

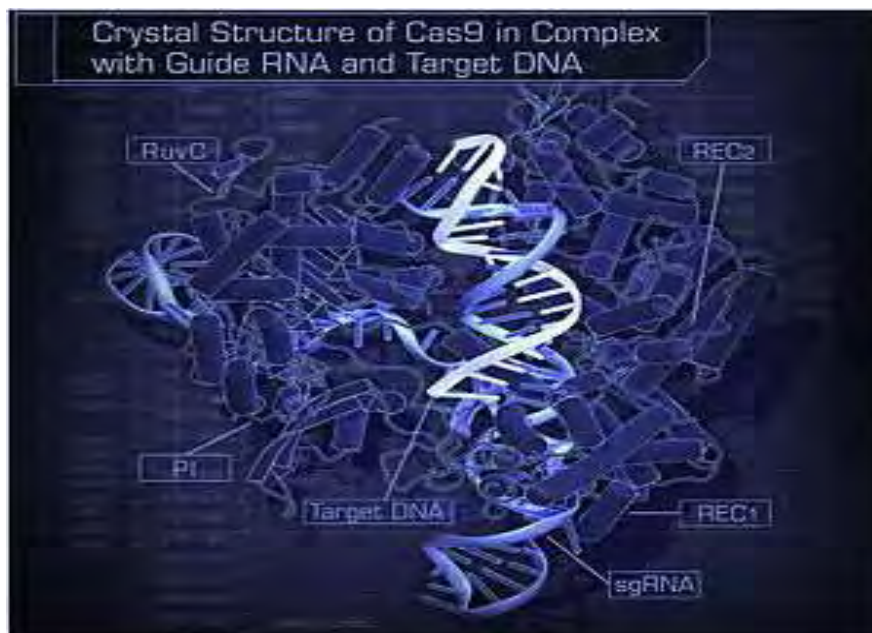


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



*Μελέτη του ρόλου του lncRNA GrACILE 3 στον καρκίνο
του στομάχου με CRISPR-activation*

*Transcriptional activation of the lncRNA Gracile3 through CRISPR-
activation & study of its role in human gastric cancer*



Τσικλή Βασιλική

Επιβλέπων Καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Λάρισα 2019

Τριμελής επιτροπή

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1. Καρκίνος	9
1.1.1 Τα στάδια του καρκίνου	9
1.1.2 Πρωτο-ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια	10
1.1.3 Τα είδη του καρκίνου.....	10
1.2 Ο στόμαχος	11
1.2.1 Τα κύρια μέρη του στομάχου	11
1.2.2 Το τοίχωμα του στομάχου	12
1.2.3 Οι κύριοι τύποι κυττάρων του στομάχου.....	13
1.3 Καρκίνος του στομάχου	14
1.3.1 Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου κατά Laurén.....	15
1.3.1.1 Helicobacter Pylori	15
1.3.1.2 Epstein-Barr virus.....	16
1.3.2 Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου (WHO)	16
1.3.3 Μοριακή κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου.....	17
1.4 Παλαιότερες τεχνολογίες γενετικής τροποποίησης	18
1.4.1 Νουκλεάσες με επικράτεια δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs).....	18
1.4.2 Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs).....	20
1.5 Ρυθμιστικές συστοιχίες τακτικά παρεμβαλλόμενων παλινδρομικών επαναλήψεων που σχετίζονται με CRISPR πρωτεΐνες (CRISPR-Cas).....	21
1.5.1 Φιλοσοφία του CRISPR-Cas	21
1.5.2 Ανακάλυψη του CRISPR-Cas	21
1.5.3 Η δομή του γενετικού τόπου CRISPR	23
1.5.4 Τύποι του CRISPR-Cas	23
1.5.5 Ο μηχανισμός λειτουργίας του CRISPR-Cas	25
1.5.6 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων	26
1.6 Τροποποιήσεις του αρχικού συστήματος CRISPR-Cas9.....	27
1.6.1 Εφαρμογές του CRISPR-dCas9 συστήματος	29
1.6.2 CRISPR activation.....	29
1.6.3 CRISPR inhibition	31
1.7 Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος στον καρκίνο του στομάχου	32
1.7.1 Προϊόντα γονιδίων που συμμετέχουν στην εκδήλωση του καρκίνου του στομάχου	34
1.7.2 Ο μεγάλος κόσμος των μη κωδικοποιητικών RNAs	35
1.7.2.1 Ο βιολογικός ρόλος των μη κωδικοποιητικών RNAs	36
1.7.2.2 miRNAs και η συμβολή τους στον καρκίνο του στομάχου.....	37
1.7.3 lncRNAs και ο ρόλος τους στον καρκίνο	39
Σκοπός	46
2. Υλικά και Μέθοδοι	48
.....	48
2.1 Υλικά.....	49

2.1.1 Κυτταρικές σειρές.....	49
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς	49
2.1.2.1 pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1.....	50
2.1.2.2 pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP	50
2.2 Μέθοδοι.....	51
2.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση	51
2.2.1.1 Volcano plot.....	51
2.2.1.2 Κωδικοποιητικό δυναμικό	51
2.2.1.3 Ανάλυση έκφρασης σε ανθρώπινους ιστούς	51
2.2.1.4 Ανάλυση συνταινίας.....	51
2.2.1.5 Ανάλυση δεδομένων ChiP-seq για εύρεση ρυθμιστικών στοιχείων του Gracile3	51
2.2.1.6 Σχεδιασμός sgRNA.....	52
2.2.2 Μέθοδοι.....	52
2.2.2.1 Χημικός μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH5-alpha	52
2.2.2.2 Πέψη του πλασμιδίου pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP με σκοπό την ένθεση των sgRNA.....	54
2.2.2.3 Κλωνοποίηση sgRNA στον φορέα pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI) EF1Alpha-Puro-T2A-BFP	54
2.2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την επιβεβαίωση εισαγωγής των sgRNAs στον φορέα pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP .	55
2.2.2.5 Πέψη του πλασμιδίου pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1.....	55
2.2.2.6 Κατασκευή καμπύλης τοξικότητας κυττάρων στην πουρομυκίνη.....	56
2.2.2.7 Διαμόλυνση κυττάρων MKN45 & HFE45 με το pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1 μέσω λιποφεκταμίνης.	57
2.2.2.8 Απομόνωση RNA	57
2.2.2.9 Εφαρμογή DNase.....	57
2.2.2.10 cDNA synthesis	58
2.2.2.11 Ποσοτική PCR (qPCR).....	58
3. Αποτελέσματα.....	60
3.1 Πρότυπα μεταγραφής του Gracile 3 σύμφωνα με μεταγραφομικές αναλύσεις	61
3.2 Εκτίμηση κωδικοποιητικού δυναμικού.....	63
3.3 Ανάλυση έκφρασης σε ανθρώπινους ιστούς.....	64
3.4 Ανάλυση συνταινίας-έκφρασης	65
3.5 Ανάλυση δεδομένων ChiP-seq για εύρεση ρυθμιστικών στοιχείων του Gracile3.....	66
3.6 Γραμμοποίηση των φορέων pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1 & pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP	68
3.7 Επιβεβαίωση ένθεσης των sgRNAs στον φορέα pLVU6-gRNA	69
3.8 Κατασκευή καμπύλης τοξικότητας κυττάρων στην πουρομυκίνη	70
3.10 Ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων κυττάρων MKN45, HFE45 μετά την προσθήκη πουρομυκίνης.....	72
3.10 Επιβεβαίωση γενετικά τροποποιημένων κυττάρων MKN45 & HFE45	73
4. Συζήτηση.....	77

Παράρτημα	83
pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1	84
pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BF	86
Βιβλιογραφία	87

Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί τον πέμπτο καρκίνο με τα περισσότερα κρούσματα η κατανομή των οποίων δεν είναι ομοιόμορφη με τους Ασιατικούς πληθυσμούς να καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό, ενώ ακολουθούν οι Ευρωπαίοι. Η ελλιπής διάγνωση των πρώτων σταδίων ταυτόχρονα με τις ανεπαρκείς τωρινές θεραπευτικές μεθόδους είναι υπεύθυνες για την κατάταξη του στην τρίτη θέση με τους πιο θανάσιμους καρκίνους παγκοσμίως. Τον τελευταίο καιρό αναπτύσσονται προσεγγίσεις που στηρίζονται στην γονιδιακή θεραπεία με στόχο την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας γονιδιακών τόπων. Αυτοί οι γονιδιακοί τόποι αφορούσαν κυρίως κωδικοποιητικά γονίδια. Η ανακάλυψη του σημαντικού πληθυσμού και βιολογικού ρόλου των μη κωδικοποιητικών RNA έθεσε το ξεκίνημα στην εξερεύνηση ενός πολλά υποσχόμενου πεδίου. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εστίασαμε στην μελέτη ενός long non-coding RNA Gracile3 (Gastric Cancer Induced LincRNA 3 - GrACILe3) το οποίο υπέρ-εκφράζεται σημαντικά στον καρκίνο του στομάχου. Σκοπός ήταν η μεταγραφική ενεργοποίηση του γενετικού τόπου σε φυσιολογικές σειρές και καρκινικές σειρές στομάχου στις οποίες τα επίπεδα έκφρασης του ήταν εξαιρετικά χαμηλά. Η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης έγινε με την χρήση μιας παραλλαγής του συστήματος CRISPR-Cas9 που ονομάζεται dCas9 SAM σύστημα και βασίζεται στην μεταφορά μεταγραφικών παραγόντων με τη βοήθεια της deadCas9 single guideRNAs. Η εύρεση της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου και ο σχεδιασμός των κατάλληλων sgRNAs αποτέλεσε αρχικό στάδιο των βιοπληροφορικών διαδικασιών, ενώ ακολούθησε προετοιμασία του φορέα στον οποίον κλωνοποιήθηκαν. Η γενετική τροποποίηση των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών με ένα διαφορετικό πλασμίδιο, που περιέχει το γονίδιο της dCas9 και των υπολοίπων μεταγραφικών παραγόντων, έγινε με την μέθοδο των λιποσωμάτων. Η επιλογή των τροποποιημένων κυττάρων επιτεύχθηκε με την προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού, ενώ μετά από ανάπτυξη τους απομονώθηκε το RNA από αυτά και με μια ποσοτική PCR (qPCR) ελέγχθηκε η έκφραση των συστατικών του φορέα.

Λέξεις-κλειδιά: Καρκίνος του στομάχου, Μεγάλου μήκους μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, CRISPR, μεταγραφική ενεργοποίηση

Abstract

Gastric cancer is the fifth kind of cancer that presents the most cancer incidents the majority of which is noted in the Asian continent and next in Europeans. The missing diagnosis of early cancer stages and the defective ongoing therapies are responsible for the gastric cancer to be classified among the three most fatal cancers worldwide. Lately, new approaches are developing which are based on the genome therapy that aim in the correction of the pathological genotype. Those gene locus were mostly coding genes. The discovery of the great number and the biological role of non-coding genes makes a start in the research of a promising field. In the present thesis we focused in the study of the non-coding RNA Gracile3 that is significantly overexpressed in gastric cancer. The aim of this project was the transcriptional activation of the specific gene locus in normal and cancer human cell lines in which the expression levels was extremely low. The alteration of the expression levels was achieved through a CRISPR-Cas9 system variation that is known as dCas9 SAM system and it is based on the deadCas9/single guideRNA-depedent transfer of transcription factors to desired gene locus. The detection of the gene's regulatory elements and the design of the appropriate sgRNAs were the first steps of the bioinformatic procedures, while followed the preparation of the vector which they cloned in. Gene editing of the human cell lines with a different plasmid, that contains the dCas9 gene and other genes that code the transcription factors, was through the liposome methodology. The selection of the modified cells was achieved through the addition of an appropriate antibiotic, while after their sufficient growth, there was a quantitative PCR using the isolated RNA so as to define the expression of the vector's elements.

Keywords: Gastric Cancer, Long non-coding RNAs, CRISPR, Transcriptional activation

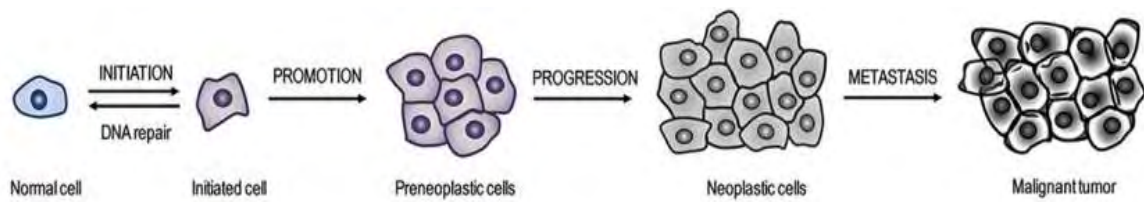
1. Εισαγωγή

1.1. Καρκίνος

Βασική λειτουργία των κυττάρων είναι η ανάπτυξη και διαίρεση για την παραγωγή νέων κυττάρων. Φυσιολογικά κύτταρα σε ενήλικους ιστούς συνήθως δεν είναι ενεργά ως προς την κυτταροδιαίρεση λόγω διαφοροποίησης. Ωστόσο, μερικά φυσιολογικά κύτταρα, από την φύση τους διατηρούν ένα μιτωτικό δυναμικό, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση μεταλλάξεων που δεν είναι δυνατό να επιδιορθωθούν από ενδογενείς μηχανισμούς ελέγχου κυτταρικών βλαβών (Stratton, 2010). Σε αυτό το σημείο ενεργοποιείται ένα πρόγραμμα ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου, γνωστό ως απόπτωση, προκειμένου το ελαττωματικό φυσιολογικό κύτταρο να καταστραφεί προτού μεταβιβάσει τις αλλοιώσεις του σε νέα θυγατρικά κύτταρα. Στον αντίποδα, χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου είναι ότι τα κύτταρα διαιρούνται ανεξέλεγκτα, παρακάμπτοντας τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που επάγουν απόπτωση και τελικά διαχέονται σε γειτονικούς ιστούς αυξάνοντας την γενετική παραλλακτικότητα και άρα την φαινοτυπική πλαστικότητα του όγκου (Hanahan, 2000). Ο καρκίνος συνήθως προκαλείται από μεταλλάξεις σε γονίδια που ελέγχουν την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συνήθως η καρκινογένεση είναι μια δυναμική διαδικασία που προϋποθέτει συσσώρευση ανεξάρτητων μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να προκαλούνται είτε από περιβαλλοντικούς παράγοντες είτε από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA. Οι μεταλλάξεις του DNA χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις χρωμοσωμικές και τις γονιδιακές. Οι πρώτες διακρίνονται περαιτέρω σε δομικές (αναστροφή, έλλειμα, διπλασιασμός) και αριθμητικές (ανευλοειδίες). Οι δομικές αφορούν μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο DNA, όπως είναι οι αντικαταστάσεις (μεταστροφές, μεταπτώσεις), αφαιρέσεις ή προσθήκες ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων (Navin, 2010).

1.1.1 Τα στάδια του καρκίνου

Αρχικά, κατά το στάδιο της έναρξης πραγματοποιούνται τυχαίες μεταλλάξεις στο DNA που προκαλούνται είτε από την δράση κάποιου χημικού παράγοντα είτε από βλάβες κατά την αντιγραφή του γενετικού υλικού. Αυτές οι αλλαγές συνήθως μεταβάλλουν το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης. Εκτός από αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλυσίδα του DNA, αλλαγές στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης προκαλούνται και από επιγενετικούς παράγοντες που περιλαμβάνουν μεθυλιώσεις και ακετυλιώσεις στις αζωτούχες βάσεις ή στις ιστόνες που σχηματίζουν νουκλεοσώματα. Εάν αυτά περιλαμβάνουν μεταλλάξεις σε πρωτο-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, τότε τα μεταλλαγμένα κύτταρα μετατρέπονται σε προ-νεοπλασματικά κύτταρα μέσω του σταδίου της προαγωγής (Beckman, 2018). Το τελευταίο στάδιο εξέλιξης της ασθένειας περιλαμβάνει μια σημαντική αύξηση στο μέγεθος και στον αριθμό των κυττάρων από περαιτέρω μεταλλάξεις και την μετατροπή τους σε νεοπλασματικά κύτταρα (**Εικ. 1**). Η αγγειογένεση στην περιοχή του όγκου και η υδρόλυση των μεμβρανών που συγκρατούν τα κύτταρα στην συγκεκριμένη περιοχή, στη συνέχεια, οδηγεί σε μετακίνηση των κυττάρων σε γειτονικά όργανα και ιστούς, διαδικασία γνωστή ως μετάσταση (Viallard, 2017; Fidler, 2015).



Εικόνα 1: Τα στάδια της καρκινογένεσης (Siddiqui, 2015)

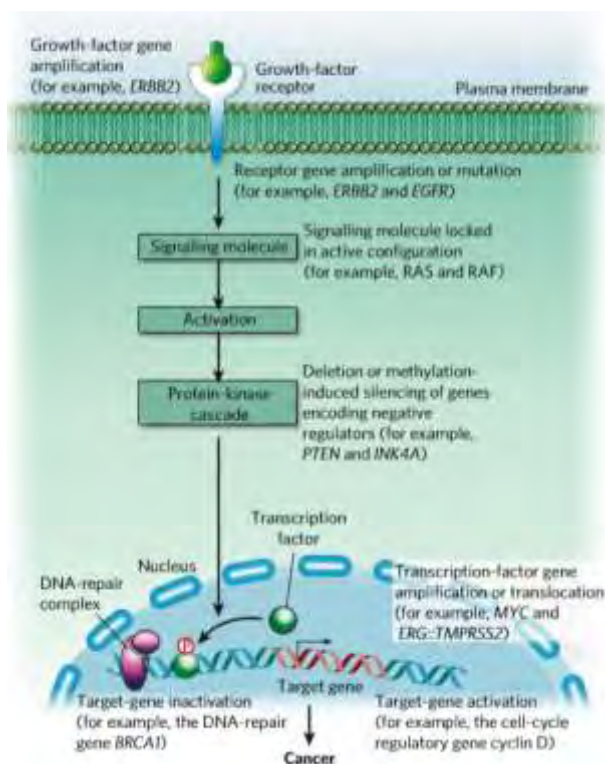
1.1.2 Πρωτο-ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια

Η μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά επάγεται από μεταλλάξεις σε δυο μεγάλες ομάδες γονιδίων, τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η πρώτη κατηγορία αφορά γονίδια που επιδρούν θετικά στην ανάπτυξη του όγκου αφού συνήθως συμμετέχουν στην ανάπτυξη και προαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Υπέρ-έκφραση αυτών των γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης σε συνδυασμό με την παρεμπόδιση του κυτταρικού θανάτου και την κυτταρική διαφοροποίηση (Cooper, 2000). Ο ρόλος των προϊόντων αυτών των γονιδίων διαφέρει, καθώς οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν μπορεί να είναι αυξητικοί παράγοντες (πχ ERBB2), υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (πχ EGFR), ένα συνεχώς ενεργό σηματοδοτικό μόριο (πχ RAS) ή μεταγραφικοί παράγοντες (πχ MYC). Μετάλλαξη σε ένα από τα αλληλόμορφα των παραπάνω γονιδίων ενός κυττάρου είναι ικανή να προδιαθέσει για απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και αυξάνει πιθανότητα μετατροπής σε καρκινικό κύτταρο (Chin, 2008). Από την άλλη, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από κύρια ογκοκατασταλτικά γονίδια, προάγουν την απόπτωση των κυττάρων (PTEN, Phosphatase and TENsin homolog), ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και αναστέλλουν την διεκπεραίωση του όταν δεν πληρούνται οι κατάλληλες προϋποθέσεις (CHK2, Checkpoint Kinase 2) (Ahn, 2004), ενεργοποιούν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (TP53, Tumor Protein p53) και τέλος, κάποια από αυτά αποτελούν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση των μεταλλάξεων που λαμβάνουν χώρα κατά την αντιγραφή του DNA (BRCA1/2, BRCA2) (Lee, 2010). Μετάλλαξη σε ένα από τα δυο αλληλόμορφα των παραπάνω γονιδίων δεν έχει ως αποτέλεσμα κάποια καθοριστική φαινοτυπική αλλαγή για το κύτταρο, καθώς το δεύτερο αλληλόμορφο θα είναι λειτουργικό και θα καταστέλλει επαρκώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπου αυτό είναι αναγκαίο (Cooper, 2000).

1.1.3 Τα είδη του καρκίνου

Ο καρκίνος κάθε ιστού διακρίνεται σε πολλές υποκατηγορίες και ονομάζεται ανάλογα τον τύπο του οργάνου από το οποίο ξεκίνησε ο όγκος είτε ανάλογα τον τύπο των κυττάρων που μετατράπηκαν σε καρκινικά. Οπότε, με την πρώτη κατηγοριοποίηση υπάρχουν καρκίνοι, όπως ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος του εγκεφάλου, ο καρκίνος της καρδιάς κ.α. Ο διαχωρισμός των όγκων που ξεκινούν από συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, περιορίζει τους τύπους καρκίνου σε πέντε κύριους. Αρχικά, το καρκίνωμα αποτελεί τον πιο συνήθη τύπο όγκου και προκαλείται από διάφορους

τύπους επιθηλιακών κυττάρων. Το σάρκωμα σχηματίζεται σε οστά και σε μαλακούς ιστούς, όπως τα αιμοφόρα αγγεία και οι μύες. Οι λευχαιμίες ξεκινούν από τον μυελό των οστών, το σημείο παραγωγής νέων κυττάρων του αίματος. Το λέμφωμα ξεκινά από τα Τ ή Β λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 2: Οι λειτουργίες των πρώτο-ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου (Chin, 2008).

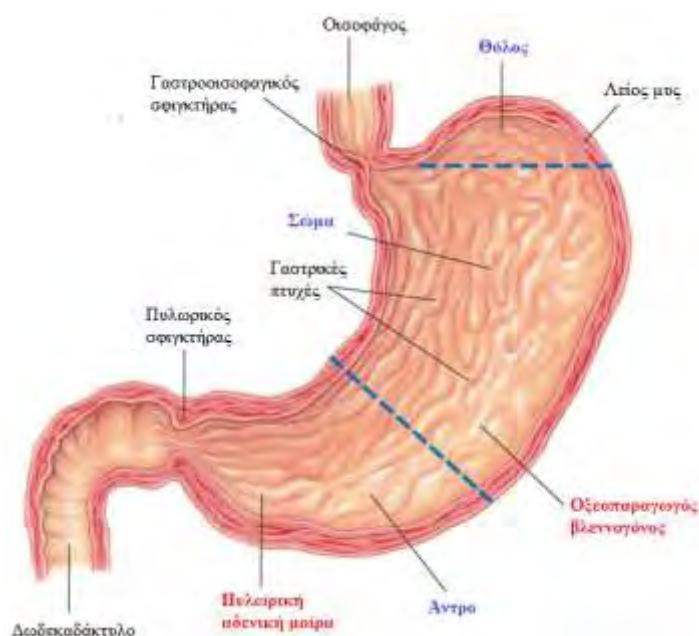
Αυτός ο τύπος καρκίνου χωρίζεται σε δυο κατηγορίες, το λέμφωμα Hodgkin το οποίο προκαλείται από Β λεμφοκύτταρα, και το λέμφωμα Non-Hodgkin που σχηματίζεται από Β ή Τ λεμφοκύτταρα. Τέλος, το μελάνωμα αναπτύσσεται σε μελανοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της χρωστικής μελανίνης. Πιο συχνά το μελάνωμα εμφανίζεται στο δέρμα, σε περιοχές του κορμού, της κεφαλής, αλλά η εμφάνιση του έχει σημειωθεί και σε άλλους ιστούς, όπως το μάτι (Thompson & Thompson, Ιατρική Γενετική, 2007).

1.2 Ο στόμαχος

1.2.1 Τα κύρια μέρη του στομάχου

Κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα μεταξύ του οισοφάγου και του λεπτού εντέρου εντοπίζεται ο στόμαχος, ένα όργανο που μοιάζει με σάκο σε σχήμα J, με βασικές λειτουργίες την πρόσληψη και την πέψη της τροφής και την μεταβίβαση της στο λεπτό έντερο όπου και λαμβάνει χώρα μεγάλο ποσοστό της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών. Χωρίζεται σε 5 τμήματα που διαφέρουν τόσο στη δομή τους όσο και στις επιμέρους λειτουργίες τους (**Εικ. 3**) (Wang, 2019). Η δομή που χωρίζει τον οισοφάγο από το στομάχι ονομάζεται γαστροοισοφαγικός σφιγκτήρας, είναι μυϊκής φύσης και αποτρέπει την μεταφορά της τροφής από τον στόμαχο πίσω στον οισοφάγο.

Ο θόλος(fundus) καταλαμβάνει το τμήμα του στομάχου που εντοπίζεται πάνω από το στόμιο εισόδου του οισοφάγου. Κατώτερα βρίσκεται το σώμα του στομάχου όπου λαμβάνει χώρα η αποθήκευση και η πέψη της τροφής μέσω έκκρισης πεπτικών ενζύμων και υδροχλωρικού οξέος. Το κατώτερο τμήμα του στομάχου περιλαμβάνει το άντρο(antrum) το οποίο συμμετέχει στην ανάμειξη των τροφών και στην μετατροπή τους σε έναν χυλό μέσω των μοναδικών ισχυρών περισταλτικών συσπάσεων (Karimi, 2015). Το τελευταίο τμήμα του στομάχου είναι ο πυλωρικός σφιγκτήρας(pyloicus), ένας μυς που ελέγχει την μεταφορά του χυλού από τον στόμαχο στο δωδεκαδάκτυλο και τελικά στο λεπτό έντερο, το κύριο όργανο για τη πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών των τροφών εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των λαχνών. Στις λειτουργίες του πυλωρικού σφιγκτήρα περιλαμβάνεται και η αποτροπή της μεταφοράς της τροφής από το λεπτό έντερο πίσω στον στόμαχο (Platzer, Fritsch, Kuhnel, Kahle, Frotscher, Εγχειρίδιο Περιγραφικής Ανατομικής, Εκδόσεις Πασχαλίδης, 3^η Ελληνική Έκδοση, σελ 640).



