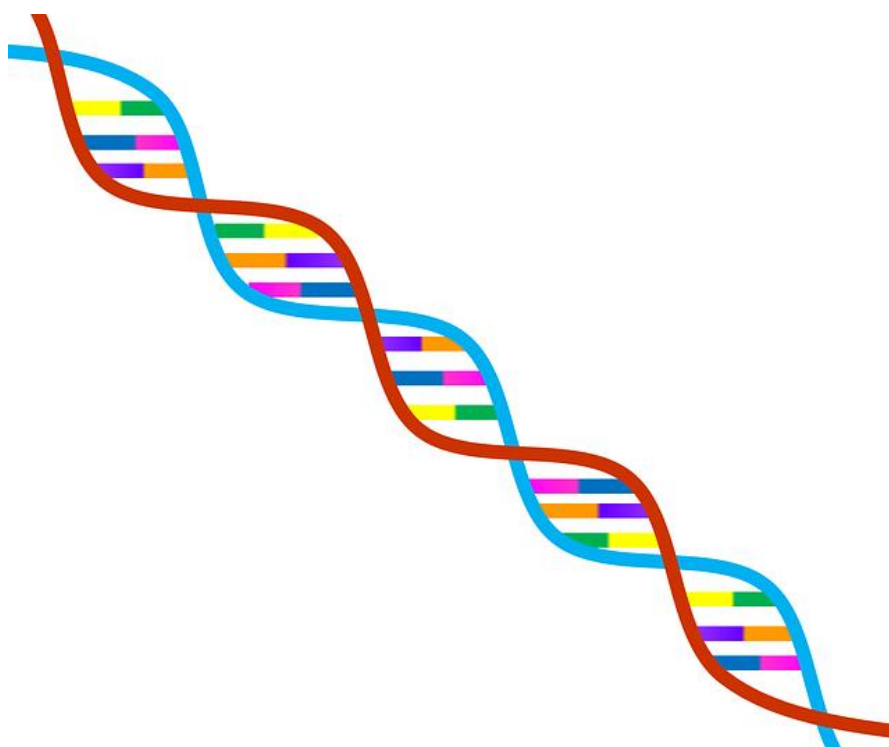


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιοματικής



**«Αποσιώπηση μιας RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης με συστήματα
επαγωγίμου RNAi στον γαστρικό καρκίνο»**

**“Silencing of an RNA-binding protein with inducible RNAi systems
in gastric cancer”**

Δρόσος Χρίστος του Ιωάννη

Λάρισα, 2025

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων:

- **Γιακουντής Αντώνιος**, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- **Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Μπελούκας Απόστολος**, Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το έτος 2025. Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Αντώνιο Γιακουντή, για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά και τον κύριο Απόστολο Μπελούκα για την συμμετοχή τους στην συμβουλευτική επιτροπή. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τις συμφοιτήτριες μου, Αθηνά Καψή και Ανθή Νικολαΐδου για την άψογη συνεργασία μας. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου για την διαρκή στήριξη και συμπαράσταση της σε κάθε μου προσπάθεια.

Περιεχόμενα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	1
Ευχαριστίες	2
Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Γαστρικός Καρκίνος	8
1.1.1 Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου	8
1.1.2 Ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου	9
1.1.3 Ιστολογική ταξινόμηση	9
1.1.4 Μοριακή Ταξινόμηση	12
1.1.5 Υφιστάμενες μέθοδοι διάγνωσης	14
1.2 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNA / lncRNA)	15
1.2.1 Χαρακτηρισμός των μη κωδικοποιητικών RNA	15
1.2.2 Ταξινόμηση των lncRNA	16
1.2.3 Ιδιότητες των lncRNA	17
1.2.4 Τα lncRNA στον καρκίνο	18
1.2.5 Υγρή Βιοψία και lncRNA.....	19
1.3 Μια ιδιαίτερη κατηγορία: cis-acting lncRNA	19
1.3.1 Χαρακτηρισμός των cis-acting lncRNA	19
1.3.2 Μηχανισμοί δράσης των cis-acting lncRNA	20
1.4 Σίγηση μέσω του μηχανισμού RNAi	22
1.4.1 Μηχανισμός δράσης του RNAi	22
1.4.2 Επαγόμενο σύστημα Tet και RNAi	23
1.4.3 Το επαγόμενο σύστημα Tet-on	24
2. Σκοπός	26
3. Υλικά και Μέθοδοι	27
3.1 Υλικά	27
3.1.1 Κυτταρική σειρά AGTR13	27
3.1.2 Πλασμιδιακός φορέας pTER	27
3.1.3 Πλασμιδιακός φορέας AIO-Puro	28

3.2 Μέθοδοι	29
3.2.1 Σύστημα επαγωγίμου RNAi	29
3.2.1.1 Επιβεβαίωση της ύπαρξης του shRNA στον φορέα pTER	29
3.2.1.2 Γραμμοποίηση του φορέα pTER	30
3.2.1.3 Διαμόλυνση των κυττάρων AGTR13	30
3.2.1.4 Απομόνωση RNA από τους κλώνους που διαμολύνθηκαν με τον pTER	32
3.2.1.5 Κατεργασία του RNA με DNάση	32
3.2.1.6 Σύνθεση του cDNA από τα δείγματα RNA	33
3.2.1.7 qPCR ελέγχου των επιπέδων έκφρασης διαφόρων γονιδίων	34
3.2.1.8 Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (CFA- Colony Formation Assay)	34
3.2.1.9 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay)	35
3.2.2 Προετοιμασία του φορέα AIO-Puro για μελλοντικό πείραμα CRISPR-nCas9...	36
3.2.2.1 Υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων (sgRNA1 και sgRNA2)	36
3.2.2.2 Πέψη του AIO-Puro και εκχύλιση από πήκτωμα αγαρόζης	36
3.2.2.3 Κλωνοποίηση του κομμένου AIO-Puro με το sgRNA1 και μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli DH5a	37
3.2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και διαγνωστική PCR για το sgRNA1	38
3.2.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον θετικό κλώνο με εμπορικές μεθόδους	39
3.2.2.6 PCR επιβεβαίωσης στον πλασμιδιακό φορέα και πέψη του με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο	40
3.2.2.7 Κλωνοποίηση του κομμένου AIO-Puro-sgRNA1 με το sgRNA2 και μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli DH5a	41
3.2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και διαγνωστική PCR για το sgRNA2	41
3.2.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον θετικό κλώνο με εμπορικές μεθόδους	42
3.2.2.10 PCR επιβεβαίωσης της ένθεσης των sgRNA1+2 στον πλασμιδιακό φορέα.	42
3.2.2.11 Γραμμοποίηση του κλωνοποιημένου φορέα AIO-Puro-sgRNA1+2	43
4. Αποτελέσματα.....	45
4.1 Αποσιώπηση μιας RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης με συστήματα επαγωγίμου RNAi	45
4.1.1 Έλεγχος της ύπαρξης του shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pTER.....	45
4.1.2 Γραμμοποίηση του κλωνοποιημένου φορέα pTER.....	46

4.1.3 Διαμόλυνση των κυττάρων AGTR13 με τον πλασμιδιακό φορέα pTER, συλλογή κλώνων και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του mRNA στόχου CPR	46
4.1.4 Επιβεβαίωση της σίγησης του mRNA στόχου CPR στον κλώνο 26 σε ανεξάρτητο πείραμα και σύγκριση της έκφρασης του lncRNA RECUR1	48
4.1.5 Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay).....	49
4.1.6 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay)	52
4.1.7 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων-δεικτών	53
4.1.8 Έλεγχος της παραγωγής του mRNA του καταστολέα TET	54
4.2 Προετοιμασία του φορέα AIO-Puro για μεταλλαξιγένεση του υποκινητή του γονιδίου-στόχου με CRISPR-nCas9	55
4.2.1 Πέψη του άδειου πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro	55
4.2.2 Έλεγχος της κλωνοποίησης του sgRNA1 με PCR για επιλογή θετικών αποικιών	56
4.2.3 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro-sgRNA1	58
4.2.4 Έλεγχος της κλωνοποίησης του sgRNA2 με PCR για επιλογή θετικών αποικιών	59
4.2.5 PCR επιβεβαίωσης της ύπαρξης των sgRNA1+2 στον θετικό κλώνο	59
4.2.6 Γραμμοποίηση του AIO-Puro-sgRNA1+2	60
5. Συζήτηση	62
6. Βιβλιογραφία	66

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί τον 5^ο πιο συχνό και 4^ο πιο θανατηφόρο τύπο καρκίνου παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από ετερογένεια και απουσία πρώιμων συμπτωμάτων, ενώ οι υφιστάμενες διαγνωστικές μέθοδοι είναι παρεμβατικές και δαπανηρές, γεγονός που καθιστά αναγκαία την αναζήτηση νέων μοριακών βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) συμμετέχουν σε πολλές ρυθμιστικές διεργασίες και παρουσιάζουν καρκινοειδική δράση. Επίσης, μπορούν να ανιχνευτούν σε σωματικά υγρά επιτρέποντας την μη επεμβατική διάγνωση της νόσου. Στην παρούσα πτυχιακή διερευνήθηκε ο ρόλος μίας RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης που πιθανολογείται ότι αλληλεπιδρά με το lncRNA RECUR1 και επιδρά ογκοεπαγωγικά στον γαστρικό καρκίνο. Δημιουργήθηκε μία σταθερή κυτταρική σειρά γαστρικού αδενοκαρκινώματος με επαγωγίμο σύστημα RNAi, το οποίο επιτρέπει την αναστρέψιμη και ελεγχόμενη σίγηση του γονιδίου-στόχου. Η σίγηση επιβεβαιώθηκε με qPCR και συσχετίστηκε με μεταβολές στην έκφραση του lncRNA RECUR1. Για την μελέτη του φαινοτύπου που προκύπτει από την σίγηση, πραγματοποιήθηκαν λειτουργικές δοκιμασίες όπως η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay), η δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay), καθώς και ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων-δεικτών για καρκινοειδικές διεργασίες. Επιπλέον, κλωνοποιήθηκαν δύο sgRNA στον φορέα AIO-Puro, με στόχο την καταστολή του υποκινητή του γονιδίου-στόχου σε μελλοντικά πειράματα, προσφέροντας μία εναλλακτική προσέγγιση σίγησης. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η RNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη συνεργάζεται με το γειτονικό lncRNA RECUR1 με πιθανή *cis-acting* δράση, συμβάλλοντας στην καρκινογένεση. Η εργασία αυτή προσφέρει νέα δεδομένα για τους μοριακούς μηχανισμούς του γαστρικού καρκίνου και θέτει βάσεις για την αξιοποίηση νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών στόχων στο μέλλον.

Abstract

Gastric cancer is the fifth most common and fourth most lethal type of cancer worldwide. It is characterized by heterogeneity and the absence of early symptoms, while current diagnostic methods are invasive and costly, highlighting the urgent need for novel molecular biomarkers and therapeutic targets. Long non-coding RNA (lncRNA) participate in numerous regulatory processes and often display cancer-specific expression. They can also be detected in body fluids, enabling non-invasive disease diagnosis. In this thesis, the role of an RNA-binding protein that is hypothesized to interact with the lncRNA RECUR1 and exert oncogenic effects in gastric cancer was investigated. A stable gastric adenocarcinoma cell line was generated with an inducible RNAi system, which allowed controlled and reversible silencing of the target gene. Silencing was validated by qPCR, which revealed changes in RECUR1 expression. To study the phenotype resulting from silencing, functional assays were performed, including Colony Formation Assay, Wound Healing Assay and analysis of the expression of selected marker genes for cancer-related processes. In addition, two sgRNA were cloned into the AIO-Puro vector, aiming at promoter knock-out of the target gene in future experiments, providing an alternative silencing strategy. Overall, the findings suggest that the RNA-binding protein cooperates with the neighboring lncRNA RECUR1, likely through *cis-acting* mechanisms, contributing to gastric carcinogenesis. This work provides new insights into the molecular mechanisms of gastric cancer and lays the foundation for the development of novel diagnostic and therapeutic targets in the future.

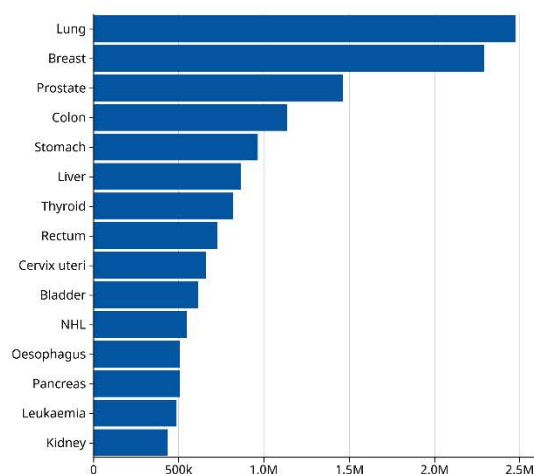
1. Εισαγωγή

1.1 Γαστρικός Καρκίνος

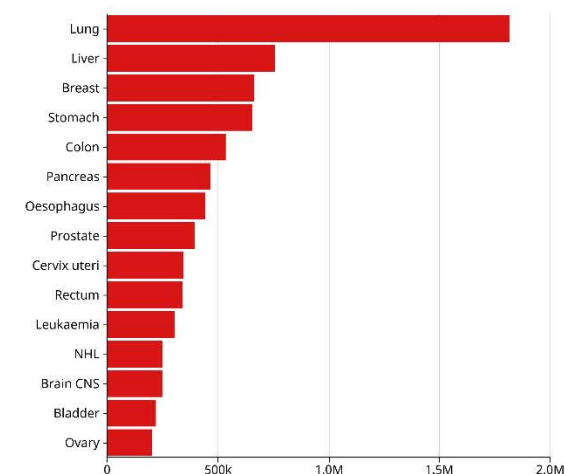
1.1.1 Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου

Ο γαστρικός καρκίνος ή αλλιώς καρκίνος του στομάχου είναι μια νόσος με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης, ενώ παράλληλα χαρακτηρίζεται από μεγάλη θνησιμότητα καθώς οδηγεί σε μεγάλο αριθμό θανάτων. [1] Συγκεκριμένα, ο γαστρικός καρκίνος είναι ο πέμπτος πιο συχνός τύπος καρκίνου παγκοσμίως και τέταρτος σε συχνότητα θανάτων (**Εικόνα 1.1**) [2]. Στην Ευρώπη, η θνησιμότητα παραμένει υψηλή για την συγκεκριμένη νόσο καθώς την κατατάσσει στην έκτη θέση, ενώ στην Ασία η νόσος κατατάσσεται τρίτη σε αριθμούς θανάτων. [3] Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης νόσου είναι ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών δεν επιβιώνουν, καθώς η διάγνωση γίνεται αφού η νόσος έχει ήδη μεταβεί σε προχωρημένα στάδια. [4] Τα στατιστικά αυτά αναδεικνύουν την ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθόδων για έγκαιρη διάγνωση της νόσου σε αρχικά στάδια, ενώ παράλληλα την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων μεθόδων καταπολέμησης της.

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022
World
(Top 15 cancer sites)



Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022
World
(Top 15 cancer sites)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version: Globocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2025

Number (in millions)

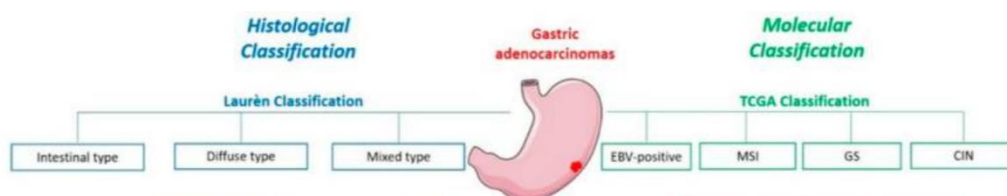
International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Εικόνα 1.1: Ραβδογράμματα συχνότητας εμφάνισης και θνησιμότητας του γαστρικού καρκίνου ανά τον κόσμο

Available from <https://gco.iarc.fr/today>

1.1.2 Ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

Ο αυξημένος αριθμός θανάτων που προκαλούνται από τον γαστρικό καρκίνο οφείλεται στην πολυπλοκότητα αλλά και την ετερογένεια της συγκεκριμένης νόσου. [5] Η στοχευμένη εύρεση της πιο κατάλληλης θεραπείας βασίζεται στην αναγνώριση των ιδιαιτεροτήτων που χαρακτηρίζουν τη νόσο σε κάθε ασθενή. [6] Όλα συγκλίνουν ότι ο χαρακτηρισμός κάθε μεμονωμένης περίπτωσης είναι απαραίτητος για την κατάλληλη αντιμετώπιση, καθώς πρέπει να γίνει πλήρως κατανοητή η παθογένεια της. Κάθε περίπτωση γαστρικού καρκίνου πρέπει να χαρακτηριστεί και να ταξινομηθεί ανάλογα τα μορφολογικά ή τα μοριακά χαρακτηριστικά της. [7] Συγκεκριμένα, η ιστολογική υποκατηγοριοποίηση της νόσου μπορεί να γίνει σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren, ενώ η μοριακή ταξινόμηση σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ερευνητικής κοινοπραξίας The Cancer Genome Atlas (TCGA). (Εικόνα 1.2)



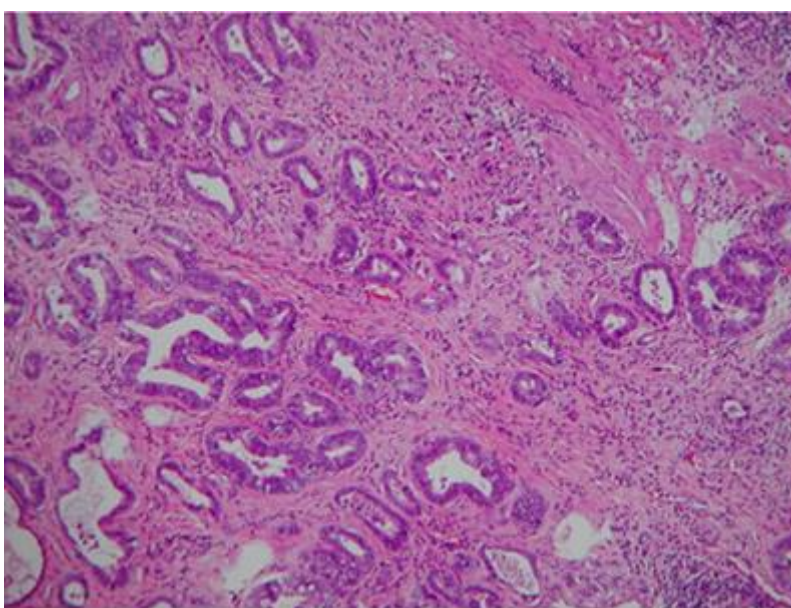
Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της ιστολογικής και μοριακής ταξινόμησης του γαστρικού καρκίνου
Edited from [7]

1.1.3 Ιστολογική ταξινόμηση

Ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να ταξινομηθεί σε κατηγορίες ανάλογα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που έχει σε κάθε περίπτωση. Η ιστολογική ταξινόμηση μπορεί να γίνει σύμφωνα με τα κριτήρια που θέτονται από το σύστημα κατά Lauren, το οποίο είναι ίσως το πιο διαδεδομένο σύστημα ιστολογικής ταξινόμησης της νόσου, καθώς χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη. [8] Η νόσος διαχωρίζεται σε τρεις υπότυπους όπου συγκεκριμένα είναι ο εντερικός υπότυπος (intestinal type), ο διάχυτος υπότυπος (diffuse type) αλλά και ο μεικτός υπότυπος (Mixed type), ο οποίος παρουσιάζει χαρακτηριστικά και από τους δύο άλλους υπότυπους. [9] Κάθε υπότυπος διακρίνεται από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπου τον εξειδικεύουν.

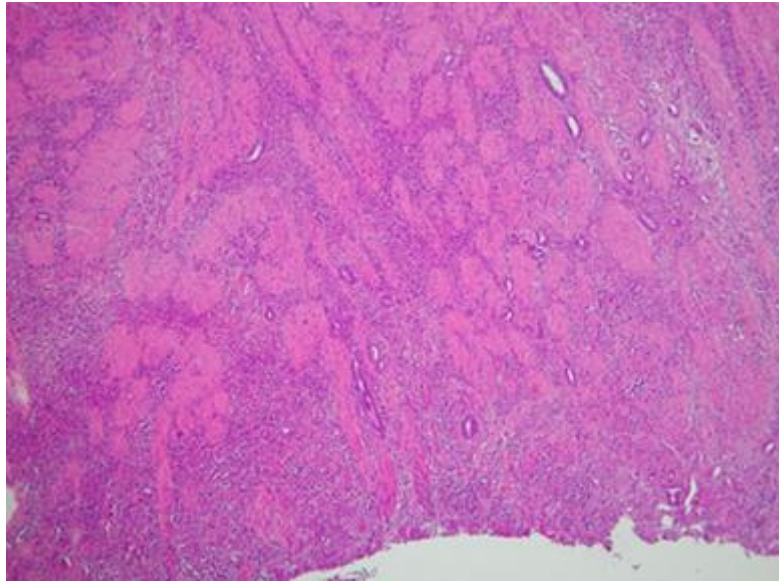
Ο εντερικός υπότυπος αποτελεί τον συχνότερο υπότυπο γαστρικού καρκίνου σε σχέση με τους άλλους υπότυπους με ποσοστό 54,4%. [8, 10] Φαίνεται ότι η συχνότερη ομάδα που εμφανίζεται ο συγκεκριμένος υπότυπος είναι άντρες μεγάλης ηλικίας, πιθανότατα λόγω του τρόπου ζωής τους. [9] Συγκεκριμένα, το κάπνισμα, οι κακές

διατροφικές συνήθειες και το αλκοόλ είναι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα για μεταπλασία των φυσιολογικών κυττάρων του στομάχου, δηλαδή την μετατροπή τους σε εντερικό επιθήλιο οδηγώντας τελικά στον εντερικό υπότυπο γαστρικού καρκίνου. [11] Βασικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων είναι η έντονη προσκόλληση μεταξύ τους, ενώ σχηματίζουν συμπαγείς σωληνοειδείς δομές. [\(Εικόνα 1.3\)](#). Ο συγκεκριμένος υπότυπος δεν είναι τόσο επιθετικός σε σχέση με τον διάχυτο υπότυπο, καθώς φαίνεται να οδηγεί πιο δύσκολα σε λεμφική διήθηση και μετάσταση. [8, 11, 12] Η πρόγνωση του υπότυπου αυτού είναι η καλύτερη έναντι των άλλων δύο.



