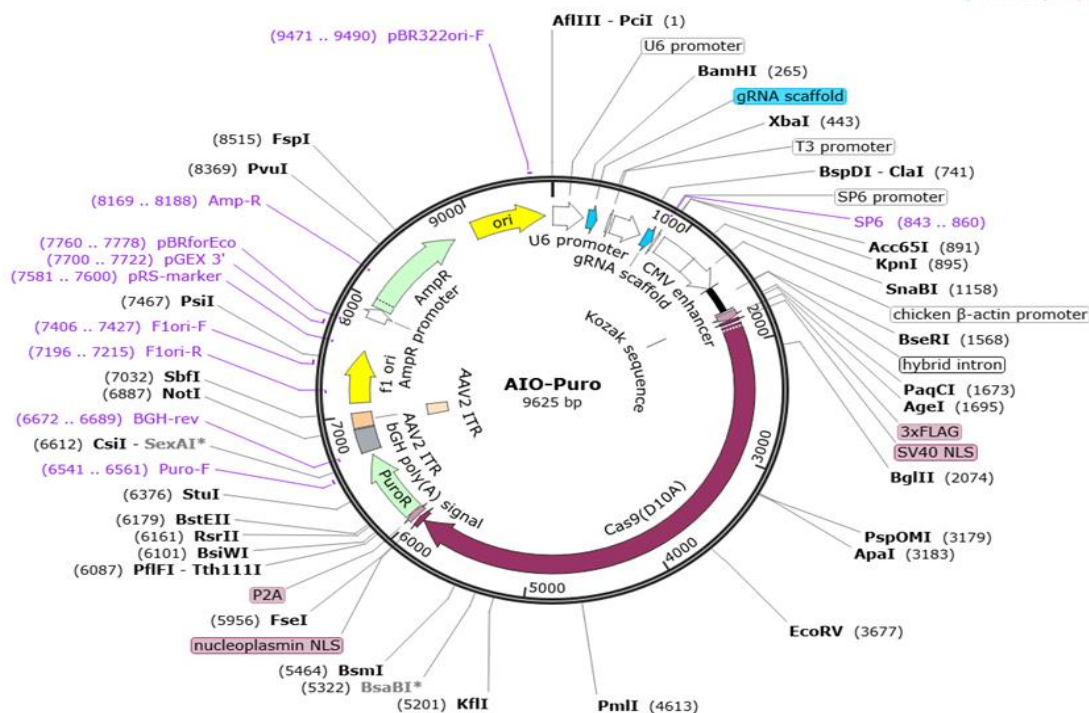
3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Για την πειραματική διαδικασία συνολικά και τις διαδοχικές γενετικές τροποποιήσεις χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κύτταρα της γαστρικής καρκινικής σειράς AGS. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά είναι υπερδιπλοειδής και προέρχεται από ιστό στομάχου θηλυκού ατόμου με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, το οποίο δεν είχε λάβει προηγουμένως κάποια θεραπεία. Τα κύτταρα έχουν επιθηλιακή μορφολογία και τα χρωμοσώματα είναι 49 σε αριθμό στο 60% των κυττάρων της κυτταρικής σειράς. Η πολυπλοειδία εμφανίζεται επίσης σε περίπου 3,6% των κυττάρων (50).

3.1.2 Πλασμιδιακός φορέας για την γενετική τροποποίηση των κυττάρων

AIO_RECURREN1_ENH sg1sg2 (AIO-Puro 9625bp)

Το συγκεκριμένο πλασμίδιο, συνολικού μεγέθους 9625 ζεύγη βάσεων του οποίου ο χάρτης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 14**, χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία για την γενετική τροποποίηση της κυτταρικής σειράς AGS. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του μοριακού εργαλείου για το εφαρμοζόμενο σύστημα CRISPR/nCas9 με στόχο την τροποποίηση της περιοχής του ενισχυτή ο οποίος αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο ελέγχου της έκφρασης του γονιδίου lncRNA. Περιλαμβάνει τις αλληλουχίες δύο small-guide RNAs, των οποίων η έκφραση καθοδηγείται από τον υποκινητή U6, καθώς και την αλληλουχία που κωδικοποιεί την νικάση Cas9 (Cas9 D10A). Τα small-guide RNAs εισήχθησαν εργαστηριακά στο πλασμίδιο έπειτα από επεξεργασία του με ένζυμα περιορισμού και σχεδιάστηκαν ειδικά για την στόχευση του συγκεκριμένου ενισχυτή που μελετάται. Περιλαμβάνονται, επίσης, και δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, την πουρομυκίνη και την αμπικιλίνη, ως δείκτες για την επιλογή των μετέπειτα γενετικά τροποποιημένων κυττάρων. Αξίζει, ακόμα, να σημειωθεί ότι ο υποκινητής U6 για την έκφραση των sgRNAs επιλέγεται με στόχο την βελτιωμένη αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας με σύστημα CRISPR/Cas9, καθώς σε διαφορετική περίπτωση μεγάλο μέρος του εκμαγείου guideRNA θα αποικοδομούταν πριν καν εκφραστεί το γονίδιο της νουκλεάσης nCas9.



Εικόνα 14: Χάρτης του πλασμιδίου AIO-Puro.

3.1.3 Συσκευές και εργαλεία

Για την μέτρηση των συγκεντρώσεων των ελεγχόμενων δειγμάτων RNA και DNA χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Nanodrop Measurement. Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Για την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιήθηκε BIO RAD CFX Connect Real-Time System. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης σε gel αгарόζης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή UV. Τέλος, για τις γενικές φυγοκεντρήσεις η φυγόκεντρος HERMLE Z233 MK-2 και για τις φυγοκεντρήσεις που εκτελέστηκαν κατά την εφαρμογή του PCR clean up kit, η μικρή φυγόκεντρος Scanspeed mini.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Γενετική τροποποίηση κυτταρικής σειράς AGS με την χρήση λιποσφαιριδίων παρουσία πλασμιδίου με ενσωματωμένο σύστημα CRISPR/nCas9

Γραμμοποίηση του πλασμιδίου AIO RECUR1 ENH sg1sg2 (AIO-Puro 9625bp) με την χρήση ενδονουκλεάσης περιορισμού

Η γενετική τροποποίηση των κυττάρων πραγματοποιείται με την εισαγωγή με την χρήση λιποσφαιριδίων, γραμμοποιημένου πλασμιδίου AIO-Puro που προαναφέρθηκε και το οποίο έχει

ενσωματωμένο το επιλεγμένο σύστημα CRISPR. Για την γραμμοποίηση γίνεται ενζυμική αντίδραση πέψης παρουσία ενδονουκλεάσης περιορισμού PvuI, για την οποία υπάρχει μοναδική θέση αναγνώρισης στην αλληλουχία του πλασμιδίου. Η αντίδραση πέψης διαρκεί 4 ώρες στους 37°C στο υδατόλουτρο. Η αρχική ποσότητα template DNA του πλασμιδίου (5000ng) χωρίζεται σε δύο δείγματα των 2500ng για να γίνει η προσθήκη του ενζύμου και έτσι προκύπτουν τελικά τα δείγματα DIG1 και DIG2 αντίστοιχα με τελικό όγκο αντίδρασης 50μl για το καθένα. Παράλληλα, ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται δύο αρνητικά controls, και συγκεκριμένα δύο άκοπα πλασμίδια που διαθέτουν αλληλουχίες των sgRNA1 και sgRNA2 από άλλο πείραμα, στα οποία δεν θα γίνει προσθήκη του ενζύμου περιορισμού (**Πίνακας 1**). Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, παρουσία ladder *Long Range ladder* [Enzyquest], για το 10% της αντίδρασης πέψης (δηλαδή για 5μl DIG1 και 5μl DIG2).

Πίνακας 1: Σύσταση ενζυμικής αντίδρασης πέψης πλασμιδίου AIO-Puro με ενδονουκλεάση περιορισμού PvuI

DNA template (-Ladder)	Ποσότητες (όγκος, συγκέντρωση)	Παρουσία ενζύμου PvuI
Ladder (Long Range ladder, Enzyquest) (10X)	3μl (1X)	-
AIO puro RECUR1 enhancer sgRNA1+sgRNA2 kit	1μl (554,8 ng/μl) / 500ng	-
AIO RECUR1 prom SNP sg1sg2 mini 1	3,2μl (158ng/μl) / 500ng	-
DIG1 (AIO_Puro_RECUR1_ENH sg1sg2)	5μl (2500ng)	+
DIG2 (AIO_Puro_RECUR1_ENH sg1sg2)	5μl (2500ng)	+

Εφόσον επιβεβαιωθεί η επιτυχής πέψη του πλασμιδίου, τα δείγματα DIG1 και DIG2 ενώνονται για να ακολουθήσει καταβύθιση (καθαρισμός από το ένζυμο και άλλα υπολείμματα πρωτεϊνικής φύσεως) και επαναδιάλυση και τελικά χρήση για την γενετική τροποποίηση των κυττάρων. Έτσι προστίθενται 400μl phenol/chloroform for DNA, 40μl Sodium Acetate και 280μl WFI για 80μl (DIG1+DIG2). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Με προσοχή αφαιρείται μόνο το υπερκείμενο και προστίθεται σε νέα σωληνάρια Eppendorf, γίνεται προσθήκη 2μl γλυκογόνου και 1ml 100% ice cold αιθανόλης (και ανακίνηση) και τα δείγματα τοποθετούνται στους -80°C για τουλάχιστον 1 ώρα. Μετά την μία ώρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά σε max στροφές και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προστίθενται 500μl 70%

παγωμένης αιθανόλη και φυγοκεντρούνται ξανά σε max στροφές για 5 λεπτά. Στην συνέχεια, γίνεται πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου και τα σωληνάρια αφήνονται στον πάγκο με ανοιχτό καπάκι μέχρι να στεγνώσει εντελώς η αιθανόλη, ενώ πραγματοποιείται επαναδιάλυση σε 22μl WFI και τα δείγματα θερμαίνονται στους 65°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα υφίστανται ανάδευση και σύντομη καταβύθιση και αποθηκεύονται στους -20°C. Τέλος, επισημαίνεται ότι για να γίνει η γενετική τροποποίηση των κυττάρων θα πρέπει η συγκέντρωση του DNA πλασμιδίου να είναι μεγαλύτερη από 230ng/μl για να υπάρχει ποσότητα 5000ng πλασμιδίου. Έτσι μετράται και η συγκέντρωση μέσω φασματοφωτομέτρησης και βρέθηκε ίση με 240ng/μl [άρα 4800ng σε 20μl (DIG1+DIG2)].

Να σημειωθεί ότι, για λόγους βιο-ασφάλειας, η γενετική τροποποίηση των κυττάρων, η καλλιέργεια και η συντήρησή τους, καθώς και η δημιουργία του συστήματος CRISPR/hCas9-ssODN επί του προαναφερόμενου πλασμιδίου δεν αποτελούν άμεσο πειραματικό σκέλος της παρούσας εργασίας καθώς έγιναν από υπ. διδάκτορα του εργαστηρίου.

3.2.2 Απομόνωση DNA

Κατά την απομόνωση DNA εφαρμόστηκαν τα εξής πειραματικά βήματα του αντίστοιχου πρωτοκόλλου: Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε στροφές 3000rpm και θερμοκρασία -7°C και ακολουθεί ο σχηματισμός του ιζήματος, δηλαδή επί της ουσίας συντελείται η καθίζηση των κυττάρων και διαχωρίζονται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, το οποίο πλέον εντοπίζεται στο υπερκείμενο. Στην συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθεται σε κάθε δείγμα διάλυμα λύσης 400μl και γίνεται επαναδιάλυση με πιπετάρισμα. Ακολουθεί προσθήκη 4μl πρωτεϊνάση K και ήπια ανάδευση και τα δείγματα τοποθετούνται για ολονύκτια επώαση στους 55°C στο υδατόλουτρο. Έπειτα προστίθεται σε όλα τα δείγματα ισοπροπανόλη (με αναλογία lysis buffer:ισοπροπανόλη = 1:1) 400μl και κατά την απομόνωση τοποθετούνται σε tubes του 1ml. Τέλος, στο απομονωμένο πλέον DNA προστίθεται διάλυμα έκλουσης 100μl (ή 50μl ανάλογα με την ποσότητα DNA που παίρνω) σε νέα Eppendorf tubes 1,5ml, τα δείγματα επωάζονται για 5-6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μετά για 5 λεπτά στους 65°C. Επιπλέον γίνεται vortex και spin, τα επαναδιαλυμένα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη για 1 ώρα στους -20°, επωάζονται πάλι για 5 λεπτά στους 65°C, πραγματοποιείται ξανά vortex και spin, μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητας (OD_{260/280}) στο nanodrop.

3.2.3 Διαγνωστική PCR

Προκειμένου να ελεγχθεί σε ποιους από τους γενετικά τροποποιημένους κλώνους της κυτταρικής σειράς AGS έδρασε αποτελεσματικά το σύστημα CRISPR/hCas9 παρουσία του μονόκλωνου δότη ssdonor-DNA πραγματοποιήθηκε μια σειρά από διαγνωστικές PCR με την χρήση διαφορετικών εκκινητών κάθε φορά. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές στοχεύουν σε διαφορετικά σημεία εντός της αλληλουχίας του ενισχυτή που όμως περιλαμβάνουν και την πολυμορφική θέση

ενδιαφέροντος. Παράλληλα, για τον έλεγχο της ακεραιότητας των κυττάρων και του DNA, πραγματοποιείται κάθε φορά και ξεχωριστή αντίδραση PCR ως κανονικοποιητής παρουσία εκκινητών β-ακτίνης. Στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει ενίσχυση, δηλαδή απουσιάζει το προϊόν DNA μετά την PCR, τα συγκεκριμένα δείγματα απορρίπτονται καθώς το αποτέλεσμα αποτελεί ένδειξη ότι η διαδικασία επιδιόρθωσης του ενισχυτή με το DNA δότη δεν έχει γίνει επιτυχώς και άρα έχουν εισαχθεί ανεπιθύμητες μεταλλάξεις. Η σύσταση της αντίδρασης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2** και οι συνθήκες στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 2: Σύσταση αντίδρασης PCR [1X].