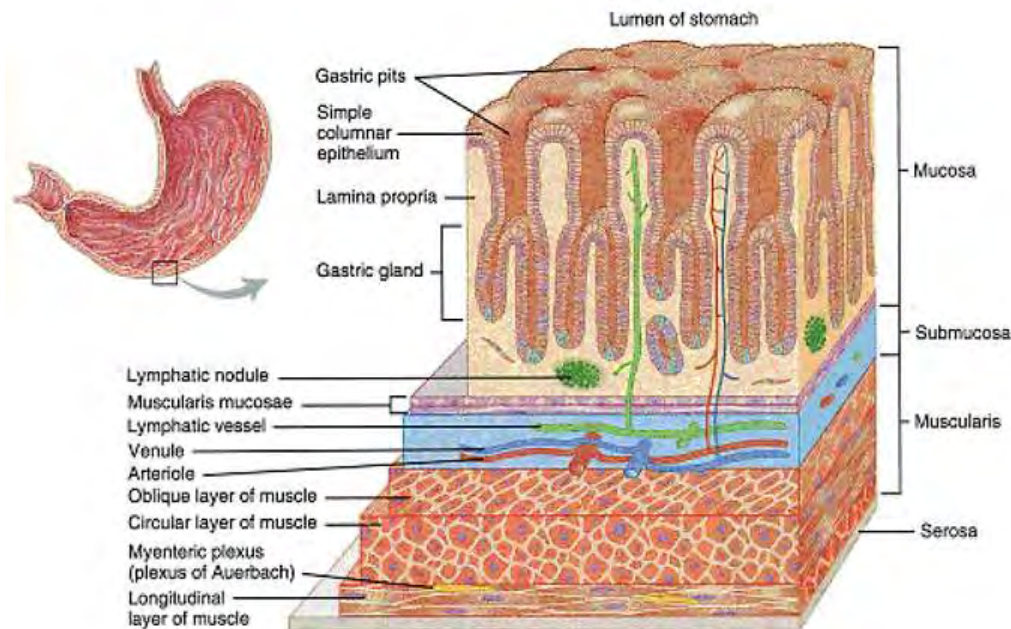
Εικόνα 3: Η ανατομία του στομάχου(Lauralee Sherwood, Εισαγωγή στη φυσιολογία του ανθρώπου,2016)

1.2.2 Το τοίχωμα του στομάχου

Το τοίχωμα του στομάχου αποτελείται από τέσσερα στρώματα. Από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του στομάχου συναντάται μια λεία μεμβράνη που ονομάζεται χιτώνιο ή serosa, μια πυκνή μυώδης μεμβράνη που λέγεται muscularis externa, ένα στρώμα συνδετικού ιστού που συναντάται ως υπο-βλεννογόνος (submucosa) και ένα στρώμα από διαφορετικά είδη ιστών που λέγεται βλεννογόνος ή mucosa (**Εικ.4**) (Laurent, 2012).

Πιο συγκεκριμένα, το στρώμα του ορογόνου (serosa) διαχωρίζει τις εσωτερικές κοιλότητες του στομάχου από τον υπερκείμενο συνδετικό ιστό και αποτελείται από δυο στρώματα, ένα στρώμα επιθηλίου και ένα στρώμα συνδετικού ιστού. Το στρώμα επιθηλίου αποτελείται από κύτταρα που εκκρίνουν ένα υγρό που βοηθάει στη μείωση της τριβής που αναπτύσσεται κατά την κίνηση των μυών του στομάχου. Το στρώμα του στομαχικού συνδετικού ιστού παρέχει όλα τα αιμοφόρα αγγεία και νεύρα που

χρειάζονται τα εκκριτικά κύτταρα και ακόμα, συμβάλλει στην προσκόλληση του ορογόνου στα όργανα ή σε άλλες δομές (Soybel, 2005). Η μυϊκή στοιβάδα (muscularis externa) είναι υπεύθυνη για τις περισταλτικές κινήσεις του στομάχου και την μετακίνηση της τροφής σε αυτόν και αποτελείται από τρία στρώματα μυϊκού ιστού, την εξωτερική διαμήκη μυϊκή στοιβάδα (longitudinal outer muscular layer) , την εσωτερική κυκλική μυϊκή στοιβάδα (inner circular muscular layer) και την εσωτερική λοξοειδή στοιβάδα (inner oblique layer) (Kang, 2013). Η εξώτερη διαμήκη μυϊκή στοιβάδα λειτουργεί μειώνοντας την έκταση, ενώ η εσωτερική κυκλική μυϊκή στοιβάδα εμποδίζει την κίνηση του φαγητού προς την περιοχή από την οποία προήλθε. Το τελευταίο στρώμα, η εσωτερική λοξοειδή στοιβάδα , εξασφαλίζει την κίνηση του χυλού στο εσωτερικό του με σκοπό την πέψη της τροφής. Το στρώμα του υπόβλεννογόνου είναι ένα πυκνό στρώμα συνδετικού ιστού και περιέχει μεγάλα αιμοφόρα αγγεία νεύρα υποστηρίζοντας τον βλεννογόνο. Οι ουσίες που περνούν από τον βλεννογόνο συλλέγονται και απορροφούνται από το συνδετικό τμήμα του υπόβλεννογόνου. Το πιο εσωτερικό στρώμα, που έρχεται σε επαφή με τον αυλό του στομάχου και τον χυλό, είναι ο βλεννογόνος και συμμετέχει στην απορρόφηση και στην έκκριση ενζύμων και ουσιών για την μερική πέψη των τροφών. Αποτελείται από τρία στρώματα, ένα λεπτό στρώμα λείου ιστού που είναι γνωστό ως μυϊκός βλεννογόνος (muscularis mucosa), ένα στρώμα λεπτού συνδετικού ιστού που λέγεται lamina propria και ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων. Τα επιθηλιακά κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τον αυλό του στομάχου εισέρχονται στο εσωτερικό του βλεννογόνου σχηματίζοντας μια δομή ανάποδου Y (McCracken, 2017).

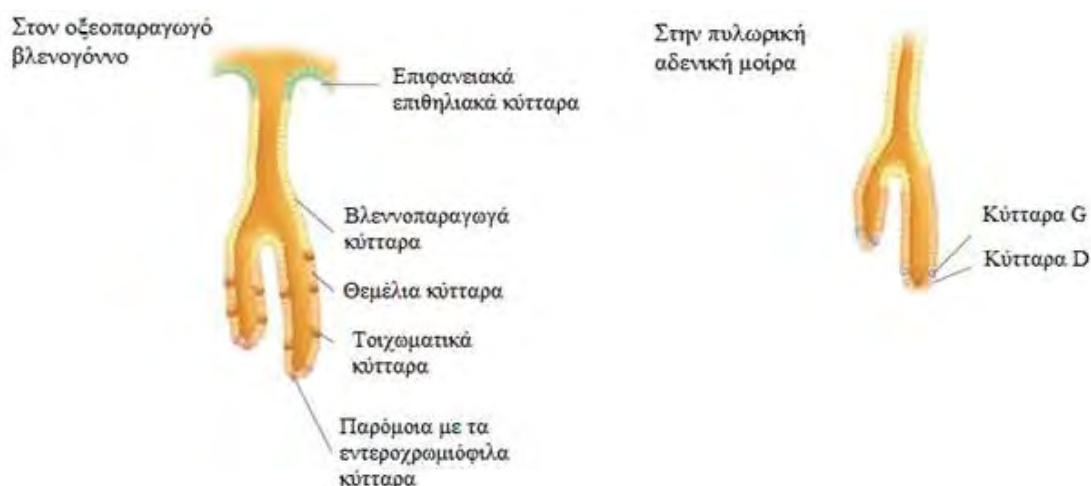


Εικόνα 4: Τα διάφορα στρώματα ιστών που περιβάλλουν τον στόμαχο (Laurent, 2012).

1.2.3 Οι κύριοι τύποι κυττάρων του στομάχου

Ο στόμαχος χωρίζεται σε δυο τμήματα, τον οξεοπαραγωγό βλεννογόνο και την πλευρική αδενική μοίρα, με διαφορετικές λειτουργίες. Στην περιοχή του σώματος του

στομάχου συναντάται ο οξεοπαραγωγός βλεννογόνος, ενώ στην περιοχή του άντρου η πλευρική αδενική μοίρα. Τα αδενικά κύτταρα που απαρτίζουν αυτές τις περιοχές εμφανίζουν σημαντικές διαφορές (**Εικ. 5**). Στον οξεοπαραγωγό βλεννογόνο εντοπίζονται κύτταρα όπως βλεννοπαραγωγά κύτταρα (εκκρίνουν βλέννη που προστατεύει το βλεννογόνο από τραυματισμούς από την πεψίνη και το γαστρικό οξύ), θεμέλια κύτταρα (εκκρίνουν πεψινογόνο που διασπάται σε πεψίνη και συμμετέχει στην πέψη των πρωτεϊνών), τα τοιχωματικά κύτταρα (εκκρίνουν HCl που ενεργοποιεί το πεψινογόνο και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες της τροφής) και κύτταρα παρόμοια με τα εντεροχρωμόφιλα κύτταρα (εκκρίνουν ισταμίνη που διεγείρει τα τοιχωματικά κύτταρα) (O'Connor, 2014). Η διαφορά στο στρώμα της πλευρικής αδενικής μοίρας είναι ότι δεν αποτελείται από τοιχωματικά και παρόμοια με εντεροχρωμόφιλα κύτταρα, αλλά αποτελείται από κύτταρα G (εκκρίνει γαστρίνη που διεγείρει τα θεμέλια κύτταρα) και κύτταρα D (εκκρίνουν σωματοστατίνη που δρουν αναστέλλοντας τα θεμέλια κύτταρα) (Widmaier, Raff, Strang, Vander's Φυσιολογία του Ανθρώπου: Οι Μηχανισμοί του Σώματος, 2^η Ελληνική Έκδοση, 2016).



Εικόνα 5: Τα αδενικά κύτταρα του στομάχου

(Lauralee Sherwood, Εισαγωγή στη φυσιολογία του ανθρώπου, 2016)

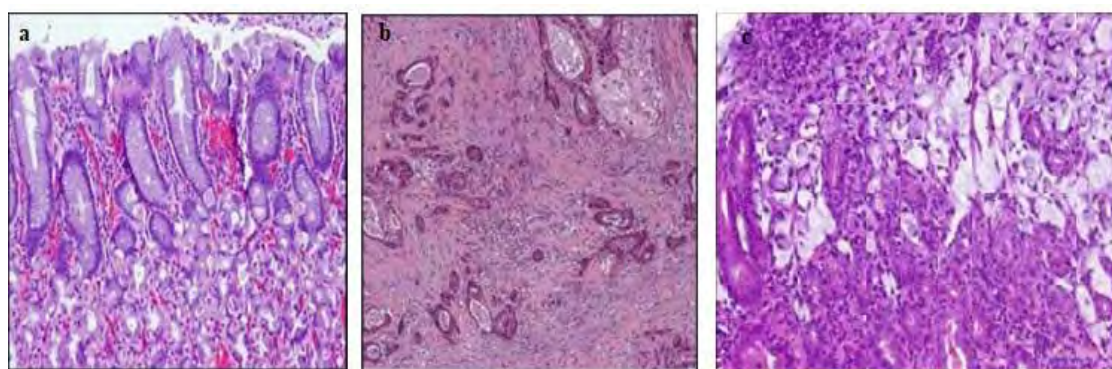
1.3 Καρκίνος του στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί τον πέμπτο πιο συχνό τύπο καρκίνου παγκοσμίως, μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη. Το 2012 παγκοσμίως καταγράφηκαν 952.000 περιστατικά καρκίνου του στομάχου και παράλληλα 723.000 άτομα από αυτά απεβίωσαν (Song, 2017). Η κατανομή των περιστατικών, ωστόσο δεν είναι ομοιόμορφη, με τους Ασιατικούς και Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς να αποτελούν μεγάλο ποσοστό αυτών των περιστατικών. Από την άλλη, η Αφρική και η Αμερική παρουσιάζουν χαμηλότερες συχνότητες εμφάνισης καρκίνου του στομάχου (Röcken, 2017). Παρά τις ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της βιοϊατρικής με προσπάθειες βελτίωσης της διάγνωσης των ασθενειών και της εξατομικευμένης θεραπείας, ο καρκίνος του στομάχου παραμένει η τρίτη αιτία

θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως λόγω της ανεπαρκούς διάγνωσης των πρώιμων σταδίων συνδυαστικά με μη επαρκείς μεθόδους θεραπείας των προχωρημένων σταδίων του καρκίνου του στομάχου. (Gullo, 2017).

1.3.1 Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου κατά Laurén

Με βάση την κατηγοριοποίηση κατά Laurén που σχετίζεται με την ιστολογική προέλευση ο καρκίνος του στομάχου διακρίνεται σε δυο μεγάλες υποκατηγορίες, τον εντερικό και τον διάχυτο υπότυπο. Η διάκριση σε αυτές τις υποκατηγορίες βασίζεται σε διαφορές όσον αφορά την προέλευση, την παθολογία αλλά και την αιτιολογία εμφάνισης του όγκου. Στον εντερικό υπότυπο τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλή συνεκτικότητα και διατάσσονται σε σωληνοειδείς ή αδενικές δομές. Εμφανίζεται πιο συχνά σε ηλικιωμένους άντρες σε περιοχές του στομάχου όπου είναι πιο εύκολη η αντιμετώπιση του, και γι' αυτό τα περιστατικά του εντερικού καρκίνου μειώνονται με τον χρόνο. Η δεύτερη κατηγορία, ο διάχυτος υπότυπος καρκίνος του στομάχου, περιέχει κύτταρα μειωμένης συνεκτικότητας που σχηματίζουν πληθυσμούς διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων. Συναντάται σε άτομα, κυρίως θηλυκά, πιο νεαρής ηλικίας, αναπτύσσεται κυρίως στο σώμα του στομάχου όπου ο όγκος είναι πιο επιθετικός και λιγότερο αντιμετωπίσιμος (Εικ. 6) (Gullo, 2017). Η πιθανότητα εμφάνισης και των δυο τύπων καρκίνου του στομάχου εξαρτάται τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες όσο από τις διατροφικές συνήθειες του ατόμου. Παρόλα αυτά, ο διάχυτος καρκίνος εμφανίζει κληρονομικότητα και προϋποθέτει κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο, ενώ η ανάπτυξη του εντερικού καρκίνου σχετίζεται περισσότερο με περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* και τον ιό *Epstein-Barr* (Hunt, 2015), ωστόσο μπορεί να έχει και κληρονομική βάση. Κρούσματα καρκίνου του στομάχου που δεν κατατάσσονται στις δυο προηγούμενες κατηγορίες, ανήκουν σε έναν τρίτο τύπο που ονομάζεται μικτός (Gullo, 2017).



Εικόνα 6: Ιστολογικά χαρακτηριστικά διάφορων τύπων καρκίνου με βάση την κατηγοριοποίηση κατά Laurén. (a) φυσιολογικό γαστρικό mucosa, (b) αδενοκαρκίνωμα εντερικού τύπου (c) αδενοκαρκίνωμα διάχυτου τύπου (Riquelme, 2015).

1.3.1.1 *Helicobacter Pylori*

Το *Helicobacter Pylori* ανήκει στην ομάδα των Gram⁻ βακτηρίων και η μόλυνση από αυτό το βακτήριο έχει συσχετιστεί με υψηλή πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του

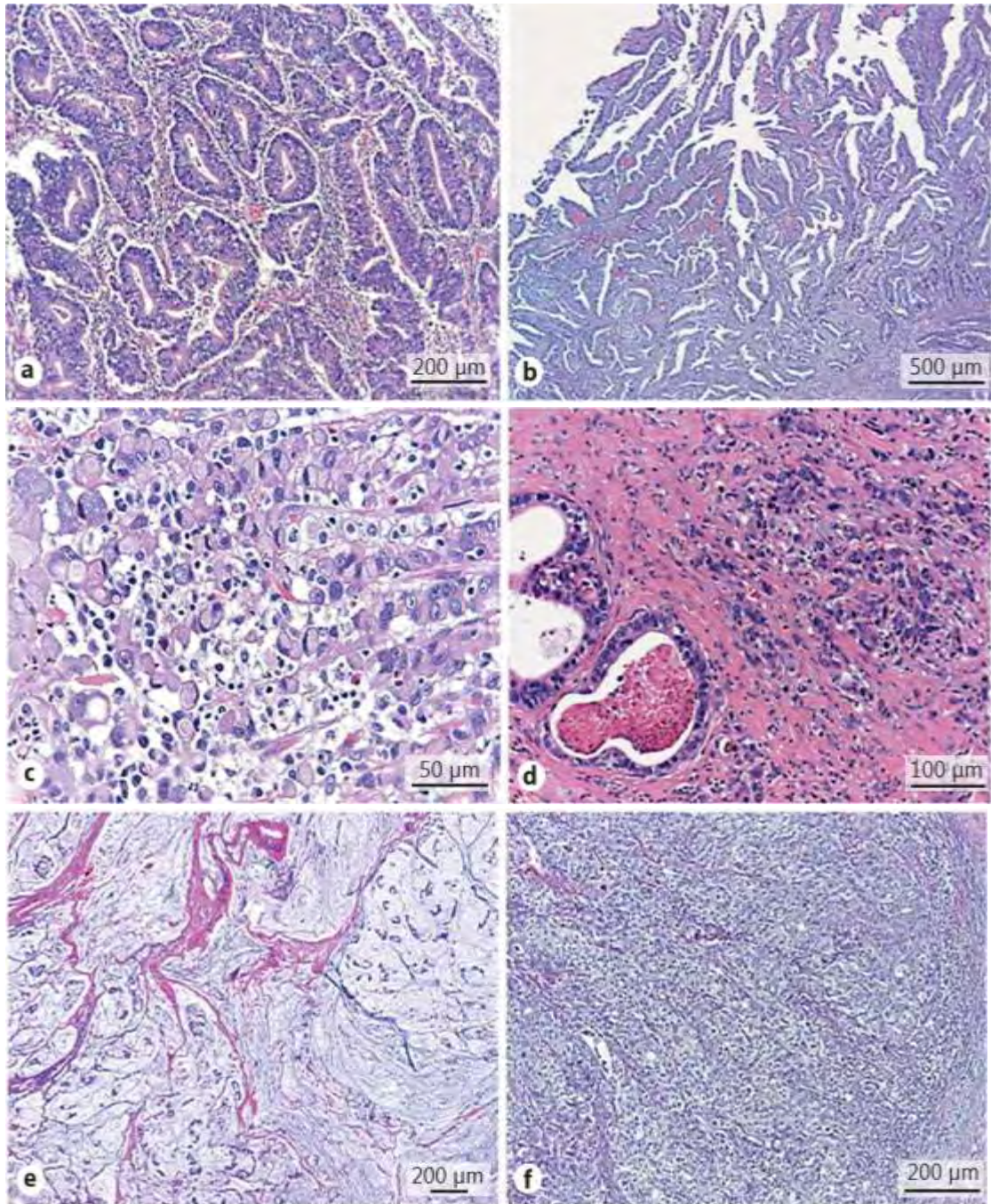
στομάχου και ειδικότερα του εντερικού υποτύπου. Το βακτήριο μετά την είσοδο του στον ξενιστή, αποικίζει στο επιθήλιο του στομάχου και οδηγεί στην εμφάνιση γαστρίτιδας (Polk, 2010). Ωστόσο, έχει σημειωθεί ότι το *Helicobacter* προκαλεί καρκινογένεση μέσω διάφορων οδών, όπως με την φλεγμονή που προκαλείται λόγω της μόλυνσης, με την αλληλεπίδραση με άλλους μικροοργανισμούς που οδηγούν σε μη σταθερότητα του ξενιστή ή τέλος, με επιγενετικές τροποποιήσεις για τις οποίες ευθύνεται το *Helicobacter*. Κάθε περιστατικό μόλυνσης δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα για τον ξενιστή λόγω της γενετικής ποικιλότητας των διαφόρων στελεχών του *Helicobacter*. Η επιθετικότητα της μόλυνσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από πρωτεΐνες που εκφράζει το βακτήριο, όπως η vacuolating toxin, η HP neutrophil-activating protein (HP-NAP) και πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την νησίδα cag (Ajani, 2017).

1.3.1.2 Epstein-Barr virus

Η απομόνωση του ιού Epstein-Barr έγινε για πρώτη φορά από βιοψίες ασθενών που έπασχαν από έναν καρκίνο του λεμφικού συστήματος, το λέμφωμα Burkitt. Από τότε η ανάπτυξη του συγκεκριμένου ιού έχει συσχετιστεί με ασθένειες που αφορούν ανωμαλίες λεμφικών και επιθηλιακών κυττάρων. Ο EBV ανήκει στην ομάδα των ερπητοϊών με γραμμικό δίκλωνο DNA ως γενετικό υλικό περιβαλλόμενο από νουκλεοκαψίδιο (COHEN, 2000). Μολύνει τα Β-λεμφοκύτταρα αφού προσδεθεί στη επιφάνεια τους μέσω κατάλληλων γλυκοπρωτεϊνών του ιού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεταμόρφωση των Β-λεμφοκυττάρων σε κύτταρα που να εξακολουθούν να εκφράζουν τους δείκτες που να υποδεικνύουν την ταυτότητα των Β-κυττάρων, αλλά εκφράζουν επιπλέον ικά γονίδια. Το γεγονός αυτό είναι συνδεδεμένο με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανικανότητα θανατοποίησης τους. Περίπου το 9-10% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων είναι θετικά σε μόλυνση από τον EBV ο οποίος έχει συνδεθεί και με την εμφάνιση της λοιμώδους μονοπυρήνωσης και καρκίνων, όπως ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα. Επίσης, μεγάλο ποσοστό των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου που έχουν μολυνθεί παράλληλα και από τον EBV καταλήγουν σε μετάσταση στο λεμφικό σύστημα και έχει συνδεθεί και με χαμηλή θνησιμότητα. (Young, 2004; Riquelme, 2015).

1.3.2 Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου (WHO)

Η οργάνωση της παγκόσμιας υγείας (World Health Organization, WHO), το 2010, διέκρινε τον καρκίνο του στομάχου σε διάφορους τύπους ανάλογα με τα ιστολογικά πρότυπα που εμφάνιζαν. Με βάση αυτό, ο καρκίνος του στομάχου χωρίζεται σε θηλοειδή, σωληνοειδή και βλενώδη τύπο που εντάσσονται στην ευρύτερη κατηγορία των εντερικών καρκίνων σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση κατά Laurén, σε χαμηλής συνεκτικότητας τύπο που αντιστοιχεί στον διάχυτο τύπο καρκίνου και τέλος σε ανάμεικτο και έναν τύπο σπάνιων ιστολογικών ιδιοτήτων (**Εικ. 7**) (Gullo, 2017).



Εικόνα 7: Ιστολογικά χαρακτηριστικά καρκίνων του στομάχου σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση κατά WHO. (a) σωληνοειδής τύπος καρκίνου, καλά διαφοροποιημένος, (b) καλά διαφοροποιημένος θηλεοειδής τύπος καρκίνου, (c) κύτταρα χαμηλής συνεκτικότητας, (d) ανάμεικτο καρκίνωμα, (e) βλενώδες αδενοκαρκίνωμα, (f) αδιαφοροποίητο καρκίνωμα (Gullo, 2017).

1.3.3 Μοριακή κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου

Οι κλασικές μέθοδοι κατηγοριοποίησης του καρκίνου του στομάχου με βάση την ιστοπαθολογία του όγκου, ωστόσο, δεν συμβάλλουν στην εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπειών. Η γενωμική πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τον καρκίνο του στομάχου υποδεικνύει απαραίτητη τη διάκριση του σύμφωνα με μοριακά χαρακτηριστικά.

Δεδομένα από αναλύσεις αλληλούχησης των DNA και RNA και συστοιχίες πρωτεϊνών συμμετείχαν στην νέα μοριακή κατηγοριοποίηση του σε 4 υποτύπους: Θετικοί σε μόλυνση από τον ιό *Epstein Barr*, όγκοι που χαρακτηρίζονται από αστάθεια μικροδορυφόρων (microsatellite unstable MSI), από γενωμική σταθερότητα (genomically stable, GS) ή χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability, CIN) (Chia, 2016).

Οι όγκοι που προέρχονται από μολυσμένα κύτταρα από τον EBV διακρίνονται από:

- Υπερμεθυλίωση των υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων π.χ του γονιδίου CDKN2A(cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A) που κωδικοποιεί για έναν αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 2A η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου.
- Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τις PIK3CA(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A), και BCOR(BCL6 corepressor)

Οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από αστάθεια μικροδορυφόρων παρουσιάζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Ενεργοποίηση μιτωτικών μονοπατιών
- Μεταλλάξεις γονιδίων, όπως TP53, PTEN, KRAS, ARID1A, PIK3CA που είτε αναστέλλουν την ογκοκατασταλτική τους δράση είτε επάγοντας την ογκογόνο δράση (Sanjeevaiah, 2018)

Οι όγκοι που παρουσιάζουν γενωμική σταθερότητα, συνήθως κατατάσσονται και στην ομάδα των διάχυτων δυσπλασιών, ενώ οι μεταλλάξεις που παρουσιάζουν σχετίζονται με τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι Rho πρωτεΐνες με δράση GTPάσης.