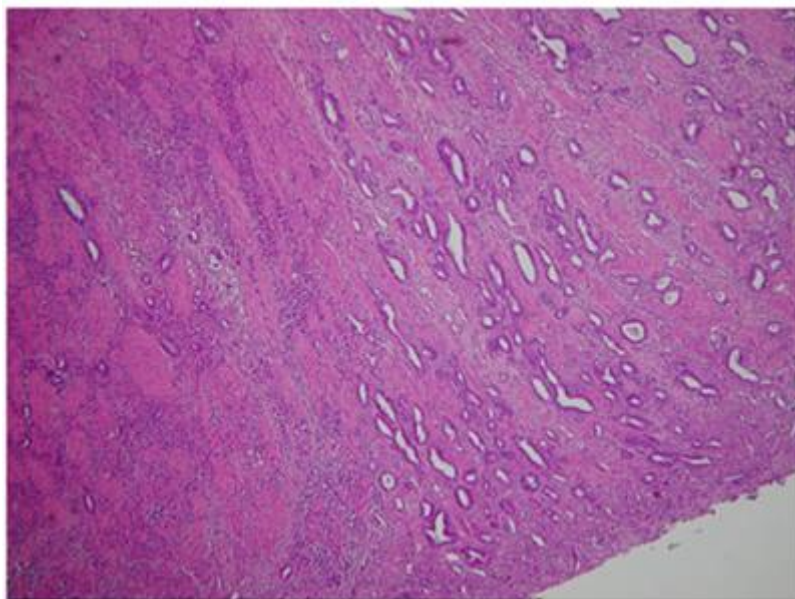
Εικόνα 1.3: Τομή εντερικού υπότυπου γαστρικού καρκίνου μετά από χρώση αιματοξυλίνης εοσίνης [8]

Ο διάχυτος υπότυπος γαστρικού καρκίνου έχει μικρότερη συχνότητα εμφάνισης από τον εντερικό υπότυπο, με ποσοστό 32,6%, ενώ η κύρια ομάδα που παρατηρείται είναι οι γυναίκες νεαρής ηλικίας. [8, 13] Τα καρκινικά κύτταρα του διάχυτου υπότυπου είναι αδιαφοροποίητα και χαρακτηρίζονται από έλλειψη διακυτταρικών επαφών. Είναι διάχυτα και δεν προσκολλώνται, με αποτέλεσμα να διαχέονται στα τοιχώματα του στομάχου, δημιουργώντας καρκινώματα. [\(Εικόνα 1.4\)](#) [9] Φαίνεται ότι ο υπότυπος αυτός είναι αρκετά επιθετικός καθώς οδηγεί σε μεταστάσεις τόσο στους λεμφαδένες όσο και σε απομακρυσμένα όργανα σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα. [11, 14]



Εικόνα 1.4: Τομή διάχυτου υπότυπου γαστρικού καρκίνου μετά από χρώση αιματοξυλίνης εοσίνης [8]

Ο μεικτός υπότυπος γαστρικού καρκίνου εμφανίζεται με μικρότερη συχνότητα (13%) σε σχέση με τους άλλους υπότυπους. [8, 13] Φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος υπότυπος απαρτίζεται από κύτταρα και των δύο προηγούμενων τύπων μέσα στον ίδιο όγκο. [\(Εικόνα 1.5\)](#) [11] Γενικότερα, φαίνεται ότι η πρόγνωση του υπότυπου αυτού ακολουθεί τα μοτίβα του διάχυτου και όχι του εντερικού καθώς χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη επιθετικότητα και μειωμένα ποσοστά επιβίωσης. [8, 11, 13]



Εικόνα 1.5: Τομή μεικτού υπότυπου γαστρικού καρκίνου μετά από χρώση αιματοξυλίνης εοσίνης [8]

1.1.4 Μοριακή Ταξινόμηση

Ο χαρακτηρισμός κάθε γαστρικού καρκίνου σε κάποιον από τους τρεις υπότυπους που προκύπτουν από το σύστημα Lauren δεν αρκεί πλέον προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη θεραπευτική κατεύθυνση για κάποιον ασθενή, καθώς είναι πολύ δύσκολη η πρόβλεψη της πορείας της νόσου. [6] Πλέον γίνεται μοριακός χαρακτηρισμός της νόσου, αξιοποιώντας σύγχρονες τεχνολογίες όπως η αλληλούχηση νέας γενιάς. Ο γαστρικός καρκίνος ταξινομείται σε μοριακό επίπεδο, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφοροποιήσεις σε επίπεδο μεταλλάξεων που υπάρχουν κάθε φορά. [15] Η μοριακή ταξινόμηση μπορεί να γίνει σύμφωνα με τις κατευθύνσεις που θέτει η κοινοπραξία TCGA. [16] Μετά από έρευνες που πραγματοποίησε η συγκεκριμένη κοινοπραξία, παρουσίασε τέσσερις διακριτούς υπότυπους στους οποίους διαχωρίστηκε ο καρκίνος του στομάχου. Συγκεκριμένα, οι μοριακοί υπότυποι απαρτίζονται από τον θετικό στον ιό Epstein-Barr όγκο (EBV), τον όγκο με αστάθεια μικροδορυφόρων (MicroSatellite Instability, MSI), γονιδιωματικά σταθερό όγκο (Genomically Stable, GS) και όγκο με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal INstability, CIN). [\(Εικόνα 1.6\)](#)

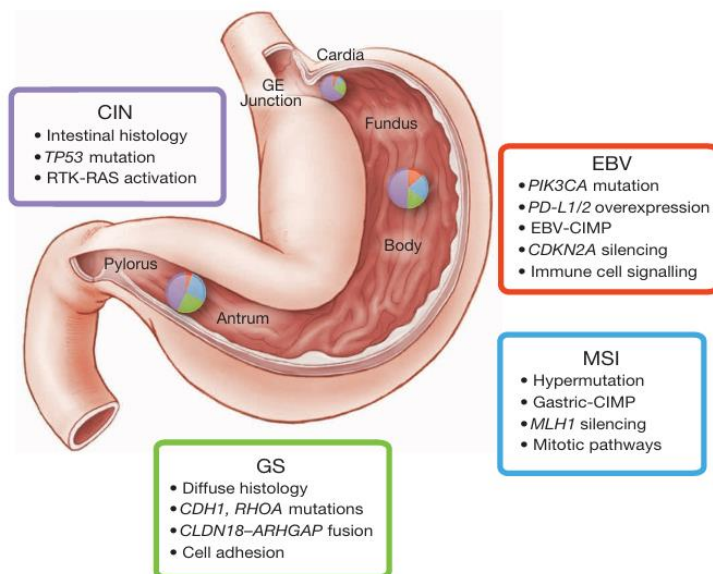
Ο ιός Epstein-Barr είναι ένα παθογόνο στο οποίο οφείλονται πολλές ανθρώπινες νόσοι εκ των οποίων και ο γαστρικός καρκίνος. Οι θετικοί στον συγκεκριμένο ιό καρκίνοι του στομάχου αποτελούν τον πιο σπάνιο υπότυπο από τους τέσσερις με ποσοστό 1,3 – 28,3% . [17] Φαίνεται ότι στο 62% των περιπτώσεων, η θέση όπου δημιουργείται αυτός ο υπότυπος είναι το σώμα και ο θόλος του στομάχου, ενώ παρατηρείται συνήθως σε άντρες με ποσοστό 81%. [\(Εικόνα 1.6\)](#) [18] Ένα χαρακτηριστικό που ξεχωρίζει αυτήν την μορφή γαστρικού καρκίνου από τις άλλες είναι η ύπαρξη εκτεταμένης υπερμεθυλίωσης του DNA σε νησίδες CpG (CpG Islands Methylator Phenotype - CIMP). [16] Η συγκεκριμένη επιγενετική τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων που τελικά οδηγούν στην ανάπτυξη της νόσου. Επίσης, έχει παρατηρηθεί υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της κινάσης CDKN2A που έχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. [19]

Οι όγκοι με αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI) αποτελούν το 22% των περιπτώσεων και κυρίως παρατηρούνται σε άτομα μεγάλης ηλικίας και ειδικότερα σε γυναίκες. [18] Η θέση στην οποία δημιουργείται αυτός ο μοριακός υπότυπος είναι το

άντρο του στομάχου. [\(Εικόνα 1.6\)](#) [16] Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η ύπαρξη υπερμεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου MLH1 που οδηγεί στην παραγωγή ενός ενζύμου επιδιόρθωσης του DNA. Το αποτέλεσμα της επιγενετικής τροποποίησης είναι η μείωση της έκφρασης του γονιδίου, με αποτέλεσμα την δημιουργία γονιδιωματικής αστάθειας, γνωστής και ως αστάθειας μικροδορυφόρων. [18, 20] Η ύπαρξη αυτής της κατάστασης οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα για μεταλλάξεις με κίνδυνο την ενεργοποίηση άλλων ογκογονιδίων που θα εγκαθιδρύσουν τελικά την νόσο. [20] Γενικότερα, οι όγκοι με αστάθεια μικροδορυφόρων όπως και οι θετικοί στον ιό Epstein-Barr όγκοι, φαίνεται να παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με τον εντερικό υπότυπο γαστρικού καρκίνου σύμφωνα με το σύστημα Lauren. [18]

Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (Genomically Stable, GS) μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τον διάχυτο υπότυπο γαστρικού καρκίνου. [17] Παρατηρούνται κυρίως στο άντρο του στομάχου αλλά και στον πυλωρό. Χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της Καδερίνης-E (CDH1), που τελικά οδηγεί στον διάχυτο φαινότυπο καθώς διευκολύνεται η επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάβαση (EMT). [21] Παράλληλα, υπάρχουν και άλλες μεταλλάξεις όπως αυτές στο γονίδιο RHOA που κωδικοποιεί μια GTPάση που επηρεάζει την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων αυτού του υπότυπου. [18]

Οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal Instability, CIN) χαρακτηρίζονται από ανευπλοειδία ή πολυπλοειδία καθώς υπάρχουν εκτενείς τροποποιήσεις στα χρωμοσώματα που μπορούν να οδηγήσουν είτε σε αντιγραφή ή απαλοιφή τους. [22] Οι κυριότερες μεταλλάξεις που συναντώνται, βρίσκονται στο γονίδιο TP53 που αποτελεί βασικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο. [23] Η καταστολή του συγκεκριμένου γονιδίου οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια που επιτρέπει την αύξηση συγκεκριμένων υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs) λόγω διπλασιασμών, οδηγώντας τελικά στην νόσο. [19, 23] Γενικότερα, αυτός ο υπότυπος παρουσιάζει παρόμοια ιστολογικά χαρακτηριστικά με τον εντερικό υπότυπο κατά Lauren. [17, 18]



Εικόνα 1.6: Οι μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του στομάχου με τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους σύμφωνα με την κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas [16]

1.1.5 Υφιστάμενες μέθοδοι διάγνωσης

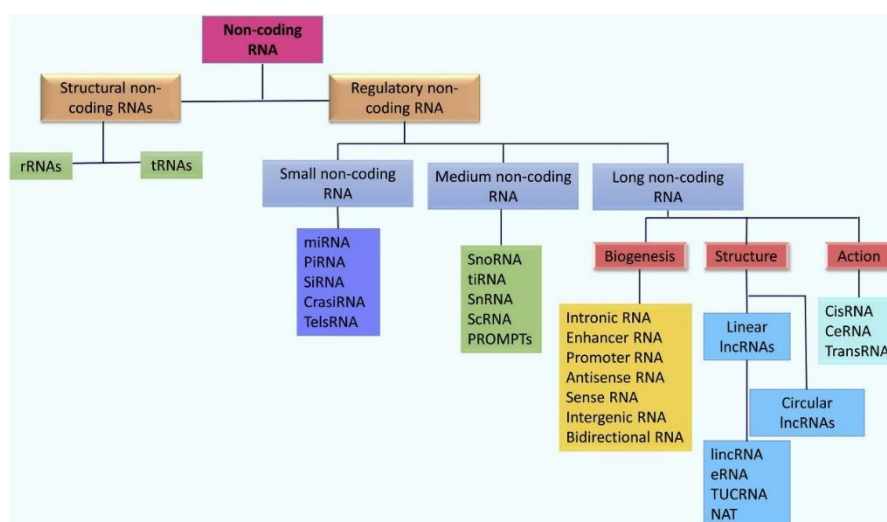
Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι ανίχνευσης του γαστρικού καρκίνου σήμερα είναι οι ενδοσκοπήσεις, οι οποίες είναι επεμβατικές και άρα αρκετά επίπονες για τους ασθενείς. [24] Χώρες στις οποίες παρατηρείται η υψηλότερη συχνότητα του συγκεκριμένου τύπου, όπως είναι η Ιαπωνία και η Νότια Κορέα, υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες ως προς τους απαραίτητους ελέγχους που πρέπει να κάνουν οι πολίτες προκειμένου να ανιχνεύσουν έγκαιρα τον καρκίνο του στομάχου. [25] Όπως προαναφέρθηκε, η έγκαιρη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου είναι από τα πιο κρίσιμα και καθοριστικά στάδια που απαιτούνται για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του. [6] Φαίνεται ότι μέθοδοι ενδοσκόπησης έχουν μεγάλη αποτελεσματικότητα και επιτρέπουν την διάγνωση της νόσου σε πρόωρα στάδια. [24, 26] Όμως, οι μέθοδοι αυτές είναι παρεμβατικές, αποτρέποντας μεγάλο ποσοστό πληθυσμού από τον προληπτικό έλεγχο και επιβαρύνοντας οικονομικά και το σύστημα υγείας. Οι ασθενείς επιλέγουν την μέθοδο της ενδοσκόπησης αφού εμφανίσουν συμπτώματα, συνήθως σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Παράλληλα, υπάρχουν πολλές προσπάθειες για δημιουργία μοριακών δεικτών ανιχνεύονται στον ορό των ανθρώπων και μπορούν να διαγνώσουν την νόσο. [27] Η δειγματοληψία είναι μη επεμβατική και λιγότερο επίπονη από την ενδοσκόπηση με αποτέλεσμα να είναι προτιμότερη από τους περισσότερους. [27, 28] Για τον σκοπό αυτό, υπάρχει διαρκής ανάγκη εύρεσης νέων και

εξειδικευμένων μοριακών βιοδεικτών, τόσο για την διάγνωση όσο και την πρόγνωση της νόσου, που να επιτρέπουν την μη επεμβατική ανίχνευση της σε πρώιμα στάδια.

1.2 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNA / lncRNA)

1.2.1 Χαρακτηρισμός των μη κωδικοποιητικών RNA

Τα μετάγραφα που προκύπτουν από την έκφραση γονιδίων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Συγκεκριμένα, η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα κωδικοποιητικά RNA (mRNA) που στην συνέχεια μεταφράζονται και οδηγούν στην παραγωγή πρωτεϊνών, ενώ η δεύτερη, περιλαμβάνει τα μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNA or non-coding RNA). [29] Γενικά, μόλις το 2% των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος οδηγούν στην παραγωγή κωδικοποιητικών μεταγράφων, ενώ τα υπόλοιπα αφορούν την παραγωγή μη κωδικοποιητικών RNA. [30] Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον γύρω από τον χαρακτηρισμό της δράσης των ncRNA καθώς φαίνεται ότι συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, ενώ στον καρκίνο συχνά εμφανίζουν καρκινοειδική έκφραση και δράση. [31] Τα ncRNA διαχωρίζονται αρχικά σε δύο κατηγορίες, τα δομικά ncRNA που περιλαμβάνουν τα rRNA και τα tRNA αλλά και τα ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά RNA. Τα ρυθμιστικά ncRNA διαχωρίζονται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες ανάλογα το μήκος τους. [\(Εικόνα 1.7\)](#) [32] Συγκεκριμένα, υπάρχουν τα Small non-coding RNA με πιο γνωστά τα miRNAs μήκους 20-30 βάσεις, τα Medium non-coding RNA με πιο γνωστά τα snRNA μήκους 30-200 βάσεις και τέλος τα Long non-coding RNA με μήκος πάνω από 200 βάσεις. [31, 32]

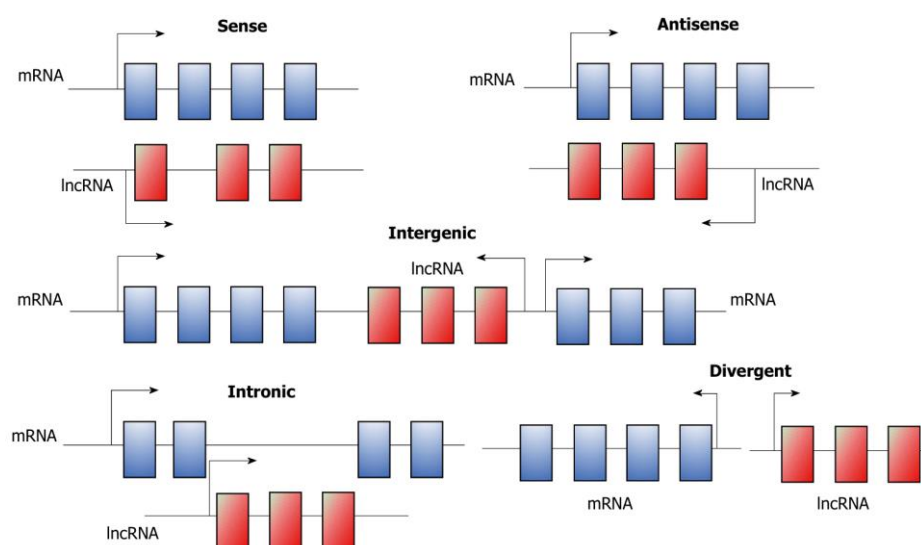


Εικόνα 1.7: Χαρακτηρισμός και ταξινόμηση των μη κωδικοποιητικών RNA [32]

1.2.2 Ταξινόμηση των lncRNA

Τα lncRNA αποτελούν μια υποκατηγορία των ncRNA με μήκος πάνω από 200 βάσεις. Στο παρελθόν, η επιστημονική κοινότητα πίστευε ότι αποτελούσαν παραπροϊόντα χωρίς κάποια βιολογική δράση ενώ πλέον η αντίληψη αυτή έχει καταρριφθεί, καθώς ανακαλύφθηκε ότι τα lncRNA έχουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση των κυττάρων, ο κυτταρικός κύκλος, ο μεταβολισμός αλλά και σε ασθένειες όπως ο καρκίνος. [33, 34] Η βιογένεση των lncRNA είναι παρόμοια με αυτή των mRNA, καθώς μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, περιέχουν 3'-polyA ουρά και 5'-καλύπτρα. Επίσης, σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να υποστούν και εναλλακτικό μάτισμα. [35]

Τα lncRNA μπορούν να διαχωριστούν σε κατηγορίες με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα. [\(Εικόνα 1.8\)](#) [32, 36] Συγκεκριμένα, χωρίζονται στα νοηματικά και τα μη νοηματικά lncRNA όπου μεταγράφονται από την νοηματική και την μη νοηματική αλυσίδα κάποιου κωδικοποιητικού γονιδίου αντίστοιχα. Τα lncRNA αυτών των δύο κατηγοριών μπορεί να βρίσκονται είτε εντός ιντρόνιων, είτε εξονίων κωδικοποιητικών γονιδίων. [37] Επίσης, υπάρχουν τα μεσογονιδιακά lncRNA (Intergenic) όπου η θέση από την οποία μεταγράφονται βρίσκεται ανάμεσα από δύο γονίδια. [32] Αντίστοιχα, υπάρχουν τα ιντρονικά lncRNA όπου η μεταγραφή τους γίνεται μέσα σε ιντρονικές περιοχές γονιδίων. [33, 37] Τέλος, υπάρχουν και τα Αποκλίνοντα lncRNA (Divergent) τα οποία μεταγράφονται από την αντίθετη αλυσίδα μεταγραφής κάποιου κωδικοποιητικού γονιδίου που ξεκινά σε απόσταση μικρότερη των 1000 βάσεων. [35]

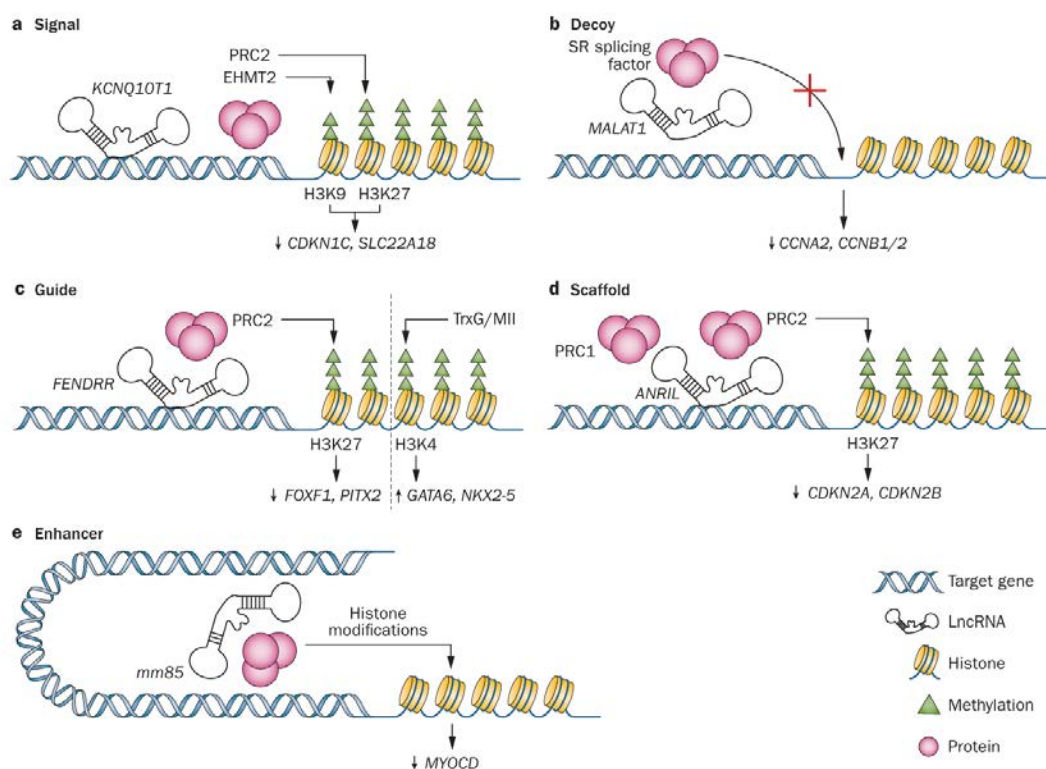


Εικόνα 1.8: Διαχωρισμός των lncRNA με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα [37]

1.2.3 Ιδιότητες των lncRNA

Για να χαρακτηριστεί ένα μετάγραφο ως lncRNA αρκεί να μην μεταφράζεται προς κάποια λειτουργική πρωτεΐνη και το μέγεθος του να ξεπερνά τις 200 βάσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν πάρα πολλά lncRNA με πολλές και διαφορετικές ιδιότητες. [36] Υπάρχουν κάποιες που είναι πιο διαδεδομένες και παρουσιάζονται στην [Εικόνα 1.9](#). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν τα σηματοδοτικά lncRNA όπου έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε κάποιο σήμα και να τροποποιούν την μεταγραφή γονιδίων αλλάζοντας την ρύθμιση τους. [38] Στην συνέχεια, υπάρχουν τα lncRNA δολώματα όπου προσελκύουν μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, αποτρέποντας την ικανότητα τους να μεταγράψουν συγκεκριμένα γονίδια οδηγώντας έτσι σε καταστολή της έκφρασης τους. [39] Μια ακόμα ιδιότητα που έχει παρατηρηθεί σε κάποια lncRNA είναι η δράση τους ως οδηγοί (guides), καθώς έχουν την ικανότητα να συμπλοκοποιούνται με ριβονουκλεοπρωτεΐνες και να τις κατευθύνουν σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, οδηγώντας είτε σε ενεργοποίηση, είτε σε καταστολή της έκφρασης γονιδίων στόχων. [32, 35]. Επίσης, υπάρχουν lncRNA όπου μπορούν να δράσουν σαν σκαλωσιές που προσελκύουν διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, επιτρέποντας τους την δημιουργία συμπλόκων. [30] Η δημιουργία αυτών των ρυθμιστικών συμπλόκων και η σύσταση αυτών μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση ή καταστολή της έκφρασης γονιδίων. Ένας ακόμα μηχανισμός δράσης που έχει παρατηρηθεί είναι η ύπαρξη lncRNA με δράση ενισχυτή (ElncRNA). [35] Μετάγραφα που έχουν αυτήν την ιδιότητα μπορούν να διατηρήσουν την αλληλεπίδραση ενός υποκινητή με κάποιον ενισχυτή επηρεάζοντας έτσι την έκφραση κάποιου γονιδίου. [35]

Γενικότερα, φαίνεται ότι τα lncRNA μπορούν να έχουν περισσότερες από μία ιδιότητες οδηγώντας στις περισσότερες περιπτώσεις σε ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Για παράδειγμα, το lncRNA KCNQ1OT1 φαίνεται να δρα τόσο ως σηματοδοτικό lncRNA αλλά έχει και δράση οδηγού. [40] Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNA δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί και γι' αυτό υπάρχει συνεχής έρευνα γύρω από την κατανόηση νέων μηχανισμών δράσης. [41]



Εικόνα 1.9: Σύνοψη των βασικών ιδιοτήτων των lncRNA [35]

1.2.4 Τα lncRNA στον καρκίνο

Ο τεράστιος αριθμός lncRNA, σε συνδυασμό με την ικανότητα τους να ρυθμίζουν την έκφραση των κωδικοποιητικών γονιδίων με πολλούς τρόπους όπως παρουσιάστηκαν στην [ενότητα 1.2.3](#), τα καθιστά σημαντικά στην διαδικασία της απορρύθμισης των φυσιολογικών κυττάρων και μετατροπής τους σε καρκινικά. [42, 43] Έρευνες δείχνουν ότι τα lncRNA έχουν πολυεπίπεδο ρόλο στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Μάλιστα, φαίνεται να συμμετέχουν σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης, όπως η αλλαγή του προτύπου έκφρασης των γονιδίων και πρόκληση γονιδιωματικής αστάθειας σε αρχικά στάδια, έως και την επαγωγή του EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) που είναι το έναυσμα της μετάστασης. [44, 45] Φαίνεται από έρευνες ότι κάποια από τα lncRNA που οδηγούν σε απορρύθμιση της έκφρασης και επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου, εμφανίζουν ιστο- ή/και καρκινοειδικότητα. Η έκφραση των συγκεκριμένων lncRNA είναι αυξημένη ή μειωμένη μόνο στα καρκινικά κύτταρα και όχι σε φυσιολογικά κύτταρα. [44] Μάλιστα, υπάρχουν και lncRNA που δρουν σε πολύ συγκεκριμένους τύπους καρκίνου ή ακόμα και σε συγκεκριμένα στάδια της νόσου. Αυτό αποτελεί μια ευκαιρία καθώς τέτοια μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πιθανοί μοριακοί βιοδείκτες για την διάγνωση κάποιου τύπου καρκίνου. [46] Σε επόμενο επίπεδο, μετά την χαρτογράφηση τέτοιων

lncRNA με καθοριστικό ρόλο στην έναρξη ή εξέλιξη της νόσου, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μοριακοί στόχοι για θεραπεία καθώς η ιστοειδικότητα τους θα επιτρέψει την εξειδικευμένη στόχευση καρκινικών κυττάρων περιορίζοντας τις παρενέργειες. [46, 47]

1.2.5 Υγρή Βιοψία και lncRNA

Η λήψη υγρής βιοψίας αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο, κατά την οποία συλλέγονται σωματικά υγρά από τον ασθενή. Τα υγρά περιέχουν διάφορα μόρια που μπορούν να ανιχνευτούν και να χρησιμοποιηθούν για την διάγνωση και πρόγνωση διάφορων τύπων καρκίνου, όπως ο γαστρικός, για τον οποίο οι υπάρχουσες διαγνωστικές μέθοδοι είναι συχνά ακριβές και παρεμβατικές. [48] Στα υγρά που λαμβάνονται μπορούν να περιέχονται ελεύθερα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), ελεύθερο DNA από τον όγκο (Circulating tumor-ctDNA) αλλά και εξωσώματα. [49] Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια μεγέθους 40-150nm τα οποία απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα στα σωματικά υγρά και περιέχουν συστατικά όπως πρωτεΐνες, lncRNA και λιπίδια και γενικότερα η σύσταση τους μοιάζει με αυτή των κυττάρων προέλευσης. [50] Η απομόνωση εξωσωμάτων και η ανάλυση των συστατικών τους από την υγρή βιοψία ενός ασθενή, σε συνδυασμό με την ύπαρξη κατάλληλων μοριακών δεικτών, όπως τα lncRNA που εμφανίζουν ιστοειδικότητα σε συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους, επιτρέπει την έγκυρη ανίχνευση της νόσου. [51] Οι νέες τεχνολογίες που αναπτύσσονται επιτρέπουν όλο και πιο ακριβή ανίχνευση των συστατικών των εξωσωμάτων και άρα υπάρχει ανάγκη για ανακάλυψη κατάλληλων μορίων όπως τα lncRNA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες.