Σύσταση αντίδρασης PCR	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer A [KAPA BIOSYSTEMS]	5 µl
Forward primer [Eurofins Genomics] (10µM)	1 µl
Reverse primer [Eurofins Genomics] (10µM)	1 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl
Taq polymerase [KAPA BIOSYSTEMS] (5u/µl)	0,25 µl
Vt (τελικός όγκος αντίδρασης)	50 µl

Πίνακας 3: Συνθήκες αντίδρασης PCR.

Στάδια αντίδρασης	συνολικής	Συνθήκες αντίδρασης PCR	x45 κύκλους
Αρχική αποδιάταξη		95°C	5 min
Αποδιάταξη		95°C	1 min
Υβριδοποίηση εκκινητών		60°C	20 sec
Επιμήκυνση		72°C	20 sec
Τελική επιμήκυνση		72°C	5 min

Για την επιβεβαίωση των κλώνων με ανέπαφο DNA στην περιοχή του ενισχυτή, συντελείται εκ νέου αντίδραση PCR με στόχο να ενισχυθεί τμήμα στο οποίο αναμένεται να έχει γίνει η σημειακή αλλαγή του αλληλομόρφου, ώστε να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για αλληλουχήσεις Sanger που ακολούθησαν, με σκοπό την οριστική και πιο αξιόπιστη επιβεβαίωση των θετικών, ως προς την μεταλλαγή στην αλληλουχία του SNP εντός του ενισχυτή, κλώνων.

3.2.4 Πέψη PCR δειγμάτων DNA με ένζυμο περιορισμού

Πριν από τις αντιδράσεις Sanger και με σκοπό να επιβεβαιωθεί διπλά η μεταλλαγή του SNP στους υποψήφιους κλώνους, έγινε αντίδραση πέψης παρουσία της ενδονουκλεάσης περιορισμού

SphI στα προϊόντα της αντίδρασης PCR με ένα ζεύγος εκκινητών dCAP εκατέρωθεν της θέσης στόχευσης. Το συγκεκριμένο ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία

5´ GCATG--C 3´.

3´ C--GTACG 5´

Στην περίπτωση που πραγματοποιηθεί επιτυχώς η τροποποίηση στον ενισχυτή, το πέμπτο νουκλεοτίδιο με βάση την **γουανίνη G** αντικαθίσταται με νουκλεοτίδιο με βάση την **αδενίνη A**. Οπότε, το ένζυμο, στους κλώνους που δεν υπέστησαν την αλλαγή **SNP** θα έχει ως αποτέλεσμα την πέψη των προϊόντων ενίσχυσης. Το αντίθετο θα συμβεί στην περίπτωση των θετικών για το SNP κλώνων. Να σημειωθεί ότι το αναμενόμενο μέγεθος (σε βάσεις bp) του τελικού προϊόντος της PCR-dCAP είναι 340bp, ενώ το αναμενόμενο μέγεθος μετά το θετικό αποτέλεσμα πέψης με SphI είναι 292bp. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4**) παρατίθενται τα συστατικά της αντίδρασης πέψης τόσο σε συνθήκες που λειτουργούν ως έλεγχος (control) - δηλαδή μάρτυρας για την επιβεβαίωση του ότι απουσία ενζύμου δεν υπάρχει καμία απολύτως επίδραση στο γονιδιωματικό DNA - όσο και παρουσία ενζύμου. Στα controls προσομοιάζονται όλες οι συνθήκες στις οποίες θα λειτουργήσει το ένζυμο και όλα τα δείγματα τελικά επωάζονται στους 37°C στο υδατόλουτρο για δύο ώρες.

Πίνακας 4: Σύσταση αντίδρασης πέψης με το ένζυμο περιορισμού SphI.

Σύσταση αντίδρασης πέψης με SphI	Ποσότητες αντιδραστηρίων (Digest)	Ποσότητες αντιδραστηρίων (Control)
PCR template	15µl	15µl
SphI enzyme [Enzyquest]	1µl	1µl
EQ Buffer (10X) [Enzyquest]	5µl	5µl
WFI (dH ₂ O)	29µl	29µl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50µl	50µl

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόξης παρουσία *ladder 100bp* (Enzyquest) προκειμένου να συγκριθούν οι εν δυνάμει θετικοί κλώνοι με τους αντίστοιχους κλώνους-control AGS μετά την προσθήκη και την δράση του ενζύμου.

3.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόξης και οπτικοποίηση στο UV

Η ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόξης πραγματοποιείται προκειμένου να απεικονιστούν τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR με βάση έναν πρότυπο μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder),

που είναι ένα διάλυμα μορίων DNA διαφορετικού μήκους τα οποία είναι δείκτες αναφοράς για την εκτίμηση του μεγέθους των άγνωστων μορίων DNA που διαχωρίστηκαν με βάση την κινητικότητα τους σε ένα ηλεκτρικό πεδίο μέσω του gel αγαρόζης στην προκειμένη περίπτωση. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων που παρέχει η ηλεκτροφόρηση επιτυγχάνεται μέσω της επίδρασης ακτινοβολίας UV στην συσκευή. Για την παρασκευή του gel χρησιμοποιούνται ποσότητες αγαρόζης, ρυθμιστικού διαλύματος TBE και βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), που είναι μια φθορίζουσα χρωστική που απορροφά σε μήκος κύματος της υπεριώδους ακτινοβολίας UV. Ανάλογα με την επιθυμητή ποσότητα του gel και την επιθυμητή περιεκτικότητά του σε αγαρόζη υπολογίζονται ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος και η μάζα της αγαρόζης. Έτσι, για παράδειγμα, για gel 250mL περιεκτικότητας 1% προετοιμάζονται 2,5gr αγαρόζης και 250mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE ή για gel 250mL περιεκτικότητας 2% προετοιμάζονται 5gr αγαρόζης και 250mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE. Η ποσότητα, αντίστοιχα του EtBr προσαρμόζεται με βάση τα δεδομένα του κάθε εργαστηρίου σχετικά με το ποια είναι η ποσότητα EtBr που αντιστοιχεί π.χ. σε 250mL gel αγαρόζης.

Παράλληλα, για την χρώση του προς φόρτωση στο gel προϊόν DNA της PCR και για την παρεμπόδιση της διάχυσής του στο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται και το διάλυμα φόρτωσης (loading dye). Αυτό περιλαμβάνει μια χρωστική, για να παρακολουθείται η «πορεία» του DNA στο gel, και γλυκερόλη, ώστε το DNA να μην διαχέεται. Πριν την χρήση του loading dye αρχικής συγκέντρωση 6X απαιτείται συγκεκριμένη αρχική ποσότητα για να έχει τελική συγκέντρωση 1X, με βάση την ποσότητα του προϊόντος PCR που χρησιμοποιείται (συνήθως 50μl ή 5μl). Όσον αφορά τον ladder, αναφέρεται ότι πρόκειται για ladder της εταιρείας *Enzyquest* και είτε χρησιμοποιείται το long range είτε των 100bp, ανάλογα το μήκος του DNA που ενισχύθηκε από την PCR, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις η ποσότητα του ladder που φορτώνεται στο gel είναι 3μl.

3.2.6 PCR clean up kit

Το PCR clean up kit εφαρμόζεται προκειμένου να γίνει καθαρισμός των προϊόντων των αντιδράσεων PCR που πραγματοποιούνται για την ενίσχυση της περιοχής του ενισχυτή στους κλώνους στους οποίους πρόκειται να γίνει η αλληλούχηση Sanger. Το kit περιλαμβάνει τα εξής βήματα: προσθήκη WFI στον όγκο αντίδρασης PCR έως τα 100μl, προσθήκη 200μl NTI Binding Buffer και φυγοκέντρηση για 1 min στα 1000g, έτσι το DNA παραμένει στην στήλη του kit. Ακολουθεί προσθήκη 700μl NT3 Wash Buffer στην στήλη και φυγοκέντρηση στα 1000g, και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία ακόμα φορά. Στην συνέχεια, η στήλη φυγοκεντρείται ξανά χωρίς την προσθήκη κάποιου αντιδραστήριου, προστίθενται 35μl elution buffer, τα δείγματα θερμαίνονται στον φούρνο στους 70°C, φυγοκεντρούνται στα 1000g για 1min και το επιθυμητό προϊόν DNA είναι στο υγρό μέρος στο tube. Περίπου 20μl αυτού προορίζονται για αλληλούχηση, εφόσον γίνει επιβεβαίωση επιτυχούς καθαρισμού με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης και μέτρηση της συγκέντρωσης DNA στην συσκευή nanodrop.

3.2.7 Αλληλούχηση DNA κατά Sanger

Για την ανίχνευση και την καλύτερη και πιο στοχευμένη επιβεβαίωση της τροποποίησης στην γονιδιωματική περιοχή - στόχο επιλέχθηκε η αλληλούχηση κατά Sanger. Για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκε ο αρχικός πρόσθιος εκκινητής με τον οποίο ενισχύθηκε η περιοχή του ενισχυτή.

3.2.8 Απομόνωση RNA και cDNA σύνθεση

Απομόνωση RNA

Για να επιτευχθεί η απομόνωση RNA από τα κύτταρα προστίθενται στα τρυβλία όπου αναπτύσσονται, 1mL TRI reagent, MRC και τα κύτταρα επωάζονται για 1 λεπτό παρουσία του συγκεκριμένου παράγοντα σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλέγεται το υπερκείμενο από τα τρυβλία, προστίθενται σε tubes Eppendorf και έτσι τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο. Ακολουθεί προσθήκη χλωροφορμίου 200μl στα δείγματα - στο hood - και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε 13.000 rpm, max στροφές. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα tubes, χωρίς να περιλαμβάνει την μεσόφαση, και προστίθενται 2μl γλυκογόνου και 500μl ισοπροπανόλης. Εφόσον επωαστούν στον πάγο για 10 λεπτά, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά σε 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μl 70% ice cold αιθανόλη και γίνεται ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Στην συνέχεια, γίνεται πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου και τα tubes αφήνονται στον πάγο με ανοιχτό καπάκι μέχρι να στεγνώσει εντελώς η αιθανόλη, μιας και πρέπει οπωσδήποτε να απομακρυνθεί εφόσον είναι αναστολέας ενζυμικής δράσης. Ακολουθεί επαναδιάλυση σε 50μl Water For Injection (WFI) και τα δείγματα θερμαίνονται στο heatblock, στους 65°C για 5 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα υφίστανται vortex και spin και αποθηκεύονται στους -80°C.

Κατεργασία με DNase

Για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DNA πραγματοποιείται αντίδραση με το ένζυμο DNase, το οποίο έχει δραστηριότητα διάσπασης του DNA. Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων φτιάχνεται master mix με βάση το 1X της αντίδρασης με σύσταση που περιγράφεται αναλυτικά στον **Πίνακα 5**, με τελικό όγκο αντίδρασης για το κάθε δείγμα 30μl. Τα δείγματα μετά την προσθήκη του mix επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C στο υδατόλουτρο, για να δράσει το ένζυμο.

Πίνακας 5: Σύσταση αντίδρασης [1X] κατεργασίας με DNase

Σύσταση αντίδρασης κατεργασίας με DNase	Ποσότητες αντιδραστηρίων
DNase [thermoscientific] (1u/μl)	1 μl
RNAse out [Invitrogen] (40u/μl)	0,5 μl
Buffer 10X [thermoscientific]	3 μl
WFI (dH ₂ O)	0,5 μl
RNA template	25 μl
Vt (τελικός όγκος αντίδρασης)	30 μl

Μετά την επώαση, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και γίνεται προσθήκη 40μl sodium Acetate (RNA grade 3M pH 5,6) και 330μl WFI. Ακολουθεί προσθήκη 400μl phenol/chloroform σε κάθε δείγμα, έντονο vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Με προσοχή αφαιρείται μόνο το υπερκείμενο και προστίθεται σε νέα tubes Eppendorf, γίνεται προσθήκη 2μl γλυκογόνου και 1ml 100% ice cold αιθανόλης (και ανακίνηση) και τα δείγματα τοποθετούνται στους -80°C για τουλάχιστον 1 ώρα. Μετά την μία ώρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά σε max στροφές και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προστίθενται 500μl 70% ice cold αιθανόλη και φυγοκεντρούνται ξανά σε max στροφές για 5 λεπτά. Στην συνέχεια, γίνεται πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου και τα tubes αφήνονται στον πάγκο με ανοιχτό καπάκι μέχρι να στεγνώσει εντελώς η αιθανόλη, ενώ πραγματοποιείται επαναδιάλυση σε 25μl WFI και τα δείγματα θερμαίνονται στο heatblock, στους 65°C για 5 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα υφίστανται vortex και spin και αποθηκεύονται στους -80°C.

Σύνθεση cDNA

Προκειμένου να επιτευχθεί σε επόμενο πειραματικό στάδιο η ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης PCR απαιτείται η σύνθεση DNA με βάση το RNA υπόστρωμα των κατεργασμένων δειγμάτων, να γίνει δηλαδή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και συγκεκριμένα, σύνθεση cDNA.