Τέλος, τα αδενοκαρκινώματα του στομάχου με χρωμοσωμική αστάθεια συμπίπτουν με αδενοκαρκινώματα του εντερικού υποτύπου, ενώ μοριακά εμφανίζουν μεταλλάξεις σε υποδοχείς κινάσης τυροσίνης που συνήθως αποτελούν υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως ο EGF (epidermal growth factor). (Guo, 2016)

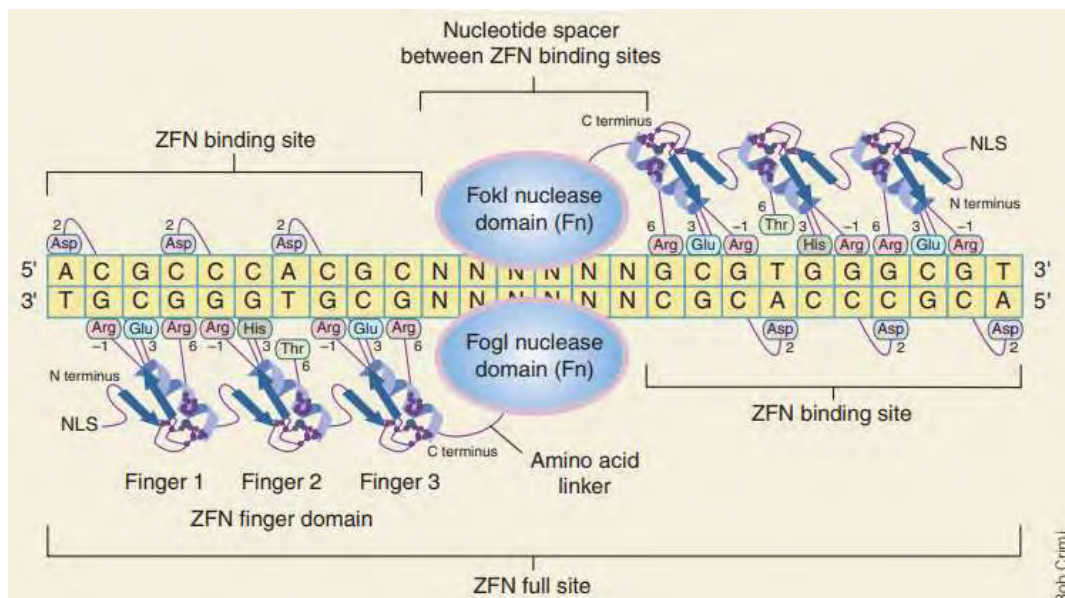
1.4 Παλαιότερες τεχνολογίες γενετικής τροποποίησης

Η πληθώρα των μεταλλάξεων που σχετίζονται με διαφορετικό υπότυπο των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου οδηγεί στην ανάπτυξη μεθοδολογιών που θα στοχεύουν στην τροποποίηση αυτών των μεταλλάξεων με σκοπό τον περιορισμό και την θεραπεία του όγκου.

1.4.1 Νουκλεάσες με επικράτεια δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs)

Πρωτεΐνες που περιέχουν το κλασικό Cys₂His₂ (ZFPs) μοτίβο δάκτυλου ψευδαργύρου ανακαλύφθηκαν από τους Klug και τους συνεργάτες του το 1986 και παρατηρούνται σε μεγάλη αφθονία στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα. Κάθε δάκτυλος αποτελείται από 30 αμινοξέα τα οποία διαμορφώνονται σε μια δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης (β-πτυχωτή επιφάνεια, β-πτυχωτή επιφάνεια, α-έλικα) (Carroll, 2005). Κάθε δάκτυλος προσελκύει ένα άτομο Zn⁺ αξιοποιώντας δυο κατάλοιπα κυστεΐνης και δυο κατάλοιπα ιστιδίνης με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του με τρεις βάσεις του DNA. Αλλαγές σε κάποια καθοριστικά κατάλοιπα της α-έλικας μπορεί να επηρεάσουν την εξειδίκευση της σύνδεσης στο DNA αναγνωρίζοντας διαφορετική τριπλέτα νουκλεοτιδίων. Αυτή η

ιδιότητα δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας ενός εργαλείου που θα είναι ικανό να στοχεύει εξειδικευμένα οποιαδήποτε αλληλουχία στο γονιδίωμα (Durai, 2005). Ανάλογα με τον αριθμό των μοτίβων ψευδαργύρου που θα αποτελείται το σύστημα μπορούν να στοχεύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες ειδικού μήκους (Εικ. 8). Το μήκος της αλληλουχίας στόχου ορίζεται από την συνθήκη ότι δεν θα πρέπει να είναι αρκετά συχνή στο εν λόγω γονιδίωμα, ώστε η πολλαπλή στόχευση τους να έχει κάποια καθοριστική επίδραση στη λειτουργία του κυττάρου (FyodorD. Urmov, 2010). Γι' αυτό συνήθως κάθε ZFP περιέχει τρεις επικράτειες δακτύλου ψευδαργύρου που συνολικά αναγνωρίζουν μια αλληλουχία DNA μήκους 9 bp. Για την επιτυχή γενετική τροποποίηση εκτός από την αναγνώριση DNA αλληλουχιών, απαιτείται και η πέψη του γενετικού υλικού αξιοποιώντας την δράση μιας νικάσης ή μιας ενδονουκλεάσης. Στο συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιείται ένα μέλος των ενζύμων περιορισμού τύπου II, η ενδονουκλεάση FokI που αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία αλλά δεν κόβει μέσα σε αυτή, δημιουργώντας τελικά κολλώδη άκρα (Carroll, 2005). Η περιοχή αναγνώρισης της φυσιολογικής FokI είναι μια μη παλινδρομική αλληλουχία που αποτελείται από πέντε δεοξυριβονουκλεοτίδια, την 5'-GGATG-3': 5'-CATCC-3' και προκαλεί την πέψη του δίκλωνου μορίου DNA εννέα νουκλεοτίδια καθοδικά αυτής της αλληλουχίας. Αυτό το ένζυμο συναντάται σε διμερή, ώστε να δημιουργηθούν δίκλωνες ρήξεις στο DNA. Συνδυάζοντας, λοιπόν, τις ZFPs που σχεδιάζονται κάθε φορά ώστε να αναγνωρίσουν επιλεγμένες αλληλουχίες DNA, με την επικράτεια ενδονουκλεάσης της FokI πρωτεΐνης που καταλύει την πέψη του DNA, είναι δυνατή η δημιουργία ενός ομοδιμερούς ZFN που θα αναγνωρίσει και θα πέσει κατ' επιλογήν αλληλουχίες DNA με σκοπό την ακριβή γενετική τους τροποποίηση (Durai, 2005).

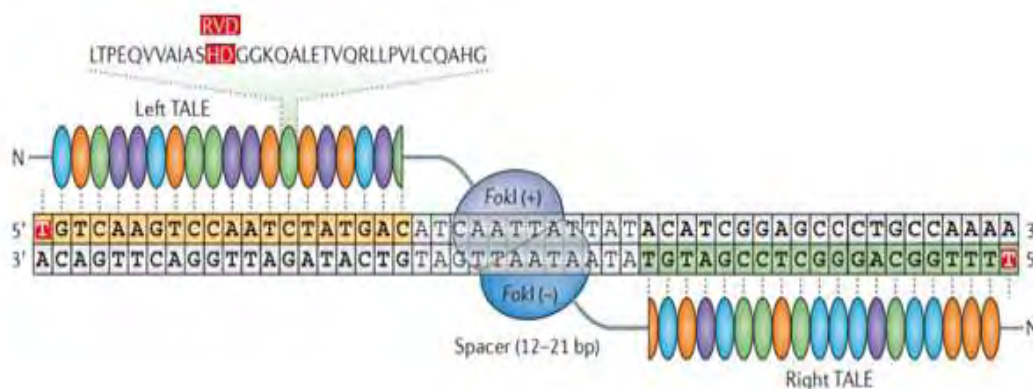


Εικόνα 8: ZFN ομοδιμερές που αλληλεπιδρά με το DNA. Φαίνεται το διμερές FokI nuclease domains στο αμινο-τελικό άκρο των οποίων εντοπίζονται οι ZFPs. Κάθε ZFP αποτελείται από 3 μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου που αναγνωρίζουν τρεις τριπλέτες νουκλεοτιδίων (Carroll, 2005)

Η τεχνολογία των ZFNs έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορους οργανισμούς σε ποικίλες εφαρμογές, όπως στην εισαγωγή ενός γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα σε φυτά καλαμποκιού (VipulaK. Shukla, 2009), για τη διόρθωση της μετάλλαξης ΔF508 υπεύθυνη για την εμφάνιση της κυστικής ίνωσης σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Ciaran M. Lee, 2012) ή ακόμα και σε προσπάθειες για την θεραπεία του Aids με την διάρρηξη του γονιδίου του συνυποδοχέα CCR5 του HIV-1 σε ανθρώπινα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα.(Lijing Li1, 2013).

1.4.2 Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)

Ένα ελάττωμα των ZFNs αποτελεί η δύσκολη, χρονοβόρα και ακριβή σύνθεση των ZFPs, αφού για κάθε στόχο DNA πρέπει να γίνονται εξειδικευμένες μεταλλάξεις στα zinc-fingers. Γι' αυτό το σκοπό, στη συνέχεια έγινε ανάπτυξη ενός νέου εργαλείου γενετικής τροποποίησης που αφορά νουκλεάσες που ομοιάζουν με μεταγραφικούς ενεργοποιητές (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN). Οι TALE πρωτεΐνες απομονώθηκαν από *Xanthomonas proteobacteria* που είναι παθογόνα για καλλιεργούμενα φυτά, όπως το ρύζι και τη ντομάτα, προκαλώντας σημαντικά οικονομικά προβλήματα στην γεωργία (Gaj, 2013). Αρχικά, βρέθηκε ότι αυτά τα βακτήρια εκκρίνουν τις TALE πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων επηρεάζοντας διάφορες φυτικές διεργασίες καθιστώντας το φυτό ευαίσθητο στην προσβολή από το παθογόνο. Είναι πλέον γνωστό, ότι τα TALENs έχουν την δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA εξαιτίας των μονομερών που περιέχουν επηρεάζοντας την μεταγραφή γονιδίων στόχων (A. A. Nemudryi, 2014). Τα μονομερή αυτά είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 33-35 αμινοξικών καταλοίπων, δυο από τα οποία εντοπίζονται στις θέσεις 12 και 13, διακρίνονται από υψηλή ποικιλομορφία (repeat variable diresidue, RVD) και ευθύνονται για την εξειδικευμένη πρόσδεση σε νουκλεοτίδια. Για την αξιοποίηση των TALENs σε εργαλεία γενετικής τροποποίησης δημιουργούνται χιμαιρικές TALE με επικράτειες ενδονουκλεάσης από τις FokI (**Εικ. 9**) (Bi, 2017).



Εικόνα 9: Φαίνεται το διμερές TALE καθένα από τα οποία αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αμινοξικές αλληλουχίες συζευγμένες στο καρβόξυ-τελικό άκρο με επικράτειες νουκλεάσης από το FokI. Οι αλληλουχίες που στοχεύονται με αυτή την τεχνική μπορεί να έχουν μήκος από 30 έως 40 ζεύγη νουκλεοτιδίων, ενώ αυτές απέχουν διάστημα 12-21 νουκλεοτιδίων που ονομάζεται spacer. Τελικά, οι FokI θα διασπάσουν τον φωφοδιεστερικό δεσμό νουκλεοτιδίων εντός της spacer αλληλουχίας. Ακόμα φαίνεται ότι στο 5' άκρο κάθε αλληλουχίας στόχου θα πρέπει να παρατηρείται η βάση T (Kim, 2014)

Η επιτυχία της γενετικής τροποποίησης μέσω των TALENs έχει ελεγχθεί με εφαρμογές σε οργανισμούς μοντέλα, όπως η μύγα των φρούτων (Kondo, 2013), το ψάρι ζέβρα (Zu, 2013) και ο βάτραχος (Lei, 2012). Ακόμα, έχουν χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία ενδογενών γονιδίων σε μεταξοσκώληκες (Sajwan, 2013) (Wang, 2014), καθώς επίσης και σε κουνούπια (Smidler, 2013) (Aryan, 2013). Επιπλέον, τα TALEN αξιοποιήθηκαν και για θεραπευτικούς σκοπούς για την διόρθωση μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση διάφορων ασθενειών, όπως η μυϊκή δυστροφία Duchenne (Li, 2015), η β-θαλασσαιμία (Xu, 2015), η ασθένεια Parkinson που οφείλεται στο γονίδιο α-συνουκλεΐνης (Sander, 2013). Οι νουκλεάσες TALEN διακρίνονται από ευκολότερο σχεδιασμό, υψηλά ποσοστά επιτυχημένης πέψης και μεγαλύτερη ευελιξία στόχευσης του γονιδιώματος συγκριτικά με τις ZFNs γι' αυτό και επικράτησαν αρχικά έναντι αυτών. Παρόλα αυτά, τόσο η τεχνολογία των ZFNs και των TALEN προϋποθέτουν την τροποποίηση πρωτεϊνών για την στόχευση ενός σχετικά ικανοποιητικού εύρους αλληλουχιών η οποία για να επιτευχθεί εκτός από χρόνο και υψηλό κόστος στηρίζεται και σε ένα απαιτητικό εργαστηριακό πρωτόκολλο. Επομένως, εμφανίζεται η ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών που θα υπερέχουν σε αυτά τα στοιχεία από τις ήδη υπάρχουσες (Singh, 2017).

1.5 Ρυθμιστικές συστοιχίες τακτικά παρεμβαλλόμενων παλινδρομικών επαναλήψεων που σχετίζονται με CRISPR πρωτεΐνες (CRISPR-Cas)

1.5.1 Φιλοσοφία του CRISPR-Cas

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας έναντι των βακτηριοφάγων στοχεύοντας διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του ιού, όπως με την παρεμπόδιση της προσρόφησης, της εισαγωγής του γονιδιώματος του ιού ή της στόχευσης και κατακερματισμού του ιικού DNA (Wei, 2017). Με την ανάπτυξη της αλληλούχησης επόμενης γενεάς και την μελέτη πλήθους βακτηριακών γονιδιωμάτων την τελευταία εικοσαετία παρατηρήθηκε ένα πρότυπο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε πληθώρα γονιδιωμάτων βακτηρίων και αρχαίων που στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι παίζουν ρόλο ως ένας μοριακός επίκτητος μηχανισμός προστασίας που στοχεύει DNA που προέρχεται από ιούς ή ακόμα και πλασμίδια. Συγκεκριμένα, το CRISPR-Cas σύστημα περιέχει μια περιοχή cas γονιδίων και μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που παρεμβάλλει αλληλουχίες με ομολογία έναντι ιικών γονιδιωμάτων (Barrangou, 2007).

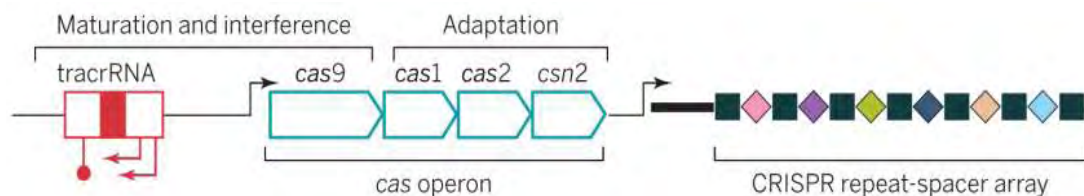
1.5.2 Ανακάλυψη του CRISPR-Cas

Από το 1998 έγιναν οι πρώτες αναφορές σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία που εντοπίζονταν σε προκαρυωτικά γονιδιώματα. Το παράδοξο με αυτά τα στοιχεία που

κίνησε το ενδιαφέρον ήταν η υψηλή συντήρηση τους σε συγγενικά μακρινούς οργανισμούς (vanBelkum, 1998). Το 2002, ο Mojica κατάταξε αυτές τις αλληλουχίες σε μια νέα οικογένεια προκαρυωτικών επαναλήψεων λόγω του γεγονότος ότι αποκλίνουν σε πολλά χαρακτηριστικά από τα ήδη μελετημένα επαναλαμβανόμενα μοτίβα. Συγκεκριμένα, αυτά είναι μικρά επαναλαμβανόμενα στοιχεία τα οποία συναντώνται σε συστοιχίες, και είναι μοναδικά στο ότι παρεμβάλλουν ακολουθίες σταθερού μήκους που ονομάστηκαν protospacers. Έτσι, αυτές οι επαναλήψεις ορίστηκαν πρώτα ως μικρές επαναλήψεις με τακτική επανάληψη (Short Regularly Spaced Repeats, SRSRs). Στη μελέτη του Mojica έγινε μια πρώτη ανάλυση των γονιδιωμάτων βακτηρίων και αρχαίων για την εύρεση των SRSRs. Αυτά βρέθηκε ότι συναντώνται σε πολλές φυλογενετικές προκαρυωτικές ομάδες, πιθανότατα σε όλα τα αρχαία και τα υπερθερμόφιλα βακτήρια, καθώς και σε κάποια μέλη των κυανοβακτηρίων και των πρωτεοβακτηρίων. Μεταξύ αυτών των οργανισμών το μήκος των SRSRs κυμαίνεται από 24–40bp και οργανώνεται σε συστοιχίες επαναλαμβανόμενων μονάδων που παρεμβάλλουν αλληλουχίες μήκους 20-58 bp (FranciscoJ. M. Mojica, 2002). Λίγο πιο μετά, τον Απρίλιο του 2002, βρέθηκαν τα CRISPR-associated genes (Cas) κοντά στην CRISPR περιοχή υποδεικνύοντας ότι τα cas γονίδια με τις επαναλήψεις του CRISPR locus έχουν μια λειτουργική συσχέτιση μεταξύ τους. Τα 4 cas γονίδια οδηγούν στην παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών (Cas1,Cas2,Cas3,Cas4) από τις οποίες οι Cas3 και Cas4 φάνηκε ότι συμμετέχουν στον μεταβολισμό του DNA ή στην γονιδιακή έκφραση (Ruud. Jansen, 2002). Στη συνέχεια η μελέτη συνεχίστηκε με την ανάλυση των αλληλουχιών που παρεμβάλλονταν μεταξύ των SRSRs. Παρατηρήθηκε ότι αυτές οι παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες εμφανίζουν ομολογία έναντι του γονιδιώματος βακτηριοφάγων ή ακόμα και πλασμιδίων. Ενδιαφέρον αποτέλεσε το γεγονός, ότι βακτήρια με ομόλογες παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες από συγκεκριμένους ιούς ήταν ανθεκτικά στην μόλυνση από αυτούς. Παρόμοια, πλασμίδια που μεταφέρονται επιτυχώς σε βακτήρια δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε προκαρυώτες που φέρουν παρεμβαλλόμενες ομόλογες αλληλουχίες με το αντίστοιχο πλασμίδιο (FranciscoJ.M. Mojica, 2005). Αυτά και άλλα ευρήματα οδήγησαν τελικά στην υπόθεση ότι το CRISPR αποτελεί έναν συντηρημένο επίκτητο μοριακό μηχανισμό προστασίας έναντι εισβολέων, ο οποίος ομοιάζει με την παρεμβολή RNA αλλά αντίθετα στηρίζεται στην στόχευση ξένου DNA το οποίο κατακερματίζει. Όμως πως το ίδιο το κύτταρο προστατεύεται από την πέψη της αλληλουχίας protospacer, αφού είναι όμοια με το ξένο DNA; Για διαφορετικούς τύπους CRISPR αυτό επιτυγχάνεται και με διαφορετικό μηχανισμό. Το πιο γνωστό σύστημα CRISPR (type II CRISPR-Cas) χρησιμοποιεί μια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία PAM(protospacer adjacent motif) η οποία εντοπίζεται καθοδικά της αλληλουχίας στόχου στο ξένο γονιδίωμα αλλά όχι στο προκαρυωτικό γονιδίωμα. Κάθε Cas πρωτεΐνη που απομονώνεται από διαφορετικό οργανισμό εξειδικευμένα αναγνωρίζει PAM ειδικού μήκους και αλληλουχίας. (Kira S. Makarova, 2011).

1.5.3 Η δομή του γενετικού τόπου CRISPR

Νεότερες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο αριθμός των παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών στον γενετικό τόπο CRISPR ποικίλει από ένα έως μερικές εκατοντάδες μεταξύ ειδών (π.χ. 587 spacers εντοπίζονται στην περιοχή CRISPR του μυξοβακτηρίου *Haliangium ochraceum*). Μεταξύ των διαφορετικών ειδών το μήκος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μπορεί να ποικίλει από 21 έως 48 bp, ενώ το μήκος των παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών κυμαίνεται από 26 έως 72 ζεύγη βάσεων. Επίσης, ένα γονιδίωμα μπορεί να περιέχει περισσότερους από έναν γενετικούς τόπους CRISPR, με μη συντηρημένη επαναλαμβανόμενη αλληλουχία μεταξύ αυτών. Πιο συγκεκριμένα, βακτηριακά γονιδιώματα έχει αναφερθεί ότι μπορεί να περιέχουν έως και 15 γενετικούς τόπους CRISPR, ενώ και τα γονιδιώματα διάφορων αρχαίων περιέχουν πολλαπλούς CRISPR τόπους. Η μεταγραφή των CRISPR γενετικών τόπων οδηγούν στην παραγωγή τριών διαφορετικών ειδών RNA. Μόνο το πρώτο κωδικοποιεί για κάποιες πρωτεΐνες, ενώ τα άλλα είναι μη κωδικοποιητικά. Το πρώτο είναι τα mRNAs τα οποία θα μεταφραστούν από τους μηχανισμούς του κυττάρου και θα παραχθούν οι cas πρωτεΐνες. Το δεύτερο είναι τα pre-CRISPR RNAs, τα οποία στη συνέχεια θα ωριμάσουν σε crRNAs που περιέχουν την αλληλουχία του protospacer και με βάση αυτό θα καθοδηγηθεί η cas πρωτεΐνη στον στόχο της. Το τελευταίο συμβάλλει στην δημιουργία του συμπλόκου Cas-crRNA και ορίζεται ως tracrRNA (trans-activating crRNA) (Εικ. 10) (Carroll, 2014).



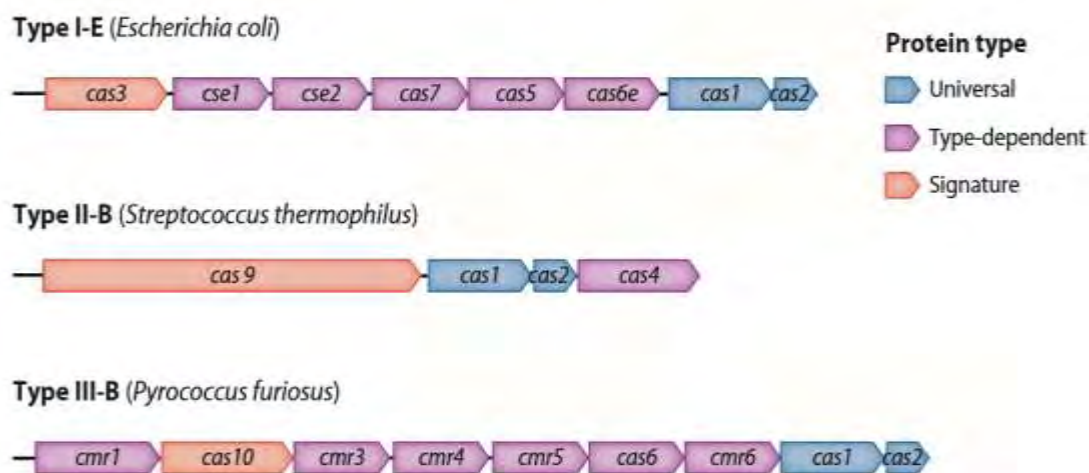
Εικόνα 10: Η δομή της περιοχής CRISPR στο γονιδίωμα του *Streptococcus pyogenes* (Doudna, 2014)

1.5.4 Τύποι του CRISPR-Cas

Υπάρχουν 3 τύποι CRISPR-Cas: τα I & III έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό ότι τα pre-crRNAs επεξεργάζονται από cas ενδονουκλεάσες, ενώ στο σύστημα II αυτή η επεξεργασία περιλαμβάνει tracrRNAs (συμπληρωματικά με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του CRISPR γενετικού τόπου) που επάγουν μια ειδική RNase III (ειδική για δίκλωνο RNA) σε παρουσία της Cas9 (Jinek, 2012).

Σημαντικό στοιχείο του CRISPR-Cas τύπου I συστήματος αποτελεί το cas3 γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μια μεγάλη Cas3 πρωτεΐνη με δράση ελικάσης με ικανότητα να ξετυλίγει δίκλωνο DNA και υβρίδια DNA-RNA. Συχνά, η επικράτεια ελικάσης συζευγνύεται με την επικράτεια HD ενδονουκλεασών που συμμετέχουν στην πέψη DNA-στόχου. Η HD επικράτεια συνήθως εντοπίζεται στο αμινο-τελικό άκρο των Cas3 πρωτεϊνών με ελάχιστες εξαιρέσεις. Το τύπου I CRISPR-Cas σύστημα χωρίζεται σε 7

(Εικ. 12). Και οι δυο υπότυποι έχουν δειχθεί ότι στοχεύουν DNA αλλά και RNA (Kira S. Makarova, 2015).