1.3 Μια ιδιαίτερη κατηγορία: *cis-acting* lncRNA

1.3.1 Χαρακτηρισμός των *cis-acting* lncRNA

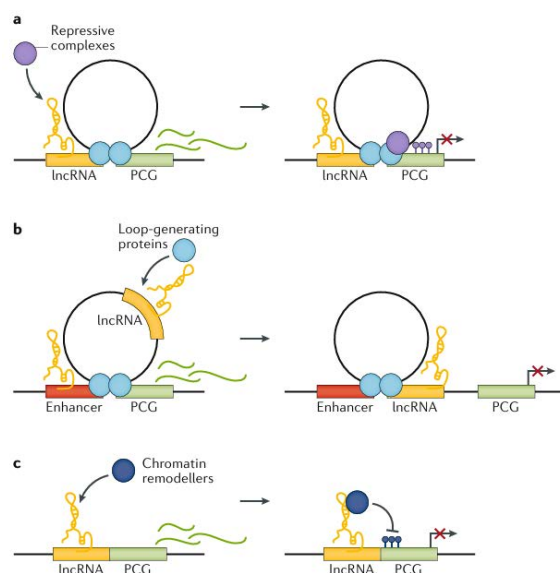
Υπάρχουν κάποια lncRNA που εμφανίζουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και ρυθμίζουν την έκφραση κωδικοποιητικών γονιδίων που βρίσκονται πολύ κοντά στην θέση μεταγραφής των ίδιων των lncRNA ρυθμιστών τους που άρα εκδηλώνουν την ρυθμιστική τους δράση τοπικά (*in-cis*). [42] Τα συγκεκριμένα ncRNA ονομάζονται *cis-acting* lncRNA και η ύπαρξη τους φαίνεται να προέρχεται από μεταλλάξεις σε ενισχυτές. [52] Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η θέση μεταγραφής των περισσότερων *cis-acting* lncRNA έχει παράλληλα και δράση ενισχυτή. Μάλιστα, κάποιες φορές το lncRNA που παράγεται από το σημείο μεταγραφής, που ταυτόχρονα είναι και

ενισχυτής, δεν έχει κάποια βιολογική λειτουργία, αλλά η έκφραση του ή όχι επηρεάζει την δράση του ενισχυτή. [53] Ως γνωστόν, οι ενισχυτές συνήθως εμφανίζουν ιστοειδικότητα, δηλαδή δρουν μόνο σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. [54] Αυτό το χαρακτηριστικό μοιράζονται και τα lncRNA που παράγονται από τις θέσεις αυτών. [55] Επίσης, ένα ακόμα χαρακτηριστικό των *cis-acting* lncRNA είναι ότι η θέση μεταγραφής τους είναι σχεδόν πάντα κοντά σε κάποιο κωδικοποιητικό γονίδιο που οδηγεί στην παραγωγή κάποιου μεταγραφικού παράγοντα ή κάποιας πρωτεΐνης που συμμετέχει στην τροποποίηση της χρωματίνης. [56] Όλα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα *cis-acting* lncRNA ρυθμίζουν πολύ σημαντικά γονίδια που οδηγούν σε αλλαγή του προτύπου έκφρασης ολόκληρου του κυττάρου. Η απορρύθμιση τους μπορεί να έχει δραματικά αποτελέσματα όπως την μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Συμπερασματικά, η μελέτη τέτοιων μορίων και η κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους, μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία κάποιου μοριακού βιοδείκτη ή την ανακάλυψη κάποιου θεραπευτικού στόχου που θα βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση του καρκίνου αντίστοιχα. [44]

1.3.2 Μηχανισμοί δράσης των *cis-acting* lncRNA

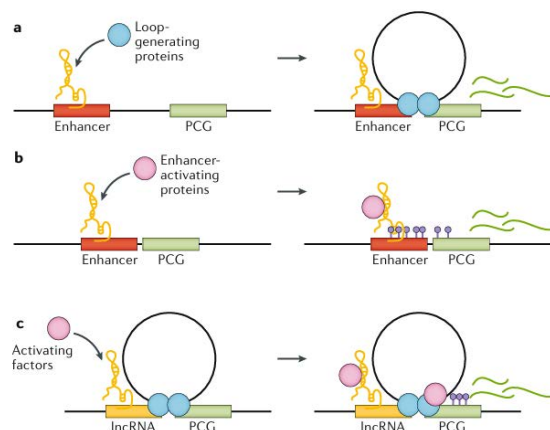
Τα *cis-acting* lncRNA μπορούν να επηρεάσουν την ρύθμιση γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων οδηγώντας σε επαγωγή ή καταστολή της έκφρασης τους. [42] Κάποιοι από τους μηχανισμούς καταστολής της έκφρασης παρουσιάζονται στην [Εικόνα 1.10](#). Αρχικά, σε κάποιες περιπτώσεις όπου έχει δημιουργηθεί βρόγχος της χρωματίνης και υπάρχει αλληλεπίδραση ενός ενισχυτή και ενός γονιδίου με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του, μπορεί να μεταγραφεί ένα *cis-acting* lncRNA από την θέση του ενισχυτή όπου στην συνέχεια, θα προσελκύσει σύμπλοκα καταστολής της μεταγραφής που θα διακόψουν την έκφραση του κωδικοποιητικού γονιδίου. [57, 58] Ένας ακόμα μηχανισμός καταστολής περιλαμβάνει την αλλαγή της διαμόρφωσης της χρωματίνης. [59] Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην [Εικόνα 1.10b](#), η αρχική λούπα επιτρέπει την αλληλεπίδραση ενός ενισχυτή με τον υποκινητή ενός κωδικοποιητικού γονιδίου οδηγώντας σε επαγωγή της έκφρασης. Σε κάποιο τμήμα του βρόγχου υπάρχει μια αλληλουχία που οδηγεί στην παραγωγή ενός *cis-acting* lncRNA που μπορεί να προσελκύει πρωτεΐνες που αλλάζουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Η αλλαγή αυτή οδηγεί στην αλληλεπίδραση του ενισχυτή με την θέση μεταγραφής του lncRNA και όχι με τον υποκινητή με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης. [59] Ο τρίτος μηχανισμός περιλαμβάνει την ύπαρξη κάποιου *cis-acting* lncRNA ανοδικά

από έναν υποκινητή κωδικοποιητικού γονιδίου. Η παραγωγή του lncRNA οδηγεί στην προσέλκυση πρωτεϊνών με ικανότητα εφαρμογής επιγενετικών τροποποιήσεων, συνήθως μεθυλίσεων, στην αλληλουχία του υποκινητή με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης. [60, 61]



Εικόνα 1.10: Καταστολή της έκφρασης κωδικοποιητικών γονιδίων από *cis-acting* lncRNA [42]

Έχουν καταγραφεί και *cis-acting* lncRNA με ικανότητα επαγωγής της έκφρασης γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων. [\(Εικόνα 1.11\)](#) Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την παραγωγή ενός lncRNA από μια αλληλουχία που ταυτόχρονα δρα και ως ενισχυτής. Στην συνέχεια, το lncRNA ενεργοποιεί πρωτεΐνες που δημιουργούν αναδίπλωση στο DNA η οποία επιτρέπει την αλληλεπίδραση του ενισχυτή με τον υποκινητή του γειτονικού γονιδίου επάγοντας την έκφραση του. [62] Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την μεταγραφή ενός lncRNA από θέση πολύ κοντά σε κωδικοποιητικό γονίδιο και προσέλκυση πρωτεϊνών που θα επάγουν την έκφραση του. [63] Ο τρίτος μηχανισμός μοιάζει με τον δεύτερο, με διαφορά ότι σε μια ήδη σχηματισμένη αναδίπλωση μεταξύ ενισχυτή και υποκινητή ενός γονιδίου, μεταγράφεται το lncRNA πάλι τοπικά στον υποκινητή του γονιδίου (λόγω του βρόγχου) και προσελκύει πρωτεΐνες που θα επάγουν την έκφραση του γονιδίου. [42] Για τον σκοπό αυτό, συχνά αξιοποιούνται συστήματα ελεγχόμενης γονιδιακής καταστολής με RNAi προσεγγίσεις, ώστε να μελετηθεί ο ρόλος ενός μεταγράφου είτε σε γειτονικά του γονίδια, είτε να διαλευκανθεί ο ρόλος των mRNA στόχων ενός *cis acting* lncRNA αφού ενεργοποιηθεί η έκφραση τους στην νόσο.



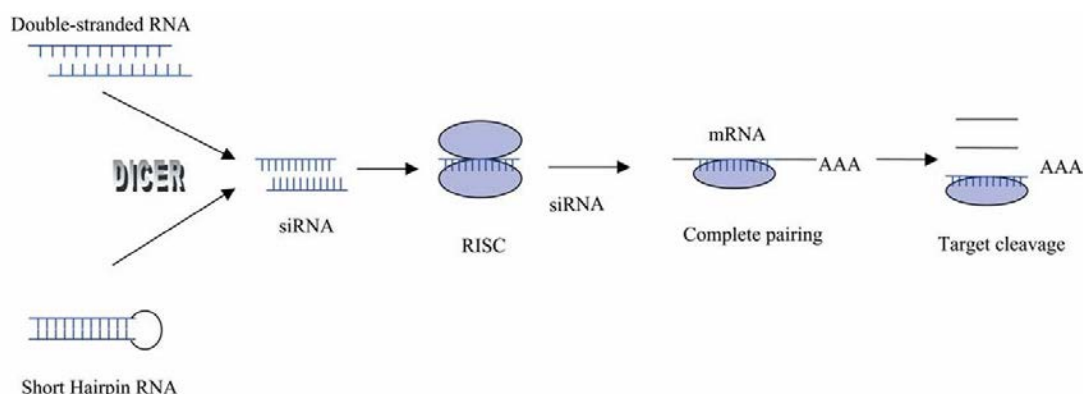
Εικόνα 1.11: Επαγωγή της έκφρασης κωδικοποιητικών γονιδίων από *cis-acting lncRNA* (edited from [42])

1.4 Σίγηση μέσω του μηχανισμού RNAi

1.4.1 Μηχανισμός δράσης του RNAi

Η παρεμβολή RNA (RNA interference, RNAi) είναι ένας φυσιολογικός μοριακός μηχανισμός που υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. [64] Η δράση του RNAi οδηγεί στον περιορισμό της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων εξειδικευμένα. [65] Συγκεκριμένα, η διαδικασία περιλαμβάνει την ύπαρξη δίκλωνων, πρόδρομων-μορίων RNA (siRNA, miRNA, shRNA) όπου αναγνωρίζονται και κόβονται σε μονόκλωνα λειτουργικά μόρια από την πρωτεΐνη Dicer. Στην συνέχεια, το σύμπλοκο RISC, με οδηγό τα μονόκλωνα μόρια RNA, αναγνωρίζει τα συμπληρωματικά ως προς αυτά, μόρια mRNA και τα κατακερματίζει. Έτσι, μειώνεται ο αριθμός των μεταγράφων-στόχων και επιτυγχάνεται η σίγηση του γονιδίου. [\(Εικόνα 1.12\)](#) [65] Ο συγκεκριμένος μηχανισμός παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον στόχο που θα κατασταλεί καθώς πρέπει να υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ του mRNA στόχου και του RNA μορίου οδηγού. [66] Σχεδόν όλα τα ανθρώπινα κύτταρα εκφράζουν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο RNAi, επιτρέποντας την εξειδικευμένη καταστολή γονιδίων στόχων. [67] Μέσω γενετικής τροποποίησης των κυττάρων μπορούν να εισαχθούν συνθετικά short hairpin RNA (shRNA) των οποίων η αλληλουχία είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να είναι συμπληρωματική με το mRNA κάποιου γονιδίου στόχου. Η παραγωγή των shRNA θα οδηγήσει στην καθοδήγηση του συμπλόκου RISC στο mRNA στόχο, ο οποίος στην συνέχεια θα κατακερματιστεί οδηγώντας σε σίγηση του γονιδίου. [65] Γενικότερα, αυτός ο μηχανισμός χρησιμοποιείται ευρέως ερευνητικά καθώς επιτρέπει την

εξειδικευμένη σίγηση γονιδίων, χωρίς αυτά να υποστούν μεταλλάξεις σε επίπεδο DNA. [68]



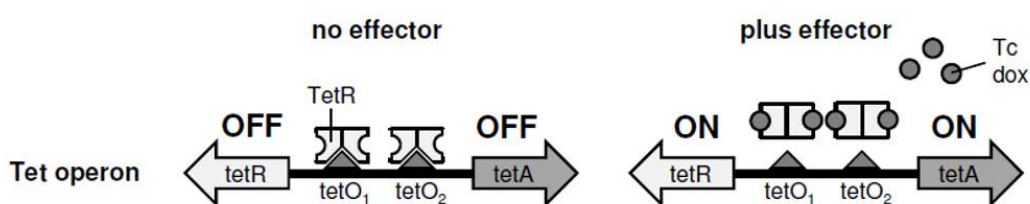
Εικόνα 1.12 : Μηχανισμός δράσης της παρεμβολής RNA [65]

1.4.2 Επαγόμενο σύστημα Tet και RNAi

Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, δεν είναι επιθυμητή η συνεχής σίγηση ενός γονιδίου αλλά προτιμάται η ελεγχόμενη επαγωγή της. [69] Για παράδειγμα, αν πραγματοποιηθεί σίγηση κάποιου γονιδίου μέσω RNAi και τα μετασχηματισμένα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση λόγω της σίγησης, δεν θα είναι δυνατή η επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων. Για να αποφευχθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιο επαγόμενο σύστημα. [69, 70] Συγκεκριμένα, η παραγωγή του συνθετικού shRNA μπορεί να ελέγχεται από ένα σύστημα όπου υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν επιτρέπει την μεταγραφή του. [70] Έτσι, οι τροποποιημένοι κλώνοι θα μπορούν να επιλεγθούν χωρίς να έχει επηρεαστεί ο φαινότυπος τους. Αφού επιλεγθούν, με χρήση κατάλληλου χημικού μορίου, θα επάγεται η έκφραση του shRNA που θα οδηγήσει τελικά στην καταστολή του mRNA στόχου. Ο φαινότυπος που προκύπτει από την σίγηση του στόχου θα εμφανίζεται μόνο μετά την επαγωγή του συστήματος και μπορεί να αντιστραφεί με απομάκρυνση του χημικού μορίου.

Ένα τέτοιο σύστημα αφορά και την κασέτα Tet-RNAi, κατά την οποία, η έκφραση του συνθετικού shRNA συνδυάζεται με το σύστημα επαγωγής από το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (Tet). [71] Το συγκεκριμένο σύστημα προέρχεται από κάποια Gram (-) βακτήρια τα οποία έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. [71] Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την διαμεμβρανική πρωτεΐνη (tetA) μέσω της οποίας η τετρακυκλίνη απομακρύνεται από το εσωτερικό των βακτηρίων. [72] Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ελέγχεται από έναν καταστολέα (tetR)

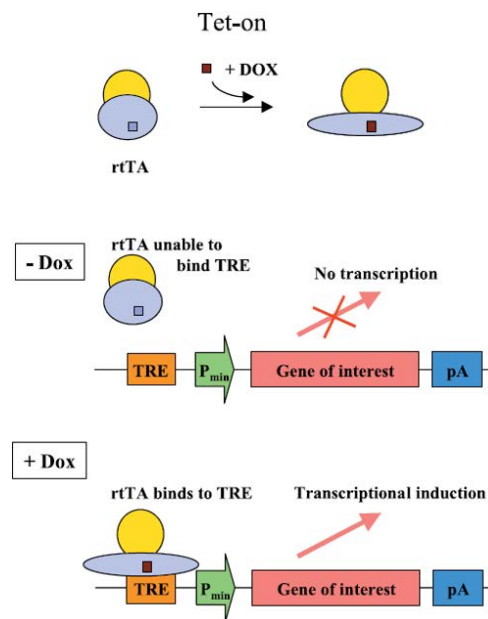
που με την σειρά του ελέγχεται από το αντιβιοτικό. Ανάμεσα από τα γονίδια των δύο πρωτεϊνών υπάρχει μία αλληλουχία χειριστή (tetO) που ρυθμίζει τα γονίδια. Όλα τα συστατικά μαζί αποτελούν ένα οπερόνιο, το Tet. **(Εικόνα 1.13)** [72] Ο καταστολέας tetR δημιουργεί διμερή όπου συνδέονται στην αλληλουχία του Tet χειριστή, οδηγώντας τελικά στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου tetA. Με παρουσία του αντιβιοτικού, υπάρχει σύνδεση μεταξύ αυτού και του καταστολέα tetR, οδηγώντας σε αλλαγή στην διαμόρφωση του, και αποτρέποντας την σύνδεση του στην αλληλουχία του χειριστή. Έτσι, επιτρέπεται η έκφραση του γονιδίου tetA και παραγωγή της μεμβρανικής πρωτεΐνης, οδηγώντας σε ανθεκτικότητα. **(Εικόνα 1.13)** [72]



Εικόνα 1.13: Ο μηχανισμός λειτουργίας του οπερόνιου Tet παρουσία ή απουσία της τετρακυκλίνης [72]

1.4.3 Το επαγόμενο σύστημα Tet-on

Το επαγόμενο σύστημα Tet-on είναι μια παραλλαγή του κλασικού συστήματος Tet. [73] Περιλαμβάνει την χρήση του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (Dox) όπου όταν χορηγείται, οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης ενός γονιδίου ενδιαφέροντος όπως κάποιο shRNA. **(Εικόνα 1.14)** [74]. Στην περίπτωση ενός RNAi επαγόμενου από το σύστημα Tet-on, απουσία δοξυκυκλίνης (-Dox) το συνθετικό shRNA που έχει εισαχθεί, δεν παράγεται και άρα τα κύτταρα εμφανίζουν φυσιολογικό φαινότυπο. Παρουσία δοξυκυκλίνης (+Dox), επάγεται η παραγωγή του shRNA και άρα υπάρχει σίγηση του mRNA στόχου οδηγώντας στην αλλαγή του φαινοτύπου ανάλογα την δράση που προκαλεί η καταστολή. [74]



Εικόνα 1.14 : Μηχανισμός λειτουργίας της παραλλαγής Tet-on παρουσία ή απουσία της δοξουκυκλίνης [74]

2.Σκοπός

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως στόχο την διερεύνηση του ρόλου μίας RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης που ονομάζεται CPR (αποκαλούμενη στο εξής ως γονίδιο-στόχος CPR) και από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου έχει φανεί ότι: i) ρυθμίζεται από το lncRNA RECUR1 και ii) προβλέπεται ότι επιδρά ογκοεπαγωγικά στον γαστρικό καρκίνο. Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε μία σταθερή κυτταρική σειρά γαστρικού καρκίνου με επαγωγίμο σύστημα RNAi, το οποίο ενεργοποιείται με προσθήκη δοξκυκλίνης και επιτρέπει την ελεγχόμενη σίγηση του γονιδίου-στόχου CPR. Το σύστημα επιτρέπει την αναστροφή της σίγησης με αφαίρεση του αντιβιοτικού. Στην συνέχεια, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA RECUR1 μετά την επαγωγή της σίγησης του CPR και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα του μάρτυρα, έτσι ώστε να διερευνηθεί και αντίστροφα η ρυθμιστική συσχέτιση ανάμεσα στο lncRNA και το γονίδιο-στόχο. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ελέγχου καρκινοειδικών φαινοτύπων, όπως η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay) και η δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay), με στόχο την παρατήρηση αλλαγών σε γαστρικά μοντέλα *in vitro* λόγω της σίγησης της πρωτεΐνης CPR. Επίσης, έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων-δεικτών καρκινοειδικών διεργασιών με στόχο την μοριακή κατανόηση του φαινοτύπου που παρατηρήθηκε αλλά και γενικότερα του μηχανισμού δράσης του γονιδίου-στόχου CPR. Μέσα από αυτή την προσέγγιση, επιδιώκεται η κατανόηση του ρόλου της πρωτεΐνης-στόχου στην ογκογένεση. Τέλος, έγινε κλωνοποίηση δύο sgRNA στον πλασμιδιακό φορέα AIO-Puro, ο οποίος φέρει το γονίδιο της pCas9. Η συγκεκριμένη κατασκευή προορίζεται για εισαγωγή σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου σε μελλοντικά πειράματα του εργαστηρίου, με σκοπό την σίγηση του γονιδίου-στόχου CPR μέσω της καταστροφής του υποκινητή του και μελέτη των αποτελεσμάτων μέσω αυτής της προσέγγισης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

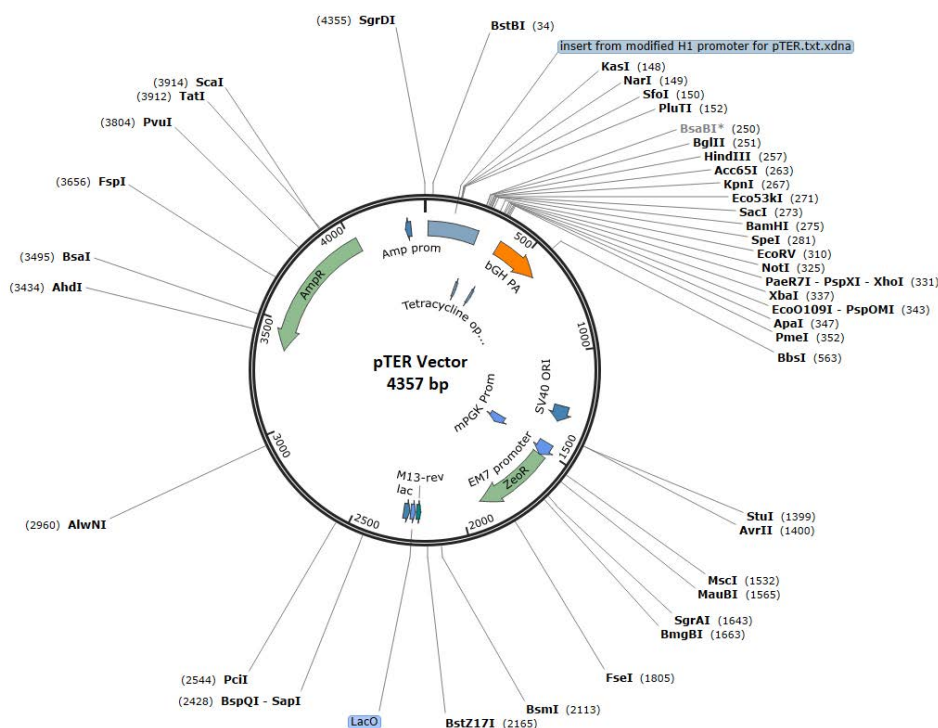
3.1 Υλικά

3.1.1 Κυτταρική σειρά AGTR13

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά AGTR13 που αφορά γαστρικά καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον καταστολέα TET στο περιβάλλον AGS. Συγκεκριμένα, είναι επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινο πρωτεύον γαστρικό αδеноκαρκίνωμα τα οποία έχουν τροποποιηθεί ώστε να υπερεκφράζουν τον καταστολέα TET.