Αρχικά, μετριέται η συγκέντρωση και η καθαρότητα (OD_{260/280}) του απομονωμένου RNA σε κάθε δείγμα ξεχωριστά μέσω nanodrop measurement. Από την συγκέντρωση, με βάση τον τύπο 1000ng/C_{δείγματος}(ng/μl) υπολογίζεται ο όγκος που απαιτείται από κάθε δείγμα, ως RNA template, για την συνολική αντίδραση της σύνθεσης cDNA. Ο όγκος αυτός συμπληρώνεται με ποσότητα WFI, μέχρι την συμπλήρωση όγκου 10μl. Στην συνέχεια, σε 10μl δείγματος προστίθεται ποσότητα 2μl

από το Mix 1, του οποίου η σύσταση περιγράφεται στον **Πίνακα 6**, και μετά επωάζονται στους 65°C για 5 λεπτά.

Πίνακας 6: Σύσταση αντίδρασης σύνθεσης cDNA (Mix1) – random hexamers.

Σύσταση αντίδρασης σύνθεσης cDNA (Mix 1 primers)	Ποσότητες αντιδραστηρίων
dNTPs (10mM)	1μl
Random hexamers (100mM)	1μl

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV παρασκευάζεται μείγμα αντιδραστηρίων, του οποίου η σύσταση περιγράφεται στον **Πίνακα 7** και σε κάθε δείγμα-Mix 1 από το προηγούμενο πειραματικό μέρος (V=12μl) προστίθεται 8μl Mix 2, έτσι ώστε ο τελικός συνολικός όγκος της αντίδρασης σύνθεσης cDNA να είναι 20μl. Ακολουθεί επώαση 2 ωρών στους 37°C στο υδατόλουτρο. Τέλος, η διαδικασία ολοκληρώνεται με προσθήκη 380μl WFI στα 20μl αντίδρασης σύνθεσης cDNA και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Πίνακας 7: Σύσταση αντίδρασης σύνθεσης cDNA (Mix 2 αντίστροφης μεταγραφάσης).

Σύσταση αντίδρασης σύνθεσης cDNA (Mix 2 αντίστροφης μεταγραφάσης)	Ποσότητες αντιδραστηρίων
Buffer 5X [Invitrogen]	4 μl
DTT [Invitrogen] 0,1M (500u/μl)	2 μl
RNAse out [Invitrogen] (40u/μl)	0,5 μl
WFI	0,5 μl
MMLV [Invitrogen] (200u/μl)	1μl

3.2.9 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Πραγματοποιήθηκε και ποσοτική PCR (**Πίνακας 8, Πίνακας 9**) για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων RECUR1, RECUR1-target και άλλων γειτονικών του ενισχυτή γονιδίων στον θετικό για το SNP κλώνο AIO_RECUR1_ENHANCER_donor_SNP_13, ο οποίος όπως και προαναφέρθηκε επιβεβαιώθηκε από την αλληλούχηση κατά Sanger, στον κλώνο AIO_RECUR1_ENHANCER_donor_SNP_3 - στον οποίο δεν δημιουργήθηκε SNP, αλλά η επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα την διαγραφή 30 νουκλεοτιδίων σε κρίσιμη αλληλουχία εντός του ενισχυτή στην οποία θα γινόταν η αλλαγή του νουκλεοτιδίου - αλλά και στα κύτταρα AGS που λειτουργούν ως δείγμα ελέγχου (control) για την σύγκριση των σχετικών αποτελεσμάτων γονιδιακής

έκφρασης πριν και μετά την επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/nCas9 – ssODN. Επί της ουσίας, επιδιώκεται η επιβεβαίωση του αν τελικά η προκείμενη επιτυχής τροποποίηση στην αλληλουχία του ενισχυτή του lncRNA RECUR1 έχει επίδραση τόσο στα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου του lncRNA όσο και στα επίπεδα έκφρασης γειτονικών του ενισχυτή γονιδίων τα οποία εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 12. Παράλληλα, διεξάγεται και έλεγχος της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων και σε κλώνο στον οποίο, ο ενισχυτής του RECUR1 έχει υποστεί knock-out μέσω προηγούμενης πειραματικής εφαρμογής άλλου συστήματος CRISPR/Cas9, και συγκεκριμένα στον κλώνο AGS_Enhancer_Knock-Out_15. Στην περίπτωση αυτή είναι ήδη γνωστό το ότι η τροποποίηση του ενισχυτή επιβεβαιωμένα επηρεάζει την δράση και την λειτουργία του και η δεδομένη αλλαγή έχει σίγουρα ορισμένα αποτελέσματα στην έκφραση γονιδίων που είναι άμεσα συσχετισμένα και ελέγχονται από αυτόν.

Πίνακας 8: Σύσταση αντίδρασης qPCR [1X]

Σύσταση αντίδρασης qPCR	Ποσότητες αντιδραστηρίων
SYBR mix [KAPA BIOSYSTEMS]	10 µl
Forward & Reverse primers (10µM), [Eurofins Genomics]	2 µl
ddH ₂ O (WFI)	4 µl
Δείγμα cDNA	4 µl
Τελικός όγκος αντίδρασης	20 µl

Πίνακας 9: Συνθήκες αντίδρασης qPCR.

Στάδια	Θερμοκρασία (°C)	Χρονική Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	5min
Αποδιάταξη	95	20sec
Υβριδοποίηση Εκκινητών	58	2min
Επιμήκυνση	72	15sec
Κύκλοι	45	

Στην ποσοτική PCR περιλαμβάνονται κάθε φορά δύο τεχνικές επαναλήψεις για κάθε ζεύγος εκκινητών σε κάθε δείγμα. Επιπλέον, γίνεται παράλληλα ποσοτική PCR παρουσία εκκινητών που στοχεύουν σε ιδιοσύστατα εκφραζόμενο γονίδιο, όπως το GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), που λειτουργεί ως κανονικοποιητής της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα CFX Manager της BioRad και μέσω της χρήσης του Microsoft Excel.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα γραμμοποίησης του πλασμιδίου AIO RECUR1 ENH sg1sg2 (AIO-Puro 9625bp) με την χρήση ενδονουκλεάσης περιορισμού

Το κυκλικό πλασμίδιο που λειτουργεί ως αρνητικό control θα έπρεπε να εμφανίζεται στο gel σε τρεις ζωνώσεις λόγω των τριών διαμορφώσεων στις οποίες μπορεί να βρεθεί (ανοικτή, υπερελικωμένη και συμπυκνωμένη). Όμως το αποτέλεσμα επηρεάστηκε από την τελικά χρησιμοποιούμενη ποσότητα (συγκέντρωση, όγκος) για κάθε αρνητικό control, εφόσον αρχικά θεωρήθηκε κατά λάθος ότι χρησιμοποιείται το θετικό control και έτσι οι διαμορφώσεις του πλασμιδίου (-) δεν φαίνονται διαχωρισμένες. Η ζώνωση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου AIO-Puro (9625bp) είναι πιο πάνω συγκριτικά με την πρώτη ζώνη του ladder (8000bp). Τα δείγματα DIG1 και DIG2 βρίσκονται ακριβώς στην ίδια ευθεία αφού έχουν ίδιο μήκος και ποσότητα (2500ng).

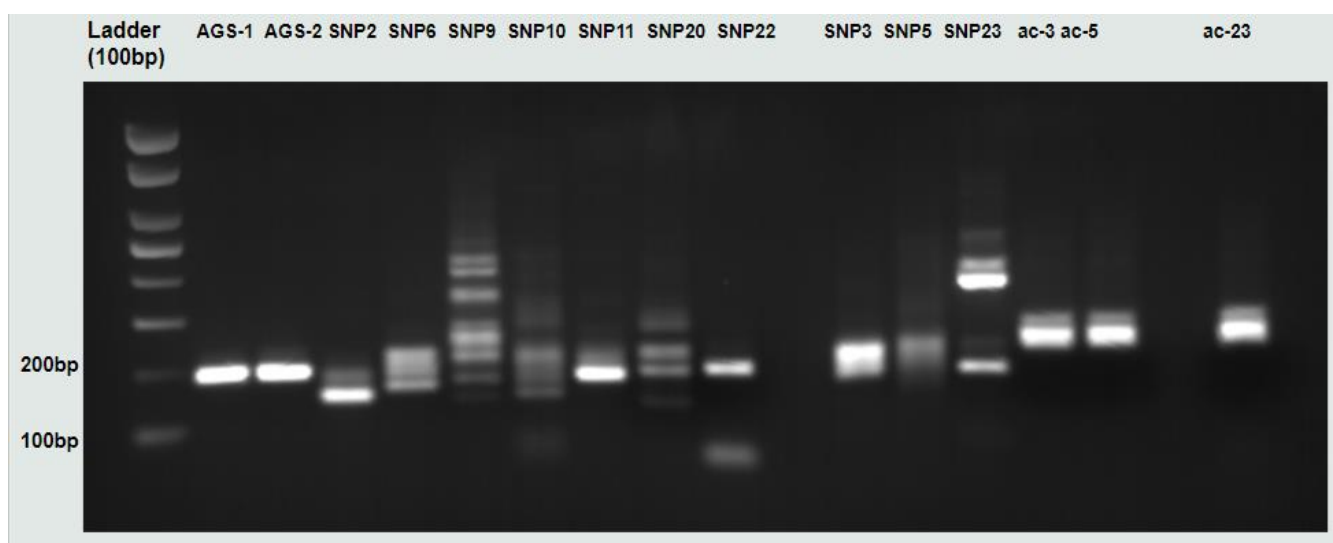
Αποτελέσματα διαγνωστικών PCR για τους κλώνους AIO RECUR1 ENHANCER donor SNP 1 έως 24

Έλεγχος και επιλογή των εν δυνάμει θετικών κλώνων

Προαπαιτούμενο για να θεωρηθεί ένας κλώνος ως θετικός για την σημειακή μεταλλαγή είναι να διαθέτει ανέπαφη της συνολική αλληλουχία του ενισχυτή. Σε αντίθετη περίπτωση, το κύτταρο θα εισάγει ανεπιθύμητες μεταλλάξεις λόγω NHEJ, χωρίς να έχει γίνει επιδιόρθωση μέσω του μηχανισμού HDR και αξιοποίησης του εξωγενούς ssODN δότη DNA. Για να προσδιοριστούν τέτοιοι κλώνοι, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές ηλεκτροφορήσεις σε προϊόντα ενίσχυσης του DNA με εκκινητές εκατέρωθεν της περιοχής στόχευσης με το nCAS9-dual sgRNA σύστημα. Όπως φαίνεται στις **Εικόνες 15, 17, 19**, επιβεβαιώθηκε πρώτα η ορθή απομόνωση επαρκούς ποσότητας DNA σε PCR με εκκινητές ακτίνης, για όλους τους κλώνους εκτός από τους 7,16,17,18,19 και 21 οι οποίοι τελικά δεν θα μας απασχολήσουν στα επόμενα πειραματικά βήματα. Στην συνέχεια, από την διαγνωστική PCR προκύπτει ότι εν δυνάμει θετικοί κλώνοι θεωρούνται μόνο οι κλώνοι 1,3,4,8,11,12,13,22 και 24, όπως φαίνεται στις **Εικόνες 16, 18, 19**. Βέβαια, υπάρχουν επιφυλάξεις σχετικά με τους κλώνους αυτούς, από την άποψη ότι για να θεωρηθεί ότι ένας κλώνος έχει ανέπαφη την περιοχή του ενισχυτή θα πρέπει να έχει ακριβώς την ίδια ζώνωση στην ζώνη 200bp του χρησιμοποιούμενου ladder συγκριτικά με τα controls AGS σε κάθε περίπτωση. Σε κάθε περίπτωση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αποκλείουν την εισαγωγή μεγάλων αλλαγών στην αλληλουχία του ενισχυτή (>30 nt) για τους συγκεκριμένους κλώνους αφού αυτή είναι και η διακριτική ικανότητα των πηκτών αгарόζης.



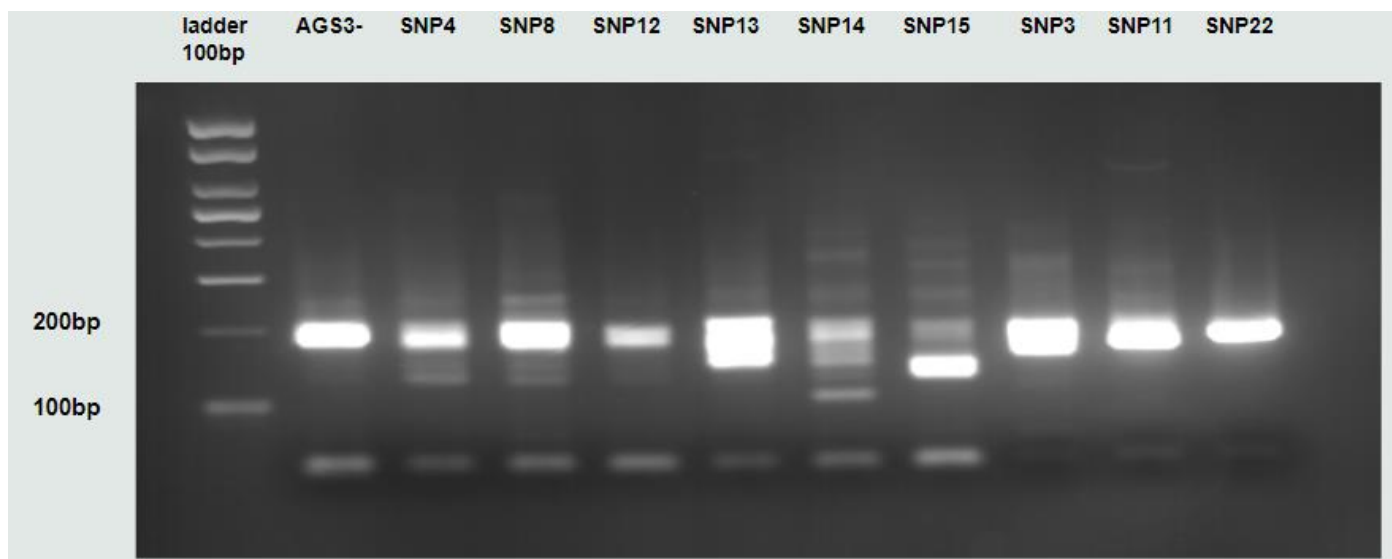
Εικόνα 15: Απεικόνιση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR για τους εκκινητές ακτίνης για τους κλώνους 2, 6, 9, 10, 11, 20, 22 και τους μάρτυρες αγρίου τύπου AGS-1 και 2 που ηλεκτροφορήθηκαν.