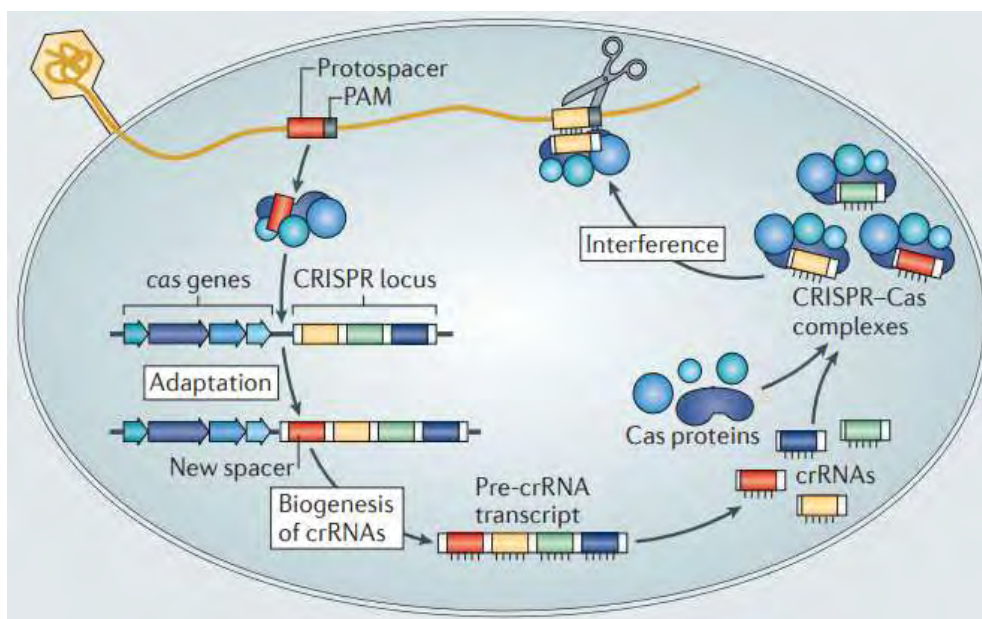


Εικόνα 12: Τα *cas* γονίδια στους διάφορους τύπους CRISPR-Cas (Julie E. Samson, 2014)

1.5.5 Ο μηχανισμός λειτουργίας του CRISPR-Cas

Η λειτουργία του CRISPR-Cas συστήματος χαρακτηρίζεται από 3 διακριτά στάδια: προσαρμογή, έκφραση και παρεμβολή. Το στάδιο της προσαρμογής λαμβάνει χώρα έπειτα από πρώτη μόλυνση του μικροοργανισμού από ένα ξένο προς αυτό DNA και περιλαμβάνει αρχικά την επιλογή τμημάτων DNA με βάση το PAM, στα συστήματα τύπου I και II, την ενσωμάτωση του στο CRISPR locus με τη δράση των Cas1 και Cas2 και την δημιουργία ενός νέου protospacer ανοδικά των προηγούμενων spacer, το οποίο παρεμβάλλεται από δυο επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Amitai, 2016). Το στάδιο της έκφρασης γίνεται κατά την δεύτερη εισβολή ενός ξένου DNA, όπου ενεργοποιείται η μεταγραφή του CRISPR γενετικού τόπου, από το οποίο θα προκύψουν οι Cas πρωτεΐνες καθώς και ένα μη κωδικοποιητικό RNA με πολλές δομές φουρκέτας. Στο τύπου III σύστημα, αυτό το μόριο (pre-crRNA) στη συνέχεια, θα υποστεί επεξεργασία από υπομονάδες της Cas6 οδηγώντας τελικά στην παραγωγή πολλών μικρών crRNA με ένα τυπικό επαναλαμβανόμενο τμήμα 8 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο και το υπόλοιπο του επαναλαμβανόμενου τμήματος σχηματίζει μια δομή φουρκέτας στο 3' άκρο του crRNA, τα οποία αναγνωρίζουν λόγω συμπληρωματικότητας διαφορετικά παθογόνα ή διαφορετική περιοχή DNA του ίδιου παθογόνου. Το τύπου II σύστημα χρησιμοποιεί ένα trans-activating small RNA (tracrRNA) που ζευγαρώνει με το επαναλαμβανόμενο τμήμα του pre-crRNA, που στη συνέχεια κόβεται στην περιοχή των επαναλήψεων από την RNase III. Κατά το στάδιο της παρεμβολής, το εισβαλλόμενο DNA υπόκειται σε πέψη. Στον τύπο I CRISPR, το crRNA οδηγεί το σύμπλοκο στους στόχους που περιέχουν το συμπληρωματικό DNA και πιθανότατα η Cas3 είναι υπεύθυνη για την πέψη του. Το PAM πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του στόχου σε αυτόν τον τύπο. Στους τύπους II,III δεν συμμετέχει το ορθόλογο της Cas3. Στου τύπου II, το σύμπλοκο της Cas9 με το crRNA και το tracrRNA στοχεύει άμεσα το DNA

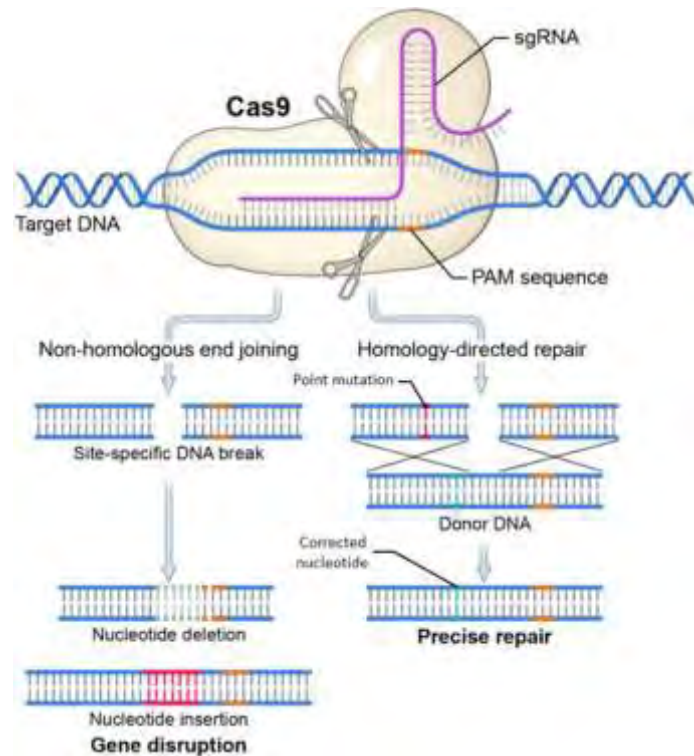
στόχο και διασπά τον φωφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του 17^{ου} και 18^{ου} νουκλεοτιδίου του protospacer, δηλαδή 3 νουκλεοτίδια ανοδικά του PAM(**Εικ.13**) (Kira S. Makarova, 2015) (Marraffini, 2015).



Εικόνα 13: Τα στάδια του CRISPR-Cas συστήματος στα βακτήρια (Julie E. Samson, 2014)

1.5.6 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων

Η δράση της Cas9 ενδονουκλεάσης μετά την καθοδήγηση της από το crRNA-tracrRNA αφορά τη πρόκληση δίκλωνης ρήξης στο DNA. Το κύτταρο διαθέτει ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης για αυτές τις δίκλωνες ρήξεις. Ο πρώτος και ο πιο συνηθισμένος ονομάζεται Non-Homologous End Joining (NHEJ) κατά τον οποίο τα άκρα ξαναενώνονται με το τμήμα της δημιουργίας ελλειμμάτων ή ενθέσεων (indels). Το αποτέλεσμα αυτού του πρόχειρου επιδιορθωτικού μηχανισμού είναι η ταχεία επούλωση των καταστροφικών ρήξεων με κόστος την συσσώρευση μεταλλάξεων με δυνητικά επιβλαβείς αλλαγές στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο γονιδίων που δύνανται να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση τους (Jiang, 2017). Το δεύτερο, και πιο σπάνιο μονοπάτι ακριβούς επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων είναι το Homology-directed repair (HDR), που αφορά ένα πιο ασφαλή τρόπο για επιδιόρθωση των δίκλωνων αλυσίδων χωρίς παράλληλη μεταλλαξιγένεση (**Εικ. 14**). Για την λειτουργία του απαιτείται μια ομόλογη αλληλουχία που λειτουργεί ως υπόστρωμα το οποίο με ομόλογο ανασυνδυασμό υβριδίζει στις αλληλουχίες εκατέρωθεν της ρήξης. Η αλληλουχία δότη έχει δυο πιθανές μορφές: δίκλωνο DNA που στις άκρες του έχει ομόλογες πλευρικές αλληλουχίες με την περιοχή του DNA στην οποία έγινε η ρήξη ή μονόκλωνο DNA ολιγονουκλεοτίδια (ssODNs). Το μονοπάτι αυτό είναι ενεργό μόνο στα διαιρούμενα κύτταρα και η επιτυχία του εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, την κατάσταση του κυττάρου, τη μορφή του DNA δότη και την γονιδιωματική περιοχή στην οποία θα συμβεί η τροποποίηση (Guitart, 2016).

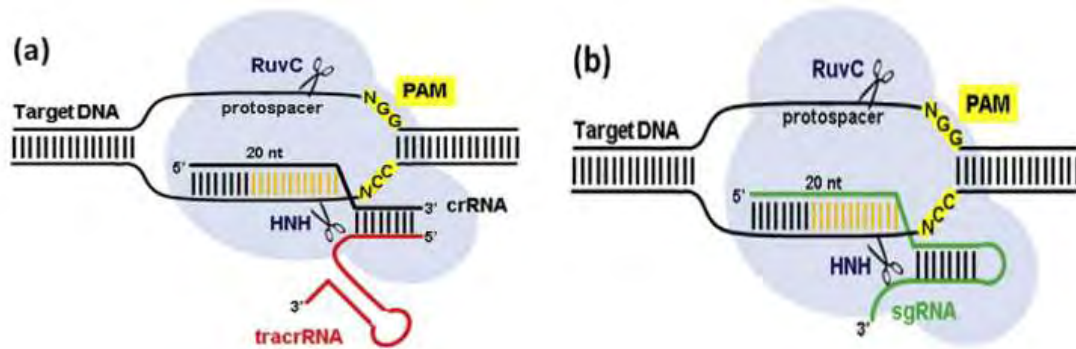


Εικόνα 14: Μηχανισμοί επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων μετά από δράση της Cas9 (Guitart, 2016)

1.6 Τροποποιήσεις του αρχικού συστήματος CRISPR-Cas9

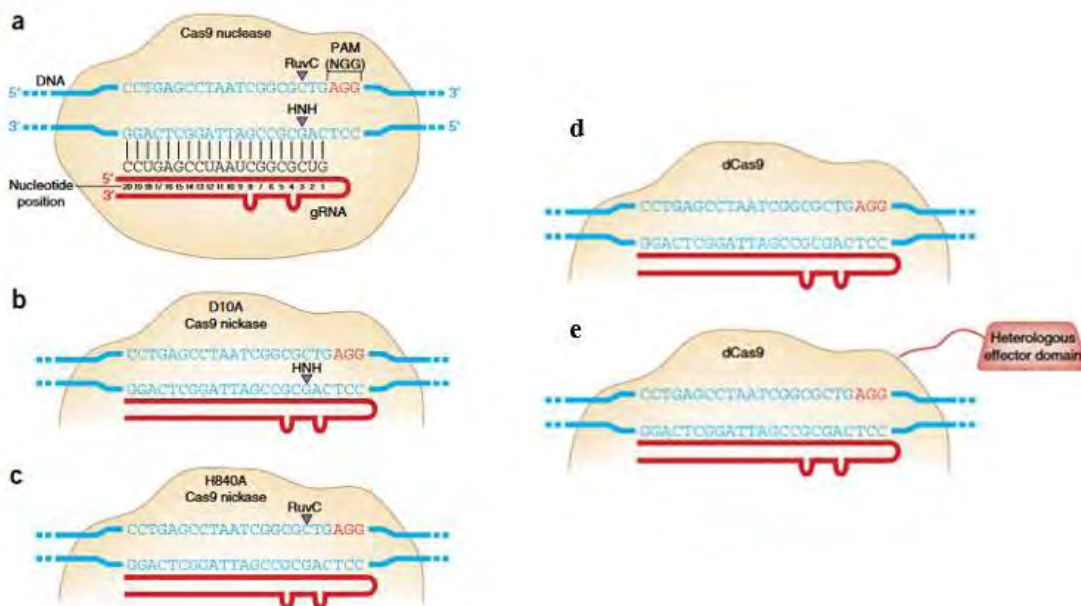
Αυτό το ενδογενές σύστημα έχει τροποποιηθεί με σκοπό την αξιοποίηση του για την γενετική τροποποίηση γονιδιωμάτων κατά βούληση. Το σημείο που αλλάζει στη δομή του συμπλόκου Cas9-tracrRNA-crRNA είναι ότι οι δύο αλληλουχίες RNA έχουν γίνει στόχος γενετικής μηχανικής με αποτέλεσμα την ενοποίηση τους σε ένα μοναδιαίο μόριο RNA που ονομάζεται sgRNA (single guide RNA). Το sgRNA έχει μήκος 80nt, από τα οποία τα 20nt αντιστοιχούν στο protospacer (**Εικ. 15**) (Guitart, 2016; Maeder, 2013).

Ένα μεγάλο πρόβλημα κατά την εφαρμογή του CRISPR-Cas9 συστήματος είναι η δράση της Cas9 σε αλληλουχίες που διαφέρουν από την αλληλουχία-στόχο κατά λίγα μόνο νουκλεοτίδια προκαλώντας μεταλλάξεις και σε άλλες μη ειδικές θέσεις στο γονιδίωμα. Έτσι, γίνεται καθοριστική η τροποποίηση του υπάρχοντος συστήματος για την αύξηση της εξειδίκευσης της δραστηριότητας της Cas9. Η άγριου τύπου Cas9 αποτελείται από δύο επικράτειες νικάσης που συνδυαστικά της προσδίδουν την δραστηριότητα ενδονουκλεάσης, την επικράτεια RuvC και την επικράτεια HNH. Η πρώτη προκαλεί πέψη στη μη συμπληρωματική αλυσίδα του sgRNA, ενώ η HNH στην συμπληρωματική (μη κωδική) αλυσίδα (Carroll, 2014). Αυτό το χαρακτηριστικό δίνει τη δυνατότητα πρόκλησης στοχευμένων μεταλλάξεων σε μία από τις δύο επικράτειες με σκοπό την μετατροπή της Cas9 από νουκλεάση σε νικάση που θα κόβει μόνο έναν από τους δυο κλώνους του DNA στόχου. Πιο συγκεκριμένα, η μετάλλαξη D10A στην RuvC επικράτεια είναι μια απώλεια λειτουργίας μετάλλαξη που δίνει τη δυνατότητα πέψης μόνο του ενός κλώνου από την HNH. Αντίστοιχα, η HNH επικράτεια χάνει τη δραστηριότητα της μέσω της μετάλλαξης H840A, όπου η Cas9 κόβει μόνο την κωδική αλυσίδα μέσω της ενεργής RuvC επικράτειας.



Εικόνα 15: CRISPR-Cas9 σύστημα στο α) ενδογενές σύστημα των μικροοργανισμών και β) μετά από τροποποίηση του συμπλόκου crRNA-tracrRNA (Bortesi, 2015)

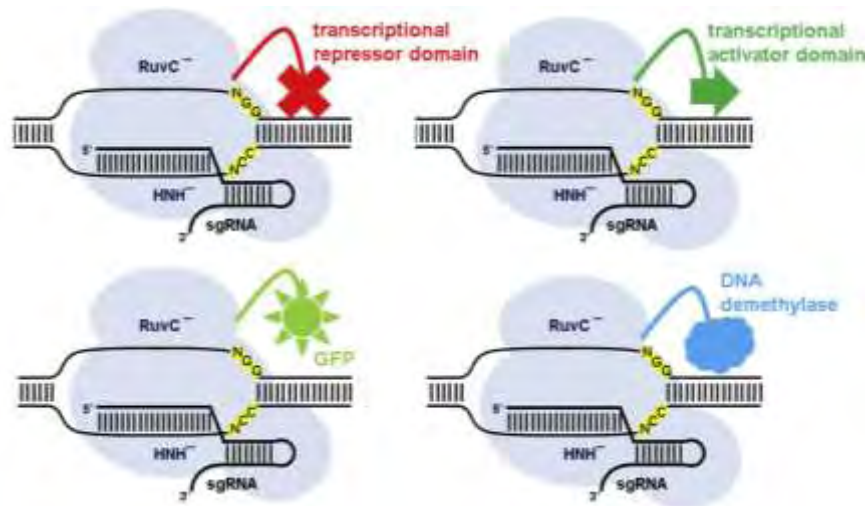
Η χρήση δυο νικασών που η κάθε μια θα καθοδηγείται από ένα sgRNA και θα προκαλεί πέψη σε έναν από τους δυο κλώνους DNA έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την εξειδίκευση του στόχου και μειώνει δραστικά τους μη ειδικούς στόχους. Η ταυτόχρονη επαγωγή των 2 μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα μια μορφή της Cas9 χωρίς δραστικότητα ενδονουκλεάσης ούτε νικάσης, που διατηρεί την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με sgRNAs και άρα με DNA στόχους και ονομάζεται dCas9 η οποία χρησιμοποιείται σε άλλες εφαρμογές γενετικής τροποποίησης (**Εικ. 16**) (Sander, 2014; Doudna, 2014).



Εικόνα 16: Απεικονίζεται (a) η Cas9 νουκλεάση με τις δυο επικράτειες RuvC, HNH που προκαλούν πέψη στις αντίστοιχες αλυσίδες του DNA-στόχου 3 νουκλεοτίδια ανοδικά της αλληλουχίας PAM (5'NGG), (b) η μεταλλαγμένη Cas9 λόγω της μετάλλαξης D10H με δραστική την επικράτεια HNH, (c) η μεταλλαγμένη Cas9 λόγω της μετάλλαξης H840A με λειτουργική την επικράτεια RuvC, (d) η deadCas9 που χαρακτηρίζεται από τις μεταλλάξεις D10H, H840A που τις αφαιρούν την ικανότητα πέψης, (e) η deadCas9 συζευγμένη με μια ετερόλογη επικράτεια (Sander, 2014).

1.6.1 Εφαρμογές του CRISPR-dCas9 συστήματος

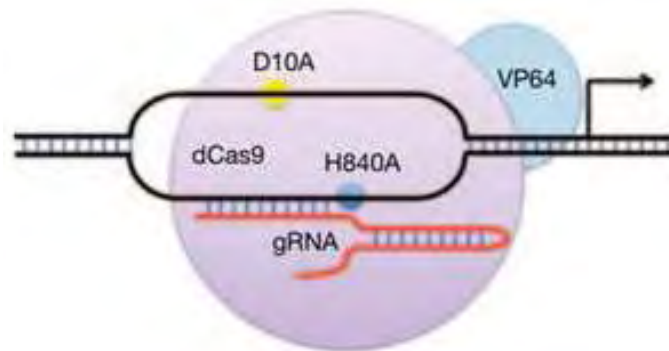
Συνθετικοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν τροποποιηθεί για να επιτευχθεί ο έλεγχος της έκφρασης γονιδίων σε θηλαστικά για ιατρικές και ερευνητικές εφαρμογές. Αυτές οι εφαρμογές περιλαμβάνουν την διέγερση αναγέννησης ιστών, ενεργοποίηση ογκοκαταστολέων, έλεγχο της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων κ.α. (Maeder, 2013). Η σύζευξη της dCas9 με ετερόλογους μεταγραφικούς ενεργοποιητές ή καταστολείς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης με στόχευση των ρυθμιστικών στοιχείων επιλεγμένων γονιδίων. Αυτά έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών CRISPR-Cas9 μέσω των οποίων μπορεί να γίνει ενεργοποίηση (CRISPR activation) ή καταστολή της μεταγραφής ενός γονιδίου (CRISPR inhibition), ή ακόμα και επισήμανση με φθορισμό ενός τμήματος DNA σε ένα γονιδίωμα χωρίς την δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Biotaging) (Εικ. 17) (Bortesi, 2015).



Εικόνα 17: Εφαρμογές του CRISPR-Cas9 με σύζευξη της dCas9 με μεταγραφικούς καταστολείς (CRISPRi), με μεταγραφικούς ενεργοποιητές (CRISPRa), με φθορίζουσες χρωστικές (Biotaging) ή με ένζυμα, όπως απομεθυλάσες για τροποποίηση του DNA (Bortesi, 2015).

1.6.2 CRISPR activation

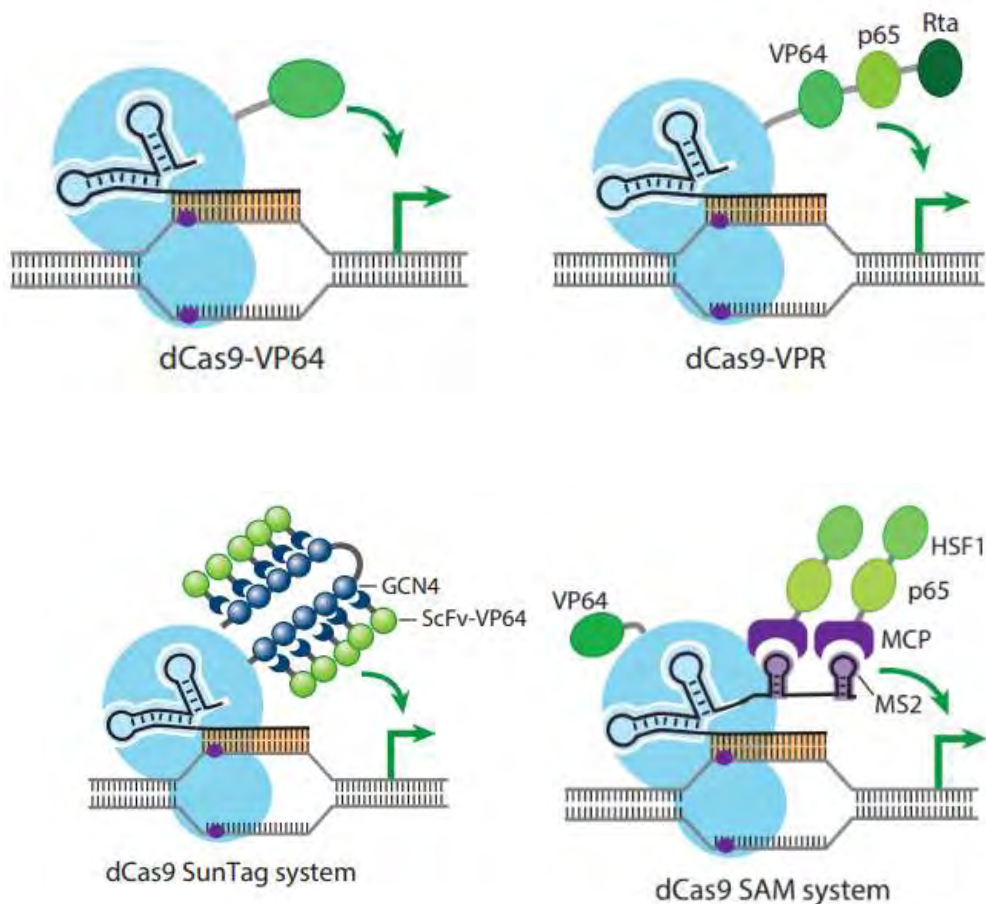
Η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων στόχων περιλαμβάνει την σύζευξη της RNA-καθοδηγούμενης dCas9 με μεταγραφικούς επαγωγείς στο καρβοξυ-τελικό άκρο της. Αρχικά, αξιοποιήθηκε η ιική πρωτεΐνη VP16 που αποτελείται από 16 αμινοξικά κατάλοιπα και χρησιμοποιείται για την επαγωγή της μεταγραφής. Με μεθοδολογίες ανασυνδυασμένου DNA επιτυγχάνεται η παραγωγή συνθετικού μεταγραφικού παράγοντα VP64 (4 αντίγραφα της VP16) συζευγμένη στο καρβοξυ-τελικό άκρο της dCas9 (Εικ. 18).



Εικόνα 18: Απεικόνιση του RNA-κατευθυνόμενου μεταγραφικού ενεργοποιητή, που δημιουργείται από την ένωση της dCas9 με τον παράγοντα VP64 (Perez-Pinera, 2013).