3.1.2 Πλασμιδιακός φορέας pTER

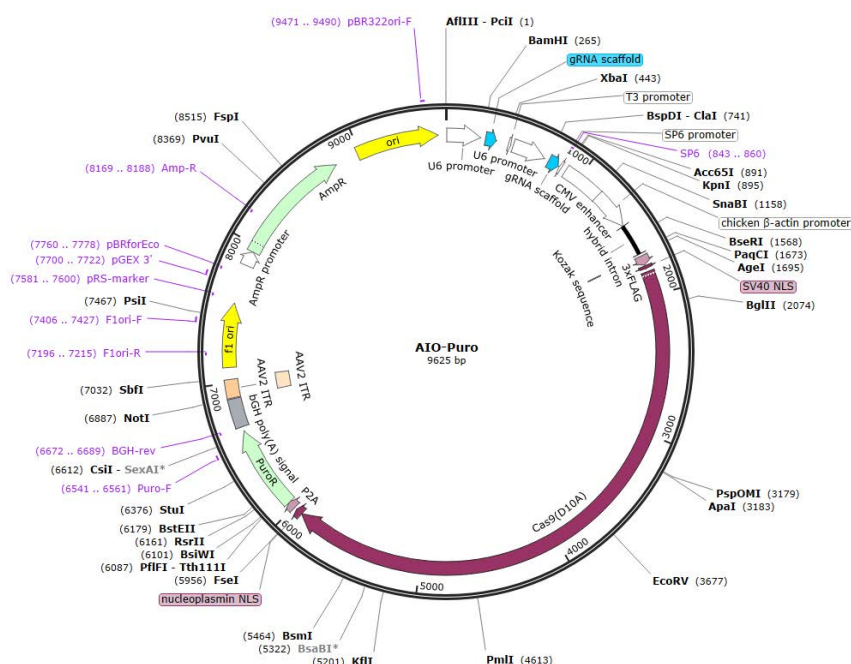
Ο πλασμιδιακός φορέας pTER έχει μέγεθος 4357 ζεύγη βάσεων και χρησιμοποιείται για πειράματα επαγόμενης σίγησης μέσω RNAi. [\(Εικόνα 3.1\)](#) Περιλαμβάνει μια θέση κλωνοποίησης ενός shRNA (short-hairpin RNA) καθοδικά από έναν τροποποιημένο υποκινητή H1, ο οποίος ελέγχεται από μια αλληλουχία χειριστή. Ο συγκεκριμένος χειριστής επιτρέπει την ενεργοποίηση του υποκινητή και άρα την παραγωγή του shRNA μόνο όταν υπάρχει το αντιβιοτικό δοξυκυκλίνη, επιτρέποντας έτσι την ύπαρξη ενός επαγόμενου διακόπτη του συστήματος. Ο πλασμιδιακός φορέας περιλαμβάνει επίσης το γονίδιο AmpR που επιτρέπει την επιλογή των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με τον συγκεκριμένο φορέα καθώς τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Τέλος, περιλαμβάνει το γονίδιο ZeoR που επιτρέπει την επιλογή των ευκαρωτικών κυττάρων που διαμολύνθηκαν επιτυχώς με τον φορέα καθώς προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη.



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pTER

3.1.3 Πλασμιδιακός φορέας AIO-Puro

Ο πλασμιδιακός φορέας All-in-One Nickase D10A (AIO-Puro) έχει μέγεθος 9625 ζεύγη βάσεων και χρησιμοποιείται για πειράματα CRISPR-nCas9. [\(Εικόνα 3.2\)](#) Είναι κατάλληλος για την κλωνοποίηση δύο sgRNA (single-guide RNA) καθώς περιέχει θέσεις κλωνοποίησης καθοδικά από δύο διαδοχικούς U6 υποκινητές. Παράλληλα, περιλαμβάνει ένα γονίδιο που οδηγεί στην παραγωγή της πρωτεΐνης Cas9 (D10A) η οποία είναι μια νικάση. Επίσης, περιέχει το βακτηριακό γονίδιο AmpR που όταν εκφράζεται σε βακτήρια οδηγεί σε ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη αλλά και το ευκαρυωτικό γονίδιο PuroR που όταν εκφράζεται από ευκαρυωτικά κύτταρα όπως τα AGS, τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη. Το γονίδιο AmpR επιτρέπει την επιλογή των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με τον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα, ενώ το γονίδιο Puro επιτρέπει την επιλογή των ευκαρυωτικών κυττάρων που διαμολύνθηκαν επιτυχώς με αυτόν. Άρα, ο τελικός στόχος του συγκεκριμένου φορέα είναι η έκφραση δύο sgRNA αλλά και της νικάσης στα ευκαρυωτικά κύτταρα.



Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Σύστημα επαγωγισμού RNAi

3.2.1.1 Επιβεβαίωση της ύπαρξης του shRNA στον φορέα pTER

Η αλληλουχία του shRNA που στοχεύει τον mRNA στόχο CPR είχε ήδη κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου. Για τον έλεγχο της ύπαρξης του ενθέματος, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη του φορέα pTER με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες. [\(Πίνακας 1\)](#)

Πίνακας 1: Σύσταση της διαγνωστικής πέψης του πλασμιδιακού φορέα pTER

	Ποσότητα
CutSmart Buffer 10x	3 μ l
EcoRI HF	1 μ l
Πλασμιδιακός φορέας	1 μ l
WFI	25 μ l
Τελικός όγκος	30 μ l

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστέθηκαν στο δείγμα 6 μ l loading dye 6x και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης μαζί με θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

3.2.1.2 Γραμμοποίηση του φορέα pTER

Για την διαμόλυνση των κυττάρων AGTR13, ο πλασμιδιακός φορέας pTER από κυκλικός έπρεπε να μετατραπεί σε γραμμικός. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Η αντίδραση πέψης (**Πίνακας 2**) πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες.

Πίνακας 2: Σύσταση της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pTER με στόχο την γραμμοποίηση του

	Ποσότητα
rCutSmart Buffer 10x	5 µl
ScaI HF	4 µl
Πλασμιδιακός φορέας	5 µl
WFI	36 µl
Τελικός όγκος	50 µl

Μετά την ολοκλήρωση της πέψης απομονώθηκαν 5µl της αντίδρασης και σε αυτά προστέθηκαν 2µl Loading Dye 6x και 5µl WFI. Στην συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με στόχο την επιβεβαίωση της πέψης του φορέα. Η υπόλοιπη ποσότητα (45µl) καθαρίστηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθήκη 40µl οξικό νάτριο 3M, pH 5,2 και 315µl WFI στο δείγμα
- Προσθήκη 400µl Φαινόλης-Χλωροφόρμιου-Ισοαμυλικής αλκοόλης και vortex
- Φυγοκέντρηση δειγμάτων για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4°C
- Συλλογή της πάνω φάσης που περιλαμβάνει τον γραμμοποιημένο φορέα σε νέα tubes 1,5ml
- Προσθήκη 1ml αιθανόλης 100% και 2µl γλυκογόνο και αποθήκευση στους -80°C για όλο το βράδυ
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 14000rpm και 4°C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 500µl αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4°C
- Αφαίρεση υπερκείμενου και Air-Drying για 15 λεπτά
- Επαναδιάλυση του φορέα σε 50µl WFI

Μετά από την επαναδιάλυση του φορέα ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης σε ειδικό μηχάνημα (nanodrop).

3.2.1.3 Διαμόλυνση των κυττάρων AGTR13

Κύτταρα AGTR13 από stock υγρού αζώτου καλλιεργήθηκαν για κάποιες μέρες σε μεγάλη φλάσκα και φρέσκο θρεπτικό RPMI με 10% FBS με στόχο την αύξηση του

αριθμού τους. Την ημέρα της διαμόλυνσης αφαιρέθηκε το θρεπτικό από την φλάσκα, προστέθηκαν 2,5ml θρυψίνης για ξέπλυμα και στην αφαιρέθηκαν. Στην συνέχεια, προστέθηκαν ακόμα 2,5ml θρυψίνης και η φλάσκα μπήκε σε επωαστήρα σε 37°C, CO₂ 5% και σταθερή υγρασία για 4 λεπτά. Μετά την επώαση με χτύπημα της φλάσκας τα προσκολλημένα κύτταρα μετατράπηκαν σε εναιώρημα. Προστέθηκαν στο εναιώρημα 2,5ml θρεπτικού RPMI με 10% FBS με στόχο την αναστολή της δράσης της θρυψίνης. Ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με πλάκα Neubauer. Η συγκέντρωση που μετρήθηκε ήταν 600.000 κύτταρα/ml. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε δημιουργία των λιποσωμάτων που θα μεταφέρουν τον γραμμοποιημένο pTER στα κύτταρα σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Θέρμανση του παράγοντα P-PEI σε drybath στους 55°C
- Σε νέο tube 1,5ml προσθήκη 250μl νέου θρεπτικού DMEM χωρίς αντιβιοτικά και προσθήκη 48μl του pTER (16224ng) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Σε άλλο tube 1,5ml προσθήκη 250μl νέου θρεπτικού DMEM χωρίς αντιβιοτικά και 60μl του παράγοντα P-PEI με πυκνότητα 1w/v (αναλογία παράγοντα με φορέα για σχηματισμό λιποσωμάτων 1:4 w/w) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Ένωση των περιεχόμενων των 2 tubes, ανάμειξη τους και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με στόχο τον σχηματισμό των λιποσωμάτων που περιέχουν στο εσωτερικό τους τον πλασμιδιακό φορέα

Σε falcon των 15ml προστέθηκαν 2,5ml εναιωρήματος με συνολικό αριθμό 1500000 κύτταρα. Επίσης, έγινε προσθήκη 500μl από τα λιποσώματα που δημιουργήθηκαν και στην συνέχεια έγινε επώαση των λιποσωμάτων και των κυττάρων για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν δύο πιάτα για την ανάπτυξη των κυττάρων που διαμολύνθηκαν. Στο πρώτο πιάτο (πυκνό) προστέθηκαν 1000000 κύτταρα και 20ml θρεπτικό RPMI με 10% FBS ενώ στο δεύτερο πιάτο (αραιό) προστέθηκαν 500000 κύτταρα και 20ml θρεπτικό RPMI με 10% FBS. Τα δύο πιάτα μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα σε 37°C, CO₂ 5% και σταθερή υγρασία. Μετά από 24 ώρες αφαιρέθηκε το θρεπτικό κάθε πιάτου και ανανεώθηκε με 25ml φρέσκου RPMI με 10% FBS. Παράλληλα, προστέθηκαν σε κάθε πιάτο τα αντιβιοτικά επιλογής τα οποία ήταν 50μl βλαστισιδίνη 1000x (επιλογή του καταστολέα TET) και 250μl ζεοσίνη 250x (επιλογή του pTER). Μετά από 10 μέρες τα πιάτα παρατηρήθηκαν κάτω από μικροσκόπιο και παρατηρήθηκε ότι δημιουργήθηκαν αποικίες. Συνολικά επιλέχθηκαν 30 κλώνοι για έλεγχο του ποσοστού σίγησης του mRNA στόχου CPR.

3.2.1.4 Απομόνωση RNA από τους κλώνους που διαμολύνθηκαν με τον pTER

Κάθε κλώνος καλλιεργήθηκε σε 2 πηγάδια όπου το ένα ήταν ο μάρτυρας και το άλλο δέχτηκε δύο δόσεις δοξκυκλίνης ώστε να γίνει επαγωγή της έκφρασης του shRNA. Για την απομόνωση RNA από κάθε πηγάδι έγινε αφαίρεση του θρεπτικού που περιείχε και στην συνέχεια ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθήκη 800μl τριζόλης σε κάθε πηγάδι και επώαση για 1 λεπτό
- Μεταφορά της τριζόλης κάθε πηγαδιού σε tube 1,5ml
- Προσθήκη 200μl Χλωροφόρμιου, έντονο vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Συλλογή της υδατινής φάσης (πάνω) που περιλαμβάνει το RNA
- Προσθήκη ισοπροπανόλης σε ίση αναλογία με την ποσότητα κάθε δείγματος και 2μl γλυκογόνου και επώαση σε πάγο για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 500μl αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Αφαίρεση υπερκείμενου και Air-Drying για 15 λεπτά
- Επαναδιάλυση του RNA σε 50μl WFI

Μετά από την επαναδιάλυση του RNA ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης σε ειδικό μηχάνημα (nanodrop).

3.2.1.5 Κατεργασία του RNA με DNάση

Για την απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα RNA πραγματοποιήθηκε κατεργασία των δειγμάτων με DNάση. Η σύσταση της αντίδρασης παρουσιάζεται στον [Πίνακα 3](#). Η διαδικασία περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37oC για μία ώρα.

Πίνακας 3: Σύσταση της κατεργασίας των δειγμάτων RNA με DNάση

	Ποσότητα
DNase Buffer 10x	3 μl
DNase	1 μl
RNase-out	0,5 μl
Δείγμα RNA	25 μl
WFI	0,5 μl
Τελικός όγκος	30 μl

Μετά της κατεργασία του RNA με DNάση ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθήκη 40μl οξικό νάτριο 3M, pH 5,2 και 330μl WFI σε κάθε δείγμα
- Προσθήκη 400μl Φαινόλης-Χλωροφόρμιου-Ισοαμυλικής αλκοόλης και vortex

- Φυγοκέντρωση δειγμάτων για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Συλλογή της πάνω φάσης που περιλαμβάνει το RNA σε νέα tubes 1,5ml
- Προσθήκη 1ml αιθανόλης 100% και 2μl γλυκογόνο σε κάθε δείγμα και αποθήκευση στους -80oC για 1 ώρα
- Φυγοκέντρωση για 30 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 500μl αιθανόλης 70% και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Αφαίρεση υπερκείμενου και Air-Drying για 15 λεπτά
- Επαναδιάλυση του RNA σε 12μl WFI

Μετά από την επαναδιάλυση του RNA ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης σε ειδικό μηχανήμα (nanodrop).

3.2.1.6 Σύνθεση του cDNA από τα δείγματα RNA

Για την σύνθεση του cDNA για κάθε δείγμα απαιτούνται περίπου 1000ng RNA. Κάθε δείγμα μεταφέρεται σε νέο tube 1,5ml και αραιώνεται με WFI εφόσον χρειάζεται, ανάλογα την συγκέντρωση που προέκυψε μετά την κατεργασία με DNάση. Στόχος είναι ο τελικός όγκος κάθε δείγματος να είναι 10μl και να περιέχει συνολικά 1000ng RNA. Στην συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται 1μl dNTPs 10mM και 1μl oligodTs 10mM. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε drybath στους 65oC για 5 λεπτά με στόχο την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA. Αμέσως μετά την επώαση τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο. Στην συνέχεια προστίθενται σε κάθε δείγμα 8μl που περιλαμβάνει τα συστατικά του [Πίνακα 4](#). Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος είναι 20μl.

Πίνακας 4: Σύσταση του Master Mix που δημιουργήθηκε για την σύνθεση του cDNA

	Ποσότητα x1:
First-Strand Buffer 5x	4 μl
DTT 0,1M	2 μl
M-MLV Reverse Transcriptase	1 μl
RNase-Out	1 μl
Τελικός όγκος	8 μl

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37oC για δύο ώρες όπου και πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA. Μετά την επώαση, προστίθεται σε κάθε δείγμα 380μl WFI με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος κάθε δείγματος να είναι 400μl.

3.2.1.7 qPCR ελέγχου των επιπέδων έκφρασης διαφόρων γονιδίων

Για τον έλεγχο των επιπέδων των μεταγράφων διαφόρων στόχων στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR (qPCR). Για την qPCR δημιουργούνται MasterMix από τα οποία γίνεται προσθήκη 11μl σε κάθε PCR tube, ενώ στην συνέχεια προστίθενται 4μl cDNA κάθε φορά. [\(Πίνακας 5\)](#)

Πίνακας 5: Σύσταση του MasterMix που χρησιμοποιείται στην ποσοτική PCR

	Ποσότητα
SYBR mix 2x	7,5 μl
Primer Mix	2 μl
WFI	1,5 μl
Τελικός όγκος	11 μl

Για κάθε δείγμα που ελέγχεται η έκφραση διαφόρων γονιδίων στόχων, πάντα ελέγχονται και τα επίπεδα κάποιου house-keeping γονιδίου με στόχο την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι Primers και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη qPCR παρουσιάζονται στους [Πίνακες 6+7](#).

Πίνακας 6: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95oC	5 min
Αποδιάταξη	95oC	20 sec
Υβριδοποίηση	58oC	20 sec
Επιμήκυνση	72oC	15 sec
Αριθμός κύκλων	45	

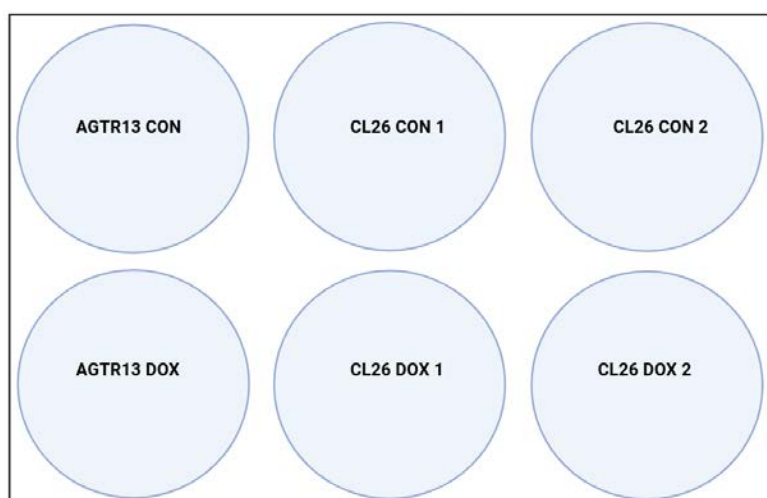
Πίνακας 7: Τα γονίδια που ελέγχθηκαν τα επίπεδα των μεταγράφων τους στην qPCR

Primer Mix for Target Genes	Primer Mix for House-Keeping Genes	Primer Mix for Marker Genes
CPR F1 R1	GAPDH F1 R1	E2F8 F1 R1
CPR F2 R2	RPLP1 F1 R1	CDKNIC F1 R1
RECUR F5 R5		DDIT4 F1 R1
		PHLDA F1 R1
		VIM F1 R1
		EMP2 F1 R1

3.2.1.8 Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (CFA – Colony Formation Assay)

Μετά την επιλογή των θετικών κλώνων και αφού επιβεβαιώθηκε η σύγχιση του mRNA στόχου CPR και σε ανεξάρτητο πείραμα, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία

σχηματισμού αποικιών με στόχο την παρατήρηση διαφορών στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων με ή χωρίς την σίγηση. Κύτταρα από τον κλώνο 26 και κύτταρα AGTR13 με ρόλο αρνητικού μάρτυρα στρώθηκαν σε πιάτο με 6 πηγάδια. **(Εικόνα 3.3)** Στα ζεύγη CON και DOX προστέθηκε ίδιος αριθμός κυττάρων. Έγινε προσθήκη δοξυκυκλίνης στα DOX πηγάδια και μετά από τρεις μέρες επώασης έγινε λήψη φωτογραφιών των αποικιών που σχηματίστηκαν με μικροσκόπιο. Μετά από μία εβδομάδα επώασης, τα κύτταρα βάφθηκαν με μπλε του Μεθυλενίου και μετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών σε κάθε πηγάδι.



Εικόνα 3.3: Απεικόνιση της διάταξης του πιάτου για την δοκιμασία CFA

3.2.1.9 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay)

Παράλληλα με την δοκιμασία σχηματισμού αποικιών, πραγματοποιήθηκε και η δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay). Στην συγκεκριμένη δοκιμασία, κύτταρα του κλώνου 26 αλλά και AGTR13 κύτταρα με ρόλο αρνητικού control προστέθηκαν σε πιάτο με 6 πηγάδια σε παρόμοια διάταξη με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε στην δοκιμασία σχηματισμού αποικιών. **(Εικόνα 3.3)** Στην συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ότου να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια κάθε πηγαδιού. Παράλληλα, στα πηγάδια DOX έγινε προσθήκη δοξυκυκλίνης. Την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, σε κάθε πηγάδι έγινε χάραγμα με στόχο την δημιουργία μιας τομής κατά μήκος των κυττάρων. Μετά την δημιουργία της τομής έγινε λήψη φωτογραφιών από 3 διαφορετικά σημεία σε κάθε πηγάδι ανά τακτικά χρονικά διαστήματα: $t=0$, $t=4h$, $t=8h$, $t=12h$, $t=24h$ και $t=32h$. Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν σε κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα (ImageJ/Fiji) όπου μετρήθηκε το εμβαδόν κάθε τομής στις διαφορετικές στιγμές. Για κάθε σημείο, έγινε κανονικοποίηση των

μετρήσεων του εμβαδού κάθε στιγμής με το εμβαδόν της στιγμής 0h. Στην συνέχεια, υπολογίστηκε το μέσο εμβαδόν για κάθε χρονική στιγμή από όλα τα σημεία μέτρησης κάθε δείγματος. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι μετρήθηκε και το εμβαδόν των κυττάρων που έφυγαν από τον κύριο άξονα και μετανάστευσαν στο εσωτερικό της τομής και αφαιρέθηκε από το συνολικό εμβαδόν, έτσι ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις. Τέλος, έγινε υπολογισμός του Migration index για κάθε χρονική στιγμή. Στόχος του Wound Healing Assay είναι η παρατήρηση διαφορών στον χρόνο επούλωσης της τομής μεταξύ των CON και DOX του κλώνου 26 και άρα μελέτη της κινητικότητας των κυττάρων με ή χωρίς την σίγηση του mRNA στόχου CPR.

3.2.2 Προετοιμασία του φορέα AIO-Puro για μελλοντικό πείραμα CRISPR-nCas9

3.2.2.1 Υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων (sgRNA1 και sgRNA2)

Έγινε σχεδιασμός δύο κατάλληλων sgRNA για την στόχευση του υποκινητή του γονιδίου-στόχου CPR. Αφού έγινε η παραλαβή των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων για κάθε sgRNA πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση αυτών σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθήκη 98μl Annealing Buffer σε tube 1,5ml
- Προσθήκη 1μl από το Sense και 1μl από το Antisense ολιγονουκλεοτίδιο
- Επώση σε βραστό νερό σε beaker πάνω από φωτιά για 5 λεπτά
- Αφαίρεση του beaker με τα tubes από την φωτιά και επώση έως να φτάσει η θερμοκρασία του νερού 40oC
- Αποθήκευση των δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων στους -20oC

3.2.2.2 Πέψη του AIO-Puro και εκχύλιση από πήκτωμα αгарόζης

Ο άδειος πλασμιδιακός φορέας AIO-Puro για να προσλάβει το sgRNA1 έπρεπε να υποστεί πέψη με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού που θα επέτρεπε το άνοιγμα της πρώτης θέσης κλωνοποίησης. (Πίνακας 8) Η πέψη πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37oC για τέσσερις ώρες.

Πίνακας 8: Σύσταση αντίδρασης πέψης του άδειου πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro

	Ποσότητα
rCutSmart Buffer 10x	5 μl
BbsI HF	3 μl
Πλασμιδιακός φορέας	10 μl
WFI	32 μl
Τελικός όγκος	50 μl

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, μέρος της συνολικής ποσότητας ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με στόχο την επιβεβαίωση της πέψης του φορέα. Η υπόλοιπη ποσότητα ηλεκτροφορήθηκε και ακολούθησε εκχύλιση του φορέα που υπέστη πέψη με κατάλληλο kit (gel extraction). Μετά την επαναδιάλυση του φορέα ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης σε ειδικό μηχάνημα (nanodrop).

3.2.2.3 Κλωνοποίηση του κομμένου AIO-Puro με το sgRNA1 και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* DH5a

Η κλωνοποίηση του sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε με αντίδραση λιγάσης. Τα συστατικά της αντίδρασης περιγράφονται στον [Πίνακα 9](#). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 16oC για 16 ώρες.

Πίνακας 9: Σύσταση της αντίδρασης λιγάσης του άδειου AIO-Puro και του sgRNA1

	Ποσότητα
T4 ligase Buffer 10x	1 µl
T4 ligase	1 µl
Άδειος πλασμιδιακός φορέας	1,5 µl
dsoligo sgRNA1	4 µl
WFI	2,5 µl
Τελικός όγκος	10 µl

Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν χημειοδεκτικά βακτήρια *Escherichia coli* στελέχους DH5a. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθήκη 40µl βακτηρίων *E. Coli* DH5a και 5µl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης σε tube 1,5ml και επώαση σε πάγο για 20 λεπτά
- Προσθήκη του tube στους 42oC για 50 δευτερόλεπτα με στόχο το θερμικό σοκ των βακτηρίων
- Απευθείας επώαση σε πάγο για 2 λεπτά
- Προσθήκη 800µl θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικά και στην συνέχεια μεταφορά της συνολικής ποσότητας του tube σε σωλήνες επώασης
- Μεταφορά των σωλήνων σε επωαστήρα με 37oC και 160RPM για 50 λεπτά
- Επίστρωση 400µl καλλιέργειας σε τρυβλίο με LB άγαρ και αμπικιλίνη
- Προσθήκη του τρυβλίου σε επωαστήρα στους 37oC για 16 ώρες

Μετά την επώαση του τρυβλίου για 16 ώρες, αναπτύχθηκαν αποικίες. Ακολούθησε προσθήκη 2ml θρεπτικού LB με αμπικιλίνη σε σωλήνες επώασης και συλλογή 6 αποικιών κάτω από φλόγα. Οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα με 37oC και 160RPM για 16 ώρες.