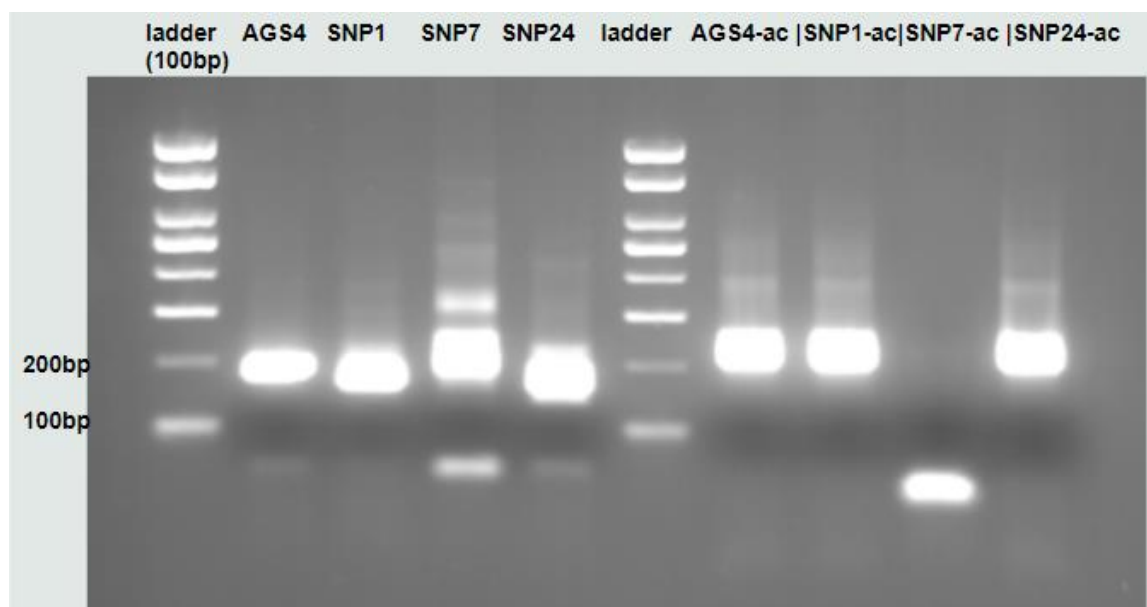
Εικόνα 16: Απεικόνιση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR για τους κλώνους 2,6,9,10,11,20,22 και τα control AGS1 και AGS2 που ηλεκτροφορήθηκαν. Περιλαμβάνονται και οι κλώνοι 3,5 και 23 και για τους GATA εκκινητές και για τους actin εκκινητές (οι εκκινητές ακτίνης συμβολίζονται με το ac), για την επιβεβαίωση εν δυνάμει θετικών κλώνων.



Εικόνα 17: Απεικόνιση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR για τους εκκινητές ακτίνης για τους κλώνους 4,8,12,13,14,15,16,17,18,19,21 και το control AGS3 που ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης.



Εικόνα 18: Απεικόνιση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR για τους κλώνους 4,8,12,13,14,15,3,11 και 22 και το control AGS3 που ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης, για την επιβεβαίωση εν δυνάμει θετικών κλώνων.



Εικόνα 19: Απεικόνιση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR και για τους εκκινητές ακτίνης για τους κλώνους 1, 7, και 24 και το control AGS4 που ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης, για την επιβεβαίωση εν δυνάμει θετικών κλώνων.

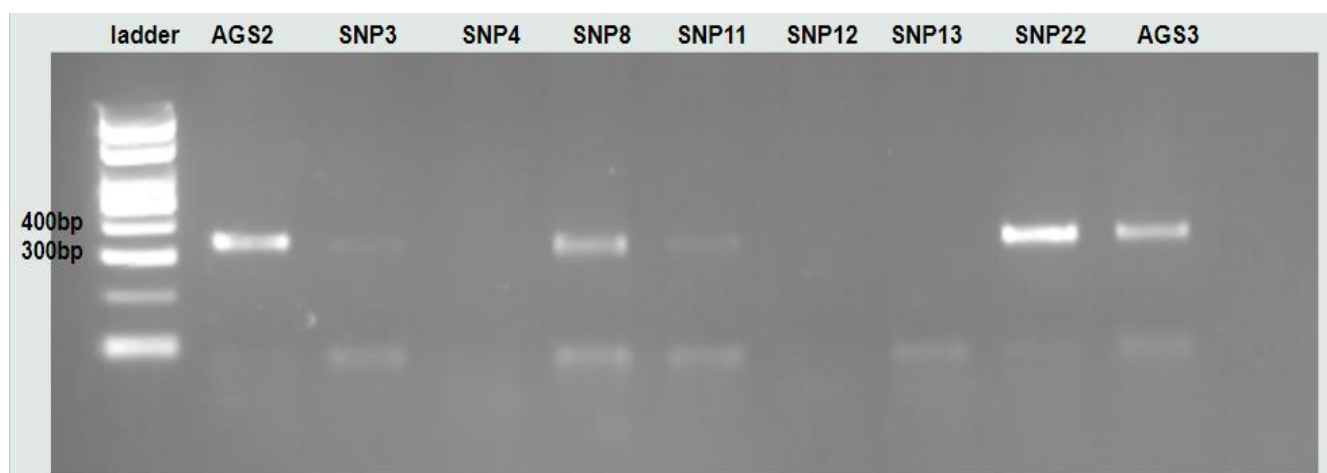
Όσοι κλώνοι θεωρήθηκαν ως εν δυνάμει θετικοί επιλέχθηκαν με βασικό κριτήριο την χαρακτηριστική τους ζώνωση μετά την εξειδικευμένη διαγνωστική PCR. Η ζώνωση σε αυτούς τους κλώνους ήταν ίδια ιδανικά, ή και παρόμοια σε κάποιες περιπτώσεις κλώνων, με την αντίστοιχη των κλώνων ελέγχου (control) AGS λαμβάνοντας υπόψιν το εξής: το σύστημα CRISPR/hCas9-ssODN κατά την εισαγωγή του στον πυρήνα των κυττάρων, στην περίπτωση επιτυχούς δράσης του, προκαλεί, στην περιοχή του ενισχυτή, μονόκλωνη ρήξη στον νοηματικό κλώνο (λόγω συμπληρωματικότητας του sgRNA1) και μονόκλωνη ρήξη στην αντίθετη πλευρά στον αντι-

νοηματικό κλώνο (λόγω συμπληρωματικότητας του sgRNA2) από την δράση της ενδονουκλεάσης nCas9, ενώ στην συνέχεια, το πρότυπο μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο DNA (ssODN) λόγω ομολογίας με την αλληλουχία του ενισχυτή με διαφορά ενός νουκλεοτιδίου (SNP) συμβάλλει στην επιδιόρθωση της ουσιαστικά δίκλωνης ρήξης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι δεν γίνεται προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίων από την γονιδιωματική περιοχή του ενισχυτή και λόγω εξειδίκευσης από την χρήση διπλού οδηγού sgRNA το σύστημα θεωρητικά δεν έχει επίδραση σε οποιαδήποτε άλλη περιοχή του γονιδιώματος. Και για αυτούς τους λόγους οι κλώνοι αγρίου τύπου και οι εν δυνάμει θετικοί κλώνοι δίνουν όμοια ζώνωση. Στους κλώνους που παρουσιάζουν τελικά περισσότερες από μία ζώνες, υπάρχουν πολλαπλές επιδράσεις εκτός στόχου λόγω πιθανής μερικής συμπληρωματικότητας των sgRNAs με διαφορετικά σημεία στο χρωμόσωμα (ή και στο γονιδίωμα) και πολλαπλές εγκοπές σε αυτά τα σημεία από την ενδονουκλεάση. Σημειώνεται ότι στα κομμένα τμήματα συμπεριλαμβάνεται και η περιοχή που ενισχύεται από το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιείται στην αντίστοιχη διαγνωστική PCR. Όσον αφορά τους κλώνους οι οποίοι έχουν μοναδική ζώνωση αλλά πιο κάτω ή πιο πάνω από την ζώνη των AGS κλώνων ελέγχου, το πιθανότερο είναι να μην έχει εισαχθεί και το πρότυπο ssODN μαζί με το υπόλοιπο σύστημα, με αποτέλεσμα κατά την επιδιόρθωση να έγινε προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίων και έτσι να άλλαξε το μέγεθος της υπό ενίσχυση γονιδιωματικής περιοχής.

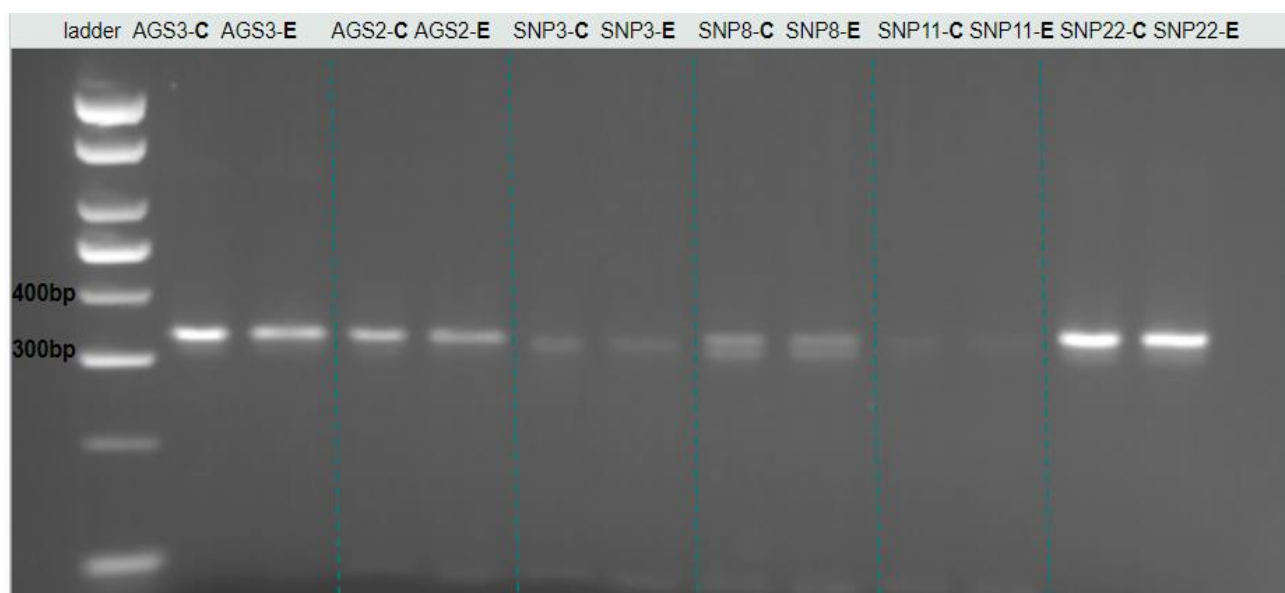
Έλεγχος των επιλεγμένων κλώνων για τον προσδιορισμό δημιουργίας SNP στον ενισχυτή – Ενζυμικός προσδιορισμός

Εφόσον πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με στόχο την περιοχή του υπό μελέτη ενισχυτή παρουσία εξειδικευμένου ζεύγους εκκινητών, αρχικά στους εν δυνάμει θετικούς κλώνους 3,4,8,11,12,13,22, όπως παρουσιάζεται στα αποτελέσματα της αντίστοιχης ηλεκτροφόρησης στην **Εικόνα 20**, ακολούθησε δοκιμαστική ενζυμική αντίδραση με την ενδονουκλεάση περιορισμού SphI για να συγκριθούν οι επιλεγμένοι κλώνοι με τους κλώνους control AGS. Η συγκεκριμένη αντίδραση εφαρμόστηκε μόνο στους κλώνους SNP_3,8,11,22, διότι οι αντίστοιχοι 4, 12 και 13 δεν παρουσίασαν ζώνωση ούτε και την αναμενόμενη στα 340bp, όπως φάνηκε και στην ηλεκτροφόρηση στην **Εικόνα 20**.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα στην **Εικόνα 21** διαπιστώνεται ότι η ενζυμική δραστηριότητα είναι προβληματική εφόσον δεν παρατηρείται πέψη ούτε στα κύτταρα AGS, οπότε δεν μπορεί να γίνει τελικά ακριβής προσδιορισμός του αν υπάρχουν κλώνοι θετικοί για την αλλαγή SNP. Μάλιστα, εξαιτίας της δεδομένης έκβασης δεν έγινε η αντίδραση PCR με εκκινητές dCAP και η ενζυμική αντίδραση για τους κλώνους 1 και 24, αλλά τελικά τα προϊόντα PCR από τους κλώνους υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση Sanger με στόχο την ακριβή επιβεβαίωση πιθανών θετικών για το SNP κλώνων.