Η αποτελεσματικότητα αυτού του συστήματος ελέγχθηκε σε αρκετές ερευνητικές εργασίες και αποδείχθηκε η επιτυχή επαγωγή της έκφρασης γονιδίων συνδυαστικά με χρήση πολλαπλών διαφορετικών sgRNAs που στόχευαν διαφορετική περιοχή του ίδιου γονιδίου (Maeder, 2013; Perez-Pinera, 2013). Ακολούθως αναπτύχθηκαν συστήματα δεύτερης γενιάς CRISPR επαγωγέων με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα dCas-VPR, dCas SunTag system, dCas SAM system τα οποία βασίζονται στην αρχική ιδέα της σύζευξης της dCas9 με ενεργοποιητές και συγκεκριμένα προτείνουν διαφορετικές εναλλακτικές για την ενίσχυση της επαγωγής με κοινό παρονομαστή τον παράγοντα VP64. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του dCas9-VPR χρησιμοποιείται το αρχικό dCas9-VP64 σύστημα όπου γίνεται προσθήκη των μεταγραφικών παραγόντων p65, Rta οι οποίοι φυσιολογικά εντοπίζονται στον άνθρωπο και τον ιό Epstein-Barr αντίστοιχα (Wang, 2013). Παράλληλα, προκειμένου να αυξηθεί η μεταγραφική ενεργοποίηση αναπτύχθηκε και το dCas9 SunTag σύστημα το οποίο στηρίζεται στην ισχυρή πρόσδεση ενός πεπτιδίου σε μια πρωτεΐνη. Στο καρβόξυ-τελικό άκρο της dCas9 προσδένονται μικρά επαναλαμβανόμενα πεπτίδια του μεταγραφικού παράγοντα GCN4 ο οποίος παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην βιοσύνθεση των πουρινών. Αυτά τα πεπτίδια συνδέονται μεταξύ τους με ειδικούς συνδέσμους 5 αμινοξέων και αλληλεπιδρούν με παράγοντες ScFv-VP64 που αποτελούνται από το Single-chain variable-fragment συζευγμένο με τον παράγοντα VP64. Το ScFv είναι ένα αντίσωμα σχεδιασμένο έναντι των GCN4 πεπτιδίων, προκύπτει από ποικίλες ελαφριές και βαριές επικράτειες της ανοσοσφαιρίνης και χρησιμοποιείται για την έμμεση προσέλκυση πολλών παραγόντων VP64 που θα προκαλέσουν αύξηση στη μεταγραφική ενεργότητα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το ίδιο σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την στόχευση περιοχών με στόχο επιγενετικές τροποποιήσεις που να αποσκοπούν στην επαγωγή ή την καταστολή της μεταγραφής. Σε αυτή την περίπτωση ο VP64 παράγοντας μπορεί να αντικατασταθεί με τον παράγοντα teneleven (TET) 1 hydroxylase που επάγει απομεθυλιώσεις σε επιθυμητές περιοχές του DNA προάγοντας την μεταγραφή. Αντίστοιχα για την καταστολή της μεταγραφής επιχειρούνται μεθυλιώσεις σε περιοχές με την δράση της de novo DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) στην θέση του VP64 (Morita, 2016; Huang, 2017). Ένα τελευταίο σύστημα βασισμένο στο dCas9-VP64 είναι το dCas9 SAM σύστημα, το οποίο αξιοποιήθηκε

στην παρούσα εργασία και που χαρακτηρίζεται από μια dCas9 συζευγμένη με τον VP64 παράγοντα και με ένα τροποποιημένο sgRNA. Πιο συγκεκριμένα, στο 3' άκρο του sgRNA έχουν τοποθετηθεί απταμερή που αποτελούν μονόκλινα DNA ή RNA, σχηματίζουν διάφορες δομές φουρκέτας και έχουν την δυνατότητα πρόσδεσης σε πρωτεϊνικούς στόχους με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία. Τέτοια απταμερή αξιοποιούνται σε αυτή την περίπτωση για να αλληλεπιδράσουν με διμερή MS2 που ανήκουν στην κατηγορία των bacteriophage coat proteins. Η σύζευξη της MS2 με μεταγραφικούς ενεργοποιητές όπως τον p65 και τον Heat Shock Factor protein 1 (HSF1) οδηγεί στην ενίσχυση της μεταγραφής συγκεκριμένων DNA-στόχων(Εικ. 19) (Zhang, 2015).

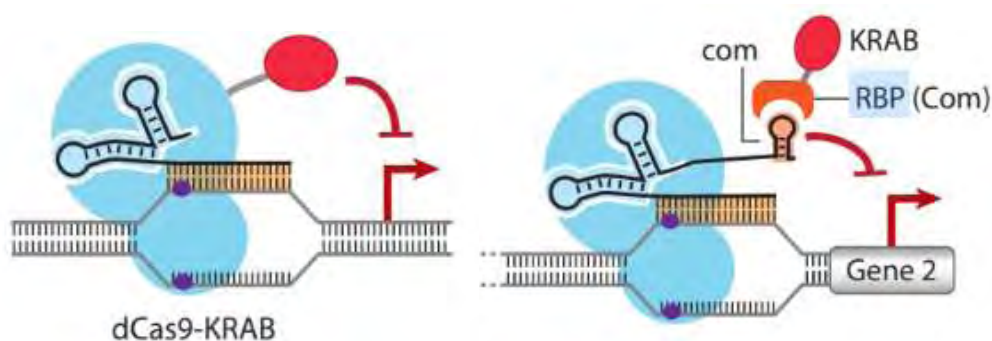


Εικόνα 19: Οι διάφορες παραλλαγές του CRISPR activation (Wang, 2013).

1.6.3 CRISPR inhibition

Η μεταγραφική καταστολή επιτυγχάνεται είτε μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων που προκαλούνται από ένζυμα π.χ. μεθυλάσες, που μπορεί να είναι άμεσα συζευγμένες με την dCas9 είτε μέσω προσέλκυσης μεταγραφικών καταστολέων στα ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου-στόχου. Στην οικογένεια των σπονδυλωτών τετραπόδων η μεγαλύτερη ομάδα των μεταγραφικών καταστολέων αποτελείται από zinc finger

proteins που περιέχουν στο αμινο-τελικό τους άκρο την επικράτεια Krüppel-associated box (KRAB domain) (Lupo, 2013). Η επικράτεια KRAB ενσωματώνεται στις εφαρμογές της dCas9 είτε με την απ' ευθείας σύζευξή τους στο καρβοξυ-τελικό άκρο της dCas9 είτε και με μια παρόμοια μέθοδο με το dCas9 SAM σύστημα, όπου τροποποιείται το sgRNA με την προσθήκη ενός RNA απταμερούς στο οποίο προσδένονται ειδικές πρωτεΐνες που προσδένονται σε RNA προσελκύνοντας παράγοντες KRAB (Εικ. 20) (Wang, 2013). Η επικράτεια KRAB προσελκύει στην επιθυμητή περιοχή του DNA ρυθμιστές της μεταγραφής που τροποποιούν την δομή της χρωματίνης. Τέτοιοι ρυθμιστές είναι διάφορες μεθυλοτρανσφεράσες (Protein arginine methyltransferases ,PRMTs) και αποακετυλάσες (HDACs) των ιστονών που οδηγούν σε συμπύκνωση της χρωματίνης και μειωμένη μεταγραφή της περιοχής (Ecco, 2017).



Εικόνα 20: Παραλλαγές του CRISPR inhibition (Wang, 2013).

1.7 Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος στον καρκίνο του στομάχου

Η γενετική πολυπλοκότητα του καρκίνου του στομάχου οδήγησε στην μοριακή κατηγοριοποίηση του μέχρι στιγμής με δυο συστήματα.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη από **The Cancer Genome Atlas (TCGA)** χρησιμοποιώντας δείγματα από 300 όγκους οι οποίοι αναλύθηκαν με αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος και του mRNA, ανάλυση της παραλλακτικότητας των αντιγράφων διάφορων αλληλουχιών και ανάλυση προτύπου μεθυλίωσης του DNA. Αποτέλεσμα αυτών των διαδικασιών ήταν η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε τέσσερις κατηγορίες: Θετικοί σε μόλυνση από τον ιό *Epstein Barr*, όγκοι που χαρακτηρίζονται από αστάθεια μικροδορυφόρων (microsatellite unstable MSI), από γενωμική σταθερότητα (genomically stable, GS) ή χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability, CIN) (Zhang, 2014).

Οι όγκοι που διακρίνονται από χρωμοσωμική αστάθεια παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης με ποσοστό 50% στο σύνολο των περιπτώσεων αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου, ενώ φαινοτυπικά ανήκουν στην κατηγορία του εντερικού τύπου και αναπτύσσονται κυρίως στην περιοχή του θόλου. Τα κύτταρα που αποτελούν τον όγκο χαρακτηρίζονται από ανευπλοειδία, ενώ γονίδια διάφορων ομάδων εμφανίζουν προσθήκες στο γονιδίωμα. Χαρακτηριστική ομάδα γονιδίων που ενισχύεται στον καρκίνο του στομάχου είναι οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases RTKs) πολλά μέλη των οποίων αποτελούν υποδοχείς σημαντικών αυξητικών παραγόντων όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor, FGF). Ακόμα, γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες KRAS

αποτελούν σημαντικά ογκογονίδια που συμμετέχουν σε μια πληθώρα μονοπατιών συμπεριλαμβανομένου και μονοπατιών που ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες και η ενίσχυση των αντιγράφων τους σε καρκινικά κύτταρα συνοδεύεται από δυσμενή πρόγνωση για τον ασθενή. Μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι GATA4, GATA6, KLF5, OCT1, MYC αποτελούν βασικά μόρια που υπερεκφράζονται και συμμετέχουν στην προώθηση του καρκίνου του στομάχου. Μια τελευταία κατηγορία γονιδίων που ενισχύονται σε αδenoκαρκινώματα του στομάχου είναι αυτή των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου με κύρια μέλη CCNE1 και CCND1 που κωδικοποιούν την κυκλίνη E1 και D1 που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης. Εκτός από ενισχύσεις γονιδίων, συχνό φαινόμενο αποτελούν και μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 που οδηγούν σε μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη και σε βλάβες που παρεμποδίζουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Bass, 2014).

Η δεύτερη πιο συχνή κατηγορία όγκων είναι οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI) και έχουν συσχετιστεί με καρκίνους εντερικού τύπου που εντοπίζονται στο άντρο του στομάχου. Όσον αφορά γενετικές ανωμαλίες που εμφανίζονται στο γονιδίωμα αυτών των κυττάρων αφορούν κυρίως μεταλλάξεις σε γονίδια ARID1A, PIK3CA, PTEN, ERBB2, ERBB3, KRAS, RNF43 και TP53 ενισχύοντας την δράση ογκογονιδίων όπως το PIK3CA που αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα της PI3K και συμμετέχει σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την κυτταρική κίνηση και την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση ή καταστέλλοντας ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το PTEN. Επίσης, τα αδenoκαρκινώματα του στομάχου αυτού του υπότυπου διακρίνονται από μεταλλάξεις στον γενετικό τόπο του TP53, ενώ παρατηρείται υπερμεθυλίωση, άρα και σίγηση στον γενετικό τόπο MLH1 που συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA.

Ο επόμενος υπότυπος αφορά αδenoκαρκινώματα που διακρίνονται από γενωμική σταθερότητα και μορφολογικά συνδέονται με τον διάχυτο υπότυπο στην περιοχή του άντρου. Μοριακά εμφανίζουν μεταλλάξεις στα γονίδια CDH1, RHOA που ελέγχουν την προσκόλληση και την κινητικότητα των κυττάρων αντίστοιχα. Ένας ακόμα παράγοντας που προκαλεί βλάβες στην προσκόλληση μεταξύ κυττάρων είναι η σύζευξη των γενετικών τόπων CLDN18-ARHGAP6, ενώ σε πρωτεϊνικό επίπεδο παράγεται ένα υβριδικό μόριο που αποτελείται από 4 διαμεμβρανικές περιοχές του CLDN18 και από την δραστηριότητα RhoGAP του ARHGAP6. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 είναι πιο σπάνιες συγκριτικά με τους δυο προηγούμενους υποτύπους. Ακόμα, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν την συνεκτικότητα των κυττάρων και την αγγειογένεση είναι ενισχυμένα σε αυτόν τον υπότυπο.

Ο πιο σπάνιος υπότυπος αδenoκαρκινωμάτων του στομάχου είναι οι θετικοί από την μόλυνση με *Epstein Barr virus* οι οποίοι συμπίπτουν με όγκους εντερικού υποτύπου στον θόλο του στομάχου. Το γονιδίωμα των κυττάρων που ανήκουν σε αυτόν τον υπότυπο περιλαμβάνει μεθυλίωση του γονιδίου CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A), μεταλλάξεις στα γονίδια PIK3CA και ARID1A, ενίσχυση των γονιδίων PD-L1/2, JAK2 (Janus kinase 2) και ERBB2(erb-b2 receptor tyrosine kinase 2) (Figueiredo, 2017).

Λίγο αργότερα, η **Asian Cancer Research Group (ACRG)** επιχείρησε να κατηγοριοποιήσει τον καρκίνο του στομάχου πραγματοποιώντας αναλύσεις, όπως ταυτοποίηση του προφίλ έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, μικροσυστοιχίες του

αριθμού αντιγράφων σε γενωμική κλίμακα και στοχευμένη αλληλούχηση γονιδίων σε 300 δείγματα καρκίνου του στομάχου. Τελικά αυτά τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε τέσσερις διακριτές κατηγορίες: υπότυπος στεθερότητας μικροδορυφόρων (microsatellite stable MSS)/ επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial-mesenchymal transition EMT), υπότυπος αστάθειας μικροδορυφόρων (microsatellite instable MSI), υπότυπος MSS/tumor protein 53 (TP53)⁺ (MSS/TP53⁺), υπότυπος MSS/TP53⁻ (Fonkoua, 2018).

Ο πιο συχνός υπότυπος είναι ο MSS/TP53⁻, ο οποίος χαρακτηρίζεται από ανενεργό παράγοντα p53, δηλαδή κατεσταλμένο μονοπάτι της απόπτωσης. Ακόμα βασικό στοιχείο αυτού του φαινοτύπου είναι οι ενισχύσεις στα γονίδια ERBB2, CCNE1 και CCND1 και η πρόγνωση ενδιάμεσου βαθμού.

Τα κύτταρα που αντιστοιχούν στον υπότυπο MSS/TP53⁺ έχουν ενεργό το μονοπάτι της απόπτωσης που ενεργοποιείται από τον παράγοντα p53, ωστόσο υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων εντοπίζεται στην περιοχή του TP53. Αυτοί οι φαινότυποι έχουν συνδεθεί με την μόλυνση από EBV, καθώς και πιο εύκολη πρόγνωση σε σχέση με τον υπότυπο MSS/TP53⁻.

Ο υπότυπος MSI, όπως αναφέρθηκε και από τη TCGA, έχει συσχετιστεί με τους εντερικούς υποτύπου στο άντρο με πληθώρα μεταλλάξεων σε πολλά γονίδια με ταυτόχρονη έλλειψη του MLH1. Συγκριτικά με του υπόλοιπους υποτύπους, ο MSI παρουσιάζει την καλύτερη πρόγνωση.

Τέλος, ο πιο σπάνιος υπότυπος MSS/EMT περιλαμβάνει όγκους του διάχυτου υπότυπου που εμφανίζονται σε άτομα μικρής ηλικίας. Βασικό χαρακτηριστικό είναι η έλλειψη έκφρασης του CDH1, που κωδικοποιεί την E-καδερίνη σημαντική στην κυτταρική προσκόλληση και κινητικότητα. Η πρόγνωση των MSS/EMT φαινοτύπων είναι η πιο δυσμενής για τον ασθενή σε αντίθεση με τους προηγούμενους φαινοτύπους (Chen, 2016).

1.7.1 Προϊόντα γονιδίων που συμμετέχουν στην εκδήλωση του καρκίνου του στομάχου

Οι πρώτες μελέτες για την αιτιολογία της εμφάνισης του καρκίνου εστίαζαν στις μεταλλάξεις που αφορούν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου και μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία τροποποιημένων πρωτεϊνών και απορρύθμιση των βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν. Μια σημαντική διεργασία του κυττάρου που παρατηρείται σε καταστάσεις μετάστασης του καρκίνου είναι η epithelial-mesenchymal transition (EMT) κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων μέσω βιοχημικών αλλαγών. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης γονιδίων που είναι χαρακτηριστικά για την επιθηλιακή ταυτότητα και εκφράζουν τα αντίστοιχα γονίδια που χαρακτηρίζουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα (Kalluri, 2009). Επίσης, διακρίνονται από υψηλή μεταναστευτική ικανότητα, χάνουν την ικανότητα προσκόλλησης στη βασική επιθηλιακή μεμβράνη και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος από όπου θα καταλήξουν σε έναν άλλο ιστό-όργανο. Ωστόσο, το EMT αποτελεί ένα φυσιολογικό μονοπάτι που λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη των οργάνων και κατά την αναγέννηση των ιστών (Lamouille, 2014). Το EMT ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και από σηματοδοτικά

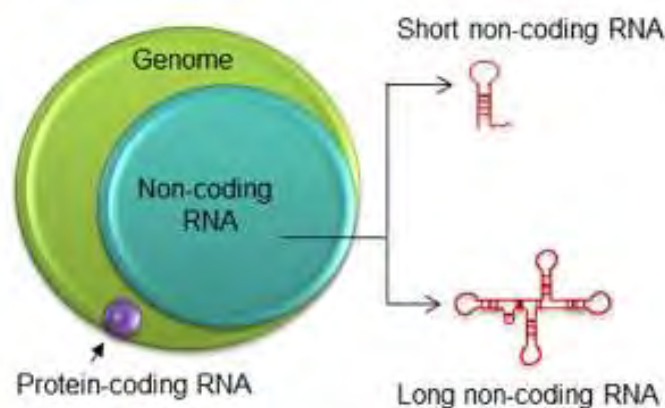
μονοπάτια όπως το TGF-β/SMAD. Ο αυξητικός παράγοντας TGF-β (Transforming growth factor beta) συμμετέχει σε πολλές διεργασίες του κυττάρου μέσω πρόσδεσης σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινασών Ser/Thr και μέσω της δράσης των Smad πρωτεϊνών. Οι τελευταίες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες και δρουν μεταφέροντας το σήμα της πρόσδεσης του TGF-β από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου θα ρυθμίσουν την έκφραση διάφορων γονιδίων (Veronica Lifshitz, Dan Frenkel, in Handbook of Biologically Active Peptides Second Edition, 2013). Σε καταστάσεις μετάστασης του καρκίνου του στομάχου έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα SHAL4. Ο ρόλος του στην προώθηση της μετάστασης έγκειται στην πρόσδεση του στην περιοχή του υποκινητή του TGF-β1 και στην επαγωγή της μεταγραφής του. Έτσι, ενεργοποιείται το μονοπάτι EMT που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την κινητικότητα των κυττάρων και την μεταστατικότητα του όγκου (Zhang, 2018). Εκτός από μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες και με άλλες λειτουργίες έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του μονοπατιού TGF-β/Smad. Το ανθρώπινο γονίδιο S100A4 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της ομάδας S100 που έχουν την δυνατότητα πρόσδεσης ασβεστίου, την S100A4 γνωστή ως καλβασκουλίνη. Τα υψηλά επίπεδα της S100A4 στον μεταστατικό καρκίνο του στομάχου οδηγούν σε αλλαγή των επιπέδων φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προαγωγή του EMT μέσω του μονοπατιού TGF-β/Smad (Li, 2018). Μια ακόμα βασική ομάδα μορίων που παίζουν ρόλο στην ακεραιότητα του ανθρώπινου οργανισμού είναι η ομάδα των ιντερλευκινών. Συγκεκριμένα οι ιντερλευκίνες ανήκουν στην μεγάλη κατηγορία των κυτοκινών, είναι πρωτεϊνικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία εκκρίνονται κυρίως από λευκά αιμοσφαίρια. Επίσης, προσδέονται σε υποδοχείς των μεμβρανών άλλων κυττάρων και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με ανοσολογικές αποκρίσεις και αντιδράσεις φλεγμονής. Είναι κατανοητό βέβαια ότι η απορρύθμιση τέτοιου είδους μορίων είναι καθοριστική για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Αυξημένα επίπεδα ιντερλευκινών, όπως IL-23 και IL-17, σχετίζονται με φλεγμονή και καρκινογένεση του παχέος εντέρου, ενώ αυξημένη παραγωγή της IL-8 συναντάται σε όγκους στην περιοχή του στομάχου (Langowski, 2006; Wu, 2019).

Η παραγωγή της IL-8 ελέγχεται από την πρωτεΐνη c-Jun που προσδέεται σε περιοχές του υποκινητή του γονιδίου της IL-8 και επιτρέπει την μεταγραφή του. Ο ρυθμιστής που επιτρέπει ή παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του c-Jun με τον υποκινητή του γονιδίου της IL-8, είναι γνωστός ως KDM4B. Η δράση αυτής της πρωτεΐνης ως απομεθυλάση οδηγεί στην αφαίρεση των μεθυλομάδων από κατάλοιπα λυσινών της ιστόνης 3 που σηματοδοτεί την επαγόμενη από το c-Jun μεταγραφή. Η αυξημένη παραγωγή της IL-8 σε καρκινικά δείγματα στομάχου προκαλεί αντιδράσεις φλεγμονής και αγγειογένεση, γεγονότα που συμβάλλουν στην μεταστατικότητα του όγκου.

1.7.2 Ο μεγάλος κόσμος των μη κωδικοποιητικών RNAs

Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της βιολογίας, το DNA περιέχει όλη τη γενετική πληροφορία του κυττάρου και εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων και οι πρωτεΐνες αποτελούν τα εκτελεστικά κυτταρικά μόρια τα οποία προέρχονται από την κωδικοποίηση της πληροφορίας του DNA. Η πληροφορία για την παραγωγή των πρωτεϊνών μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω των κωδικοποιητικών RNA, τα mRNAs (messengerRNAs).

Αρχικά, πιστευόταν ότι οι περιοχές στο γονιδίωμα που κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες αποτελούσαν και το μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού DNA σε κάθε οργανισμό. Ωστόσο, αυτό άρχισε να αλλάζει με την ανακάλυψη της μεγάλης ομάδας των μη κωδικοποιητικών RNA (non-coding RNA) (Eddy, 2001). Τα ncRNAs δεν μεταφράζονται στη συνέχεια σε πρωτεϊνικά μόρια, αλλά συναντώνται ως δομικά, ρυθμιστικά ή καταλυτικά RNAs τα οποία συμμετέχουν σε κύριες λειτουργίες του κυττάρου. Οι πρώτες ομάδες ncRNA που χαρακτηρίστηκαν είναι τα transferRNAs (tRNAs) και τα ribosomalRNAs (rRNAs) που συμβάλλουν ενεργά στην διαδικασία της μετάφρασης. Η μετέπειτα ανακάλυψη νέων ομάδων μη κωδικοποιητικών RNA (snoRNA, miRNA, siRNA) οδήγησε στην διάκριση των μη κωδικοποιητικών RNA σε μικρού και μεγάλου μήκους RNA (short non-coding RNAs-sncRNAs, long non-coding RNAs-lncRNAs). Σήμερα είναι γνωστό ότι τα μη κωδικοποιητικά RNAs περιλαμβάνουν ένα πολύ μεγαλύτερο τμήμα του ανθρώπινου γονιδιώματος συγκριτικά με τα κωδικοποιητικά RNAs (**Εικ. 21**) (Huttenhofer, 2005).



Εικόνα 21: Σχετική ποσοτικοποίηση των μη κωδικοποιητικών και κωδικοποιητικών RNAs στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Διαίρεση των μη κωδικοποιητικών RNAs σε μικρού και μεγάλου μήκους ncRNAs (Parasramka, 2016)

1.7.2.1 Ο βιολογικός ρόλος των μη κωδικοποιητικών RNAs

Ανάλογα με το υποκυτταρικό οργανίδιο στο οποίο συναντώνται τα ncRNAs εξαρτάται και η λειτουργία τους. Έτσι, τα κυτταροπλασματικά ncRNAs εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου, όπως το κυτταρικό στρες, την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και την διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος. Από την άλλη, τα πυρηνικά ncRNAs αλληλεπιδρούν με το DNA είτε αλλάζοντας τη διαμόρφωση της χρωματίνης είτε προσελκύνοντας διάφορους παράγοντες, γεγονός που οδηγούν στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Σημαντικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν είναι η απενεργοποίηση ενός εκ των δυο χρωμοσώματων σε κύτταρα ομόζυγα ως προς το X χρωμόσωμα, στην εγκαθίδρυση του γενωμικού εντυπώματος και στην αλλαγή της δομής της χρωματίνης (Costa, 2005).

Νωρίς στη ζωή ενός κυττάρου θηλυκού ατόμου, μεταγράφεται από το απενεργοποιημένο χρωμόσωμα X ένα μετάγραφο XIST το οποίο αποτελεί ένα μακρύ μη κωδικό RNA. Παράλληλα, από τον ίδιο γενετικό τόπο εκφράζεται ένα δεύτερο αντινοσηματικό ως προς το XIST μη κωδικοποιητικό RNA, το TSIX. Τα δύο αυτά μετάγραφα έχουν αντίθετες λειτουργίες, με το πρώτο να προωθεί την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, ενώ το δεύτερο εμποδίζει την δράση του πρώτου. Παρόλο που

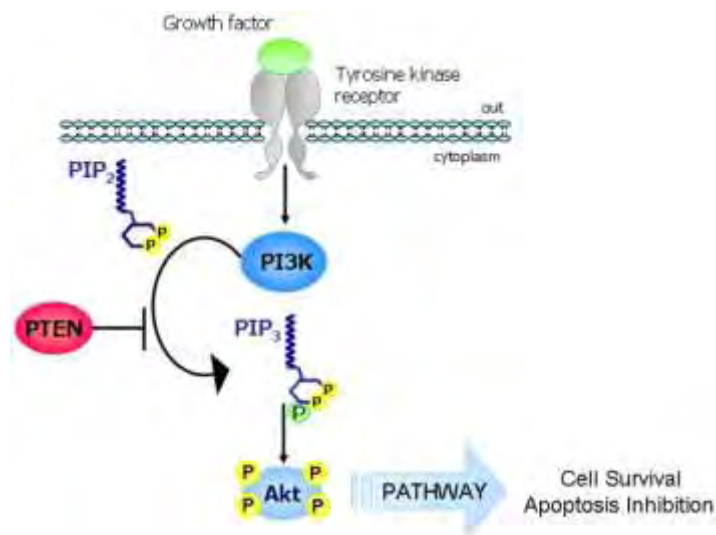
ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αλληλεπιδρούν αυτά τα μετάγραφα δεν είναι γνωστός, έχουν προταθεί κάποιοι πιθανοί μηχανισμοί δράσης. Η μια θεωρία υποστηρίζει ότι τα XIST και TSIX σχηματίζουν δίκλωνες δομές οι οποίες επεξεργάζονται από Dicer-like πρωτεΐνες και συμμετέχουν στο μονοπάτι παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi). Σύμφωνα με την δεύτερη, επικρατεί η μεταγραφή ενός ncRNA από τον γενετικό τόπο του XIST το οποίο στρατολογεί ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών (polycomb repressive complex 2, PRC2) που οδηγεί στη μεθυλίωση ιστονών και κατά συνέπεια στη συμπύκνωση της χρωματίνης σε περιοχές γονιδίων του χρωμοσώματος X με σκοπό την απενεργοποίηση του. Παρόλα αυτά, και οι δυο παραλλαγές έχουν κοινή έκβαση, δηλαδή την ρύθμιση της έκφρασης των γενετικών τόπων του X χρωμοσώματος (Qu, 2012). Κατά τη διάρκεια τόσο της ωογένεσης όσο και της σπερματογένεσης μη κωδικοποιητικά RNAs ελέγχουν την απενεργοποίηση των εντυπωμένων γονιδίων ανάλογα με την μητρική ή πατρική προέλευση του αλληλομόρφου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μακρύ μη κωδικοποιητικό Kcnq1 overlapping transcript 1 (Kcnq1ot1) το οποίο εκφράζεται μόνο από τα πατρικής προέλευσης αλληλόμορφα και κατά την εμβρυική ανάπτυξη δρα διατηρώντας την μεθυλίωση του DNA σε γειτονικά γονίδια, αναστέλλοντας την έκφραση τους (Fatica, 2013).