3.2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και διαγνωστική PCR για το sgRNA1

Για κάθε αποικία πρέπει να γίνει έλεγχος της κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενα στάδια και να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-Puro. Από κάθε καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με homemade kit σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Μεταφορά 1,5ml από κάθε καλλιέργεια σε tube 1,5ml
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Αφαίρεση υπερκείμενου από κάθε tube και προσθήκη 100μl από το Lysis Buffer I
- Vortex των tubes και επαναδιάλυση των βακτηρίων
- Προσθήκη 200μl από το Lysis Buffer II ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Προσθήκη 150μl από το Lysis Buffer III ανακίνηση και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Συλλογή και μεταφορά 400μl από το υπερκείμενο σε νέα tubes
- Προσθήκη 1ml αιθανόλης 100% και επώαση στους -80oC για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 500μl αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4oC
- Αφαίρεση υπερκείμενου και Air-Drying για 15 λεπτά
- Επαναδιάλυση του απομονωμένου πλασμιδιακού φορέα σε 100μl WFI

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα από κάθε καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR για την εξακρίβωση της ύπαρξης του sgRNA1 ή όχι. Η σύσταση και οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στους [Πίνακες 10+11](#).

Πίνακας 10: Σύσταση της διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του sgRNA1 στον AIO-Puro

	Ποσότητα
Taq Polymerase Buffer A 10x	5 μl
Taq Polymerase	0,15 μl
dNTPs 10mM	0,5 μl
Primer Prom_sgRNA1_F1	1 μl
Primer AIO_seq_F	1 μl
Πλασμιδιακός φορέας	1 μl
WFI	41,35 μl
Τελικός όγκος	50 μl

Πίνακας 11: Συνθήκες της διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του sgRNA1 στον AIO-Puro

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95oC	3 min
Αποδιάταξη	95oC	45 sec
Υβριδοποίηση	60oC	10 sec
Επιμήκυνση	72oC	50 sec
Τελική Επιμήκυνση	72oC	5 min
Αριθμός κύκλων	35	

Στα προϊόντα της διαγνωστικής PCR έγινε προσθήκη 10μl Loading Dye και στην συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1% Ο θετικός κλώνος (P1) που επιλέχθηκε, ανακαλλιεργήθηκε σε 3ml θρεπτικό LB με αμπικιλίνη και μεταφέρθηκε σε επωαστήρα με 37oC και 160RPM για 16 ώρες. Μετά την επώαση, μέρος της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία stock γλυκερόλης.

3.2.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον θετικό κλώνο με εμπορικές μεθόδους

Μέρος της καλλιέργειας του θετικού κλώνου χρησιμοποιήθηκε για της απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro που περιείχε το sgRNA1. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το NucleoSpin Plasmid kit από MACHEREY-NAGEL. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- Προσθήκη καλλιέργειας σε tube 1,5ml και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11000g και θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 250μl Buffer A1 και επαναδιάλυση βακτηρίων με vortex
- Προσθήκη 250μl Buffer A2 (lysis), ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Προσθήκη 300μl Buffer A3, ανακίνηση μέχρι αλλαγής χρώματος και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 11000g και θερμοκρασία δωματίου
- Μεταφορά 750μl από το υπερκείμενο σε στήλη και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11000g και θερμοκρασία δωματίου
- Απόρριψη του flowthrough, προσθήκη 500μl από το AW και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11000g και θερμοκρασία δωματίου
- Απόρριψη του flowthrough, προσθήκη 600μl από το Buffer A4 και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11000g και θερμοκρασία δωματίου
- Απόρριψη του flowthrough, μεταφορά της στήλης σε νέο tube και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 11000g και θερμοκρασία δωματίου

- Μεταφορά της στήλης στο τελικό tube, προσθήκη 50μl ζεσταμένου Elution Buffer στο κέντρο της στήλης και επώση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 11000g και θερμοκρασία δωματίου

Ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης του απομονωμένου πλασμιδιακού φορέα σε ειδικό μηχάνημα (nanodrop).

3.2.2.6 PCR επιβεβαίωσης στον πλασμιδιακό φορέα και πέψη του με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο

Για τον πλασμιδιακό φορέα που απομονώθηκε, πραγματοποιήθηκε PCR επιβεβαίωσης με σύσταση και συνθήκες που περιγράφονται στους [Πίνακες 10+12](#).

Πίνακας 12: Συνθήκες PCR επιβεβαίωσης του θετικού κλώνου P1

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95oC	3 min
Αποδιάταξη	95oC	45 sec
Υβριδοποίηση	60oC	10 sec
Επιμήκυνση	72oC	30 sec
Τελική Επιμήκυνση	72oC	5 min
Αριθμός κύκλων	30	

Στα προϊόντα της PCR επιβεβαίωσης έγινε προσθήκη 10μl Loading Dye και στην συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Αφού επιβεβαιώθηκε το αποτέλεσμα ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού φορέα με κατάλληλο ένζυμο έτσι ώστε να ανοίξει η θέση κλωνοποίησης του sgRNA2. Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37oC σε υδατόλουτρο για 5 ώρες. ([Πίνακας 13](#))

Πίνακας 13: Σύσταση αντίδρασης πέψης του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro-sgRNA1

	Ποσότητα
Neb 3.1 buffer 10x	5 μl
BsaI HF	5 μl
Πλασμιδιακός φορέας	3 μl
WFI	37μl
Τελικός όγκος	50 μl

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, μέρος της συνολικής ποσότητας ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με στόχο την επιβεβαίωση της πέψης του φορέα. Μαζί με τον προϊόν πέψης, ηλεκτροφορήθηκαν και αρνητικός και θετικός μάρτυρας. Η υπόλοιπη ποσότητα ηλεκτροφορήθηκε και ακολούθησε εκχύλιση του

φορέα που υπέστη πέψη με κατάλληλο kit (gel extraction). Μετά την επαναδιάλυση του φορέα ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης σε ειδικό μηχάνημα (nanodrop).

3.2.2.7 Κλωνοποίηση του κομμένου AIO-Puro-sgRNA1 με το sgRNA2 και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* DH5a

Η κλωνοποίηση του sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε με αντίδραση λιγάσης. Τα συστατικά της αντίδρασης περιγράφονται στον [Πίνακα 14](#). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 16oC για 16 ώρες.

Πίνακας 14: Σύσταση της αντίδρασης λιγάσης του AIO-Puro-sgRNA1 και του sgRNA2

	Ποσότητα
T4 ligase Buffer 10x	1 µl
T4 ligase	1 µl
Άδειος πλασμιδιακός φορέας	2,4 µl
dsoligo sgRNA2	4 µl
WFI	1,6 µl
Τελικός όγκος	10 µl

Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους DH5a και στρώσιμο τρυβλίου με LB agar και αμπικιλίνη όπως περιγράφηκε στην [ενότητα 3.2.2.3](#). Μετά την επώαση 16 ωρών, αναπτύχθηκαν αποικίες και επιλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν 6 από αυτές σε σωλήνες επώασης με 2ml θρεπτικό LB με αμπικιλίνη σε επωαστήρα με 37oC και 160RPM για 16 ώρες.

3.2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και διαγνωστική PCR για το sgRNA2

Από τις 6 υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με homemade kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην [ενότητα 3.2.2.4](#). Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα από κάθε καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR για την εξακρίβωση της ύπαρξης του sgRNA2 ή όχι. Η σύσταση και οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στους [Πίνακες 15+16](#).

Πίνακας 15: Σύσταση της διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του sgRNA2 στον AIO-Puro-sgRNA1

	Ποσότητα
Taq Polymerase Buffer A 10x	5 µl
Taq Polymerase	0,15 µl
dNTPs 10mM	0,5 µl
Primer Prom sgRNA2 F1	1 µl
Primer AIO_seq_F	1 µl
Πλασμιδιακός φορέας	1 µl
WFI	41,35 µl
Τελικός όγκος	50 µl

Πίνακας 16: Συνθήκες της διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του sgRNA2 στον AIO-Puro-sgRNA1

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95oC	3 min
Αποδιάταξη	95oC	45 sec
Υβριδοποίηση	60oC	10 sec
Επιμήκυνση	72oC	20 sec
Τελική Επιμήκυνση	72oC	5 min
Αριθμός κύκλων	25	

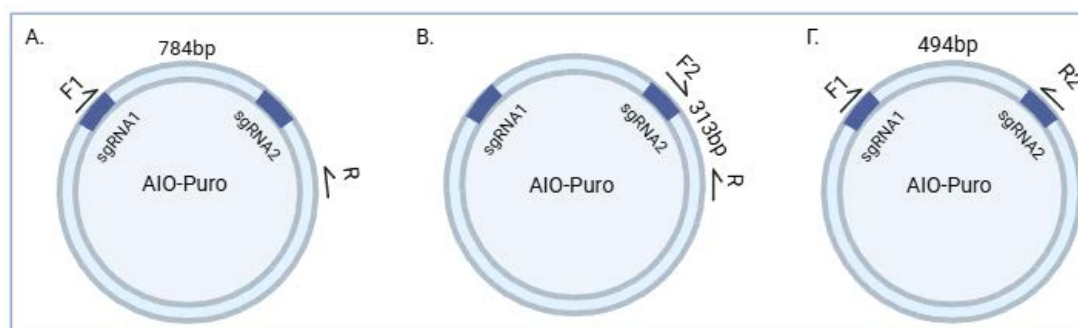
Στα προϊόντα της διαγνωστικής PCR έγινε προσθήκη 10μl Loading Dye και στην συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1% Ο θετικός κλώνος (P3) που επιλέχθηκε, ανακαλλιεργήθηκε σε 3ml θρεπτικό LB με αμπικιλίνη και μεταφέρθηκε σε επωαστήρα με 37oC και 160RPM για 16 ώρες. Μετά την επώαση, μέρος της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία stock γλυκερόλης.

3.2.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον θετικό κλώνο με εμπορικές μεθόδους

Μέρος της καλλιέργειας του θετικού κλώνου (P3) χρησιμοποιήθηκε για της απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro που περιείχε τα sgRNA1 και sgRNA2. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το NucleoSpin Plasmid kit από MACHEREY-NAGEL. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφηκε στην [ενότητα 3.2.2.5](#). Ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης του απομονωμένου πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro-sgRNA1+2 σε ειδικό μηχάνημα (nanodrop).

3.2.2.10 PCR επιβεβαίωσης της ένθεσης των sgRNA1+2 στον πλασμιδιακό φορέα

Χρησιμοποιώντας τον απομονωμένο πλασμιδιακό φορέα AIO-Puro-sgRNA1+2 πραγματοποιήθηκαν 3 PCR επιβεβαίωσης της ένθεσης των sgRNA1+2. Τα τμήματα που ενισχύθηκαν σε κάθε PCR παρουσιάζονται στην [Εικόνα 3.4](#).



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro μετά την ένθεση των δύο sgRNA και τις τρεις διαγνωστικές PCR που πραγματοποιήθηκαν Α) Σχηματική απεικόνιση της διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση της ένθεσης του sgRNA1 Β) Σχηματική απεικόνιση της διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση της ένθεσης του sgRNA2 Γ) Σχηματική απεικόνιση της PCR επιβεβαίωσης για την επιβεβαίωση της ένθεσης των δύο sgRNA

Συγκεκριμένα, για την ενίσχυση του τμήματος της [Εικόνας 3.4Α](#) πραγματοποιήθηκε PCR επιβεβαίωσης με την σύσταση και τις συνθήκες που παρουσιάζονται στους [Πίνακες 10+12](#). Αντίστοιχα, για την ενίσχυση του τμήματος της [Εικόνας 3.4Β](#) πραγματοποιήθηκε PCR επιβεβαίωσης με την σύσταση και τις συνθήκες που παρουσιάζονται στους [Πίνακες 15+16](#). Για την ενίσχυση του τμήματος της [Εικόνας 3.4Γ](#) πραγματοποιήθηκε PCR επιβεβαίωσης με την σύσταση και τις συνθήκες που παρουσιάζονται στους [Πίνακες 17+18](#).

Πίνακας 17: Σύσταση της PCR επιβεβαίωσης με Primers που υβριδίζουν πάνω στα sgRNA1+2

	Ποσότητα
Taq Polymerase Buffer A 10x	5 µl
Taq Polymerase	0,15 µl
dNTPs 10mM	0,5 µl
Primer Prom sgRNA1 F1	1 µl
Primer Prom sgRNA2 R1	1 µl
Πλασμιδιακός φορέας	2 µl
WFI	40,35 µl
Τελικός όγκος	50 µl

Πίνακας 18: Συνθήκες της PCR επιβεβαίωσης με Primers που υβριδίζουν πάνω στα sgRNA1+2

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95oC	3 min
Αποδιάταξη	95oC	45 sec
Υβριδοποίηση	60oC	10 sec
Επιμήκυνση	72oC	30 sec
Τελική Επιμήκυνση	72oC	5 min
Αριθμός κύκλων	25	

Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε άκοπος πλασμιδιακός φορέας ως αρνητικός μάρτυρας, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και θετικός μάρτυρας για την PCR όπου παρουσιάζεται στην [Εικόνα 3.4Α](#). Έγινε προσθήκη 10µl Loading Dye σε κάθε προϊόν PCR και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1,2%.

3.2.2.11 Γραμμοποίηση του κλωνοποιημένου φορέα AIO-Puro-sgRNA1+2

Για την διαμόλυνση των κυττάρων AGS ο πλασμιδιακός φορέας AIO-Puro-sgRNA1+2 από κυκλικός έπρεπε να μετατραπεί σε γραμμικό. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις πέψης του φορέα με κατάλληλο ένζυμο

περιορισμού. Η αντίδραση πέψης ([Πίνακας 19](#)) πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες.

Πίνακας 19: Σύσταση της πέψης του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro-sgRNA1+2 για την γραμμοποίηση του

	Ποσότητα x1
NEB 3.1 Buffer 10x	4 µl
PvuII HF	2 µl
Πλασμιδιακός φορέας	6,5 µl
WFI	27,5 µl
Τελικός όγκος	40 µl

Μετά την ολοκλήρωση της πέψης απομονώθηκαν 4µl της αντίδρασης και σε αυτά προστέθηκαν 2µl Loading Dye 6x και 6µl WFI. Στην συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με στόχο την επιβεβαίωση της πέψης του φορέα. Η υπόλοιπη ποσότητα (36µl) καθαρίστηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Ένωση των 2 προϊόντων πέψης σε 1 νέο tube 1,5ml
- Προσθήκη 40µl οξικό νάτριο 3M, pH 5,2 και 288µl WFI στο δείγμα
- Προσθήκη 400µl Φαινόλης-Χλωροφόρμιου-Ισοαμυλικής αλκοόλης και vortex
- Φυγοκέντρηση δειγμάτων για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4°C
- Συλλογή της πάνω φάσης που περιλαμβάνει τον γραμμοποιημένο φορέα σε νέα tubes 1,5ml
- Προσθήκη 1ml αιθανόλης 100% και 2µl γλυκογόνο και αποθήκευση στους -80°C για 1 ώρα
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 14000rpm και 4°C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 500µl αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 14000rpm και 4°C
- Αφαίρεση υπερκείμενου και Air-Drying για 15 λεπτά
- Επαναδιάλυση του φορέα σε 32µl WFI και μέτρηση της συγκέντρωσης του σε ειδικό μηχανήμα (nanodrop)

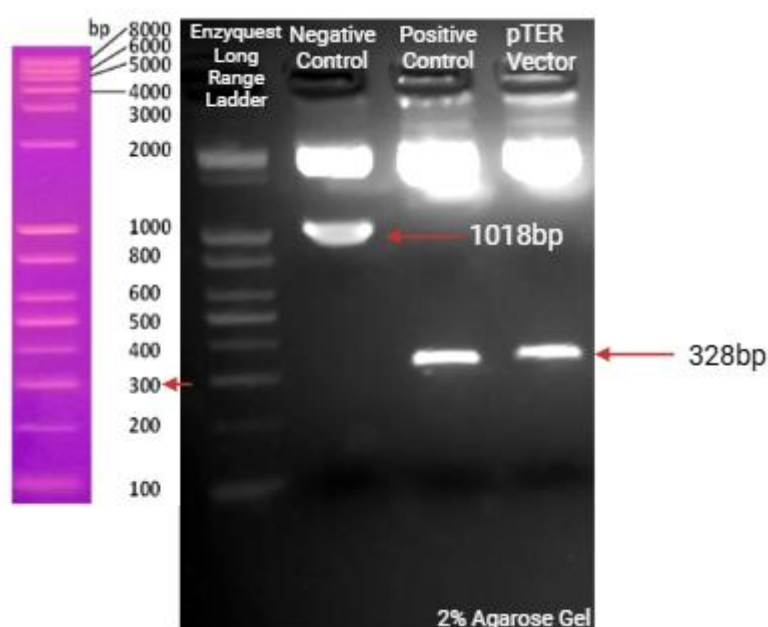
Αποθήκευση στους -20°C για μελλοντική χρήση

4. Αποτελέσματα

4.1 Αποσιώπηση μιας RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης με συστήματα επαγωγίμου RNAi

4.1.1 Έλεγχος της ύπαρξης του shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pTER

Το κατάλληλο shRNA είχε κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pTER από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου. Για την επιβεβαίωση της ορθής κλωνοποίησης του shRNA, πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα μαζί με θετικό και αρνητικό μάρτυρα, χρησιμοποιώντας κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Τα προϊόντα πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.1](#).

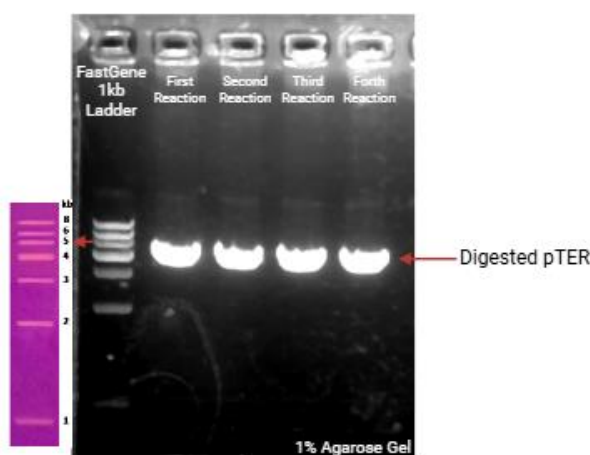


Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση του pTER με την ένθεση του shRNA μετά από πέψη με *EcoRI* σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με στόχο την εξακρίβωση της ύπαρξης του ενθέματος. Φορτώθηκαν με σειρά: Long Range Ladder, αρνητικός μάρτυρας όπου ήταν άδειος φορέας με αλληλουχία Stuffer, θετικός μάρτυρας όπου ήταν pTER φορέας με επιβεβαιωμένη ένθεση shRNA και ο υπό εξέταση pTER φορέας

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την κλωνοποίηση του shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pTER. Η ζώνη που προέκυψε μετά την πέψη του φορέα εντοπίζεται στο ίδιο σημείο με τον θετικό μάρτυρα, ο οποίος ήταν ο pTER φορέας με επιβεβαιωμένη ύπαρξη shRNA. Αντίστοιχα, στον αρνητικό μάρτυρα ο οποίος ήταν άκοπος pTER, παρατηρείται η αναμενόμενη ζώνη στα 1018 ζεύγη βάσεων (stuffer sequence).

4.1.2 Γραμμοποίηση του κλωνοποιημένου φορέα pTER

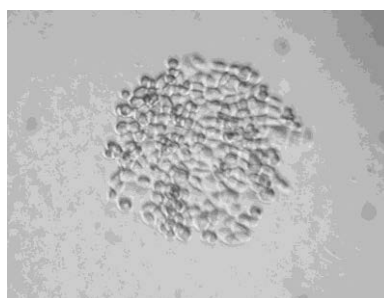
Για την επιτυχημένη διαμόλυνση των κυττάρων AGTR13, ο φορέας που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει πρώτα να έχει γραμμοποιηθεί. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις πέψης. Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων, μέρος κάθε προϊόντος ηλεκτροφορήθηκε ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της πέψης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.2](#). Συγκεκριμένα, η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Ακολούθησε καθαρισμός του γραμμοποιημένου φορέα, με συνολική απόδοση 16224ng DNA.



Εικόνα 4.2: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του pTER σε πήκτωμα αгарόζης 1% με στόχο τον έλεγχο της επιτυχίας της γραμμοποίησης του φορέα. Φορτώθηκαν σε σειρά: 1Kb Ladder, προϊόν 1^{ης} αντίδρασης, προϊόν 2^{ης} αντίδρασης, προϊόν 3^{ης} αντίδρασης και προϊόν 4^{ης} αντίδρασης

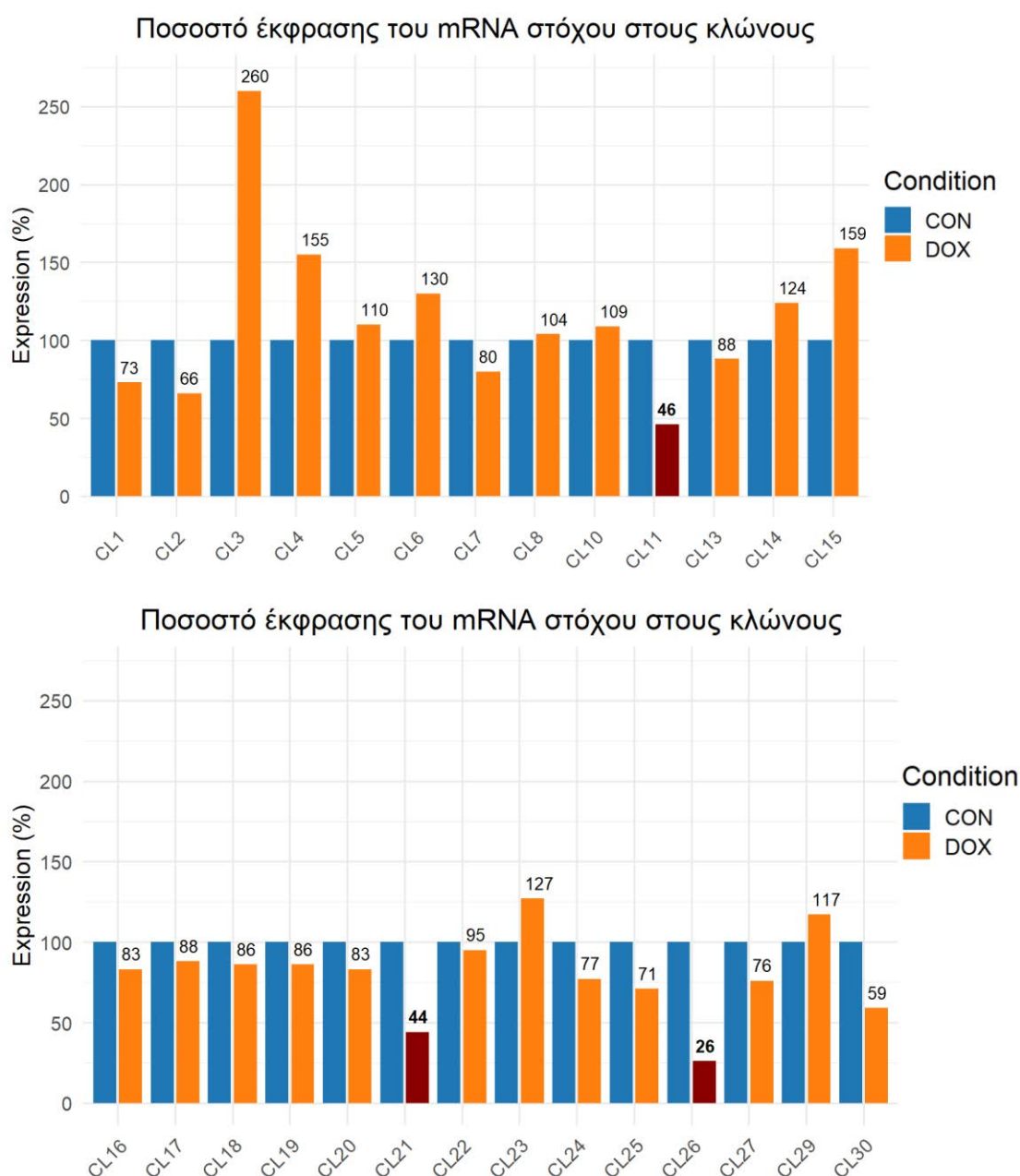
4.1.3 Διαμόλυνση των κυττάρων AGTR13 με τον πλασμιδιακό φορέα pTER, συλλογή κλώνων και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του mRNA στόχου CPR

Η διαμόλυνση των κυττάρων AGTR13 ήταν επιτυχής, καθώς μετά από 12 ημέρες επώασης σε θρεπτικό μέσο επιλογής με αντιβιοτικά παρατηρήθηκαν αναπτυσσόμενες αποικίες. Στην [Εικόνα 4.3](#) παρουσιάζεται μία από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν.