Εικόνα 20: Απεικόνιση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR για τους κλώνους 3,4,8,11,12,13,22 και το control AGS3 και AGS2 που ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης, για τον αρχικό προσδιορισμό κλώνων με την αλλαγή SNP.



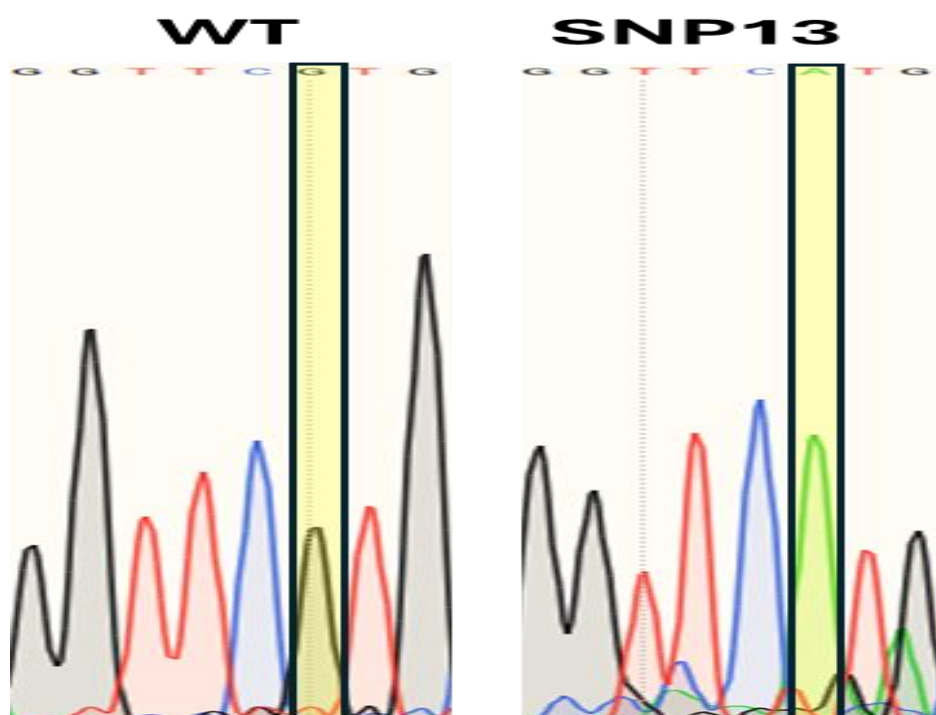
Εικόνα 21: Απεικόνιση σε gel αγαρόζης των αποτελεσμάτων μετά την αντίδραση πέψης με ένζυμο περιορισμού SphI στους επιλεγμένους ως εν δυνάμει θετικούς κλώνους 3,8,11 και 22 και στα controls δείγματα AGS3 και AGS2. Για κάθε κλώνο συμπεριλαμβάνεται αντίδραση Control (C) απουσία ενζύμου – παρουσία WFI αντί για ένζυμο και αντίδραση Enzyme (E) παρουσία ενζύμου.

Αλληλουχίες Sanger για επιβεβαίωση δημιουργίας θετικών για το SNP κλώνων

Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αλληλουχήσεις με διαφορετικό εκκινητή κάθε φορά για τα προϊόντα ενίσχυσης PCR των επιλεγμένων εν δυνάμει θετικών κλώνων προκειμένου να καταλήξουμε σε ένα συμπέρασμα σχετικά με το ποιος από αυτούς τους κλώνους διαθέτει την αλλαγή SNP στην αλληλουχία του ενισχυτή μετά από την επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/nCas9 – ssDonor. Η δεύτερη αντίδραση αλληλούχησης λειτούργησε ως συμπληρωματική, διότι η πρώτη

παρείχε ικανοποιητική ποιοτική εικόνα για την αλληλουχία της επιθυμητής ενισχυμένης περιοχής μόνο για τους κλώνους 3 και 13. Οπότε οι υπόλοιποι κλώνοι υποβλήθηκαν εκ νέου σε αντίδραση PCR για διαφορετικό ζεύγος εκκινητών που ήταν γνωστό ότι θα καλύψει μεγαλύτερο εύρος αλληλουχίας γύρω από την περιοχή του ενισχυτή και έτσι θα ήταν τελικά εφικτή η οριστική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Η πρώτη αλληλούχηση επιβεβαίωσε ως θετικό για το SNP κλώνο 13, του οποίου το αποτέλεσμα της αλληλούχησης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 22**, ενώ όσον αφορά των κλώνο 3 εντοπίστηκε ότι έχει υποστεί διαγραφή 30 νουκλεοτιδίων στην περιοχή του ενισχυτή (δεν παρουσιάζεται). Η δεύτερη αλληλούχηση παρείχε ουσιαστικές πληροφορίες μόνο για τον κλώνο 22, ο οποίος επιβεβαιώθηκε ως αρνητικός για το SNP κλώνος.

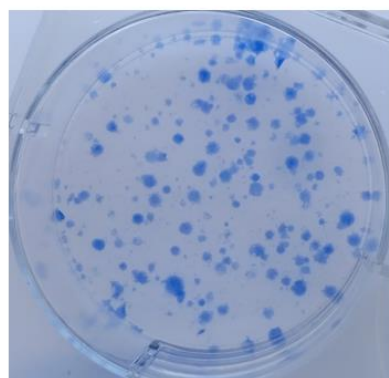
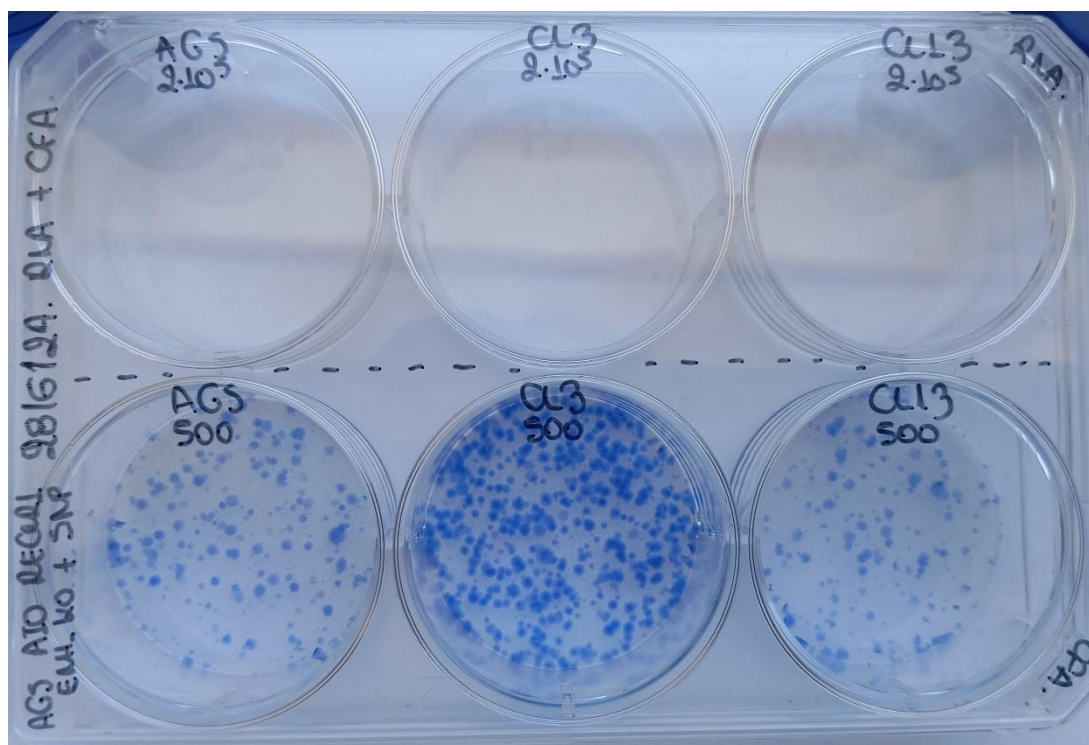


Εικόνα 22: Αποτελέσματα αλληλούχησης κατά Sanger με εκκινητή τον *RECUR1_enh_subclon_Reverse3* (από PCR με εκκινητές *RECUR1_enh_subclon_F3/R3*) για τον κλώνο 13.

Παρατίθεται, επιπλέον, σαν σχόλιο, ότι θα ήταν περισσότερο ωφέλιμο για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων να υπάρχει στο τέλος του πειράματος και τουλάχιστον ένας δεύτερος κλώνος με επιτυχημένη αλλαγή του νουκλεοτιδίου στον ενισχυτή και σχηματισμένο αλληλόμορφο SNP, προκειμένου να αποτελέσει κλώνο επιβεβαίωσης του ότι η αλλαγή του νουκλεοτιδίου είναι αποτέλεσμα επίδρασης του συστήματος CRISPR/nCas9-ssODN και δεν προέκυψε λόγω τυχαίας μετάλλαξης εντός του κυττάρου στην δεδομένη χρωμοσωμική περιοχή.

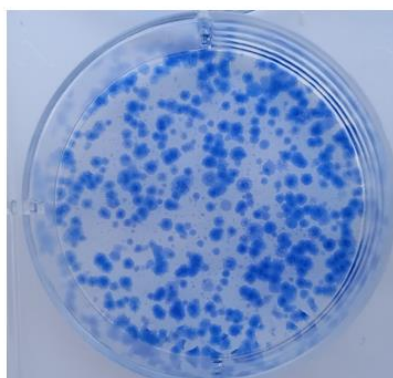
Φαινοτυπική ανάλυση των τροποποιημένων AGS κλώνων

Μετά από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης Sanger και την επιλογή των τελικά επιθυμητών κλώνων 3 και 13 ακολούθησε ανάπτυξη αυτών και του αρνητικού μάρτυρα αγρίου τύπου σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για την τελική παρατήρηση φαινοτύπου μετά την γενετική τροποποίηση των κυττάρων και την επιβεβαιωμένη ως θετική επίδραση του συστήματος CRISPR/nCas9 – ssODN σε αυτά.



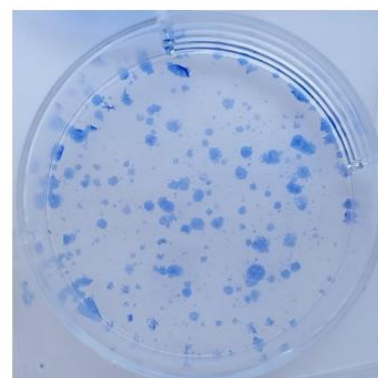
AGS-

Control sample without modifications



RECUR1 ENH SNP3

Enhancer CRISPR/nCas9 – ssODN system deletion of about 30nts



RECUR1 ENH SNP13

Enhancer SNP-edited by CRISPR/nCas9 – ssODN system clone

Εικόνα 23: Φαινοτυπικό αποτέλεσμα στους κλώνους 3 και 13 όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων που αναπτύσσονται εκ νέου σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μετά την επιτυχή γενετική τροποποίηση και δράση του συστήματος CRISPR/nCas9 – ssODN.