Η ρύθμιση της έκφρασης γενετικών τόπων επιτυγχάνεται και με άλλους τρόπους από ncRNAs. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένα μετάγραφο που προκύπτει από την περιοχή ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου της αναγωγάσης του διϋδροφολικού (dihydrofolate reductase, DHFR). Η βασική λειτουργία αυτού του μεταγράφου φαίνεται να είναι η αναστολή της έκφρασης των καθοδικών γονιδίων μέσω δημιουργίας ενός συμπλόκου RNA-DNA με τον υποκινητή του γονιδίου με αποτέλεσμα να μην είναι προσβάσιμος σε μεταγραφικούς ενεργοποιητές και μέσω αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα TFIIB ο οποίος είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής (Santosh, 2014).

1.7.2.2 miRNAs και η συμβολή τους στον καρκίνο του στομάχου

Στη συνέχεια οι έρευνες επεκτάθηκαν και σε άλλου είδους μετάγραφα, τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα που φαίνεται τελικά ότι καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό του ανθρώπινου γονιδιώματος. Με βάση το μήκος τους αυτά κατηγοριοποιούνται σε small non-coding RNAs και long non-coding RNAs (Calin, 2006). Μια αρκετά μελετημένη ομάδα των small non-coding RNAs, τα microRNAs (miRNAs), αποτελούνται από 20-22 νουκλεοτίδια και προέρχονται από τα MIR γονίδια. Η μεταγραφή των MIR γονιδίων οδηγεί στην δημιουργία ενός μερικώς δίκλωνου μεταγράφου με δομή φουρκέτας, το pri-miRNA. Μετά την δράση των RNA ενδονουκλεασών Drosha, Dicer-like, της πρωτεΐνης Αργοναύτη και του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου RISC (RNA-induced silencing complex), το αρχικό μετάγραφο με την δομή φουρκέτας μετατρέπεται σε ένα μονόκλωνο μετάγραφο μήκους 20-22nt (Bartel, 2004; Ha, 2014). Η δράση τους περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μέσω συμπληρωματικότητας με mRNA με αποτέλεσμα την μεταφραστική καταστολή των τελευταίων (και σπανιότερα την σίγηση τους λόγω μεταγραφικής αποικοδόμησης στα θηλαστικά), ενώ μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως ογκοκαταστολείς είτε ως ογκογονίδια ανάλογα με την λειτουργία των μεταγράφων που καταστέλλουν. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του miR-21 σε αρκετούς τύπους καρκίνου, όπως σε καρκίνο του μαστού, του θυρεοειδούς και του

πνεύμονα, και δρα ως ογκοεπαγωγέας καταστέλλοντας το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN (Phosphatase and tensin homolog). Το PTEN γονίδιο κωδικοποιεί μια φωσφατάση η οποία παρεμποδίζει την φωσφορυλίωση της Akt κινάσης η οποία θα οδηγούσε σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε αναστολή της απόπτωσης. Η μεταγραφική σίγηση του PTEN μεταγράφου από το miR-21 αίρει την αναστολή του Akt μονοπατιού με ογκογόνες συνέπειες για το κύτταρο (**Εικ. 22**) (Molinari, 2013).



Εικόνα 22: Το Akt μονοπάτι (Molinari, 2013)

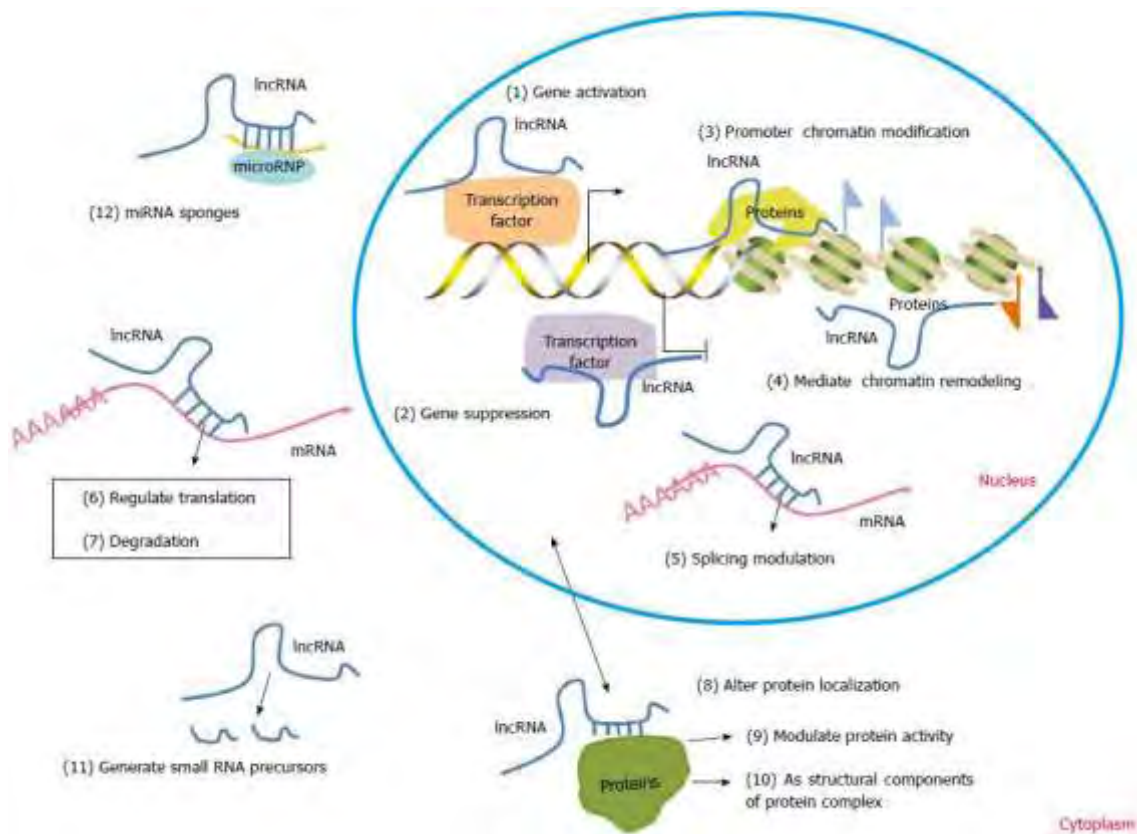
Και για τον καρκίνο του στομάχου έχουν βρεθεί miRNAs που δρουν ως επαγωγείς ή καταστολείς του όγκου. Μειωμένα επίπεδα των miR-143 και miR-145 έχουν παρατηρηθεί σε καρκινικούς ιστούς στομάχου και η δράση τους στηρίζεται στην πρόσδεση μέσω συμπληρωματικότητας με την 3' UTR του μεταγράφου του γονιδίου MYO6. Το MYO6 αποτελεί μια κινητήρια πρωτεΐνη που κινείται στα ινίδια ακτίνης και έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του προστάτη, του πνεύμονα και του μαστού. Χαμηλή έκφραση των miR-143 και miR-145 οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα του mRNA του MYO6 και σε αυξημένες πιθανότητες μετάστασης του όγκου (Lei, 2017).

Ένα σημαντικό μονοπάτι που φαίνεται να επηρεάζεται σε παθολογικές καταστάσεις είναι το μονοπάτι των Rho GTPασών μέσω του οποίου ρυθμίζεται ο κυτταροσκελετός της ακτίνης ελέγχοντας έτσι το σχήμα και την μορφολογία του κυττάρου και την διαδικασία της μίτωσης. Κατά την διάρκεια της μίτωσης το Rho μονοπάτι μεταβάλλει το μεταγραφικό προφίλ, ώστε να επιτραπεί ή όχι η είσοδος στον κυτταρικό κύκλο και στο στάδιο της μετάβασης κατά την G1/S φάση. Εκτός από αυτό, συμμετέχουν και στην κυτταροκίνηση για τον διαχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων και στην τοποθέτηση του πυρήνα στην σωστή θέση στα νέα κύτταρα (David, 2012). Στον καρκίνο του στομάχου τα miR-31 και miR-647 δρουν ως ογκοκατασταλτικά μετάγραφα παρεμποδίζοντας την μεταστατικότητα του όγκου επιδρώντας στο μονοπάτι των Rho GTPασών. Το πρώτο αλληλεπιδρά με το μετάγραφο της GTPάσης RhoA, ενώ το δεύτερο με το mRNA του SRF, συστατικά που επηρεάζουν θετικά το Rho μονοπάτι (Chen, 2016; Ye, 2017).

1.7.3 lncRNAs και ο ρόλος τους στον καρκίνο

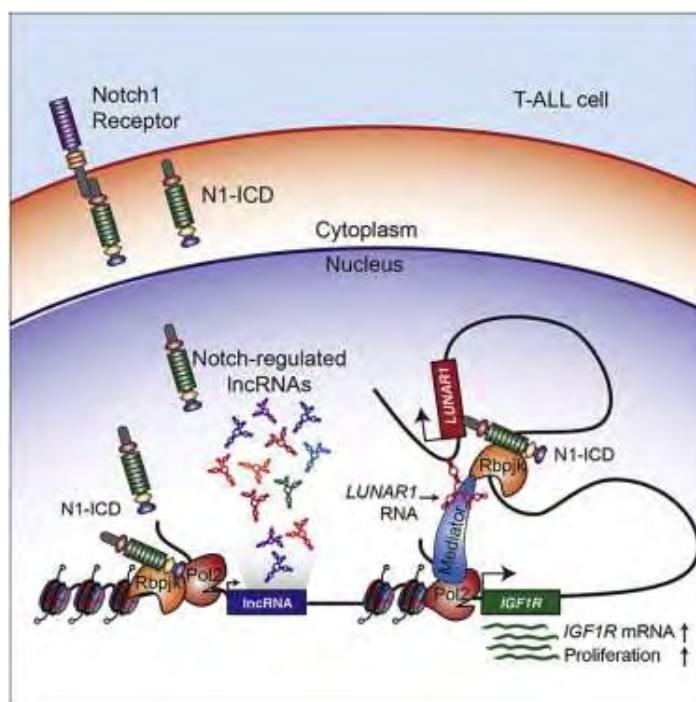
Ο όρος long non-coding RNAs (lncRNAs) αναφέρεται σε ώριμα μεταγγραφα μήκους μεγαλύτερου από 200nt τα οποία δεν χαρακτηρίζονται από κωδικό δυναμικό, δηλαδή δεν παρέχουν την πληροφορία για την παραγωγή κάποιας πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά παρουσιάζουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά με τα mRNAs, όπως ότι μεταγράφονται από την RNA polymerase II και προστατεύονται από μια 3' πολύ (A) ουρά και μια 5' καλύπτρα. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία τους διαφέρει μεταξύ των ειδών, ενώ ενδεχομένως να μην εντοπίζονται σε κάποιους οργανισμούς λόγω του γεγονότος ότι προέκυψαν κατά την εξέλιξη των ειδών. Επίσης, ένα μεγάλο μέρος από αυτά τα μεταγγραφα χαρακτηρίζονται από ιστοεδικότητα, καθώς δεν εκφράζονται στον ίδιο βαθμό σε όλους του ιστούς ή κάποια από αυτά εκφράζονται σε συγκεκριμένους τύπους παθολογικών καταστάσεων, όπως στον καρκίνο. Ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους τα lncRNAs χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά. Αναφορικά με τον λειτουργικό ρόλο των πυρηνικών lncRNAs αυτός αφορά την ρύθμιση της τρισδιάστατης αλληλεπίδρασης χρωμοσωμικών περιοχών που απέχουν μεγάλη απόσταση, ενώ άλλα πυρηνικά lncRNA επάγουν επιγενετικές τροποποιήσεις στο DNA προσελκύοντας ή παρεμποδίζοντας σύμπλοκα πρωτεϊνών τροποποίησης της δομής της χρωματίνης. Επίσης, τα lncRNAs επηρεάζουν την μεταγραφή γονιδίων θετικά ή αρνητικά μέσω προσέλκυσης μεταγραφικών ενεργοποιητών ή καταστολέων αντίστοιχα (Xie, 2016). Σε αυτή την κατηγορία, ανήκει το LncHIFCAR που λειτουργεί προσελκύοντας τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1a (Hypoxia-inducible factor-1) σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων που προάγουν τον καρκίνο του στόματος (Shih, 2017). Στόχοι των πυρηνικών lncRNAs, εκτός από την χρωματίνη, αποτελούν και άλλα μόρια RNA, όπως τα mRNAs και τα miRNAs. Αυτά τα lncRNAs εμπλέκονται σε διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος, απαραίτητες για την ωρίμανση των mRNAs. Με την έξοδο των mRNAs από τον πυρήνα είναι δυνατή η ρύθμιση της σταθερότητας τους από lncRNAs επηρεάζοντας θετικά ή αρνητικά την δράση του πρωτεασώματος.

Η σταθερότητα των μεταγράφων επιτυγχάνεται και μέσω των miRNA sponges, κυταροπλασματικών δηλαδή lncRNA τα οποία δρουν σαν υποστρώματα των miRNAs με σκοπό την σταθεροποίηση των κωδικοποιητικών τους μεταγράφων-στόχων που θα αποικοδομούνταν από τα miRNAs. Σε επόμενο στάδιο, η μετάφραση συγκεκριμένων γονιδίων ελέγχεται αρνητικά μέσω lncRNAs, (Antisense UCHL1) ενώ μέσω αυτών λαμβάνει χώρα και η αλληλεπίδραση διάφορων πρωτεϊνών (Geisler, 2013). Τέλος, κάποια lncRNAs κωδικοποιούν μικρά πεπτίδια (<60 aa) τα οποία αν και δεν σχηματίζουν κλασσικές πρωτεΐνες εμφανίζουν λειτουργίες αλλοστερικής καταστολής. Μια περίπτωση lncRNA που παράγει μικρά πεπτίδια είναι το HOXB-AS3 του οποίου το πεπτίδιο φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τον σχηματισμό όγκου στον πρωκτό (Εικ. 23) (Huang, 2017).



Εικόνα 23: Οι ρόλοι των long non-coding RNAs στο εσωτερικό ενός κυττάρου (Xie, 2016)

Σημαντικά μέλη αυτής της ομάδας μεταγράφων έχουν ταυτιστεί με τον σχηματισμό όγκων σε διάφορους ιστούς και όργανα. Ιδιαίτερο ρόλο παίζει το μη κωδικοποιητικό RNA Leukemia-Associated Non-Coding IGF1R Activator RNA 1 ή LUNAR1 στο Διάχυτο Λέμφωμα από Μεγάλα Β-Κύτταρα (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL). Το LUNAR1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15 και αρχικά είχε τονιστεί ο ρόλος του στη T-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (T cell Acute Lymphoblastic Leukemia, T-ALL). Συγκεκριμένα, συμμετέχει στην επαγωγή του μονοπατιού της IGF1 μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης IGF1R που προσδένει αυξητικούς παράγοντες που μοιάζουν με την ινσουλίνη (**Εικ. 24**). Η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχει ο IGF1R οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής του μονοπατιού Ras-MAPK και σε αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K-AKT/PKB, το σημαντικότερο μονοπάτι αναστολής της απόπτωσης. Επομένως, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του LUNAR1 προωθούν τις παραπάνω διαδικασίες οι οποίες καταλήγουν σε δυο από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του καρκίνου: επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης και παρεμπόδιση της απόπτωσης. Ενδιαφέροντα αποτελούν και τα δεδομένα από Kaplan-Meier διαγράμματα που δείχνουν την χαμηλή βιωσιμότητα ασθενών που πάσχουν από DLBCL οι οποίοι να εμφανίζουν και υψηλά ποσοστά έκφρασης του LUNAR1 υποδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο του στην πρόοδο της ασθένειας (Peng, 2016).

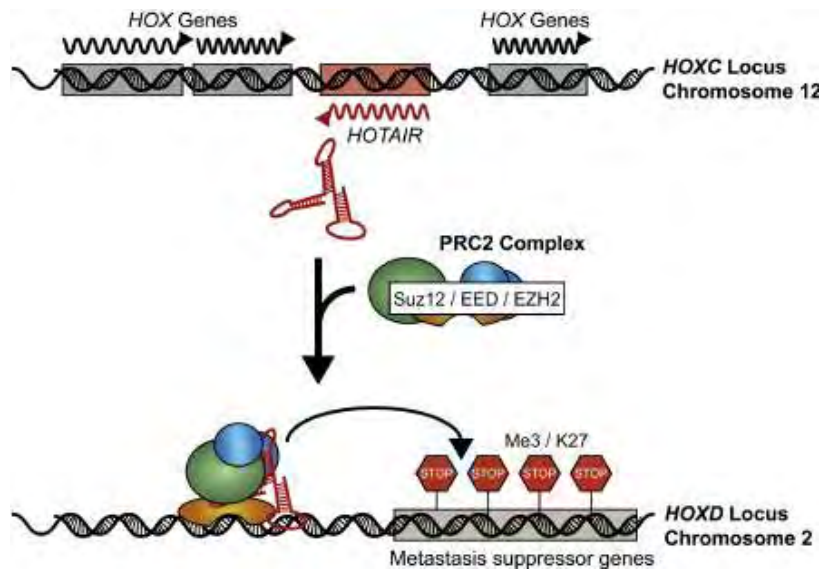


Εικόνα 24: Επαγωγή της μεταγραφής του IGF1R γενετικού τόπου μέσω της δράσης του long non-coding RNA LUNAR1 σε T-λεμφοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από T-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (Trimarchi, 2014).

Ένα άλλο σημαντικό μετάγραφο στην καρκινογένεση αποτελεί το HOTAIR, ή αλλιώς HOX antisense intergenic RNA, που ο ρόλος του έχει συνδεθεί με προώθηση της μετάστασης σε καρκίνους του μαστού. Συγκεκριμένα, αυτό το μετάγραφο αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο PRC2 (polycomb repressive complex 2) και το καθοδηγεί σε ρυθμιστικές περιοχές διάφορων γονιδίων. Η δράση της πρωτεΐνης EZH2 του συμπλόκου οδηγεί σε τρι-μεθυλίωση της H3K27 και συνεπώς στη μεταγραφική σίγηση της περιοχής HOXD locus που περιέχει καταστολείς της μετάστασης (**Εικ. 25**). Η συμπεριφορά αυτού του μεταγράφου οδηγεί στην αλλαγή του μεταγραφικού προτύπου των κυττάρων και την προώθηση της μετάστασης στον καρκίνο του μαστού (Loewen, 2014; Gupta, 2010). Πέρα από τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα, το HOTAIR υπέρ-εκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου και πιο ειδικά συνδέεται με την μετάσταση στο λεμφικό σύστημα και τη δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς που πάσχουν από τον διάχυτο τύπο του καρκίνου του στομάχου (Endo, 2013).

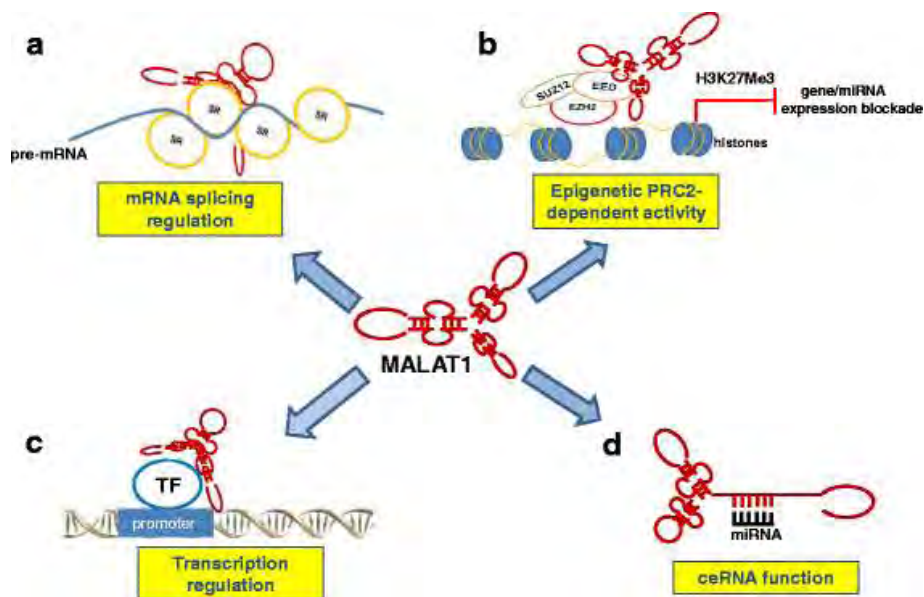
Το MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς, ενώ υπέρ-έκφραση του έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του ήπατος. Λειτουργεί με παραπάνω από έναν μηχανισμούς όπως:

- επηρεάζοντας το εναλλακτικό μάτισμα μεταγράφων μέσω αλληλεπίδρασης με τις SR πρωτεΐνες,
- μέσω επιγενετικών, επαγόμενων από το PRC2, τροποποιήσεων H3K27me3 που οδηγούν σε καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας γονιδίων



Εικόνα 25: Ο ρόλος του HOTAIR στην απορρύθμιση κατασταλικών γονιδίων που σχετίζονται με την μετάσταση (Gibb, 2011).

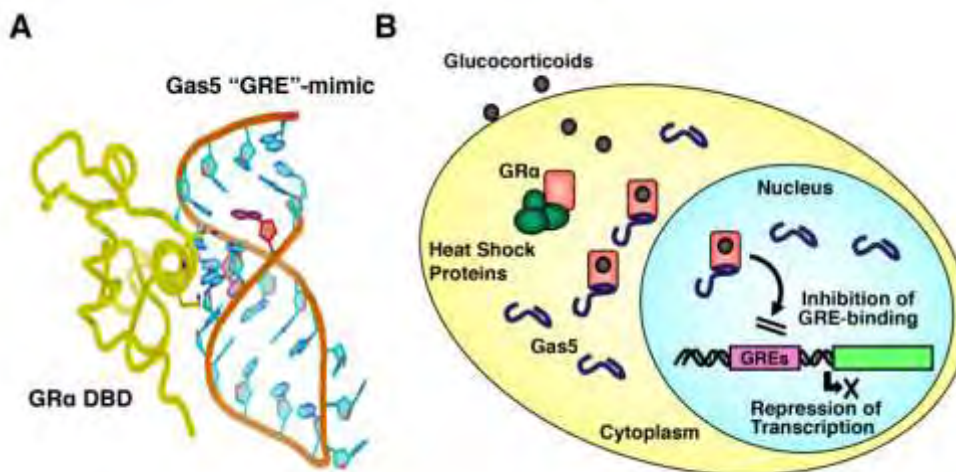
- προσελκύνοντας μεταγραφικούς παράγοντες σε περιοχές υποκινητών γονιδίων με θετική ή αρνητική επίδραση στην μεταγραφή
- λειτουργώντας ως miRNA sponge και έτσι ευνοεί την μεταγραφή των αντίστοιχων κωδικοποιητικών miRNA στόχων (**Εικ. 26**) (Gibb, 2011; Amodio, 2018).



Εικόνα 26: Οι μηχανισμοί δράσης του μεταγράφου MALAT1 (Amodio, 2018).

Ένα ογκοκαταστατικό lncRNA, το GAS5, συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη όγκων όταν τα επίπεδα του είναι χαμηλά. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης του GAS5 ανάλογα με την περίπτωση καρκίνου. Ένας από αυτούς υποστηρίζει την πρόσδεση του GAS5 στην επικράτεια πρόσδεση στο DNA του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση των GR με περιοχές υποκινητών που λέγονται GRE (Glucocorticoid

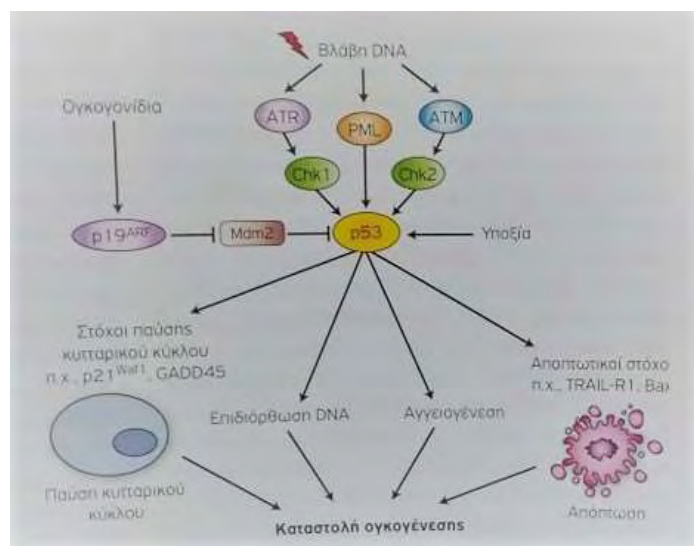
Response Element) (Εικ. 27). Αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία εντοπίζονται σε αντι-αποπτωτικά γονίδια που ενεργοποιούνται από την δράση γλυκοκορτικοειδών. Η επίδραση του GAS5 στην μεταγραφή αυτών των γονιδίων είναι ανασταλτική προάγοντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 27: A. Απεικόνιση της πρόσδεσης του GAS5 με την DNA-binding περιοχή του GRα. B. Δράση του GAS5 στο μονοπάτι ενεργοποίησης γονιδίων επαγόμενα από τα γλυκοκορτικοειδή (Tomoshige, 2017).