Εικόνα 4.3: Φωτογραφία από μία ενδεικτική αποικία που αναπτύχθηκε μετά από την επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής

Συνολικά, συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν 30 μεμονωμένοι κλώνοι. Για κάθε έναν, απομονώθηκε RNA με και χωρίς προσθήκη δοξυκυκλίνης, έγινε κατεργασία με DNάση, σύνθεση cDNA και τελικά σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του mRNA στόχου CPR με qPCR μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν με δοξυκυκλίνη (DOX) και αυτών που δεν επωάστηκαν με το αντιβιοτικό (CON). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.4](#).



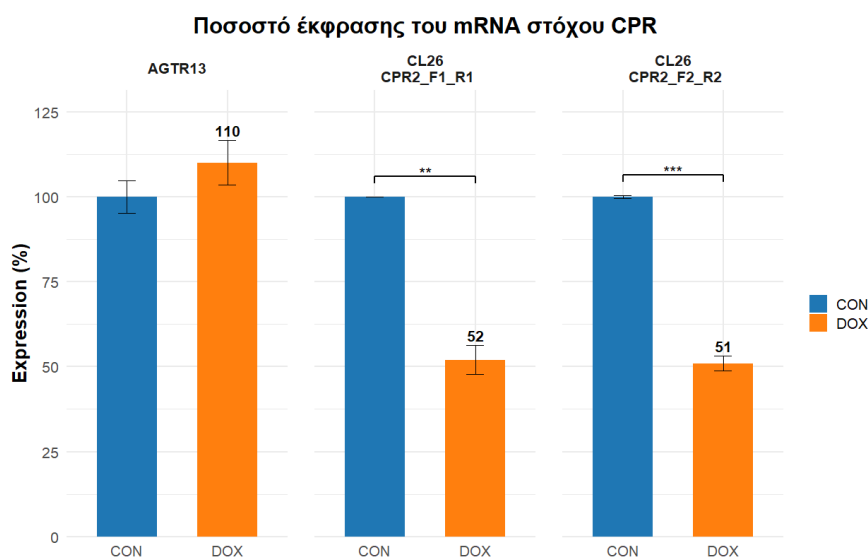
Εικόνα 4.4: Τα ποσοστά έκφρασης του mRNA-στόχου CPR στους κλώνους μετά από κανονικοποίηση με GAPDH. Οι τιμές έκφρασης στα κύτταρα CON κάθε κλώνου χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς (100%).

Παρατηρήθηκαν τρεις κλώνοι με ικανοποιητική μείωση της έκφρασης του mRNA στόχου CPR. Συγκεκριμένα, στους κλώνους 11, 21 και 26 παρατηρήθηκε ποσοστό

σίγησης 54%, 56% και 74% αντίστοιχα. Επιλέχθηκε ο κλώνος 26 καθώς εμφάνισε την μεγαλύτερη απόδοση σίγησης σε σχέση με τους άλλους δύο.

4.1.4 Επιβεβαίωση της σίγησης του mRNA στόχου CPR στον κλώνο 26 σε ανεξάρτητο πείραμα και σύγκριση της έκφρασης του lncRNA RECUR1

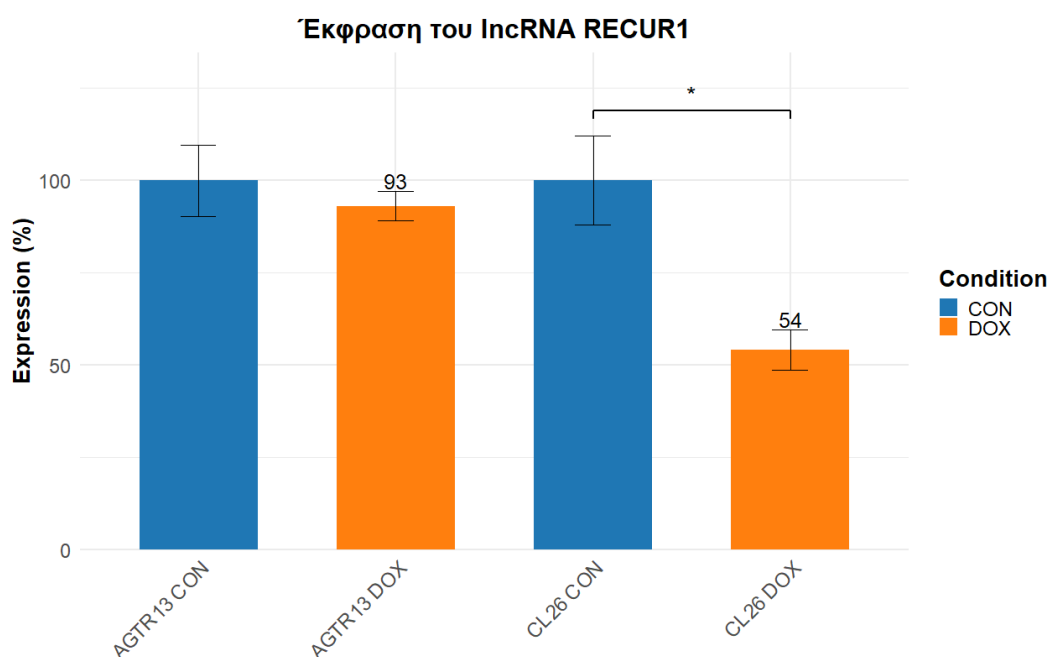
Ο κλώνος 26 επιλέχθηκε και ανακαλλιεργήθηκε σε μεγάλη φλάσκα. Στην συνέχεια, κύτταρα της φλάσκας χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του mRNA στόχου CPR μεταξύ κυττάρων που επωάστηκαν με δοξκυκλίνη (DOX) και κυττάρων που δεν επωάστηκαν με το αντιβιοτικό (CON). Στόχος της διαδικασίας ήταν η επιβεβαίωση της σίγησης και σε ανεξάρτητο πείραμα. Μαζί με τα κύτταρα του κλώνου 26, ελέγχθηκαν και κύτταρα AGTR13 χωρίς τροποποίηση, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.5](#). Στα κύτταρα AGTR13 δεν παρατηρείται σίγηση του mRNA στόχου CPR, ενώ στον κλώνο 26 καταγράφεται ποσοστό σίγησης περίπου 50%. Μάλιστα, το ποσοστό σίγησης στον κλώνο επιβεβαιώνεται με δύο διαφορετικά primer sets.



Εικόνα 4.5: Επιβεβαίωση της σίγησης του mRNA-στόχου CPR στον κλώνο 26 σε ανεξάρτητο πείραμα. Ο κλώνος AGTR13 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας και δεν παρουσιάζει αλλαγή στην έκφραση. Στον κλώνο 26 η σίγηση του στόχου επιβεβαιώθηκε με δύο διαφορετικά primer sets (CPR2_F1_R1 και CPR2_F2_R2). Οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το RPLP1 και εκφράζονται ως ποσοστά με σημείο αναφοράς το CON (100%)

Στην συνέχεια, έγινε μέτρηση και σύγκριση της έκφρασης του lncRNA ώστε να διερευνηθεί εάν ρυθμίζεται από το γονίδιο-στόχο CPR (το οποίο έχει ήδη φανεί ότι ρυθμίζει θετικά από προηγούμενη πτυχιακή του εργαστηρίου). Στην [Εικόνα 4.6](#) παρουσιάζεται η σύγκριση της έκφρασης του RECUR1. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι στα κύτταρα DOX του κλώνου 26, υπάρχει μείωση της έκφρασης του lncRNA κατά

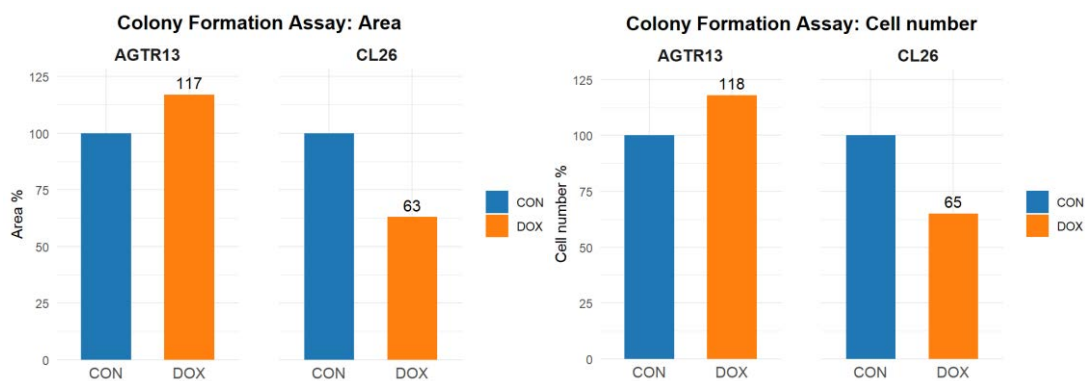
46% έναντι των κυττάρων του μάρτυρα (CON). Παράλληλα, στα κύτταρα AGTR13 με ρόλο αρνητικού μάρτυρα, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA ανάμεσα στα CON και DOX. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού άξονα μεταξύ γονιδίου-στόχου CPR και του lncRNA RECUR1, κατά τον οποίο τα δύο γονίδια ρυθμίζουν αμοιβαία και θετικά την έκφραση τους.



Εικόνα 4.6: Έκφραση του lncRNA RECUR1 στον κλώνο 26. Τα κύτταρα AGTR13 χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας και δεν εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στην έκφραση. Στον κλώνο 26, η επαγωγή της σίγησης του γονιδίου στόχου CPR οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του RECUR1 κατά 46% σε σύγκριση με τα CON. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς το GAPDH και εκφράζονται με σημείο αναφοράς το CON (100%)

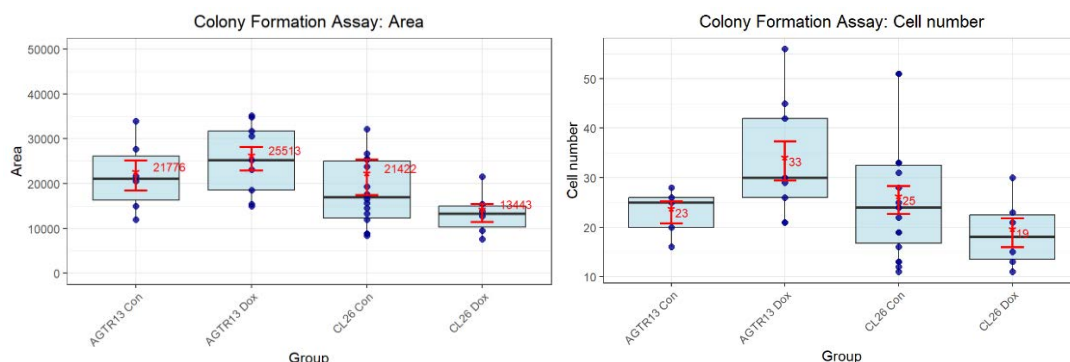
4.1.5 Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay)

Αφού επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα της σίγησης του mRNA στόχου CPR στον κλώνο 26 και σε ανεξάρτητο πείραμα, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών όπως περιγράφηκε στην [ενότητα 3.2.1.8](#). Την τρίτη ημέρα επώασης, έγινε λήψη φωτογραφιών των αποικιών που σχηματίστηκαν στα πηγάδια με μικροσκόπιο. Στην συνέχεια, έγινε μέτρηση του μεγέθους των αποικιών αλλά και του αριθμού των κυττάρων κάθε μίας και έγινε σύγκριση μεταξύ τα CON και DOX πηγάδια. Στην [Εικόνα 4.7](#) παρουσιάζονται δύο διαγράμματα όπου φαίνεται η ποσοστιαία διαφορά του εμβαδού και του αριθμού των κυττάρων των αποικιών στα δείγματα CL26 και AGTR13.



Εικόνα 4.7: Αποτελέσματα του Colony Formation Assay στον κλώνο 26 και στον αρνητικό μάρτυρα AGTR13. Στο αριστερό διάγραμμα παρουσιάζεται η ποσοστιαία διαφορά στο εμβαδόν των αποικιών και στο δεξί διάγραμμα η ποσοστιαία διαφορά στον αριθμό κυττάρων. Τα κύτταρα AGTR13 δεν εμφάνισαν σημαντική μεταβολή με την προσθήκη DOX, ενώ στον κλώνο 26 παρατηρήθηκε μείωση του εμβαδού κατά 37% και του αριθμού κυττάρων κατά 35%. Οι τιμές εκφράζονται σε ποσοστά σε σχέση με το αντίστοιχο CON (100%).

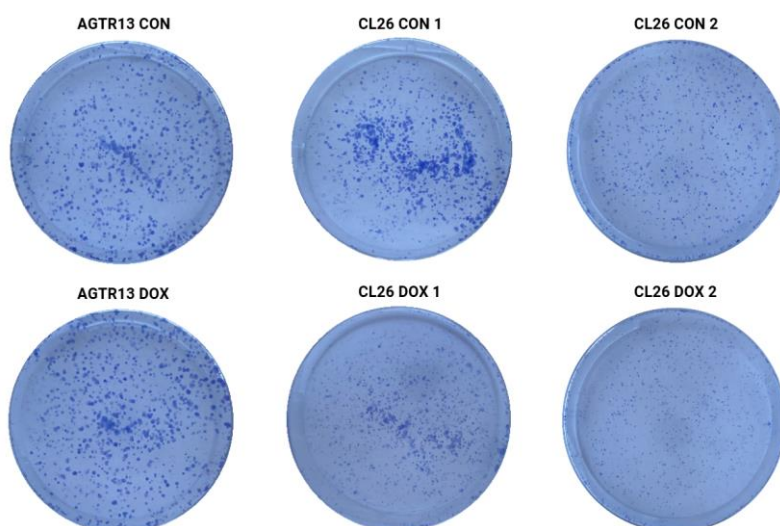
Φαίνεται ότι η σίγηση του mRNA στόχου CPR στον κλώνο 26 επηρέασε το μέγεθος των αποικιών, καθώς και τον αριθμό των κυττάρων που τις απαρτίζουν. Συγκεκριμένα, οι αποικίες που δημιουργήθηκαν από κύτταρα που επώαστηκαν με δοξκυκλίνη για τρεις μέρες, ήταν κατά 37% μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με αυτές που προέκυψαν κύτταρα σε θρεπτικό χωρίς δοξκυκλίνη. Επακολούθως, οι αποικίες DOX αποτελούνταν από 35% λιγότερα κύτταρα έναντι των CON. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στον αρνητικό μάρτυρα AGTR13, όπου το μέγεθος των αποικιών και ο αριθμός των κυττάρων δεν εμφανίζει μείωση. Στην [Εικόνα 4.8](#) παρουσιάζονται τα ακριβή αποτελέσματα σε boxplots, όπου για τον κλώνο 26 το μέσο εμβαδόν και ο αριθμός κυττάρων των αποικιών CON ήταν 21422 και 25 αντίστοιχα ενώ για τα DOX ήταν 13443 και 19.



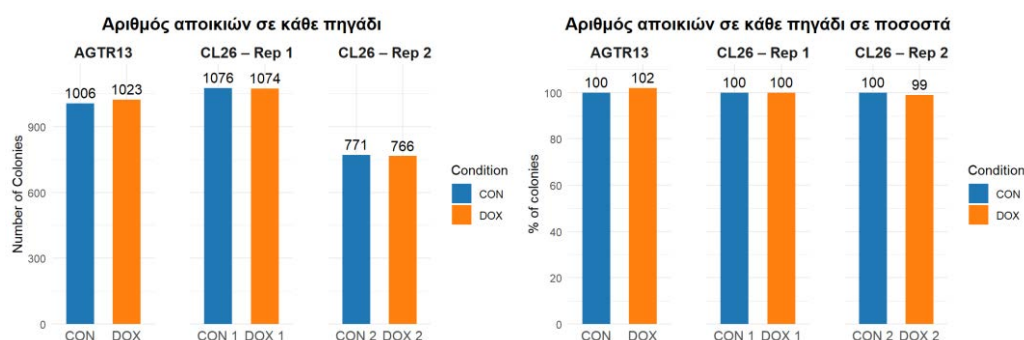
Εικόνα 4.8: Boxplots των μετρήσεων του Colony Formation Assay. Στο αριστερό διάγραμμα απεικονίζεται το εμβαδόν και στο δεξί ο αριθμός κυττάρων για τα δείγματα AGTR13 που αποτελεί αρνητικό μάρτυρα και τον κλώνο 26 υπό συνθήκες CON και DOX

Μετά από μία εβδομάδα επώασης του πιάτου, τα κύτταρα βάφτηκαν με μπλε του μεθυλενίου και στην συνέχεια έγινε λήψη φωτογραφιών από τα πηγάδια. Από την [Εικόνα 4.9](#) φαίνεται ότι στα πηγάδια DOX του κλώνου 26 υπάρχει μικρότερη ανάπτυξη των αποικιών έναντι των πηγαδίων CON. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει για τα κύτταρα AGTR13 όπου δεν υπάρχει διαφορά στην ανάπτυξη των αποικιών ανάμεσα στα πηγάδια CON και DOX, επιβεβαιώνοντας την επίδραση της σίγησης του mRNA στόχου CPR στην ανάπτυξη των γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS.

Μετά από μέτρηση του αριθμού των αποικιών σε κάθε πηγάδι, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα πηγάδια CON και DOX. ([Εικόνα 4.10](#)) Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, καθώς υποδηλώνει ότι η σίγηση του mRNA στόχου CPR δεν επηρεάζει τον αριθμό των αποικιών που δημιουργούνται αλλά τον ρυθμό ανάπτυξης τους, δηλαδή την ισορροπία ανάμεσα σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση, καθώς φαίνεται ότι αναπτύσσονται με μικρότερο ρυθμό.



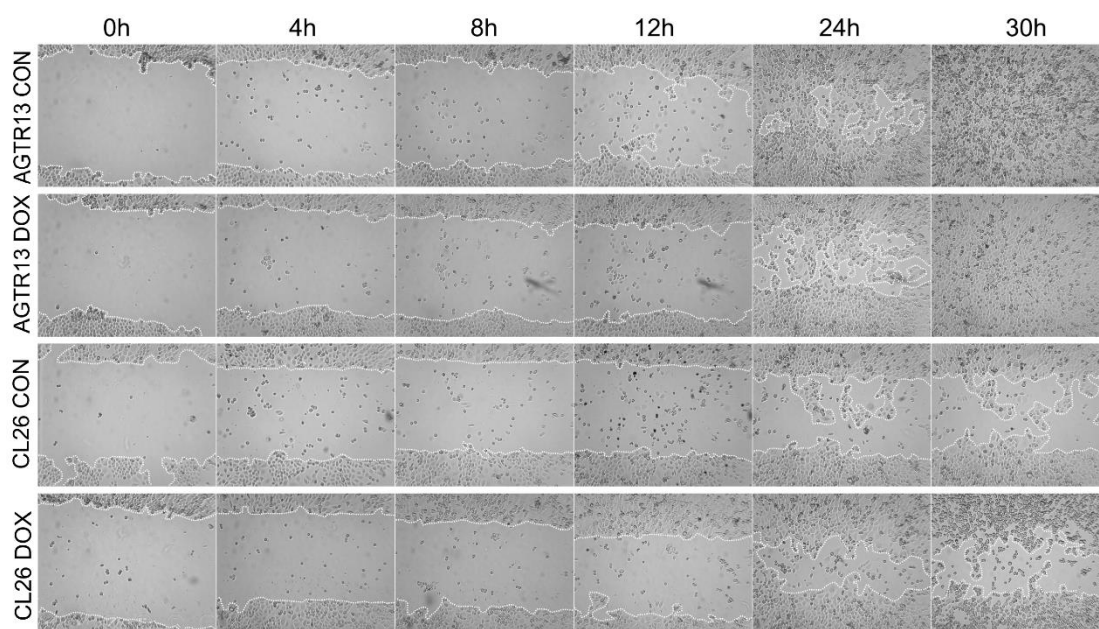
Εικόνα 4.9: Φωτογραφίες των πηγαδίων από Colony Formation Assay μετά από χρώση με μπλε του Μεθυλενίου. Κύτταρα AGTR13 με ρόλο αρνητικού μάρτυρα και ο κλώνος 26 σε δύο επαναλήψεις.



Εικόνα 4.10: Συγκριτική ανάλυση του αριθμού αποικιών μετά από χρώση με μπλε του Μεθυλενίου. Στο αριστερό διάγραμμα απεικονίζεται ο απόλυτος αριθμός αποικιών ανά πηγάδι, ενώ στο δεξί οι ίδιες μετρήσεις εκφρασμένες σε ποσοστά με σημείο αναφοράς τα δείγματα CON (100%).

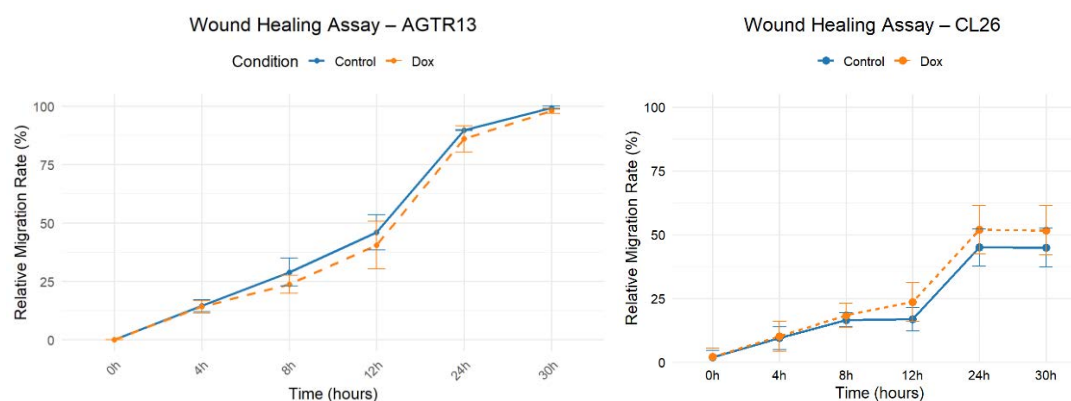
4.1.6 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay)

Στόχος της δοκιμασίας επούλωσης πληγών ήταν η μελέτη της κινητικότητας των κυττάρων στα οποία έγινε καταστολή του mRNA στόχου σε σύγκριση με τα κύτταρα control. Όπως περιγράφηκε και στην [ενότητα 3.2.1.9](#), δημιουργήθηκε τομή σε κάθε πηγάδι και στην συνέχεια έγινε λήψη φωτογραφιών στα σημεία τομής σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Συγκεκριμένα, σε κάθε πηγάδι λήφθηκαν εικόνες από τρία διαφορετικά σημεία της τομής για κάθε χρονική στιγμή. Στην [Εικόνα 4.11](#) παρουσιάζονται φωτογραφίες από την μετακίνηση των κυττάρων μίας τομής για κάθε δείγμα κάθε χρονική στιγμή. Συγκεκριμένα, φαίνεται η μετακίνηση των κυττάρων από την περιφέρεια προς τον κενό χώρο.



Εικόνα 4.11: Φωτογραφίες των κυττάρων κάτω από μικροσκόπιο για την παρατήρηση της μετανάστευσης των κυττάρων και την επούλωση της τομής που δημιουργήθηκε κατά το Wound Healing Assay. Παρουσιάζεται η πορεία κλεισίματος της τομής σε διαφορετικά χρονικά σημεία για τα κύτταρα AGTR13 (αρνητικός μάρτυρας) και τα κύτταρα του κλώνου 26, υπό συνθήκες CON και DOX.