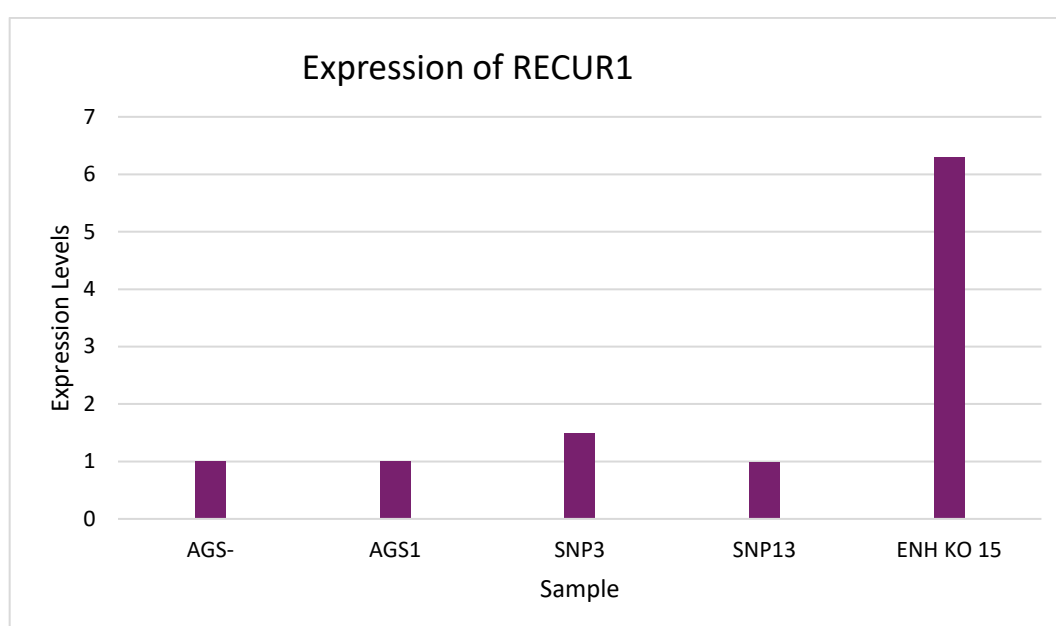
Με βάση αυτά τα φαινοτυπικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 23** και ειδικά από την παρατήρηση του κλώνου 3 συμπεραίνεται ότι ο υπό μελέτη ενισχυτής έχει ρόλο στην εκτεταμένη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, κρίνοντας από τον εμφανώς αυξημένο αριθμό κυττάρων συγκριτικά με τον μάρτυρα AGS, ενώ η αλληλουχία του ενισχυτή που επηρεάζεται από την επεξεργασία (διαγραφή 30 διαδοχικών νουκλεοτιδίων) είναι ιδιαίτερα κρίσιμη, προφανώς για την σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων και τροποποιητών χρωματίνης και για την αλληλεπίδραση με υποκινητές γονιδίων. Από το φαινοτυπικό αποτέλεσμα του κλώνου 13 με την αλλαγή SNP δεν προκύπτει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα μιας και δεν υπάρχει και ουσιαστική διαφορά στον αριθμό των κυττάρων σε σχέση με τον κλώνο AGS, τουλάχιστον με αυτή την απλή φαινοτυπική παρατήρηση. Η φαινοτυπική όμως διαφορά των κλώνων 3 και 13 μπορεί να σχετίζεται και με το αν στα κύτταρα επικρατεί ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία της αλλαγής στον ενισχυτή για την περιοχή αυτή στο χρωμόσωμα 12. Ενδεχομένως, τα περισσότερα κύτταρα του κλώνου 3 να είναι ομόζυγα για την διαγραφή 30 νουκλεοτιδίων στον ενισχυτή, ενώ τα κύτταρα του κλώνου 13 να είναι ετερόζυγα για το SNP στον ενισχυτή και αυτό να εκδηλώνεται και ως μη σημαντική αύξηση στον αριθμό των κυττάρων στην περίπτωση του κλώνου 13. Ο τελικός φαινότυπος, μάλιστα, διαμορφώνεται και από τον βαθμό επιρροής που έχει κάθε τύπος αλλαγής της αλληλουχίας του ενισχυτή στην γονιδιακή έκφραση. Σε κάθε περίπτωση μπορεί να επηρεάζεται η πρόσδεση διαφορετικού μεταγραφικού παράγοντα ή συνδυασμού μεταγραφικών παραγόντων που καθένας διαφοροποιείται ως προς τον τρόπο ρύθμισης της τελικής εκδήλωσης του φαινοτύπου. Τέλος, λαμβάνεται υπόψιν και το ενδεχόμενο τα κύτταρα να βρίσκονται χρονικά και ποιοτικά σε διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου και η πλειοψηφία αυτών να μην είναι σε θέση να συμβάλλει την δεδομένη στιγμή συνολικής εκδήλωσης του φαινοτύπου, στον φαινότυπο.

Ποσοτικές PCR (qPCR) για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου lncRNA RECUR1 και άλλων γειτονικών του ενισχυτή γονιδίων στους θετικούς κλώνους

Από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου έχει προκύψει η υπόθεση ότι ο συγκεκριμένος ενισχυτής δύναται να ρυθμίσει την έκφραση του γειτονικού του lncRNA RECUR1 καθώς και ενός καθοδικού του mRNA στόχου. Παράλληλα, έχει απομονωθεί ήδη και μια δεύτερη σειρά (ονομάστηκε AGS_Enhancer_Knock-Out_15) στην οποία έχει γίνει μεγαλύτερη απαλοιφή (50 nt) της αλληλουχίας του ενισχυτή και πάλι με το σύστημα CRISPR/nCas9. Προκειμένου να ελεγχθούν οι πιθανές επιπτώσεις τόσο της σημειακής μεταλλαγής (κλώνος 13) όσο και της νέας απαλοιφής των 30 nt (κλώνος 3) τόσο στην ενεργότητα του ενισχυτή όσο και στην έκφραση των γειτονικών γονιδίων ενδιαφέροντος, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ποσοτικής PCR. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε cDNA από τα κύτταρα αγρίου τύπου AGS και τον κλώνο Knock-Out_15. Για τον

κλώνο 15 αξιοποιήθηκε cDNA από τον μάρτυρα AGS1, επειδή οι δύο σειρές είχαν επωαστεί παράλληλα στο παρελθόν και άρα η σύγκρισή τους είναι πιο αξιόπιστη.

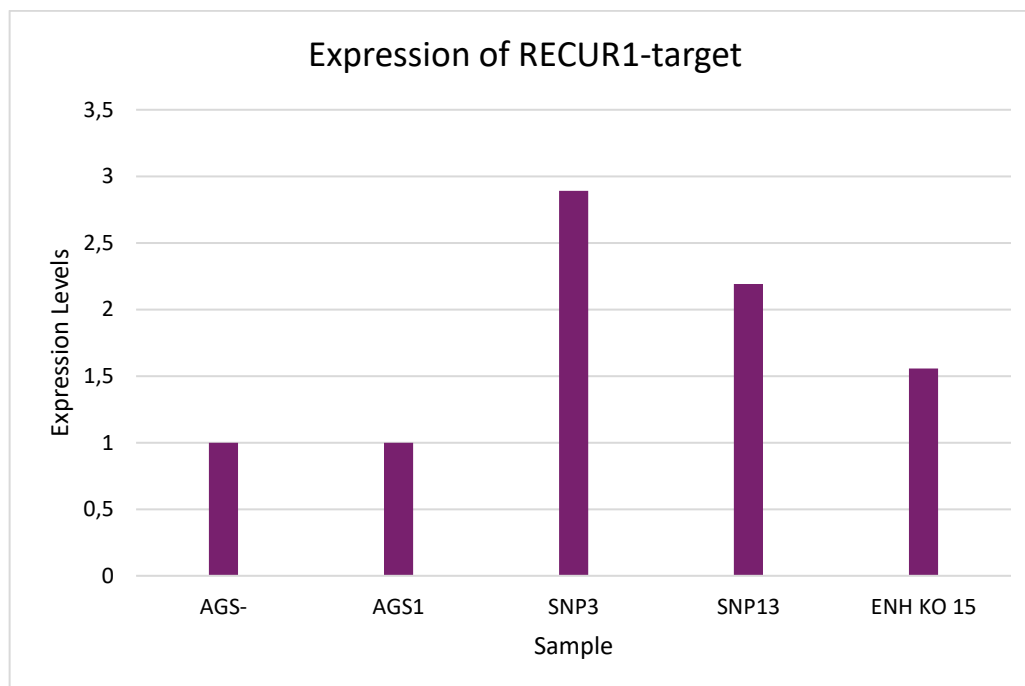
Σχετικά με το lncRNA RECUR1, παρατηρείται ήπια αύξηση της έκφρασης στον κλώνο SNP3 (απαλοιφή 30 nt) κατά 49% περίπου συγκριτικά με τον μάρτυρα, καμία σημαντική αλλαγή της έκφρασης στον κλώνο SNP13 (SNP), ενώ στον κλώνο ENH KO 15 (απαλοιφή 50 nt) παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης κατά 529% περίπου συγκριτικά με τον αντίστοιχο του κλώνο-μάρτυρα AGS1, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 24**.



Εικόνα 24: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου RECUR1 στους κλώνους 3 και 13 συγκριτικά και με τα δείγματα ελέγχου AGS-, AGS1 και AGS_Enhancer_Knock-Out_15.

Σχετικά με γειτονικό κωδικοποιητικό γονίδιο-στόχο του lncRNA RECUR1, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης στον κλώνο SNP3 κατά 180% περίπου συγκριτικά με τον μάρτυρα, αύξηση της έκφρασης στον κλώνο SNP13 κατά 120% περίπου, ενώ στον κλώνο ENH KO 15 αύξηση της έκφρασης κατά 55% περίπου συγκριτικά με τον αντίστοιχο του κλώνο-μάρτυρα AGS1, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 25**. Εκτός από τα συγκεκριμένα γονίδια, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ποσοτικής PCR και για ακόμα πέντε γονίδια εκατέρωθεν του συγκεκριμένου ενισχυτή προκειμένου να διαπιστωθεί αν αλλάζει η έκφρασή τους στα συγκεκριμένα δείγματα. Σε κανένα από αυτά τα γονίδια δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στους υπό εξέταση κλώνους, γεγονός

που συνηγορεί υπέρ της εξειδίκευσης της δράσης του συγκεκριμένου ενισχυτή ή των μεταλλάξεων του μόνο στην έκφραση του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του, τουλάχιστον στα κύτταρα AGS.



Εικόνα 25: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου *RECUR1-target* στους κλώνους 3 και 13 συγκριτικά και με τα δείγματα ελέγχου AGS-, AGS1 και AGS_Enhancer_Knock-Out_15.

Εστιάζοντας στα ποσοστά έκφρασης του γονιδίου που αποτελεί στόχο του lncRNA (*RECUR1-target*) παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στον κλώνο AGS και αποδεικνύεται πως και η διαγραφή νουκλεοτιδίων και η αλλαγή SNP στην συγκεκριμένη περιοχή του ενισχυτή επηρεάζει την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου. Επιπλέον, η κατά 49% αύξηση της έκφρασης του γονιδίου lncRNA *RECUR1* στον κλώνο 3 με την διαγραφή 30nts από την αλληλουχία του ενισχυτή, παρόλο που θεωρείται μικρή σε σχέση με το ποσοστό αύξησης της έκφρασης του *RECUR1-target* στον αντίστοιχο κλώνο, δεν σημαίνει ότι δεν λαμβάνεται υπόψιν κατά την γενικότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Δεδομένης, όμως, της γνώσης, από άλλες μελέτες του εργαστηρίου, που αφορά την καθοδική ρύθμιση του γονιδίου από το *RECUR1* επισημαίνεται ότι το γονίδιο αυτό ρυθμίζεται τόσο από το lncRNA όσο και από άλλα ρυθμιστικά στοιχεία που μπορεί να εντοπίζονται στην ευρύτερη χρωμοσωμική περιοχή. Παράλληλα, η έκφραση των γονιδίων και η τοπολογική και λειτουργική ρύθμιση του ενισχυτή που μελετώνται επηρεάζονται συνδυαστικά και από τις συνδέσεις διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (ενεργοποιητών, συν-ενεργοποιητών, καταστολέων, συγκαταστολέων), μεταγραφικών συμπλόκων, τροποποιητών χρωματίνης, διαφορετικών αλληλεπιδράσεων υποκινητών-ενισχυτών. Σημαντικό συμπέρασμα θεωρείται και το γεγονός ότι η αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου στον ενισχυτή άλλαξε σε τέτοιο μεγάλο, ουσιαστικά, βαθμό τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *RECUR1-target*. Συγχρόνως, η

αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου και η διαγραφή 30nts στην αντίστοιχη αλληλουχία του ενισχυτή επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό την δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων και την αλληλεπίδραση με έναν υποκινητή. Μπορεί, επίσης, ένας μεταγραφικός παράγοντας μεγάλης επιρροής του φαινοτύπου των κυττάρων να προσδένεται στον ενισχυτή στην περίπτωση της διαγραφής, αλλά να μην προσδένεται ή/και να μην σχηματίζει φυσιολογικά σύμπλοκο με άλλους παράγοντες στην περίπτωση του SNP. Επίσης, μπορεί η ισχύς αλληλεπίδρασης ενισχυτή-υποκινητή ή η ισχύς πρόσδεσης μεταγραφικού συμπλόκου να είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της διαγραφής (κλώνος 3) και σε αυτό να οφείλεται το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης της έκφρασης του γονιδίου RECUR1-target στον κλώνο 3 σε σύγκριση με τον κλώνο 13.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως γίνεται αντιληπτό από όσα προαναφέρθηκαν, τα lncRNAs συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον εξαιτίας του επιβεβαιωμένου ογκογόνου και ογκο-ρυθμιστικού ρόλου τους και της συμβολής τους στην εμφάνιση και ανάπτυξη καρκίνου. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία βασικό ζητούμενο αποτελεί η προσπάθεια αρχικού προσδιορισμού της επίδρασης ενός ενισχυτή που εντοπίζεται στον χρωμοσωμικό τόπο του ήδη χαρακτηρισμένου lncRNA RECUR1, τόσο στην έκφραση αυτού του μορίου lncRNA όσο και στην έκφραση γειτονικών σε αυτόν γονιδίων, εκ των οποίων, μάλιστα, το ένα αποτελεί πιθανό στόχο του RECUR1.

Είναι αξιοσημείωτη η συμβολή των lncRNAs τόσο στην γονιδιακή έκφραση γενικότερα όσο και στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου. Αναλυτικότερα, ένας μεγάλος αριθμός lncRNAs μεταγράφεται με διαφορετικό τρόπο από τα mRNAs και ρυθμίζουν την έκφραση γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων. Υπάρχει περίπτωση τα lncRNAs να συμβάλλουν στην ιστο-ειδική έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού όπου παρατηρείται συν-έκφραση του lncRNA και γονιδίων που ελέγχονται από αυτό (51). Όσον αφορά τον γαστρικό καρκίνο, ορισμένα lncRNAs επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των γαστρικών καρκινικών κυττάρων τροποποιώντας άμεσα ή έμμεσα την έκφραση ογκοκατασταλτικών παραγόντων, όπως του μεταγραφικού παράγοντα p53 και της φωσφατάσης PTEN. Για παράδειγμα το κυτταροπλασματικό LINC00470 συνδέεται με το mRNA pten και προάγει την αποικοδόμησή του με άμεση επίδραση στην εξέλιξη του γαστρικού αδενοκαρκινώματος (52).