Ακόμα, το GAS5 συμπεριφέρεται ως miRNA sponge και στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού δρα ως υπόστρωμα του miR-21, που όπως προαναφέρθηκε αναστέλλει το ογκοτασταλτικό PTEN. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της λειτουργίας του PTEN, δηλαδή την ενεργοποίηση της απόπτωσης (Zhang, 2013). Στην εκδήλωση πολλών καρκίνων, όπως του στομάχου, σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει η απορρύθμιση του μονοπατιού του p53. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με ογκοκατασταλτική δράση που συμμετέχει σε πλήθος διαδικασιών συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, της επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, της σταθερότητας του γονιδιώματος και της απόπτωσης. Κωδικοποιείται από το γονίδιο TP53, ενεργοποιείται από καταστάσεις που προκαλούν βλάβες στο κύτταρο (υποξία, βλάβες στο DNA) και μέσω της επικράτειας DRB και TAD προσδένεται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων και ενεργοποιούν την μεταγραφή τους (Εικ. 28) (Mercer, 2007).

Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε το LINC01939 ως καταστολέας της μετάστασης στον καρκίνο του στομάχου. Αυτό εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και δρα ως sponge του miR-17-5p. Φυσιολογικά το miR-17-5p προσδένεται λόγω συμπληρωματικότητας με το μετάγραφο του EGR2 (Early Growth Response 2) (Chen, 2019). Το EGR2 ανήκει στην κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων με τρεις επικράτειες δακτύλων ψευδαργύρου που του επιτρέπουν να προσδένεται σε αλληλουχίες DNA. Η έκφραση του EGR2 επάγεται από το p53 και προωθεί την απόπτωση, ενώ η έκφραση του καταστέλλεται από το miR-17-5p. Όταν το LINC01939 δεσμεύει το miR-17-5p, τότε το EGR2 ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων με σκοπό την προαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (YOKOTA, 2010).

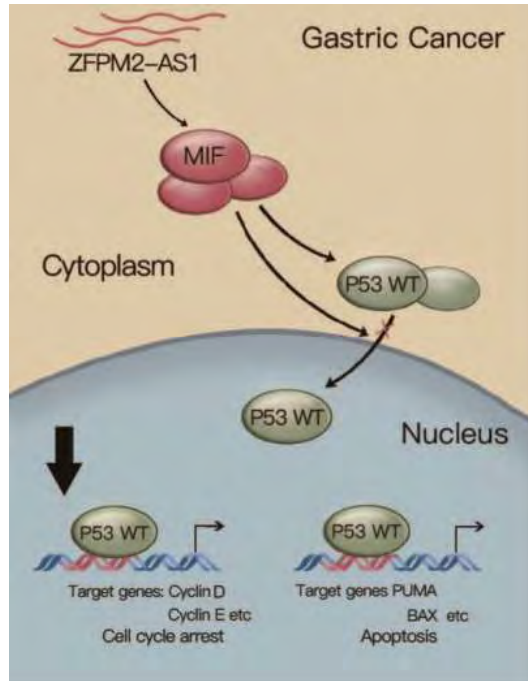


Εικόνα 28: Ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p53 μετά από βλάβες στο DNA ή σε συνθήκες υποξίας με αποτέλεσμα την καταστολή της ογκογένεσης (Shulin Wang and Wafik S. El-Deiry, 2007, P53, CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS. In: 25 Yearsof p53 Reasearch, pp141-163, Springer).

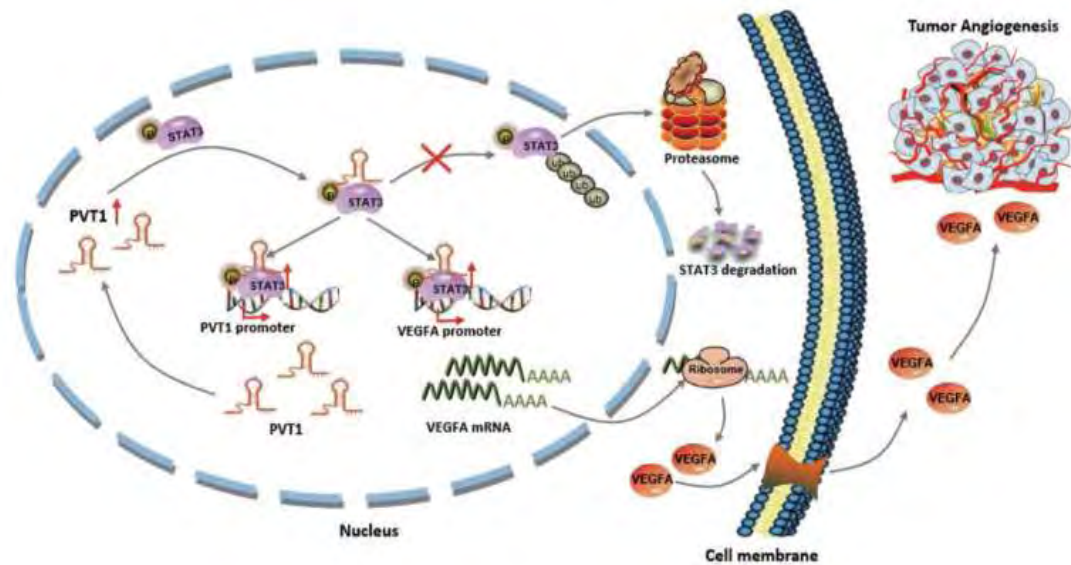
Το μονοπάτι του p53 αποτελεί μια από τις κυριότερες επιδιορθωτικές διαδικασίες, απορρυθμίζει την οποία έχει σοβαρές συνέπειες για το κύτταρο. Το lncRNA ZFPM2 antisense RNA 1 (ZFPM2-AS1) ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου του στομάχου παρεμποδίζοντας την σωστή λειτουργία του μονοπατιού p53. Η πρωτεΐνη p53 πριν ρυθμίσει την μεταγραφή γονιδίων, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα από όπου πρέπει να ενεργοποιηθεί υπό κατάλληλες συνθήκες και να μεταφερθεί στο πυρήνα. Αυτή η μεταφορά αναστέλλεται από παράγοντες, όπως ο MIF (macrophage migration inhibitory factor). Το μετάγραφο ZFPM2-AS1 αλληλεπιδρά με τον MIF σταθεροποιώντας τον με σκοπό την σταθερή παρεμπόδιση της εισόδου του p53 στον πυρήνα (**Εικ. 29**). Έτσι τελικά το κύτταρο δεν οδηγείται σε απόπτωση και συνεχίζει να διαιρείται συσσωρεύοντας μεταλλάξεις (Kong, 2018).

Η εξάπλωση του καρκίνου, στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό από την τροφοδότηση των καρκινικών κυττάρων με θρεπτικά συστατικά μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Αυτό επιτυγχάνεται εξαιτίας της αγγειογένεσης στη περιοχή του όγκου. Ο σχηματισμός των νέων αγγείων επάγεται από τον αυξητικό παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται υπό την δράση του μεταγραφικού παράγοντα Stat3 (Niu, 2002; Wei, 2003).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου εμπλέκεται το lncPVT1 στην παραπάνω διαδικασία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του με το Stat3 και την καθοδήγηση του στον υποκινητή του VEGFA γονιδίου με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης και την αγγειογένεση. Εκτός από αυτό, το σύμπλοκο lncPVT1-Stat3 επηρεάζει θετικά την έκφραση του lncPVT1 δημιουργώντας έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης όπου ενισχύεται ο σχηματισμός αγγείων κατά τον καρκίνο του στομάχου (**Εικ. 30**) (Zhao, 2018).



Εικόνα 29: Απεικονίζεται η σταθεροποίηση του MIF (macrophage migration inhibitory factor) από το lncRNA ZFPM2-AS1 που θα παρεμποδίσει την μεταφορά του p53 στον πυρήνα του κυττάρου όπου θα δρούσε ογκοκατασταλτικά (Kong, 2018).



Εικόνα 30: Το μονοπάτι δράσης του lncPVT1 κατά την αγγειογένεση στον καρκίνο του στομάχου. Η αλληλεπίδραση του lncPVT1 με το Stat3 οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του κύριου παράγοντα αγγειογένεσης VEGFA, καθώς και σε ενίσχυση της μεταγραφής και της δράσης του lncPVT1 (Zhao, 2018).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η δημιουργία ενός συστήματος CRISPR SAM activation για την ενδογενή επαγωγή της μεταγραφής long non-coding RNAs τόσο σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές στομάχου όσο και σε φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου. Στο πλαίσιο της διατριβής, πρωταρχικά γονίδια-στόχοι αυτού του συστήματος αποτέλεσαν το Gastric Cancer Induced LincRNA 3 (Gracile3) το οποίο χαρακτηρίζεται στην παρούσα μελέτη και το Gracile1, ο χαρακτηρισμός του οποίου έγινε σε παλαιότερη πτυχιακή του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής. Ένας ακόμα στόχος της παρούσας διατριβής και παράλληλα βασική προϋπόθεση για την αξιοποίηση CRISPR SAM activation συστήματος έναντι γονιδίων-στόχων, είναι ο σχεδιασμός των κατάλληλων single guide RNAs τα οποία στοχεύουν στην περιοχή των αντίστοιχων υποκινητών και η κλωνοποίηση τους σε κατάλληλο φορέα. Απώτερος σκοπός της μελέτης ήταν η γενετική τροποποίηση καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων του στομάχου ώστε να υπερεκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη dCas9, βασικό τελεστή του συστήματος CRISPR-activation.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Κυτταρικές σειρές

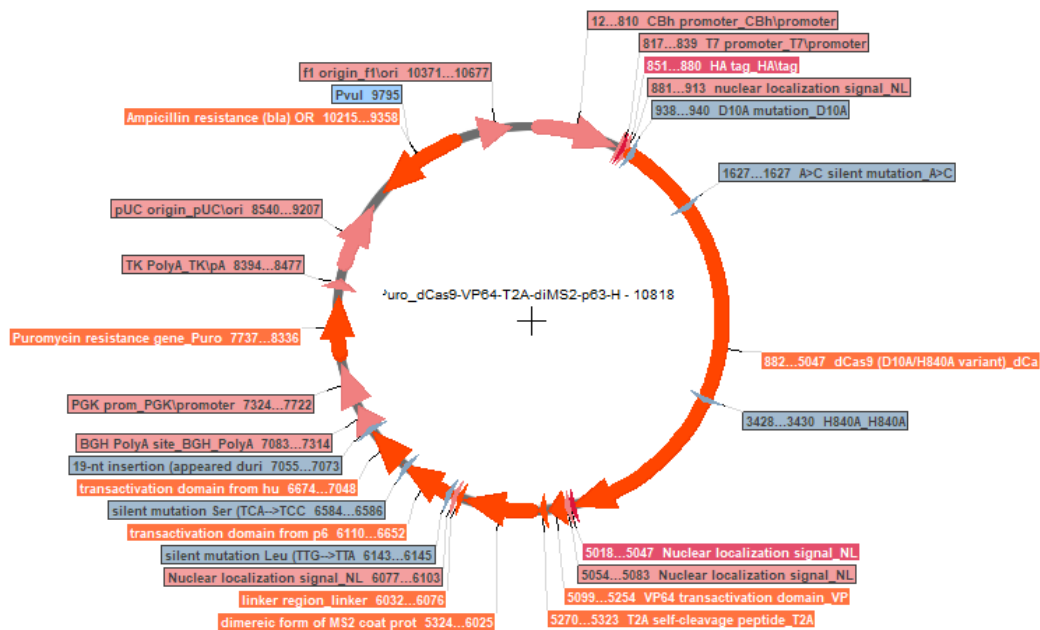
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διαθέσιμες σειρές ανθρώπινων κυττάρων που φαίνονται και στον παρακάτω πίνακα. Η HFE45 προέρχεται από φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα στομάχου και αξιοποιήθηκε ως φυσιολογικός μάρτυρας. Τα αρχικά HEK αντιστοιχούν στα Human Embryonic Kidney και παρόλο που τα κύτταρα αυτής της κυτταρικής σειράς απομονώθηκαν από νεφρά και όχι από στόμαχο, αποτελούν κύτταρα δεκτικά σε γενετικές τροποποιήσεις και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο παραγωγής λεντιών που φέρουν το πλασμίδιο που εκφράζει το sgRNA. Τα KATOIII και τα MKN45 προέρχονται από μεταστατικό καρκίνο του στομάχου σε λεμφικό ιστό και πάγκρεας αντίστοιχα, ενώ τα NUGC4 αφορούν καρκινικά κύτταρα στομάχου που έχουν υποστεί μετάσταση στον λεμφικό ιστό.

	Τύπος σειράς	Πληροφορίες δότη	Μορφολογία
<i>HFE45</i>	Φυσιολογικά επιθηλιακά στομάχου		επιθηλιακά
<i>HEK</i>	Human Embryonic Kidney		
<i>KATOIII</i>	Καρκινική στομάχου με μετάσταση σε λεμφικό ιστό	Αρσενικό άτομο καταγόμενο από Ασία 55 χρονών	σφαιρικά
<i>MKN45</i>	Καρκινική στομάχου με μετάσταση σε πάγκρεας	Θηλυκό άτομο 62 χρονών	Ατρακτοειδή ή ωοειδή
<i>NUGC4</i>	Καρκινική στομάχου με μετάσταση σε λεμφικό ιστό	Θηλυκό άτομο 35 χρονών	σφαιρικά

2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

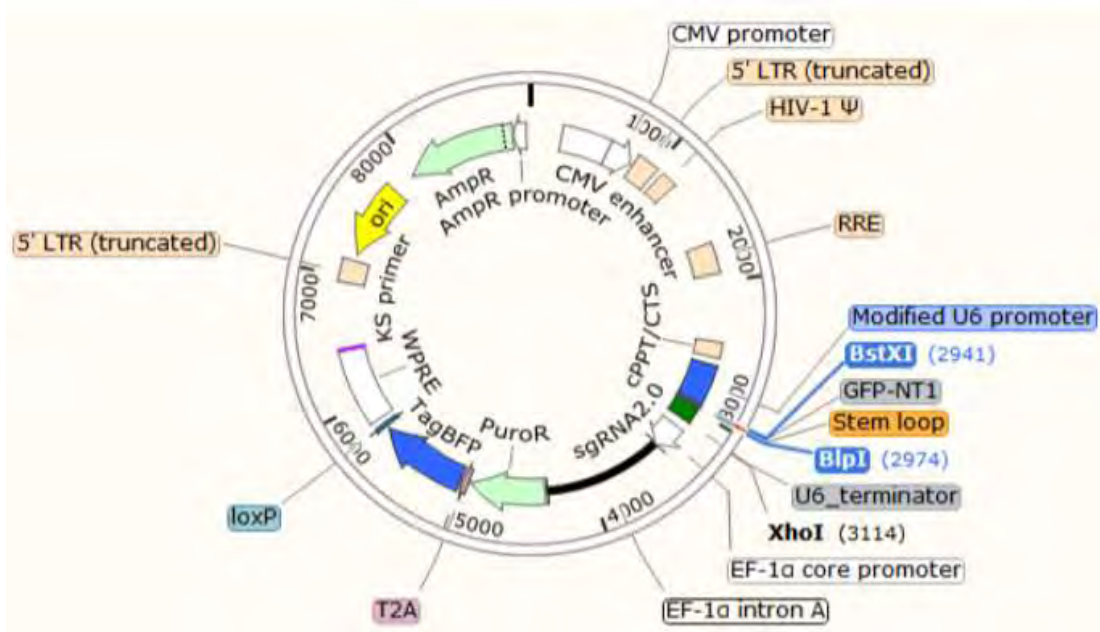
Ένα CRISPR πείραμα απαιτεί την Cas9 νουκλεάση, καθώς και το sgRNA που θα οδηγήσει την νουκλεάση στη περιοχή στόχευσης στο γονιδίωμα. Αντίστοιχα, ένα CRISPR activation SAM σύστημα εκτός από το sgRNA προϋποθέτει την παρουσία ενός αριθμού μεταγραφικών ενεργοποιητών των οποίων η συνδυαστική δράση θα οδηγήσει στην επιτυχή ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου (εν προκειμένου των Gracile1 & 3).

2.1.2.1 pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1



Εικόνα 31: Απεικόνιση των στοιχείων που περιέχονται στον φορέα pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1 που είναι απαραίτητα για την συναρμολόγηση του συμπλόκου των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στην deadCas9.

2.1.2.2 pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP



Εικόνα 32: Απεικόνιση των στοιχείων στον φορέα pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έκφραση των single guide RNAs.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

2.2.1.1 Volcano plot

Δεδομένα από RNA-seq χρησιμοποιήθηκαν για μετά-ανάλυση μεταγραφομικής με σκοπό την σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης πιθανών long non-coding RNA στόχων σε καρκινικές σειρές, φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς. Το πρόγραμμα Perseus χρησιμοποιήθηκε, ώστε οι κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης RPKM να μετατραπούν σε αποκλίσεις Z και στη συνέχεια να υπολογιστεί η στατιστική σημαντικότητα των αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση με ένα t-test, καθώς και το εύρος αλλαγής που δείχνει αν η αλλαγή αυτή είναι μεγάλη ή αμελητέα για κάθε γονίδιο.

2.2.1.2 Κωδικοποιητικό δυναμικό

Για την ανάλυση του κωδικοποιητικού δυναμικού, χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Coding Potential Calculator 2 CPC2 (<http://cpc2.cbi.pku.edu.cn/>) (Kang, 2017). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η πλήρης αλληλουχία του Gracile3 σε FASTA μορφή όπως δίνεται από τον φυλλομετρητή UCSC στην έκδοση 19 του ανθρώπινου γονιδιώματος (<https://genome.ucsc.edu/>). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία κωδικοποιητικών γονιδίων ACTB, CDX2, (MYC), GAPDH ενώ ως θετικός μάρτυρας η αλληλουχία γνωστών μακρών μη κωδικοποιητικών RNA όπως τα GAS5, NEAT1, LINC00673, HOTAIR, MALAT1, DISC2, ZFAS1, PRINS, Gracile1. Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Excel.

2.2.1.3 Ανάλυση έκφρασης σε ανθρώπινους ιστούς

Για την μελέτη της έκφρασης του Gracile3 σε ανθρώπινους ιστούς χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα ανάλυσης RNAseq (από την GTEx) από τα Public Sessions του φυλλομετρητή UCSC με σκοπό την οπτικοποίηση τους. Από τα 49 δείγματα φυσιολογικών ιστών από αρσενικούς δότες επιλέχθηκαν ενδεικτικά για απεικόνιση ο λιπώδης ιστός, η αορτή, το παχύ έντερο, ο οισοφάγος, νεφρά, το συκώτι, οι πνεύμονες, σκελετικός μυς, το πάγκρεας, το λεπτό έντερο και ο στόμαχος ωστόσο η ανάλυση περιέλαβε το σύνολο των ιστών.

2.2.1.4 Ανάλυση συνταινίας

Η ύπαρξη ορθόλογου γονιδίου με το Gracile3 στον ποντικό επιβεβαιώθηκε μέσω του φυλλομετρητή WashU (<http://epigenomegateway.wustl.edu/legacy/>) συγκρίνοντας τον γενετικό τόπο του Gracile3 στο hg19 και στοιχίζοντας τον με την αντίστοιχη περιοχή στην έκδοση mm9 του γονιδιώματος του ποντικού. Για την ίδια ανάλυση αξιοποιήθηκαν διαθέσιμα δεδομένα RNA-seq από φυσιολογικούς ιστούς ποντικού, όπως εγκέφαλο, παχύ έντερο, δωδεκαδάκτυλο, οισοφάγο, καρδιά, νεφρό, ήπαρ, πάγκρεας, στομάχι, θύμο αδένες με σκοπό την ανίχνευση πιθανών μεταγράφων στις συνταινικές γονιδιωματικές συντεταγμένες του ποντικού.

2.2.1.5 Ανάλυση δεδομένων ChiP-seq για έρεση ρυθμιστικών στοιχείων του Gracile3

Προκειμένου να σχεδιαστούν τα sgRNA του συστήματος CRISPR-cas-activation έπρεπε πρώτα να ταυτοποιηθούν τα όρια του υποκινητή του γονιδίου με βάση τον οποίο

έγινε ο σχεδιασμός των sgRNAs. Τα δεδομένα που αναλύθηκαν, προέρχονται από μετα-ανάλυση διαθέσιμων δεδομένων αλληλούχησης έπειτα από ανοσο-κατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP-seq, Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) σε ζεύγη καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από ασθενείς. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στις επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών H3K4me3 (τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3, υποκινητές) και H3K27ac(ακετυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης 3, υποκινητές και ενισχυτές).

2.2.1.6 Σχεδιασμός sgRNA

Σε μια ανεξάρτητη στρατηγική σχεδιασμού των sgRNA, εκτός της αξιοποίησης των Chip-seq αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η περιοχή -200 +50 από το TSS (Transcription Start Site: +1) του γονιδίου. Ως TSS ορίζεται το σημείο έναρξης της μεταγραφής και η αλληλουχία που περιλαμβάνει 200 νουκλεοτίδια ανοδικά και 50 νουκλεοτίδια καθοδικά αυτού του σημείου συνήθως αποτελεί τον υποκινητή του γονιδίου. Η απόκτηση της αλληλουχίας έγινε από τον φυλλομετρητή UCSC από το ανθρώπινο γονιδίωμα GRCh37/hg19. Τα προγράμματα που χρησιμοποιήσαμε για τον σχεδιασμό των shRNA είναι το ZiFit (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>), Benchling (<https://www.benchling.com/>), E-CRISPR (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>), CRISPR-ERA (<http://crispr-era.stanford.edu/>), CHOP-CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), Broad Institute (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>).

Οι αλληλουχίες sgRNA από το σύνολο των προγραμμάτων σχεδιασμού στοιχήθηκαν σε σχέση με την αλληλουχία-στόχο μέσω του προγράμματος CLC Sequence viewer 6 και στη συνέχεια επιλέχθηκαν εκείνα τα sgRNA τα οποία στόχευαν κοινό τμήμα του υποκινητή και που επιλέχθηκαν από το σύνολο των προγραμμάτων σχεδιασμού.

2.2.2 Μέθοδοι

2.2.2.1 Χημικός μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH5- α

Ο χημικός μετασχηματισμός κυττάρων DH5 α περιλαμβάνει την ανάμειξη των ειδικά τροποποιημένων κυττάρων με τον φορέα DNA ο οποίος πρέπει να εισαχθεί. Το μίγμα επώαζεται για 20 λεπτά σε πάγο. Στη συνέχεια, ακολούθησε θερμικό σοκ των κυττάρων με επώαση σε υδατόλουτρο 42°C για 50 δευτερόλεπτα και μεταφορά στον πάγο για 2 λεπτά. Τα κύτταρα μεταφέρονται δοκιμαστικό σωλήνα με την προσθήκη θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό(free) μέχρι ο συνολικός όγκος να φτάσει 1ml και υπόκεινται σε συνεχή ανακίνηση σε θάλαμο 37°C, 160 rpm για 50 λεπτά. Μετά την επώαση κατάλληλη ποσότητα από το εναιώρημα στρώνεται σε LB agar ampicillin 100mg/ml. Για την απομόνωση του πλασμιδίου από τα κύτταρα σε μικρή κλίμακα την επόμενη μέρα μεταφέρονται αποικίες σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό LB Broth 1-2ml, συνεχή τους ανακίνηση όλο το βράδυ σε θάλαμο 37°C, 210rpm και το επόμενο πρωί γίνεται η απομόνωση σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoBond® Xtra Plasmid/Plasmid (high copy) της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Για την απομόνωση πλασμιδίου σε μεγάλη κλίμακα μετά την μεταφορά των αποικιών σε δοκιμαστικούς σωλήνες και την ολονύκτια επώαση τους το επόμενο πρωί

μεταφέρονται σε νέο θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη τους για περίπου 6 ώρες και έπειτα μεταφέρεται το μέσο μεταφοράς της αποικίας σε κωνική φιάλη των 1000ml με ~200ml LB ampicillin και ολονύκτια ανακίνηση σε 37°C, 210rpm. Την επομένη πραγματοποιείται απομόνωση του πλασμιδίου σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoBond® Xtra Midi(high copy) της εταιρείας MACHEREY-NAGEL.

Για την απομόνωση του φορέα DH5-alpha με pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1 χρησιμοποιήθηκαν 200μl DH5-alpha και 1μl από το DNA. Έγινε προσθήκη 800μl LB free και στρώθηκαν 100μl σε τρυβλίο. Το πλασμίδιο απομονώθηκε με βάση το πρωτόκολλο NucleoBond® Xtra Midi της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, είχε συγκέντρωση 1,6μg/μl και είχε επαναδιαλυθεί σε 50μl (x6).