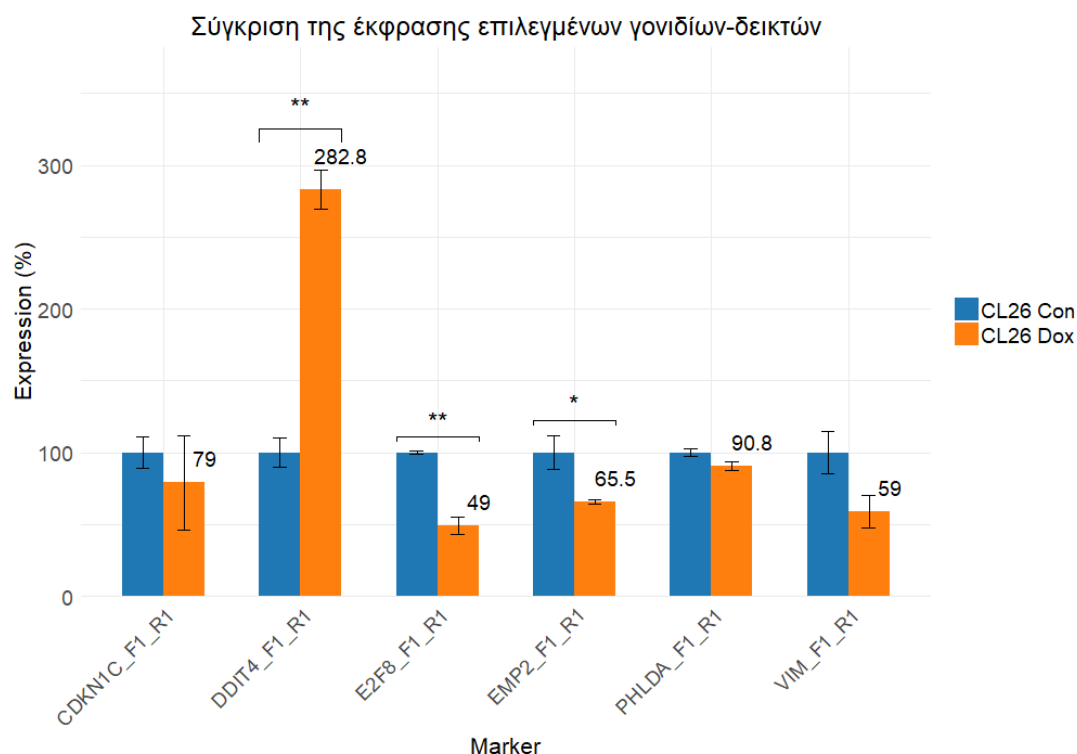
Από τον υπολογισμό των Migration index για κάθε χρονική στιγμή προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.12](#). Στα κύτταρα AGTR13 που αποτελούν αρνητικό μάρτυρα, δεν παρατηρείται διαφορά στην κινητικότητα των κυττάρων. Όσον αφορά τον κλώνο 26, προκύπτει επίσης ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην κινητικότητα των κυττάρων που πραγματοποιήθηκε η επαγωγή της σίγησης σε σχέση με τα κύτταρα CON. Μικρή διαφορά παρατηρείται στις χρονικές στιγμές 24h και 30h που όμως δεν αποτυπώνουν την κινητικότητα των κυττάρων απόλυτα, καθώς μετά τις 24h τα κύτταρα έχουν αρχίσει να διαιρούνται.



Εικόνα 4.12: Ανάλυση του Wound Healing Assay για τα κύτταρα AGTR13 (αρνητικός μάρτυρας) και τον κλώνο 26, υπό συνθήκες CON και DOX. Ο ρυθμός μετανάστευσης των κυττάρων υπολογίστηκε με κανονικοποίηση του εμβαδού κάθε χρονικής στιγμής ως προς το εμβαδόν της στιγμής 0h.

4.1.7 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων-δεικτών

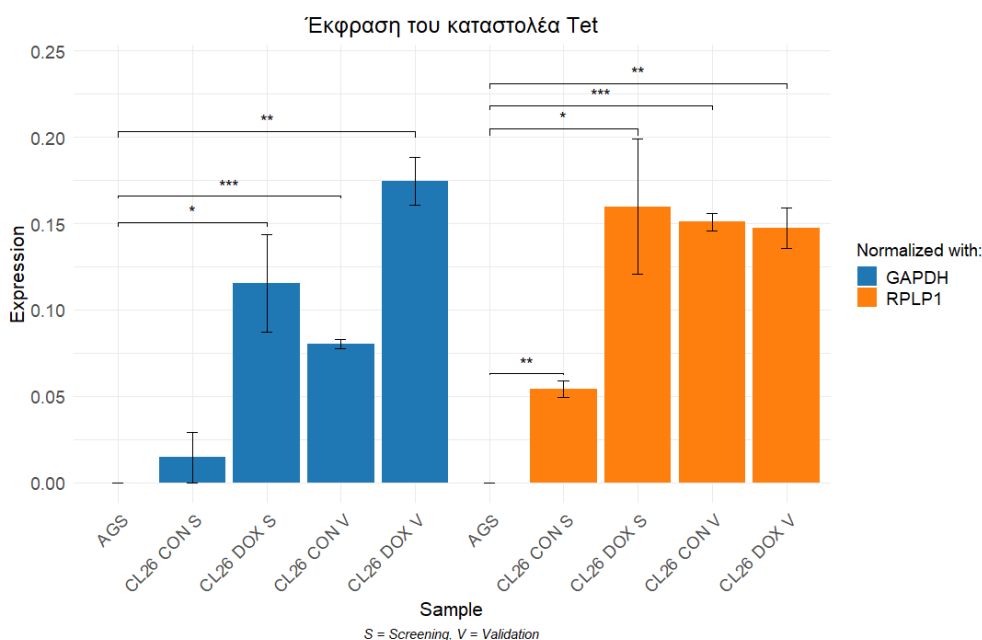
Μετά τα φαινοτυπικά πειράματα, πραγματοποιήθηκε qPCR για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων-δεικτών στα cDNA που παρασκευάστηκαν από τα κύτταρα CON και DOX του κλώνου 26 (καταστολή CPR). Τα γονίδια που ελέγχθηκαν παρουσιάζονται στην [ενότητα 3.2.1.7](#). Στην [Εικόνα 4.13](#) απεικονίζονται οι συγκριτικές τιμές έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα CON και DOX. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση των μεταγράφων των γονιδίων CDKN1C, E2F8, EMP2 και VIM στα κύτταρα DOX έναντι των CON με ποσοστά έκφρασης μικρότερα κατά 21%, 51%, 34.5% και 41% αντίστοιχα. Αντίθετα, το γονίδιο DDIT4 εμφάνισε αύξηση της έκφρασης κατά 182.8% στα κύτταρα DOX σε σύγκριση με τα CON. Για το γονίδιο PHLDA, η διαφορά έκφρασης μεταξύ CON και DOX ήταν περίπου 10%. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα Cq που μετρήθηκαν για τα γονίδια CDKN1C και DDIT4 ήταν πάνω από 36, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκφραση τους δεν είναι καθόλου αξιόπιστη και δεν πρέπει να αξιολογηθεί.



Εικόνα 4.13: Σύγκριση της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων-δεικτών σε κύτταρα του κλώνου 26, υπό συνθήκες Con και DOX. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς το GAPDH και εκφράζονται ως ποσοστά με σημείο αναφοράς το CON (100%).

4.1.8 Έλεγχος της παραγωγής του mRNA του καταστολέα TET

Πραγματοποιήθηκε qPCR επιβεβαίωσης της έκφρασης του καταστολέα TET που αποτελεί απαραίτητο στοιχείο του επαγόμενου συστήματος έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε. Τα δείγματα που συγκρίθηκαν ήταν cDNA από τα δείγματα CON και DOX του κλώνου 26, τα οποία απομονώθηκαν από το αρχικό πείραμα διαλογής (Screening-S) και από το πείραμα επιβεβαίωσης (Validation-V), καθώς και κύτταρα AGS που δεν περιείχαν την κασέτα TET και χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος δεν ήταν η σύγκριση της έκφρασης του mRNA του καταστολέα TET ανάμεσα στα δείγματα CON και DOX αλλά ο έλεγχος της έκφρασης του σε όλα τα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.14](#). Η έκφραση κανονικοποιήθηκε με δύο διαφορετικά ιδιοσύστατα γονίδια (housekeeping genes). Παρατηρείται παρουσία του mRNA του καταστολέα TET σε όλα τα δείγματα του κλώνου 26, ενώ η έκφραση είναι μηδενική στα AGS, επιβεβαιώνοντας τη σωστή λειτουργία του επαγόμενου συστήματος έκφρασης.

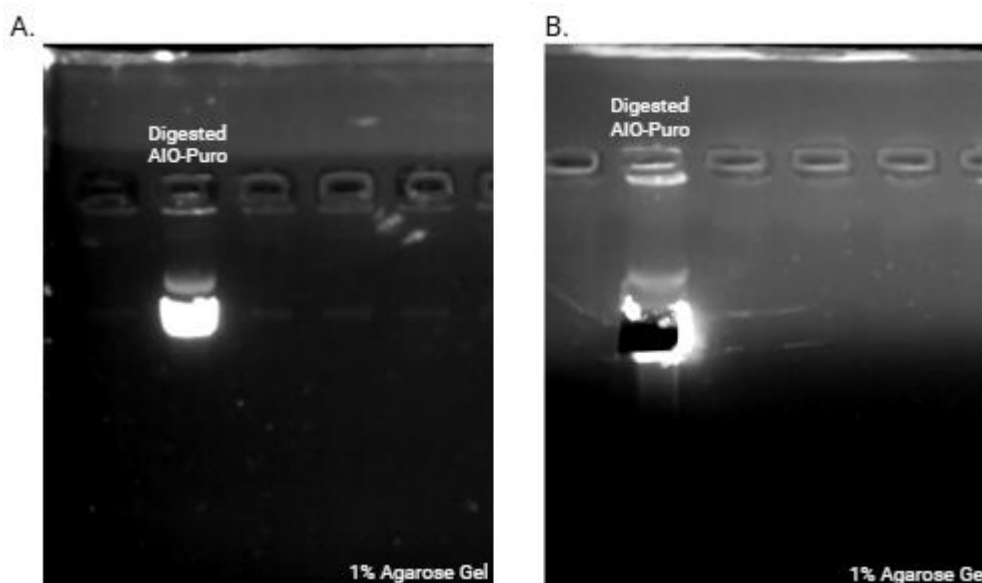


Εικόνα 4.14: Έκφραση του καταστολέα TET στα δείγματα του κλώνου 26 (CON και DOX) από το αρχικό screening (S) και από το πείραμα επιβεβαίωσης (V) και σε κύτταρα AGS με ρόλο αρνητικού μάρτυρα. Η έκφραση κανονικοποιήθηκε ως προς δύο housekeeping γονίδια (GAPDH και RPLP1). Παρατηρείται παρουσία του mRNA του καταστολέα TET σε όλα τα δείγματα του κλώνου 26, ενώ η έκφραση είναι μηδενική στα AGS.

4.2 Προετοιμασία του φορέα AIO-Puro για μεταλλαξιγένεση του υποκινητή του γονιδίου-στόχου με CRISPR-nCas9

4.2.1 Πέψη του άδειου πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro

Για την κλωνοποίηση του sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-Puro έπρεπε πρώτα να πραγματοποιηθεί μία πέψη όπου θα άνοιγε την πρώτη θέση κλωνοποίησης. Αφού πραγματοποιήθηκε η πέψη, όπως περιγράφηκε στην [ενότητα 3.2.2.2](#), ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης για την επιβεβαίωση της πέψης του φορέα και στην συνέχεια, δεύτερη ηλεκτροφόρηση για την εκχύλιση και απομόνωση μόνο του γραμμοποιημένου φορέα. Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.15](#).

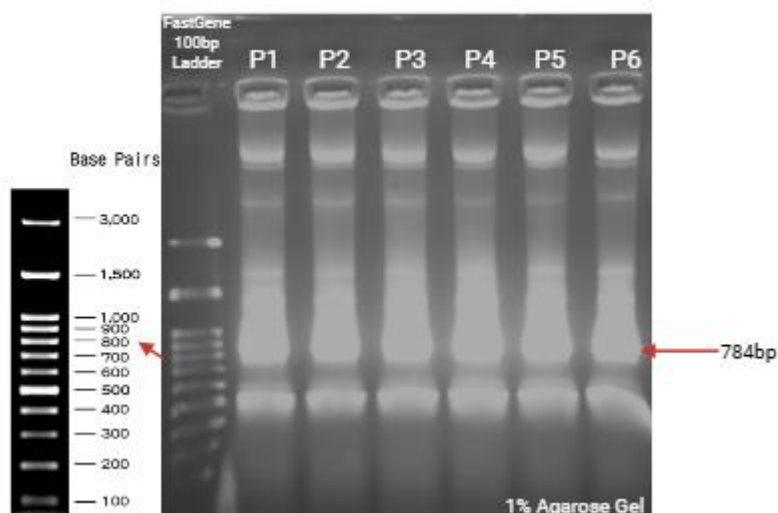


Εικόνα 4.15: Α) Ηλεκτροφόρηση μέρους της αντίδρασης πέψης που είχε στόχο το άνοιγμα της πρώτης θέσης κλωνοποίησης του άδειου φορέα AIO-Puro, για εξακρίβωση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης Β) Κόψιμο του πηκτώματος αгарόζης στο σημείο όπου βρίσκεται ο γραμμοποιημένος φορέας.

Αφού απομονώθηκε ο γραμμοποιημένος πλασμιδιακός φορέας, ακολούθησε αντίδραση λιγάσης για την κλωνοποίηση του sgRNA1. Στην συνέχεια, έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους DH5a και επίστρωση σε τρυβλίο. Αναπτύχθηκαν αποικίες και έξι από αυτές (sgRNA1 P1-P6) μεταφέρθηκαν σε υγρή καλλιέργεια.

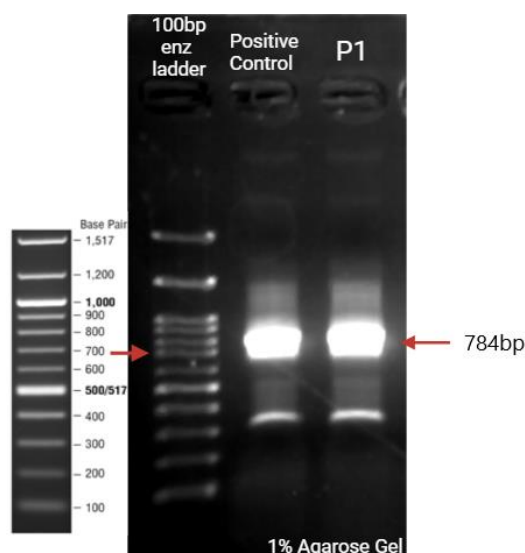
4.2.2 Έλεγχος της κλωνοποίησης του sgRNA1 με PCR για επιλογή θετικών αποικιών

Αφού έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα από κάθε καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR για έλεγχο της ύπαρξης του sgRNA1. Η διαδικασία περιγράφηκε στην [ενότητα 3.2.2.4](#). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1% και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.16](#).



Εικόνα 4.16: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR με στόχο την ανίχνευση κλώνων που προσέλαβαν τον φορέα AIO-Puro sgRNA1. Το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος ενίσχυσης ήταν περίπου 784 βάσεις. Φορτώθηκαν σε σειρά: 100bp ladder και τα προϊόντα της PCR από τους 6 κλώνους που καλλιεργήθηκαν.

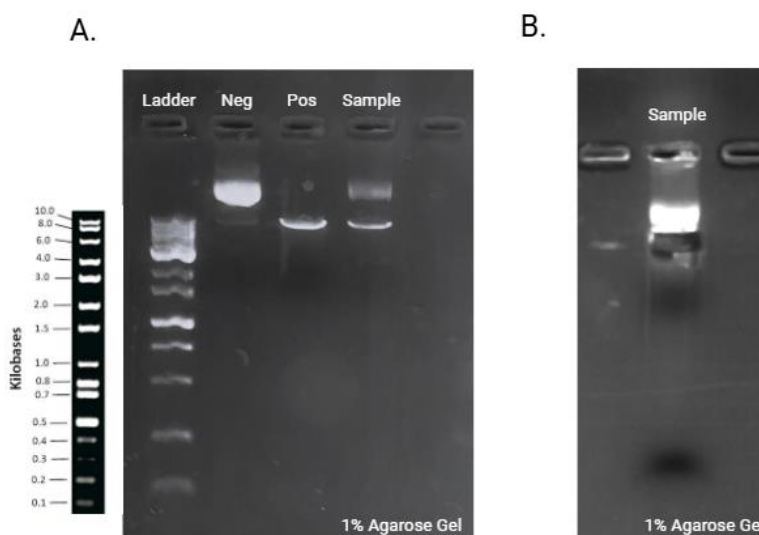
Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι σε όλους τους κλώνους ενισχύθηκε το προϊόν μήκους 784 bp. Ο κλώνος P1 επιλέχθηκε και ανακαλλιιεργήθηκε, ενώ παράλληλα δημιουργήθηκε glycerol stock. Αφού έγινε η ανακαλλιέργεια, ακολούθησε δεύτερη PCR επιβεβαίωσης της ύπαρξης του sgRNA1 με τροποποιημένες συνθήκες. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.17](#). Φαίνεται ότι υπάρχει το προϊόν στο σωστό σημείο επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη του sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα.



Εικόνα 4.17: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της επιβεβαιωτικής PCR, με στόχο τον έλεγχο της ύπαρξης του sgRNA1 στον φορέα που απομονώθηκε από τον θετικό κλώνο που επιλέχθηκε. Φορτώθηκαν σε σειρά: 100bp ladder, θετικός μάρτυρας και το προϊόν της αντίδρασης.

4.2.3 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα AIO-Puro-sgRNA1

Η κλωνοποίηση του sgRNA2 απαιτεί την πέψη του φορέα με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού με στόχο το άνοιγμα της δεύτερης θέσης κλωνοποίησης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδιακού φορέα που απομονώθηκε από τον κλώνο P1. Στην συνέχεια, έγιναν δύο ηλεκτροφορήσεις όπου η πρώτη αποσκοπούσε στον έλεγχο της επιτυχίας της πέψης, ενώ η δεύτερη στην εκχύλιση του γραμμοποιημένου φορέα από το πήκτωμα αγαρόζης. Στην πρώτη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν άκοπος πλασμιδιακός φορέας AIO-Puro αλλά και γραμμοποιημένος με ρόλο αρνητικού και θετικού μάρτυρα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.18](#).



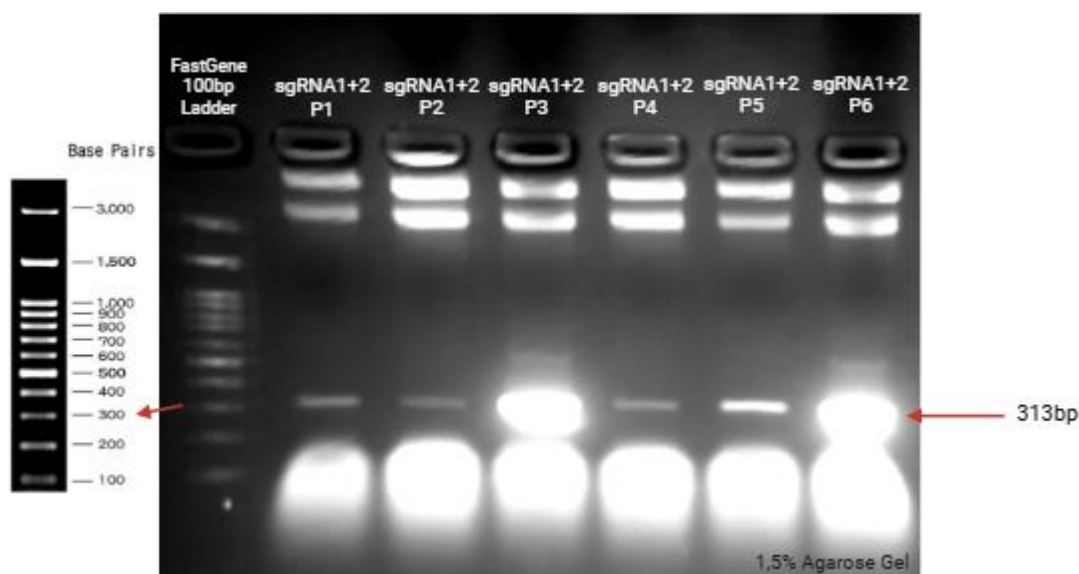
Εικόνα 4.18: Α) Ηλεκτροφόρηση μέρους της αντίδρασης πέψης που είχε στόχο το άνοιγμα της δεύτερης θέσης κλωνοποίησης του φορέα AIO-Puro sgRNA1, για εξακρίβωση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης. Φορτώθηκαν σε σειρά: 1kb ladder, αρνητικός μάρτυρας (άκοπος φορέας), θετικός μάρτυρας (επιβεβαιωμένος γραμμοποιημένος φορέας) και το προϊόν πέψης Β) Κόψιμο του πηκτώματος αγαρόζης στο σημείο όπου βρίσκεται ο γραμμοποιημένος φορέας.

Από την [Εικόνα 4.18Α](#) φαίνεται ότι μέρος του φορέα γραμμοποιήθηκε καθώς υπάρχουν δύο έντονες ζώνες. Η πάνω ζώνη αντιστοιχεί στον άκοπο φορέα, όπως προκύπτει και από τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η κάτω ζώνη στον γραμμοποιημένο φορέα όπως προκύπτει και από τον θετικό μάρτυρα.

Αφού έγινε εκχύλιση του φορέα από το πήκτωμα αγαρόζης ([Εικόνα 4.18Β](#)), πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης για κλωνοποίηση του sgRNA2. Στην συνέχεια, έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους DH5a και στρώσιμο τρυβλίου. Αναπτύχθηκαν αποικίες και έξι από αυτές (sgRNA1+2 P1-P6) μεταφέρθηκαν σε υγρή καλλιέργεια.

4.2.4 Έλεγχος της κλωνοποίησης του sgRNA2 με PCR για επιλογή θετικών αποικιών

Απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από κάθε υγρή καλλιέργεια (sgRNA1+2 P1-P6) και χρησιμοποιήθηκε για διαγνωστική PCR με στόχο τον έλεγχο της ύπαρξης του sgRNA2. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.19](#).



Εικόνα 4.19: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR με στόχο την ανίχνευση κλώνων που προσέλαβαν τον φορέα AIO-Puro sgRNA1+2. Το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος ενίσχυσης ήταν περίπου 313 βάσεις. Φορτώθηκαν σε σειρά: 100bp ladder και τα προϊόντα της PCR από τους 6 κλώνους που καλλιεργήθηκαν.

Το προϊόν που αναμένεται να παραχθεί στους κλώνους που μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα AIO-Puro-sgRNA1+2 στην συγκεκριμένη PCR έχει μήκος 313 ζεύγη βάσεων. Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, επιλέχθηκε ο κλώνος P3 για ανακαλλιέργεια και δημιουργία glycerol stock.

4.2.5 PCR επιβεβαίωσης της ύπαρξης των sgRNA1+2 στον θετικό κλώνο

Μετά την ανακαλλιέργεια του P3, έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα όπου είχε γίνει κλωνοποίηση των sgRNA1+2. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 3 PCR επιβεβαίωσης όπως περιγράφηκαν στην [ενότητα 3.2.2.10](#). Τα προϊόντα των PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.20](#).

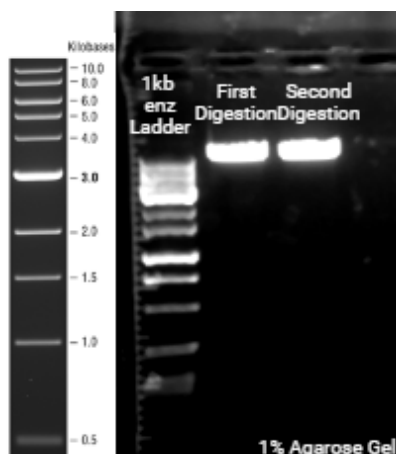


Εικόνα 4.20: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR επιβεβαίωσης που πραγματοποιήθηκαν με στόχο την επιβεβαίωση της ένθεσης του sgRNA1 και του sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-Puro. Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζονται οι θέσεις υβριδισμού των primers που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και τα αναμενόμενα μήκη των προϊόντων ενίσχυσης. Στα πηγάδια 1-3 χρησιμοποιήθηκαν primers για επιβεβαίωση του sgRNA1 και φορτώθηκαν σε σειρά: αρνητικός μάρτυρας, θετικός μάρτυρας, θετικός κλώνος. Στα πηγάδια 4+5 χρησιμοποιήθηκαν primers για ανίχνευση του sgRNA2 και φορτώθηκαν σε σειρά: αρνητικός μάρτυρας και το δείγμα. Στα πηγάδια 6+7 χρησιμοποιήθηκαν primers που υβριδίζουν πάνω στα sgRNA1+2 για τελική επιβεβαίωση της ύπαρξης και των δύο. Φορτώθηκαν σε σειρά: αρνητικός μάρτυρας και το δείγμα. Τα αναμενόμενα μήκη των προϊόντων ενίσχυσης είναι 784bp, 313bp και 494bp αντίστοιχα.