Είναι, επίσης, γνωστό ότι τα γονίδια των lncRNAs και τα κωδικοποιητικά γονίδια συχνά μοιράζονται κοινούς μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστικά στοιχεία, όπως υποκινητές και ενισχυτές. Η έκφραση των lncRNAs υπόκεινται σε ρύθμιση και μέσω της παρουσίας SNPs σε περιοχές μη-κωδικοποιητικών γονιδίων και πολλά από αυτά τα SNPs έχουν συσχετιστεί με νόσο. Για παράδειγμα, σε μελέτη του γονιδιώματος προτείνεται ότι το 93% των παραλλαγών εντοπίζεται σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων ή σε μέσο-γονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος και ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των *cis*-ρυθμιζόμενων lncRNAs και αντίστοιχων SNPs (53). Μάλιστα, στον καρκίνο του προστάτη ένα συγκεκριμένο SNP (rs7463708) στον υποκινητή του lncRNA PCAT1 συμβάλλει στην ενισχυμένη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα ONECUT2 (που έχει δραστικό ρόλο στην ογκογένεση γενικά) με αποτέλεσμα το lncRNA γονίδιο να αυξορρυθμίζεται (54). Στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου SNPs σε γονίδια lncRNAs, όπως του AMFR, EVX1 και ZNF33B ενδέχεται να μειώνουν την ευαισθησία της ασθένειας και γενικότερα έχει υποστηριχθεί ότι η παρουσία SNPs σε lncRNAs μετριάζουν την ανάπτυξη της νόσου (55). Γενετικές παραλλαγές των lncRNAs ενδέχεται να επηρεάζουν την δευτεροταγή δομή τους και κατ' επέκταση την ικανότητα

δέσμευσης με miRNAs – στόχους (53). Επιπλέον, άμεσα σχετιζόμενη με τα προαναφερόμενα είναι η περίπτωση του ογκογόνου lncRNA CCAT1 ή onco-lncRNA-40, κλινικά σημαντικού βιοδείκτη, το οποίο συσχετίστηκε με τον πολυμορφισμό SNP rs6983267 (είναι συσχετισμένος με τον καρκίνο). Το SNP αυτό, μάλιστα, εντοπίζεται στην περιοχή ενός υπερ-ενισχυτή του ανθρώπινου γονιδιώματος, όπως αποδείχθηκε (56), και είναι συνυφασμένος με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου (57).

Αναφορικά με την παρουσία σημειακών πολυμορφισμών σε μη-κωδικοποιητικές αλληλουχίες και ιδιαίτερα σε γονιδιωματικές περιοχές ενισχυτών και υποκινητών, έχει εντοπιστεί ότι η αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών SNPs τα οποία εδράζονται σε δύο διαφορετικά lncRNAs HOTAIR και HOTTIP αυξάνει έντονα τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου και μάλιστα, σε μεγαλύτερο βαθμό από τις αντίστοιχες επιδράσεις κάθε μεμονωμένου SNP (58). Επίσης έχει μελετηθεί η συσχέτιση μεταλλάξεων σε μη κωδικές ρυθμιστικές περιοχές φλεγμονωδών γονιδίων, γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα αποτοξίνωσης και ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ογκογονιδίων με την εμφάνιση και πρόγνωση γαστρικού καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, SNP στην θέση -31 από την θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της ιντερλευκίνης-1B (IL-1B) σχετιζόταν με την αναστολή της έκκρισης γαστρικού οξέος, στον υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) με αύξηση της έκφρασης του γονιδίου άρα και ενισχυμένη ανοσοκαταστολή, και στην θέση -160 του γονιδίου της καδερίνης-1 (CDH-1) όπου υφίστανται υπερμεθυλίωση DNA. Όσον αφορά την σχέση του SNP σε έναν ενισχυτή με τα επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης αναφέρεται ότι για παράδειγμα, στην περίπτωση του γονιδίου ARL4C (ADP-ribosylation factor-like 4C) η ακετυλίωση της ιστόνης H3 στο 27^ο κατάλοιπο λυσίνης (H₃K₂₇Ac) αυξάνεται σε ενισχυτές που διαθέτουν αλληλόμορφο SNP (A), παρατήρηση που υποδηλώνει ότι δυνητικά το συγκεκριμένο αλληλόμορφο ρυθμίζει ανοδικά το γονίδιο αυτό. Η περιοχή του ενισχυτή όπου εδρεύει το συγκεκριμένο SNP αλληλόμορφο παρουσιάζει αλληλεπιδράσεις με την περιοχή του αντίστοιχου υποκινητή του γονιδίου. Μάλιστα, σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο με αυξημένη έκφραση του ARL4C παρατηρήθηκε μειωμένη συνολική επιβίωση συγκριτικά με δείγματα γαστρικού καρκίνου χαμηλής έκφρασης ARL4C (59). Ακριβώς επειδή υπάρχουν πολλές συσχετίσεις του καρκίνου με τους πολυμορφισμούς SNP, τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, την επιρροή των ρυθμιστικών στοιχείων και τα lncRNAs, διεξάγονται και αρκετές μελέτες για να αποδειχθεί αν τελικά όλα τα παραπάνω συνδυάζονται μεταξύ τους. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει γίνει προσπάθεια συσχέτισης των πολυμορφισμών με τα επίπεδα έκφρασης υποψήφιων γονιδίων mRNAs και lncRNAs, εφόσον η προσέγγιση αφορούσε τον έλεγχο ενός SNP σε χρωμοσωματική περιοχή ενισχυτή το οποίο επιδρούσε στην έκφραση γονιδίων mRNAs και lncRNAs μέσω αλληλεπιδράσεων υποκινητή-ενισχυτή και τελικά αυξανόταν ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου. Μάλιστα, το συγκεκριμένο lncRNA λειτουργούσε ως μεταγραφικός ενεργοποιητής της έκφρασης καθοδικού mRNA γονιδίου

mRNA, το οποίο δυνητικά αποτελούσε ογκογονίδιο με επίδραση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και στον μεταβολισμό του ογκογόνου μορίου της προσταγλαδίνης E (60).

Το σύστημα CRISPR/Cas9, γενικότερα, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη στόχευση του γονιδιωματικού DNA σε καρκινικά κύτταρα και ζωικά μοντέλα καρκίνου, π.χ. μέσω εισαγωγής μεταλλάξεων που οδηγούν στην σίγηση γονιδίων μέσω καταστροφής ρυθμιστικών στοιχείων. Για παράδειγμα, το lncRNA GMAN είναι ένα lncRNA που σχετίζεται με την μετάσταση στον γαστρικό καρκίνο και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Η αξιοποίηση του συστήματος CRISPR/Cas9 για άμεση στόχευση του GMAN είχε ως αποτέλεσμα την σίγηση του γονιδίου, η οποία προκάλεσε την, σε σημαντικό βαθμό, κατάπαυση της μετάστασης των γαστρικών καρκινικών κυττάρων και την βελτίωση της συνολικής επιβίωσης σε ποντίκια (61). Άλλο παράδειγμα lncRNA το οποίο έχει μελετηθεί μέσω σίγησης με τεχνολογία CRISPR/Cas9 (knock-out), αποτελεί το PVT1 που υπερεκφράζεται στον γαστρικό καρκίνο (62). Ειδικότερα για την εφαρμογή του συστήματος CRISPR παρούσα νικάσης Cas9 ως ενδονουκλεάση αναφέρεται ότι είναι σπάνια σε αξιοποίηση, με βάση τις βιβλιογραφικές πηγές, κυρίως όσον αφορά τις προσεγγίσεις για τον καρκίνο. Ωστόσο, υπάρχει παράδειγμα εφαρμογής του συστήματος CRISPR/hCas9 το οποίο στοχεύει στο γονίδιο του υποδοχέα ουροκινάσης και προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων νευροβλαστώματος. Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ζεύγος sgRNAs παρουσία της ενδονουκλεάσης hCas9. Οι αλληλουχίες των sgRNAs εισήχθησαν ξεχωριστά σε δύο διαφορετικά πλασμίδια, ενώ είναι συμπληρωματικά με το γονίδιο του υποδοχέα της ουροκινάσης. Η δράση του συστήματος οδήγησε πρώτον, σε δίκλωνες ρήξεις στο DNA που ενεργοποίησαν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ), και δεύτερον σε μετάλλαξη μετατόπισης του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου κοντά στο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης με αποτέλεσμα των πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής του γονιδίου – στόχου (περίπτωση knock-out) (63). Άλλο παράδειγμα αξιοποίησης του συστήματος CRISPR/hCas9 αποτελεί η σίγηση του γονιδίου BIRC5 σε κυτταρική σειρά καρκίνου των ωοθηκών. Στην δεδομένη εφαρμογή χρησιμοποιούνται δύο gRNAs που στοχεύουν στο εξόνιο 1 του γονιδίου, παρουσία νικάσης Cas9 και εν τέλει παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της μετάβασης από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (φαινόμενο EMT) στα καρκινικά κύτταρα (64).

Γενικότερα, οι περιπτώσεις στις οποίες, η εφαρμογή συστημάτων CRISPR/Cas9 έχει προσεγγιστεί ερευνητικά με στόχο την επεξεργασία ενισχυτών και υποκινητών είναι περιορισμένες (ειδικότερα οι εφαρμογές knock-in και η χρήση nickase Cas9). Ένα σχετικό παράδειγμα αφορά την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με τροποποίηση του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή σε επιγενετική βάση μέσω συστήματος CRISPR/Cas9, με άμεσο σκοπό την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Στην μελέτη αυτή, δινουκλεοτίδια στις νησίδες CpG του υποκινητή αντικαταστάθηκαν με μη-μεθυλιωμένα

δινουκλεοτίδια μέσω επεξεργασίας παρουσία μεταλλαγμένης ενδονουκλεάσης Cas9 (dCas9) συντηγμένης με καταλυτική περιοχή ενζύμου που μεταβάλλει την μεθυλιωμένη κυτοσίνη. Στο σύστημα συμπεριλήφθηκαν τέσσερα sgRNAs που στόχευαν σε μεμονωμένες θέσεις CpG στον υποκινητή ως πρότυπο επιδιόρθωσης DNA που να μεσολαβεί για την HDR χρησιμοποιήθηκαν πέντε πλασμίδια με συγκεκριμένες μη-μεθυλιωμένες δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες το καθένα και βραχίονες ομολογίας. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Oct4 προσδιορίστηκαν με RT-PCR (65). Μια άλλη περίπτωση, αφορά στην μελέτη του PANDAR (υποκινητής του αντι-νοηματικού RNA CDKN1A που ενεργοποιείται από βλάβη στο DNA, και αποτελεί lncRNA) σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο στους οποίους το συγκεκριμένο γονίδιο αυξορρυθμίζεται και παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του CDKN1A με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Πραγματοποιήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης (knock-out) του γονιδίου PANDAR μέσω CRISPR/Cas9, δεν υπήρχε αλληλεπίδραση του PANDAR με το CDKN1A και παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης γαστρικού καρκινικού όγκου *in vivo*. Αυτή η προσέγγιση επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία του PANDAR ως βιοδείκτη για τον γαστρικό καρκίνο (66).

Επιπλέον, πάνω από 70.000 ενισχυτές έχουν συσχετιστεί με γαστρικό καρκίνο *in vivo*, πολλοί από αυτούς έχουν την ονομασία και ιδιότητα των υπερ-ενισχυτών (super - enhancers) και διαφέρουν από τους κανονικούς ενισχυτές. Γίνονται προσπάθειες πρόβλεψης των αλληλεπιδράσεων ενισχυτή-υποκινητή και εντοπισμού μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών SNPs σε αυτούς, καθώς και μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου, όχι όμως μέσω επεξεργασίας του γονιδιώματος με τεχνολογία CRISPR/Cas9 στην προκειμένη περίπτωση (67). Μάλιστα η έκφραση του γονιδίου ARL4C που αναφέρεται και παρακάτω, διαφέρει μεταξύ των ασθενών λόγω διαφορών των αντίστοιχων ενισχυτών ως προς τα SNPs που εντοπίζονται στην αλληλουχία τους, προσδίδοντας έτσι φαινοτυπική ετερογένεια στην νόσο (67). Παράλληλα, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στον έλεγχο και των υποκινητών γονιδίων lncRNAs που συσχετίζονται με τον γαστρικό καρκίνο (και με τον καρκίνο γενικότερα) στα πλαίσια του προσδιορισμού ρυθμιστικών στοιχείων lncRNAs. Για παράδειγμα, σχετική είναι η περίπτωση συμβολής πολυμορφισμού SNP rs145204276 που εδράζεται στον υποκινητή του lncRNA GAS5, στην ανάπτυξη και στην διαδικασία μετάστασης του γαστρικού καρκίνου(68).

Η έρευνα και η μελέτη των lncRNAs ως εν δυνάμει βιοδείκτες στον γαστρικό καρκίνο είναι ένα πολυδιάστατο και πολύπλευρο ζήτημα. Μπορεί να προσεγγιστεί από την πλευρά ελέγχου των αναδιαμορφώσεων χρωματίνης, των επιγενετικών αλλαγών, των ρυθμιστικών στοιχείων, της σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων και από διάφορες άλλες οπτικές που προκύπτουν από τους ρόλους των lncRNAs στο κύτταρο, την γονιδιακή ρύθμιση και κατ' επέκταση στον καρκίνο. Ειδικότερα για τα ρυθμιστικά στοιχεία, δηλαδή τους υποκινητές και τους ενισχυτές, η μελέτη των αλληλουχιών τους και των αλλαγών σε αυτές π.χ. λόγω μεταλλαξογένεσης είναι ιδιαίτερα σημαντικό

ερευνητικό κομμάτι αφού αποτελούν μια αφετηρία για την τροποποίηση της έκφρασης τόσο των ελεγχόμενων από αυτά γονιδίων lncRNAs, όσο και γειτονικών γονιδίων που αποτελούν στόχοι των αντίστοιχων lncRNAs, ενώ εξελικτικά δεν είναι καθόλου τυχαία η παρουσία πολλαπλών ρυθμιστικών αλληλουχιών σε διάφορες γονιδιωματικές περιοχές και ιδιαίτερα σε σημεία όπου εδράζονται μη-κωδικοποιητικά γονίδια, όπως εκείνα των lncRNAs.

1. Iwu CD, Iwu-Jaja CJ. Gastric Cancer Epidemiology: Current Trend and Future Direction. *Hygiene*. 2023;3(3).
2. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. Vol. 14, *Przegląd Gastroenterologiczny*. 2019.
3. Morgan E, Arnold M, Camargo MC, Gini A, Kunzmann AT, Matsuda T, et al. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *EClinicalMedicine*. 2022;47.
4. Yusefi AR, Lankarani KB, Bastani P, Radinmanesh M, Kavosi Z. Risk factors for gastric cancer: A systematic review. Vol. 19, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2018.
5. Bordonaro R, Piazza D, Sergi C, Cordio S, Tomaselli S, Gebbia V. Out-of-pocket costs in gastrointestinal cancer patients: Lack of a perfectly framed problem contributing to financial toxicity. Vol. 167, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2021.
6. Bonelli P, Borrelli A, Tuccillo FM, Silvestro L, Palaia R, Buonaguro FM. Precision medicine in gastric cancer. Vol. 11, *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2019.
7. Rodriquenz MG, Roviello G, D'angelo A, Lavacchi D, Roviello F, Polom K. Msi and ebv positive gastric cancer's subgroups and their link with novel immunotherapy. Vol. 9, *Journal of Clinical Medicine*. 2020.
8. Chia NY, Tan P. Molecular classification of gastric cancer. Vol. 27, *Annals of Oncology*. 2016.
9. Hallinan JTPD, Venkatesh SK. Gastric carcinoma: imaging diagnosis, staging and assessment of treatment response. Vol. 13, *Cancer Imaging*. 2013.
10. Jiang T, Mei L, Yang X, Sun T, Wang Z, Ji Y. Biomarkers of gastric cancer: current advancement. Vol. 8, *Heliyon*. 2022.
11. Necula L, Matei L, Dragu D, Neagu AI, Mambet C, Nedeianu S, et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World J Gastroenterol*. 2019;25(17).
12. Jiang MC, Ni JJ, Cui WY, Wang BY, Zhuo W. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am J Cancer Res*. 2019;9(7).
13. Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, Raghuwanshi S, Palapati A, Gutti RK. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. Vol. 112, *Molecular Immunology*. 2019.
14. Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, Carpenter S, Chang HY, Chen LL, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2023;24(6).
15. Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017.

16. Chowdhary A, Satagopam V, Schneider R. Long Non-coding RNAs: Mechanisms, Experimental, and Computational Approaches in Identification, Characterization, and Their Biomarker Potential in Cancer. Vol. 12, *Frontiers in Genetics*. 2021.
17. Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. Vol. 22, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021.
18. Gao Y, Wang JW, Ren JY, Guo M, Guo CW, Ning SW, et al. Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application. Vol. 26, *World Journal of Gastroenterology*. 2020.
19. Fijneman RJA, Anderson RA, Richards E, Liu J, Tijssen M, Meijer GA, et al. Runx1 is a tumor suppressor gene in the mouse gastrointestinal tract. *Cancer Sci*. 2012;103(3).
20. Xu TP, Liu XX, Xia R, Yin L, Kong R, Chen WM, et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene*. 2015;34(45).
21. Qi F, Liu X, Wu H, Yu X, Wei C, Huang X, et al. Long noncoding AGAP2-AS1 is activated by SP1 and promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1).
22. Tan H, Zhang S, Zhang J, Zhu L, Chen Y, Yang H, et al. Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications. Vol. 10, *Theranostics*. 2020.
23. Moazzen H, Rajabi A, Safaralizadeh R. Up-regulation of BOK-AS1, FAM215A and FEZF1-AS1 lncRNAs and their potency as moderate diagnostic biomarkers in gastric cancer. *Pathol Res Pract*. 2023;248.
24. Ren A, Li Q, Guo Y, Cui X, Wang L, Huo Y, et al. Low expression of lncRNA APTR promotes gastric cancer progression. *Transl Oncol*. 2022;25.
25. Mostaghimi T, Bahadoran E, Bakht M, Taheri S, Sadeghi H, Babaei A. Role of lncRNAs in Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus associated gastric cancers. Vol. 336, *Life Sciences*. 2024.
26. Sun W, Yang Y, Xu C, Xie Y, Guo J. Roles of long noncoding RNAs in gastric cancer and their clinical applications. Vol. 142, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2016.
27. Claringbould A, Zaugg JB. Enhancers in disease: molecular basis and emerging treatment strategies. Vol. 27, *Trends in Molecular Medicine*. 2021.
28. Thomas HF, Buecker C. What is an enhancer? *BioEssays*. 2023;45(10).
29. Carullo NVN, Day JJ. Genomic enhancers in brain health and disease. Vol. 10, *Genes*. 2019.
30. Carelli FN, Liechti A, Halbert J, Warnefors M, Kaessmann H. Repurposing of promoters and enhancers during mammalian evolution. *Nat Commun*. 2018;9(1).
31. Wu Z, Liu X, Liu L, Deng H, Zhang J, Xu Q, et al. Regulation of lncRNA expression. *Cell Mol Biol Lett*. 2014;19(4).
32. Zhao J, Faryabi RB. Spatial promoter–enhancer hubs in cancer: organization, regulation, and function. Vol. 9, *Trends in Cancer*. 2023.

33. Chen W, Xiao J, Shi L, Lin L, Jiang M, Ge Y, et al. Association of TP73-AS1 gene polymorphisms with the risk and survival of gastric cancer in a Chinese Han Population. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1).
34. Li K, Liu Y, Cao H, Zhang Y, Gu Z, Liu X, et al. Interrogation of enhancer function by enhancer-targeting CRISPR epigenetic editing. *Nat Commun.* 2020;11(1).
35. Ma Y, Zhang L, Huang X. Genome modification by CRISPR/Cas9. Vol. 281, *FEBS Journal.* 2014.
36. Kashtwari M, Mansoor S, Wani AA, Najar MA, Deshmukh RK, Baloch FS, et al. Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: opportunities, challenges and genome editing prospects. Vol. 49, *Molecular Biology Reports.* 2022.
37. Balon K, Sheriff A, Jacków J, Łaczmański Ł. Targeting Cancer with CRISPR/Cas9-Based Therapy. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences.* 2022.
38. Perincheri S, Hui P. KRAS mutation testing in clinical practice. Vol. 15, *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2015.
39. Cheung AHK, Chow C, Zhang J, Zhou Y, Huang T, Ng KCK, et al. Specific targeting of point mutations in EGFR L858R-positive lung cancer by CRISPR/Cas9. *Laboratory Investigation.* 2018;98(7).
40. Mahato RK, Bhattacharya S, Khullar N, Sidhu IS, Reddy PH, Bhatti GK, et al. Targeting long non-coding RNAs in cancer therapy using CRISPR-Cas9 technology: A novel paradigm for precision oncology. Vol. 379, *Journal of Biotechnology.* 2024.
41. S. Zibitt M, Hartford CCR, Lal A. Interrogating lncRNA functions via CRISPR/Cas systems. *RNA Biol.* 2021;18(12).
42. Goyal A, Myacheva K, Groß M, Klingenberg M, Duran Arqué B, Diederichs S. Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(3).
43. Trevino AE, Zhang F. Genome editing using cas9 nickases. In: *Methods in Enzymology.* 2014.
44. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. XErratum: Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity (*Cell* (2013) 154 (1380-1389)). Vol. 155, *Cell.* 2013.
45. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. XErratum: Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity (*Cell* (2013) 154 (1380-1389)). Vol. 155, *Cell.* 2013.
46. Ranawakage DC, Okada K, Sugio K, Kawaguchi Y, Kuninobu-Bonkohara Y, Takada T, et al. Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Knock-In of Composite Tags in Zebrafish Using Long ssDNA as a Donor. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8.
47. Lau CH, Tin C, Suh Y. CRISPR-based strategies for targeted transgene knock-in and gene correction. *Fac Rev.* 2020;9.
48. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. SsODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun.* 2016;7.

49. Mathew SM. Strategies for generation of mice via CRISPR/HDR-mediated knock-in. *Mol Biol Rep.* 2023;50(4).
50. Barati T, Haddadi M, Sadeghi F, Muhammadnejad S, Muhammadnejad A, Heidarian R, et al. AGS cell line xenograft tumor as a suitable gastric adenocarcinoma model: Growth kinetic characterization and immunohistochemistry analysis. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(7).
51. Jin H, Du W, Huang W, Yan J, Tang Q, Chen Y, et al. lncRNA and breast cancer: Progress from identifying mechanisms to challenges and opportunities of clinical treatment. Vol. 25, *Molecular Therapy Nucleic Acids.* 2021.
52. Yi T, Song Y, Zuo L, Wang S, Miao J. LINC00470 Stimulates Methylation of PTEN to Facilitate the Progression of Endometrial Cancer by Recruiting DNMT3a Through MYC. *Front Oncol.* 2021;11.
53. Minotti L, Agnoletto C, Baldassari F, Corrà F, Volinia S. SNPs and somatic mutation on long non-coding RNA: New frontier in the cancer studies? Vol. 7, *High-Throughput.* 2018.
54. Guo H, Ci X, Ahmed M, Hua JT, Soares F, Lin D, et al. ONECUT2 is a driver of neuroendocrine prostate cancer. *Nat Commun.* 2019;10(1).
55. Duan F, Jiang J, Song C, Wang P, Ye H, Dai L, et al. Functional long non-coding RNAs associated with gastric cancer susceptibility and evaluation of the epidemiological efficacy in a central Chinese population. *Gene.* 2018;646.
56. Kim T, Cui R, Jeon YJ, Lee JH, Lee JH, Sim H, et al. Long-range interaction and correlation between MYC enhancer and oncogenic long noncoding RNA CARLo-5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(11).
57. Mahato RK, Bhattacharya S, Khullar N, Sidhu IS, Reddy PH, Bhatti GK, et al. Targeting long non-coding RNAs in cancer therapy using CRISPR-Cas9 technology: A novel paradigm for precision oncology. Vol. 379, *Journal of Biotechnology.* 2024.
58. Abdi E, Latifi-Navid S, Zahri S, Kholghi-Oskooei V, Mostafaiy B, Yazdanbod A, et al. SNP-SNP interactions of oncogenic long non-coding RNAs HOTAIR and HOTTIP on gastric cancer susceptibility. *Sci Rep.* 2020;10(1).
59. Sandoval-Bórquez A, Saavedra K, Carrasco-Avino G, Garcia-Bloj B, Fry J, Wichmann I, et al. Noncoding Genomics in Gastric Cancer and the Gastric Precancerous Cascade: Pathogenesis and Biomarkers. Vol. 2015, *Disease Markers.* 2015.
60. Tian J, Lou J, Cai Y, Rao M, Lu Z, Zhu Y, et al. Risk SNP-mediated enhancer–promoter interaction drives colorectal cancer through both FADS2 and AP002754.2. *Cancer Res.* 2020;80(9).
61. Zhuo W, Liu Y, Li S, Guo D, Sun Q, Jin J, et al. Long Noncoding RNA GMAN, Up-regulated in Gastric Cancer Tissues, Is Associated With Metastasis in Patients and Promotes Translation of Ephrin A1 by Competitively Binding GMAN-AS. *Gastroenterology.* 2019;156(3).
62. Mahato RK, Bhattacharya S, Khullar N, Sidhu IS, Reddy PH, Bhatti GK, et al. Targeting long non-coding RNAs in cancer therapy using CRISPR-Cas9 technology: A novel paradigm for precision oncology. Vol. 379, *Journal of Biotechnology.* 2024.

63. Rysenkova KD, Semina E V., Karagyaur MN, Shmakova AA, Dyikanov DT, Vasiluev PA, et al. CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation. *Oncotarget*. 2018;9(50).
64. Zhao G, Wang Q, Gu Q, Qiang W, Wei JJ, Dong P, et al. Lentiviral CRISPR/Cas9 nickase vector mediated BIRC5 editing inhibits epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(55).
65. Kang JG, Park JS, Ko JH, Kim YS. Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system. *Sci Rep*. 2019;9(1).
66. Liu J, Ben Q, Lu E, He X, Yang X, Ma J, et al. Long noncoding RNA PANDAR blocks CDKN1A gene transcription by competitive interaction with p53 protein in gastric cancer. *Cell Death Dis*. 2018;9(2).
67. Sheng T, Ho SWT, Ooi WF, Xu C, Xing M, Padmanabhan N, et al. Integrative epigenomic and high-throughput functional enhancer profiling reveals determinants of enhancer heterogeneity in gastric cancer. *Genome Med*. 2021;13(1).
68. Li Q, Ma G, Sun S, Xu Y, Wang B. Polymorphism in the promoter region of lncRNA GAS5 is functionally associated with the risk of gastric cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2018;42(5).