Στην [Εικόνα 3.4](#) παρουσιάζονται τα αναμενόμενα μήκη που έπρεπε να προκύψουν από τις PCR επιβεβαίωσης. Αντίστοιχα, δεν παρατηρείται καμία ζώνη στους αρνητικούς μάρτυρες κάθε αντίδρασης PCR ενώ εμφανίστηκε στον θετικό μάρτυρα επιβεβαιώνοντας ότι έγινε σωστά η εκτέλεση κάθε πειράματος. Τα αποτελέσματα της [Εικόνας 4.20](#) επιβεβαιώνουν την παρουσία των sgRNA1+2 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-Puro καθώς παρατηρούνται και οι τρεις ζώνες στα επιθυμητά μήκη.

4.2.6 Γραμμοποίηση του AIO-Puro-sgRNA1+2

Για την επιτυχημένη διαμόλυνση κυττάρων, ο πλασμιδιακός φορέας πρέπει είναι γραμμοποιημένος. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις πέψης με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Μετά, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση μέρους των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης με στόχο τον έλεγχο της επιτυχίας των αντιδράσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.21](#).



Εικόνα 4.21: Ηλεκτροφόρηση μέρους των αντιδράσεων πέψης του AIO-Puro-sgRNA1+2 με στόχο την επιβεβαίωση της επιτυχίας της γραμμοποίησης στις δύο αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν. Η πέψη ήταν πλήρης και δεν απαιτήθηκε απομόνωση από την πηκτή.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η πέψη ήταν πλήρης. Ακολούθησε ένωση των προϊόντων και καθαρισμός τους, όπως περιγράφηκε στην [ενότητα 3.2.2.11](#). Ο κλωνοποιημένος φορέας αποθηκεύτηκε στους -20oC, έτοιμος προς χρήση για την διαμόλυνση κυττάρων με στόχο την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του υποκινητή του γονιδίου-στόχου CPR.

5. Συζήτηση

Η δράση των lncRNA ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων που έχουν την ικανότητα να αλλάζουν το πρότυπο έκφρασης ενός ευρύτερου συνόλου γονιδίων, τα καθιστά πιθανούς υποψήφιους για την δημιουργία βιοδεικτών αλλά και θεραπευτικών στόχων. Ήδη στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για συγκεκριμένα lncRNA με σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του στομάχου. Κάποια από αυτά δρουν ως ογκογονίδια και συνήθως υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα έναντι παρακείμενου ιστού ενώ αλλά έχουν ογκοκατασταλτική δράση και καταστέλλονται.

Από βιοπληροφορικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν, υπάρχουν τουλάχιστον 88 lncRNA που παρατηρείται αλλαγή της έκφρασης τους στον καρκίνο του στομάχου και φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στην νόσο. [75] Ένα από αυτά, το lncRNA GAPLINC, φαίνεται να υπερεκφράζεται σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου έναντι κυττάρων παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. [76] Δεδομένα από *in vivo* και *in vitro* πειράματα απέδειξαν ότι το GAPLINC ενισχύει την πολλαπλασιαστική και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων του συγκεκριμένου καρκίνου. [77] Επακολούθως, η ανίχνευση της υπερέκφρασης του συγκεκριμένου lncRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση του καρκίνου του στομάχου σε πιθανούς ασθενείς. Το HOTAIR, ένα lncRNA που έχει μελετηθεί αρκετά ως προς την δράση του στον καρκίνο του μαστού, φαίνεται να υπερεκφράζεται σε διαφόρους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού. [76] Συγκεκριμένα, μελέτες δείχνουν ότι σε καρκίνους του στομάχου που παρατηρείται υπερέκφραση του HOTAIR, παρατηρείται κακή πρόγνωση για τους ασθενείς καθώς προωθείται ο πολλαπλασιασμός, η ικανότητα μετάστασης και γενικότερα η επιθετικότητα των κυττάρων. Ένα ακόμα lncRNA που υπερεκφράζεται στον συγκεκριμένο τύπο είναι το ANRIL το οποίο μάλιστα έχει *cis-acting* δράση. Η υπερέκφραση του συγκεκριμένου ογκογονιδίου συσχετίζεται με αυξημένη πολλαπλασιαστική και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων. [78] Μάλιστα, σε πειράματα *in vivo* αλλά και *in vitro* όπου πραγματοποιήθηκε Knock-out του συγκεκριμένου lncRNA, επιτεύχθηκε περιορισμός της ανάπτυξης του γαστρικού καρκίνου, αναδεικνύοντας το ως πιθανό θεραπευτικό στόχο. [79]

Και τα τρία lncRNA που αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν και να ρυθμίζουν κάποιο mRNA στόχο που τελικά οδηγεί σε καθοριστικές αλλαγές στην ρύθμιση της έκφρασης των κυττάρων οδηγώντας έτσι σε

επιδείνωση της νόσου. Η εύρεση του mRNA στόχου και η κατανόηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ του αυτού και του lncRNA είναι απαραίτητη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το lncRNA ως πιθανός βιοδείκτης ή θεραπευτικός στόχος.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η κατασκευή ενός μοριακού εργαλείου που θα επέτρεπε την μελέτη του γονιδίου CPR που κωδικοποιεί μια RNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη, ώστε να διερευνηθεί αν ρυθμίζει το lncRNA RECUR1. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η θέση μεταγραφής του lncRNA γειτονεύει με την θέση του κωδικοποιητικού γονιδίου και από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου έχει αποδειχθεί η *cis-acting* ρυθμιστική δράση του lncRNA RECUR1 στο γονίδιο-στόχο CPR. Για την αντίστροφη ρυθμιστική μελέτη του συγκεκριμένου lncRNA-mRNA άξονα, δημιουργήθηκε μία σταθερή κυτταρική σειρά γαστρικού καρκίνου όπου περιλάμβανε ένα σύστημα επαγωγίμου RNAi με στόχο την αποσιώπηση της RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης CPR. Μετά από προσθήκη δοξυκυκλίνης και άρα επαγωγή της καταστολής στην κυτταρική σειρά που κατασκευάστηκε, επιτεύχθηκε σίγηση του mRNA στόχου CPR με απόδοση 74%. [\(Εικόνα 4.4\)](#) Στην συνέχεια, μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA RECUR1. Στα κύτταρα που πραγματοποιήθηκε επαγωγή της σίγησης του mRNA στόχου CPR, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του lncRNA κατά 46%, έναντι αυτών που δεν έγινε. [\(Εικόνα 4.6\)](#) Στην βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί αντίστοιχη συμπεριφορά ανάμεσα σε ένα lncRNA και κάποια πρωτεΐνη-στόχο. Συγκεκριμένα, το MALAT1 είναι ένα lncRNA που υπερεκφράζεται σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου και έχει δρα ως ογκογονίδιο καθώς προωθεί την ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετάστασης. [80] Έρευνες απέδειξαν ότι σε κυτταρικές σειρές όπου επιτεύχθηκε knockdown του mRNA στόχου του MALAT1, όπου κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη IGF-1R, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του ίδιου του lncRNA με ποσοστό πάνω από 50%.

Αφού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στο RECUR1 και το υπό μελέτη γονίδιο CPR, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου του φαινοτύπου. Αρχικά, από την δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (CFA) βρέθηκε ότι οι αποικίες που αναπτύχθηκαν από κύτταρα που είχε γίνει επαγωγή της σίγησης του γονιδίου στόχου CPR ήταν μικρότερες σε μέγεθος αλλά και αριθμό κυττάρων κατά 37% και 35% αντίστοιχα σε σχέση με αυτές που αναπτύχθηκαν από κύτταρα χωρίς σίγηση. [\(Εικόνα 4.7\)](#) Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα της [Εικόνας 4.10](#) όπου μετρήθηκε και συγκρίθηκε ο συνολικός αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκε στα πηγάδια που έγινε επαγωγή

της σίγησης ή όχι. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκαν δεν είχε διαφορά ανάμεσα στα πηγάδια με δοξκυκλίνη και χωρίς, υποδηλώνοντας ότι η σίγηση της RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης δεν οδήγησε τα κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση, αλλά μείωσε την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το υπό μελέτη γονίδιο CPR όντως δρα ως ογκογονίδιο καθώς με την καταστολή του παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων.

Πέρα από την δοκιμασία σχηματισμού αποικιών, πραγματοποιήθηκε και η δοκιμασία επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay) όπου στόχος ήταν ο έλεγχος της επίδρασης της σίγησης στην κινητικότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δείχνουν ότι δεν επηρεάστηκε σημαντικά η κινητικότητα των κυττάρων λόγω της σίγησης. [Εικόνα 4.12](#) Τα ευρήματα αυτά οδηγούν πιθανώς στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο-στόχος CPR δεν επιδρά σημαντικά στο EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) καθώς δεν επηρεάζεται ο ρυθμός μετατροπής των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά που έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα.

Στην συνέχεια των πειραμάτων, έγινε έλεγχος και σύγκριση των επιπέδων των mRNA διαφόρων γονιδίων-δεικτών (Marker Genes) ανάμεσα σε κύτταρα της σειράς που έγινε επαγωγή της σίγησης ή όχι. [\(Εικόνα 4.13\)](#) Παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση mRNA του παράγοντα E2F8 κατά 51% στα κύτταρα που έγινε η επαγωγή έναντι των άλλων. Ο E2F8 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων E2F και επηρεάζει το μονοπάτι σηματοδότησης NOTCH, ενώ από την βιβλιογραφία φαίνεται ότι συμμετέχει σημαντικά στον καρκίνο καθώς προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. [81] Η μείωση του mRNA του συγκεκριμένου παράγοντα στα κύτταρα όπου έγινε επαγωγή της σίγησης του γονιδίου στόχου εξηγεί τον φαινότυπο που παρατηρήθηκε στην δοκιμασία σχηματισμού αποικιών, καθώς οδηγεί σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων και άρα τελικά τον σχηματισμό αποικιών μικρότερου μεγέθους και αριθμού κυττάρων.

Εκτός από τον E2F8, παρατηρήθηκε και μείωση των επιπέδων mRNA του EMP2 (Epithelial Membrane Protein 3) κατά 34,5%. Το γονίδιο αυτό φαίνεται να υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο. Μάλιστα, έρευνες δείχνουν ότι η μείωση των επιπέδων του EMP2 οδήγησε σε μείωση του μεγέθους κάποιων όγκων ενώ παράλληλα μείωσε την

επιθετικότητα των κυττάρων. [82] Η σίγηση του γονιδίου στόχου με ογκογόνο δράση στην κυτταρική σειρά που δημιουργήθηκε, οδήγησε στην μείωση των επιπέδων του mRNA της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και άρα μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας και επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων.

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα Marker Genes που εμφάνισαν μείωση της έκφρασης τους, το γονίδιο DDIT4 (DNA damage-inducible Transcript 4) υπερεκφράζεται κατά 282,8% στα κύτταρα που έγινε επαγωγή της σίγησης της RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης. Στην βιβλιογραφία, η υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου έχει συσχετιστεί με αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα, ενώ σε δοκιμασίες σχηματισμού αποικιών παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες αποικίες σε σχέση με τα control. [83] Τα ευρήματα αυτά φαίνονται αντίθετα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ωστόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι τιμές Cq που μετρήθηκαν για το DDIT4 στην qPCR ήταν >35, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα επίπεδα έκφρασης που μετρήθηκαν δεν είναι αξιόπιστα. Αντίστοιχα, οι τιμές Cq για το γονίδιο CDKN1C ήταν ακόμα πιο ψηλές, καθιστώντας και αυτά τα δεδομένα ως μη αξιόπιστα και μη αξιοποιήσιμα.

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της βιμεντίνης μειώθηκαν κατά 41% στα κύτταρα όπου έγινε επαγωγή της σίγησης. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό καθώς η βιμεντίνη είναι γνωστό ότι υπερεκφράζεται σε κύτταρα που έχουν υποστεί EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) και άρα έχουν μεγαλύτερη μεταναστευτική ικανότητα και επιθετικότητα. [84] Η μετατροπή των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, συνεισφέρει στην πρόοδο της νόσου. [85] Συνεπώς, η παρατήρηση της μείωσης των επιπέδων του συγκεκριμένου γονιδίου, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του Wound Healing Assay που έδειξαν ότι δεν υπήρξε αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων, υποδηλώνει ότι η σίγηση του γονιδίου στόχου CPR οδήγησε σε ανάπτυξη κυττάρων με λιγότερο επιθετικό φαινότυπο, επιβεβαιώνοντας ουσιαστικά τον ογκοεπαγωγικό του χαρακτήρα. Ωστόσο, απαιτούνται επιπλέον δοκιμασίες όπως τα Migration Assays για την πλήρη επιβεβαίωση της μείωσης της επιθετικότητας.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής υποδεικνύουν ότι το υπό εξέταση γονίδιο CPR, το οποίο κωδικοποιεί μία RNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη, είναι ένα ογκογονίδιο με σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του γαστρικού καρκίνου. Η

σίγηση του οδήγησε σε μείωση της έκφρασης ογκογονιδίων και αύξηση της έκφρασης ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, ενώ παρατηρήθηκε πιο ήπιος καρκινικός φαινότυπος. Παράλληλα, αποδείχθηκε μειορρύθμιση του lncRNA RECUR1 έπειτα από την σίγηση του CPR. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι θέσεις τους είναι πολύ κοντινές και έχει ήδη αποδειχθεί η ύπαρξη *cis-acting* θετικής ρύθμισης του CPR από το RECUR1.

Η κατασκευή της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς θα βοηθήσει σημαντικά στην διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του γονιδίου στόχου CPR αλλά και του lncRNA RECUR1. Μελλοντικοί στόχοι του εργαστηρίου είναι η ανάλυση των επιπέδων της RNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης με Western blot, ώστε να υπάρχει μία καλύτερη εικόνα για τον βαθμό σίγησης του γονιδίου στόχου σε επίπεδο πρωτεΐνης. Επίσης, κύτταρα της σειράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο αποπτωτικών δεικτών έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν η σίγηση επηρεάζει την απόπτωση. Συμπληρωματικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί RNA-seq για τον πλήρη έλεγχο των μεταβολών της έκφρασης λόγω της σίγησης, καθώς ελέγχθηκε μόνο ένας μικρός αριθμός από επιλεγμένα γονίδια-δείκτες. Ακόμα, με κατάλληλο αντίσωμα για την RNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη, είναι δυνατή η ανίχνευση της υποκυτταρικά έτσι ώστε να διερευνηθεί η θέση όπου δρα. Τέλος, στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής κατασκευάστηκε φορέας κατάλληλος για τροποποίηση μέσω του συστήματος CRISPR-nCAS9, με στόχο την καταστολή του υποκινητή του γονιδίου-στόχου CPR, ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα της σίγησης με αυτήν την εναλλακτική προσέγγιση.

6. Βιβλιογραφία:

1. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.
2. Iwu, C.D. and C.J. Iwu-Jaja, *Gastric Cancer Epidemiology: Current Trend and Future Direction*. Hygiene, 2023. **3**(3): p. 256-268.
3. Kamiya, S., et al., *Current trends in gastric cancer treatment in Europe*. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 2018. **4**(7).
4. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications*. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
5. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
6. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
7. Seeneevassen, L., et al., *Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
8. Chen, Y.C., et al., *Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer*. Pathol Oncol Res, 2016. **22**(1): p. 197-202.
9. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
10. Hao, Y., et al., *Further prognostic stratification of intestinal type of gastric adenocarcinoma by CDX2 expression pattern*. Hum Pathol, 2023. **131**: p. 61-67.
11. Zheng, H., et al., *Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray*. J Clin Pathol, 2007. **60**(3): p. 273-7.
12. Lai, S., *A human mode of intestinal type gastric carcinoma*. Med Hypotheses, 2019. **123**: p. 27-29.
13. Tang, C.T., et al., *Analysis of the Incidence and Survival of Gastric Cancer Based on the Lauren Classification: A Large Population-Based Study Using SEER*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1212.
14. Assumpcao, P.P., et al., *The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma*. BMC Gastroenterol, 2020. **20**(1): p. 223.
15. Lin, X., et al., *Molecular classification and prediction in gastric cancer*. Comput Struct Biotechnol J, 2015. **13**: p. 448-58.
16. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
17. Shi, D., et al., *Research advances in the molecular classification of gastric cancer*. Cell Oncol (Dordr), 2024. **47**(5): p. 1523-1536.
18. Wang, Q., G. Liu, and C. Hu, *Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma*. Gastroenterology Res, 2019. **12**(6): p. 275-282.
19. Rocken, C., *Molecular classification of gastric cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(3): p. 293-301.
20. Choi, Y.Y., et al., *Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis*. J Surg Oncol, 2014. **110**(2): p. 129-35.

21. Usui, G., et al., *DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer*. Digestion, 2021. **102**(1): p. 25-32.
22. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology*. Neoplasia, 2017. **19**(5): p. 412-420.
23. Aubrey, B.J., A. Strasser, and G.L. Kelly, *Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(5).
24. Choi, K.S. and M. Suh, *Screening for gastric cancer: the usefulness of endoscopy*. Clin Endosc, 2014. **47**(6): p. 490-6.
25. Conti, C.B., et al., *Early Gastric Cancer: Update on Prevention, Diagnosis and Treatment*. Int J Environ Res Public Health, 2023. **20**(3).
26. Leja, M. and A. Line, *Early detection of gastric cancer beyond endoscopy - new methods*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2021. **50-51**: p. 101731.
27. Rocken, C., *Predictive biomarkers in gastric cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2023. **149**(1): p. 467-481.
28. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
29. Hirose, T., Y. Mishima, and Y. Tomari, *Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy*. EMBO Rep, 2014. **15**(5): p. 489-507.
30. Herman, A.B., D. Tsitsipatis, and M. Gorospe, *Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation*. Mol Cell, 2022. **82**(12): p. 2252-2266.
31. Graf, J. and M. Kretz, *From structure to function: Route to understanding lncRNA mechanism*. Bioessays, 2020. **42**(12): p. e2000027.
32. Dahariya, S., et al., *Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells*. Mol Immunol, 2019. **112**: p. 82-92.
33. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCcation: lncRNA localization and function*. J Cell Biol, 2021. **220**(2).
34. Kafida, M., M. Karela, and A. Giakountis, *RNA-Independent Regulatory Functions of lncRNA in Complex Disease*. Cancers (Basel), 2024. **16**(15).
35. Devaux, Y., et al., *Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(7): p. 415-25.
36. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
37. Zhang, F.F., et al., *Metastasis-associated long noncoding RNAs in gastrointestinal cancer: Implications for novel biomarkers and therapeutic targets*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(39): p. 8735-8749.
38. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.
39. Yang, M., et al., *lncRNAfunc: a knowledgebase of lncRNA function in human cancer*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(D1): p. D1295-D1306.
40. Xia, F., et al., *lncRNA KCNQ1OT1: Molecular mechanisms and pathogenic roles in human diseases*. Genes Dis, 2022. **9**(6): p. 1556-1565.
41. McDonel, P. and M. Guttman, *Approaches for Understanding the Mechanisms of Long Noncoding RNA Regulation of Gene Expression*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019. **11**(12).
42. Gil, N. and I. Ulitsky, *Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs*. Nat Rev Genet, 2020. **21**(2): p. 102-117.

43. Li, J., et al., *Regulation of lncRNA and Its Role in Cancer Metastasis*. Oncol Res, 2016. **23**(5): p. 205-17.
44. Jariwala, N. and D. Sarkar, *Emerging role of lncRNA in cancer: a potential avenue in molecular medicine*. Ann Transl Med, 2016. **4**(15): p. 286.
45. Jiang, M.C., et al., *Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities*. Am J Cancer Res, 2019. **9**(7): p. 1354-1366.
46. Yang, G., X. Lu, and L. Yuan, *LncRNA: a link between RNA and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(11): p. 1097-109.
47. Zhang, R., et al., *LncRNAs and cancer*. Oncol Lett, 2016. **12**(2): p. 1233-1239.
48. Alsaedy, H., A. Mirzaei, and R.A. Alhashimi, *Investigating the structure and function of Long Non-Coding RNA (LncRNA) and its role in cancer*. Cellular, Molecular and Biomedical Reports, 2022. **2**(4): p. 245-253.
49. Lone, S.N., et al., *Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments*. Mol Cancer, 2022. **21**(1): p. 79.
50. Kalluri, R., *The biology and function of exosomes in cancer*. J Clin Invest, 2016. **126**(4): p. 1208-15.
51. Fattahi, S., et al., *LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: A novel approach to personalized medicine*. J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3189-3206.
52. Tan, J.Y., et al., *Splicing of enhancer-associated lincRNAs contributes to enhancer activity*. Life Sci Alliance, 2020. **3**(4).
53. Paralkar, V.R., et al., *Unlinking an lncRNA from Its Associated cis Element*. Mol Cell, 2016. **62**(1): p. 104-10.
54. Heintzman, N.D., et al., *Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression*. Nature, 2009. **459**(7243): p. 108-12.
55. Hezroni, H., et al., *Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species*. Cell Rep, 2015. **11**(7): p. 1110-22.
56. Ponjavic, J., et al., *Genomic and transcriptional co-localization of protein-coding and long non-coding RNA pairs in the developing brain*. PLoS Genet, 2009. **5**(8): p. e1000617.
57. Lai, F., et al., *Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription*. Nature, 2013. **494**(7438): p. 497-501.
58. Xiang, J.F., et al., *Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus*. Cell Res, 2014. **24**(5): p. 513-31.
59. Anderson, K.M., et al., *Transcription of the non-coding RNA upperhand controls Hand2 expression and heart development*. Nature, 2016. **539**(7629): p. 433-436.
60. Ntini, E., et al., *Long ncRNA A-ROD activates its target gene DKK1 at its release from chromatin*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1636.
61. Wang, K.C., et al., *A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 120-4.

62. Pandey, R.R., et al., *Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation*. Mol Cell, 2008. **32**(2): p. 232-46.
63. Cho, S.W., et al., *Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element*. Cell, 2018. **173**(6): p. 1398-1412 e22.
64. Chery, J., *RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications*. Postdoc J, 2016. **4**(7): p. 35-50.
65. Cheng, J.C., T.B. Moore, and K.M. Sakamoto, *RNA interference and human disease*. Mol Genet Metab, 2003. **80**(1-2): p. 121-8.
66. Chen, X., et al., *RNA interference-based therapy and its delivery systems*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(1): p. 107-124.
67. Boettcher, M. and M.T. McManus, *Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR*. Mol Cell, 2015. **58**(4): p. 575-85.
68. Kim, D. and J. Rossi, *RNAi mechanisms and applications*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 613-6.
69. Liao, Y. and L. Tang, *Inducible RNAi system and its application in novel therapeutics*. Crit Rev Biotechnol, 2016. **36**(4): p. 630-8.
70. Gomez-Martinez, M., D. Schmitz, and A. Hergovich, *Generation of stable human cell lines with Tetracycline-inducible (Tet-on) shRNA or cDNA expression*. J Vis Exp, 2013(73): p. e50171.
71. Baron, U. and H. Bujard, *Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances*. Methods Enzymol, 2000. **327**: p. 401-21.
72. Das, A.T., L. Tenenbaum, and B. Berkhout, *Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression*. Curr Gene Ther, 2016. **16**(3): p. 156-67.
73. Ingole, K.D., et al., *Tetracycline-controlled (TetON) gene expression system for the smut fungus Ustilago maydis*. Front Fungal Biol, 2022. **3**: p. 1029114.
74. Bockamp, E., et al., *Of mice and models: improved animal models for biomedical research*. Physiol Genomics, 2002. **11**(3): p. 115-32.
75. Cao, W.J., et al., *Analysis of long non-coding RNA expression profiles in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(23): p. 3658-64.
76. Gu, Y., et al., *LncRNAs: emerging biomarkers in gastric cancer*. Future Oncol, 2015. **11**(17): p. 2427-41.
77. Hu, Y., et al., *Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer*. Cancer Res, 2014. **74**(23): p. 6890-902.
78. Zhang, E.B., et al., *Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a*. Oncotarget, 2014. **5**(8): p. 2276-92.
79. Lan, W.G., et al., *Silencing of long non-coding RNA ANRIL inhibits the development of multidrug resistance in gastric cancer cells*. Oncol Rep, 2016. **36**(1): p. 263-70.
80. Xia, H., et al., *The lncRNA MALAT1 is a novel biomarker for gastric cancer metastasis*. Oncotarget, 2016. **7**(35): p. 56209-56218.

81. Eoh, K.J., et al., *E2F8 Induces Cell Proliferation and Invasion through the Epithelial-Mesenchymal Transition and Notch Signaling Pathways in Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(16).
82. Zhu, W., et al., *EMP3: A promising biomarker for tumor prognosis and targeted cancer therapy*. Cancer Biomark, 2024. **40**(3-4): p. 227-239.
83. Du, F., et al., *DDIT4 promotes gastric cancer proliferation and tumorigenesis through the p53 and MAPK pathways*. Cancer Commun (Lond), 2018. **38**(1): p. 45.
84. Fuyuhiko, Y., et al., *Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells*. Anticancer Res, 2010. **30**(12): p. 5239-43.
85. Huang, Y., W. Hong, and X. Wei, *The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis*. J Hematol Oncol, 2022. **15**(1): p. 129.