Η παραπάνω διαδικασία έγινε για την απομόνωση του φορέα pLV-U6-gRNA diMS2 (B1pI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP για την οποία χρησιμοποιήθηκαν 50μl DH5-alpha και 1μl από αραιώση 1:100 του αρχικού αποθέματος του φορέα που είχε συγκέντρωση 1400ng/μl. Έγινε προσθήκη 900μl LB free και στρώθηκαν 100μl από το εναιώρημα σε τρυβλίο. Το πλασμίδιο απομονώθηκε με βάση το πρωτόκολλο NucleoBond® Xtra Midi της εταιρείας MACHEREY-NAGEL και είχε συγκέντρωση 2,5γ/λ, ενώ είχε επαναδιαλυθεί σε 40μl H₂O (x6).

Σε μικρή κλίμακα απομονώθηκαν κλωνοποιημένα πλασμίδια (η κλωνοποίηση περιγράφεται στην ενότητα 2.2.2.3) pLV-U6-gRNA diMS2 (B1pI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP με τα αντίστοιχα sgRNA που στοχεύουν τον υποκινητή του Gracile3. Χρησιμοποιήθηκαν 75μl DH5-alpha και 10μl από την αντίδραση λιγάσης. Στρώθηκαν 100μl σε τρυβλία και η συγκέντρωση των minis (διαλυμένα σε 50μl H₂O) φαίνονται παρακάτω:

pLVU6-Gracile1 sg1Γ	30,2 ng/μl
pLVU6-Gracile1 sg2A	Too low
pLVU6-Gracile3 sg1A	138,6 ng/μl
pLVU6-Gracile3 sg2A	48 ng/μl
pLVU6-Gracile3 sg3A	32,8 ng/μl
pLVU6-Gracile4 sg4Γ	33,7 ng/μl

Για τα παραπάνω δείγματα έγινε χημικός μετασχηματισμός και απομόνωση τους σε μεγάλη κλίμακα. Έγινε αραιώση των δειγμάτων που προέκυψαν από τα minis όπως φαίνεται στον πίνακα, ώστε κάθε μικρόλιτρο να αντιστοιχεί περίπου σε 5ng πλασμιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν 40μl DH5-alpha και 1μl DNA. Στρώθηκαν 90μl του εναιωρήματος σε τρυβλία, τα απομονωμένα πλασμίδια επαναδιαλύθηκαν το καθένα σε 50μl (x6) και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται παρακάτω:

Midi pLVU6-Gracile1 sg1Γ	2,7 μg/μl
Midi pLVU6-Gracile1 sgA	4,1 μg/μl
Midi pLVU6-Gracile3 sg1A	3,8 μg/μl
Midi pLVU6-Gracile3 sg2A	3,2 μg/μl
Midi pLVU6-Gracile3 sg3A	3 μg/μl
Midi pLVU6-Gracile4 sg4Γ	2,5 μg/μl

2.2.2.2 Πέψη του πλασμιδίου *pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP* με σκοπό την ένθεση των *sgRNA*.

Πραγματοποιήθηκε διαδοχική πέψη του πλασμιδίου με δυο ένζυμα της εταιρείας Biolabs, το BspI και το BstX, σε 5 αντιδράσεις συνολικού όγκου 50μl.

Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
10X Cutsmart Buffer (Biolabs)	5
Ένζυμο BspI	2
Πλασμίδιο (2,5γ/λ)	0,6
H ₂ O	42,4
Τελικός όγκος	50

Η αντίδραση αυτή διαρκεί 5 ώρες και γίνεται σε υδατόλουτρο 37°C. Στις 3 ώρες χρησιμοποιούμε 5 μl από την αντίδραση σε 1% gel αγαρόζης με 50ml TBE 0,5X για την επιβεβαίωση της πέψης από το ένζυμο. Ταυτόχρονα έγινε και προσθήκη 1μl BspI σε κάθε αντίδραση και επώαση στο υδατόλουτρο έως το πέρας των 5 ωρών. Αφού πέρασαν οι συνολικές 5 ώρες οι αντιδράσεις μοιράστηκαν σε 2 tubes των 1,5ml και πραγματοποιήθηκε PCR Clean-up σύμφωνα με το kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Σε κάθε tube έγινε προσθήκη 43μl Elution Buffer στο τέλος του καθαρισμού. Σε αυτά ακολούθησε δεύτερη αντίδραση πέψης με το ένζυμο BstX για 5 ώρες σε υδατόλουτρο 37°C. Στις 3 ώρες της αντίδρασης προστέθηκε 1μl ενζύμου και δεν πραγματοποιήθηκε ενδιάμεσο gel αγαρόζης. Μετά τις 5 ώρες της ενζυμικής αντίδρασης έγινε 1% gel αγαρόζης 180ml TBE 0,5X με σκοπό Gel extraction με το kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Συγκεκριμένα στο gel extraction χρειάστηκαν 2 tubes 1,5ml σε καθένα από τα οποία έγινε προσθήκη 20μl Elution Buffer.

Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
10X 3.1Buffer (Biolabs)	5
Ένζυμο BstX	2
Τελικός όγκος	50

2.2.2.3 Κλωνοποίηση *sgRNA* στον φορέα *pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI) EF1Alpha-Puro-T2A-BFP*

Για την παρασκευή του Annealing Buffer:

Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
1M Tris pH 8.0	10mM	10

5M NaCl	50mM	10
0,5M EDTA pH 8.0	0,5M	2
H ₂ O		978
Τελικός όγκος		1000

Για την ένωση των δυο oligos (sense+antisense) χρειάζονται 2μl sense oligo(100μM) +2μl antisense oligo(100μM) + 96μl Annealing Buffer.

Βράσιμο του μείγματος σε νερό για 5 min το μείγμα να βράσει σε νερό για 5 min.

Επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την αντίδραση σύνδεσης του oligo με τον φορέα pLV-U6-gRNA diMS2 (BlnI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP:

	pLV-U6-sgRNA-diMS2 dig self-ligation	pLV-U6-sgRNA-diMS2 dig-sgRNAs ligation
Annealed sgRNAs	-	4 μl
pLV-U6-sgRNA-diMS2	2 μl	2 μl
dig		
T4 DNA ligase Buffer	2 μl	2 μl
T4 DNA ligase	1 μl	1 μl
H ₂ O	15 μl	11 μl
Συνολικός όγκος	20μl	20μl

Overnight επώαση στους 16°C (Konermann, 2015).

2.2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την επιβεβαίωση εισαγωγής των sgRNAs στον φορέα pLV-U6-gRNA diMS2 (BlnI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP

Έγινε αραιώση(1:10) των δειγμάτων που προέκυψαν από τα minis και με βάση τα αραιωμένα πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικές PCR με εκκινητές pSiCOR_loxP_F/sgRNA(1-1/1-2/3-1/3-2/3-3/3-4) R που ενισχύουν ένα τμήμα 150 ζεύγη βάσεων και με εκκινητές sgRNA(1-1/1-2/3-1/3-2/3-3/3-4) F/ pLVU6 R.

Τελικός όγκος αντίδρασης	30 μl
dNTPs	0,5 μl
Εκκινητές (R&F)	2 μl
Template	1 μl
H₂O	23,2 μl
Kapa Taq	0,3 μl
10X Buffer	3 μl

Στα προϊόντα της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2%, 250ml TBE, 140V. Ως δείκτη μοριακών μεγεθών χρησιμοποιήθηκε ο Ladder 1kb(Biolabs)

2.2.2.5 Πέψη του πλασμιδίου pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1

Πραγματοποιήθηκε ενζυμική πέψη του πλασμιδίου με το PvuI της εταιρείας Biolabs σε 6 αντιδράσεις συνολικού όγκου 50μl.

Stock Concentration	Volume (μl)
10X 3.1 Buffer (Biolabs)	5
Ένζυμο PvuI (Biolabs)	2
Πλασμίδιο pPuro_dCas9-VP64... (1,6γ/λ midi)	1,6
H ₂ O	41,4
Τελικός όγκος	50

Η αντίδραση αυτή διαρκεί 5 ώρες και γίνεται σε υδατόλουτρο 37°C. Στις 3 ώρες χρησιμοποιούμε 5 μl από την αντίδραση σε 1% gel αγαρόζης με 200ml TBE 0,5X για την επιβεβαίωση της πέψης από το ένζυμο. Ταυτόχρονα έγινε και προσθήκη 1μl PvuI σε κάθε αντίδραση και επώαση στο υδατόλουτρο έως το πέρας των 5 ωρών. Αφού περάσουν οι συνολικές 5 ώρες έγινε ηλεκτροφόρηση σε 1% gel αγαρόζης 250ml TBE 0,5X στο οποίο ακολούθησε gel extraction σύμφωνα με το kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Σε κάθε tube έγινε προσθήκη 20μl Elution Buffer στο τέλος του καθαρισμού.

2.2.2.6 Κατασκευή καμπύλης τοξικότητας κυττάρων στην πουρομυκίνη

Χρησιμοποιήθηκαν δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές MKN45, KATOIII με σκοπό την έκθεση τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού πουρομυκίνη (συγκέντρωση stock 10mg/ml). Για κάθε κυτταρική σειρά έγινε θρυψινοποίηση με βάση την παρακάτω διαδικασία:

Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού RPMI από φλάσκες 75cm². Προσθήκη 2,5ml θρυψίνης διαλυμένη σε PBS (Phosphate buffered saline).

Ήπια ανακίνηση της φλάσκας. Απομάκρυνση της θρυψίνης. Προσθήκη 2,5ml θρυψίνης. Επώαση ~5min σε επωαστήρα 37°C. Προσθήκη 2,5ml RPMI. Έντονο πιπετάρισμα για να σπάσουν οι δεσμοί μεταξύ των κυτταρικών συσσωματωμάτων. Μεταφορά 4ml σε νέο falcon.

Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα κύτταρα με τη πλάκα Neubauer. Από τα σπασμένα κύτταρα τα 10μl προστίθενται σε ένα διάλυμα 90μl Trypan Blue. Από το μείγμα κυττάρων και Trypan Blue συνολικού όγκου 100μl, τα 10μl τοποθετούνται στην πλάκα μέτρησης Neubauer.

Προσθήκη 50.000 κύτταρα στις θέσεις του 12-well plate, ενώ 30.000 κύτταρα MKN45 στις θέσεις του 6-well plate και θρεπτικό υλικό RPMI. Επώαση σε θάλαμο στους 37°C. Την επόμενη μέρα γίνεται προσθήκη πουρομυκίνης σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (2,4 μg/ml, 1,2 μg/ml, 0,6 μg/ml) στα ανεπτυγμένα κύτταρα στο 12-well plate, ενώ στο 6-well plate ελέγχθηκε η συμπεριφορά των κυττάρων και σε συγκέντρωση πουρομυκίνης 5 μg/ml.

Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας στον οποίο δεν έγινε προσθήκη αντιβιοτικού. Ακολούθησε επώαση στους 37°C. Μετά από 48 ώρες γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, προσθήκη 3ml χρωστικής Coomassie Blue, επώαση για 4 λεπτά, αφαίρεση της χρωστικής, ξέπλυμα του πιάτου με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα του πιάτου.

2.2.2.7 Διαμόλυνση κυττάρων MKN45 & HFE45 με το pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1 μέσω λιποφεκταμίνης.

Για την γενετική τροποποίηση των MKN45 & HFE45 κυττάρων έγινε θρυψινοποίηση κυττάρων που αναπτύσσονταν σε φλάσκα 75cm² σε θρεπτικό υλικό RPMI με confluency 90%. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν 2,5ml τρυψίνης διαλυμένης σε διάλυμα PBS και 2,5ml RPMI για κάθε κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα στη συνέχεια, μετρήθηκαν με την πλάκα Neubauer με την ίδια διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω. Ως μέσο εισόδου του πλασμιδίου στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για κάθε κυτταρική σειρά ετοιμάστηκαν δύο μεγάλα τρυβλία σύμφωνα με τις πληροφορίες του πίνακα:

	1 ^ο τρυβλίο (1/3)	2 ^ο τρυβλίο (2/3)
(MKN45/HFE45)/Lipofectamin/Plasmid (ml)	2	4
RPMI (ml)	23	21
Σύνολο (ml)	25	25

Επώαση των τρυβλίων στους 37°C.

Την επόμενη μέρα έγινε προσθήκη 2,5 μg/ml πουρομυκίνης σε MKN45 & HFE45

2.2.2.8 Απομόνωση RNA

Έγινε απομόνωση RNA σε 14 κυτταρικές σειρές MKN45 που είχαν τροποποιηθεί γενετικά με την προσθήκη του πλασμιδίου pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1 σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Προσθήκη 1000μl TRI, κατευθείαν στα κύτταρα. Αναμονή 1' σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και μεταφορά το δείγμα σε πάγο.

Προσθήκη 200μL χλωροφόρμιο και πολύ καλό vortex για 30 λεπτά

Φυγοκέντρηση σε 4°C, 14.000rpm για 5 λεπτά

Μεταφορά του υπερκλειμένου, με 1000αρα πιπέτα ρυθμισμένη στα 550, σε δεύτερο tube 1,5ml

Προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης, ανακίνηση με το χέρι 1-2 φορές

Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά

Φυγοκέντρηση σε 4° C.14.000 rpm για 15 λεπτά

Απόρριψη του υπερκλειμένου και προσθήκη 500μL 70% κρύαιθανόλη, vortex για να ξεπλυθεί η πελέτα

Φυγοκέντρηση σε 4°C, 14.000 rpm για 5 λεπτά

Απομάκρυνση του υπερκλειμένου, επώαση για 10-15 λεπτά στον πάγο με ανοικτό καπάκι να στεγνώσει τελείως

Προσθήκη 25μL RNase free H₂O, θέρμανση του δείγματος στους 50°C για 3 λεπτά και μετά αμέσως vortex, πάγο και -80C.

2.2.2.9 Εφαρμογή DNase

Για κάθε δείγμα ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μl που περιλαμβάνουν:

10x buffer	3μl
DNase I	2μL
RNase out	1μl
Δείγμα νουκλεϊκών οξέων	10μl
H₂O	5μl

Σύντομο vortex και φυγοκέντρηση

Επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα.

Προσθήκη 40 μl sodium Acetate RNA grade 3M pH 5.6 και 310 μl ddH₂O (WFI)

Προσθήκη 400 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο, σε κάθε δείγμα και κάνω vortex για 30''-1'

Φυγοκέντρηση σε 4°C, 14.000 rpm, 5 λεπτά

Μεταφορά του υπερκλειμένου, με 1000αρα πιπέτα ρυθμισμένη στα , σε δεύτερο tube 1,5ml

Προσθήκη 1000 μl 100 % ice cold EtOH, ανακινώ 4-5 φορές και αποθήκευση στους - 80°C τουλάχιστον για 1 ώρα

Φυγοκέντρηση τα δείγματα για 30 λεπτά, 14.000 rpm, 4 C

Αφαίρεση όλου του υπερκλειμένου αποφεύγοντας την διατάραξη της πελέτας

Προσθήκη 500 μl 70 % ice cold EtOH (παρασκευασμένη με WFI)

Φυγοκέντρηση σε 4°C, 14.000 rpm, 5 λεπτά

Απομάκρυνση του υπερκλειμένου, επώαση για 10-15 λεπτά στον πάγκο με ανοικτό καπάκι να στεγνώσει τελείως

Επαναδιάλυση με WFI στα 20-30 μl και επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί έντονο vortex για 1 λεπτό, spin.

Αποθήκευση των δειγμάτων στους - 80°C.

2.2.2.10 cDNA synthesis

Αραίωση των δειγμάτων σε συνολικό όγκο 10μl όπου θα περιέχονται τελικά 1000ng RNA. Σε κάθε αραιωμένο δείγμα έγινε προσθήκη 2 μl από random hexamers. Επίσης, έγινε προσθήκη 1 μl από 10mM dNTPs και το μίγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 65°C για 5 λεπτά (συνολική ποσότητα 10 μl στο tube). Για κάθε δείγμα ετοιμάζεται ένα μίγμα:

5x Buffer	4 μl.
100 mM DTT	2 μl
Rnase out	1 μl
MMLV	1 μl

Vortex, spin του μίγματος και προσθήκη 8μl σε κάθε δείγμα RNA. Επώαση σε υδατόλουτρο 37°C για 2 ώρες. Μετά τις 2 ώρες έγινε προσθήκη 380μl ddH₂O και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

2.2.2.11 Ποσοτική PCR (qPCR)

Πραγματοποιήθηκε qPCR με ειδικούς εκκινητές για 4 διαφορετικούς στόχους (dCas9, VP64, p65) με την χρήση SYBR green για την ποσοτικοποίηση του DNA. Τα δείγματα DNA που ορίστηκαν ως υποστρώματα προέρχονταν από κυτταρικές σειρές MKN45 & HFE45 οι οποίες είχαν επιβιώσει από την γενετική τροποποίηση και την προσθήκη

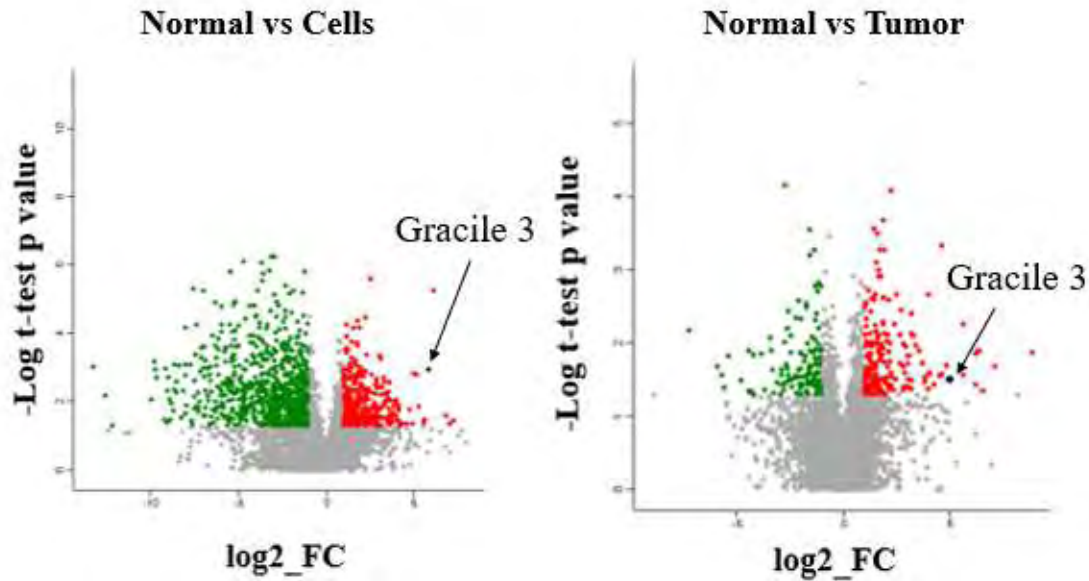
πουρομυκίνης. Συγκεκριμένα 14 κλώνοι ΜΚΝ45 (σειρά ΜDCA) και 12 κλώνοι ΗFE45 (σειρά ΗFDCA) εξετάστηκαν για την έκφραση των παραπάνω παραγόντων. Οι ίδιες συνθήκες ακολουθήθηκαν για την πραγματοποίηση qPCR έναντι των στόχων Gracile3, GAPDH, RPLP1 για την ανίχνευση τους στην σταθερή κυτταρική σειρά HdC10 έπειτα από την διαμόλυνση της με λεντιούς που φέρουν τα 4 sgRNAs. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Bio-Rad CFX 3.1, ενώ τα διαγράμματα με το Microsoft Excel.

10X SYBR	10 μl
Εκκινητές	2 μl
Δείγμα	4 μl
H₂O	4 μl
σύνολο	20 μl

3. Αποτελέσματα

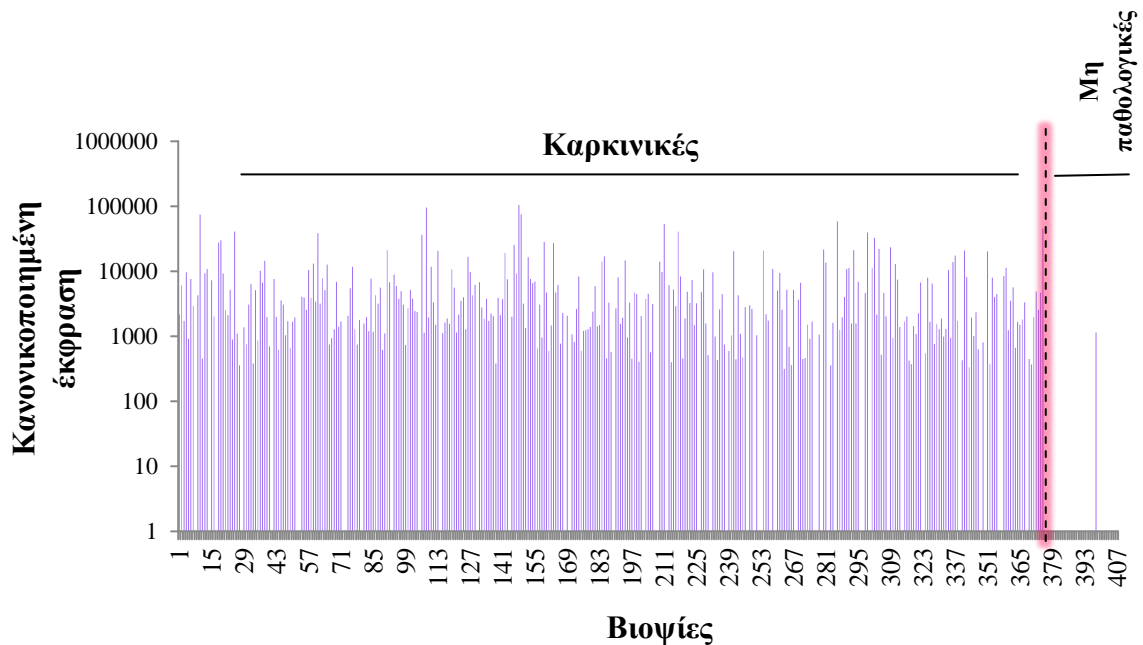
3.1 Πρότυπα μεταγραφής του *Gracile 3* σύμφωνα με μεταγραφομικές αναλύσεις

Για μια πρώτη εκτίμηση της έκφρασης του *Gracile3* έγινε μεταγραφομική ανάλυση σε δεδομένα RNA-seq καρκινικών σειρών στομάχου αλλά και φυσιολογικών και καρκινικών βιοψιών από ασθενείς. Έχοντας αυτά τα δεδομένα έγινε σύγκριση του προφίλ έκφρασης ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα από φυσιολογικούς ιστούς και αντίστοιχα ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές και στα δείγματα από καρκινικούς ιστούς. Τα παρακάτω volcano plots απεικονίζουν τον διαχωρισμό της γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα σε δύο συνθήκες ανάλογα και με την στατιστική σημαντικότητα. Στους άξονες διακρίνονται το \log_2_FC ή αλλιώς το εύρος αλλαγής που αφορά την διαφορά στην έκφραση του ίδιο γονιδίου στη συνθήκη υπό εξέταση σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα (φυσιολογικός ιστός). Με βάση αυτή την παράμετρο επιλέγονται τα γονίδια με τιμές εύρους αλλαγής πάνω από +1 (όταν η έκφραση του γονιδίου είναι αυξημένη στον καρκίνο σε σχέση με τον μάρτυρα) και χαμηλότερες από -1 (όταν η έκφραση του γονιδίου είναι χαμηλότερη στον καρκίνο σε σχέση με τον μάρτυρα). Στον y άξονα τα γονίδια κατατάσσονται με βάση την στατιστική σημαντικότητα αυτής της αλλαγής της γονιδιακής έκφρασης η οποία εκφράζεται σε λογαριθμική κλίμακα. Όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή του $-\text{Log } t\text{-test } p \text{ value}$, τόσο πιο αξιόπιστη θεωρούμε την αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση. Τιμές γονιδιακής έκφρασης $> \pm 1,3$ (αντιστοιχεί $p\text{value} < 0.05$) ορίζονται ως στατιστικώς σημαντικές και θεωρείται ότι οι αντίστοιχες μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης δεν οφείλονται σε τυχαίο γεγονός. Στα διαγράμματα κάθε κουκίδα αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο από την ανάλυση RNA-seq, ενώ με διαφορετικό χρώμα απεικονίζεται η στατιστικώς σημαντική αυξορρύθμιση (κόκκινο χρώμα) του ή η στατιστικώς σημαντική μειορρύθμιση (πράσινο χρώμα) του ανάλογα με την συνθήκη μάρτυρα. Με γκρι φαίνονται τα γονίδια που με βάση τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ή/και του εύρους αλλαγής δε θεωρούνται αξιόπιστα, ώστε να στοιχειοθετείται σημαντική αλλαγή στην έκφραση τους ανάμεσα στις δυο συνθήκες. Και στις δυο αναλύσεις ως μάρτυρας έχουν θεωρηθεί οι φυσιολογικοί ιστοί στομάχου και με μαύρη κουκίδα επισημαίνεται το *Gracile 3*. Στην πρώτη περίπτωση (κυτταρικές σειρές) το *Gracile 3* εντοπίζεται στα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα, δηλαδή στις καρκινικές σειρές εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, με σχετικά υψηλό εύρος αλλαγής και στατιστική σημαντικότητα $> 1,3$. Αναφορικά με τις βιοψίες ασθενών, το long non-coding RNA *Gracile 3* εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και σε καρκινικούς ιστούς στομάχου σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς με υψηλό εύρος αλλαγής και με συγκριτικά χαμηλή στατιστική σημαντικότητα που παρόλα αυτά και πάλι κατατάσσεται στα αξιόπιστα αποτελέσματα του πειράματος (**Εικ. 33**). Η σημαντική ένδειξη που δίνουν τα volcano plots, ότι το συγκεκριμένο μετάγραφο υπέρ-εκφράζεται περισσότερο από 40 φορές και σε καρκινικές σειρές, καθώς και σε καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς, οδηγεί και στην ανάγκη της μελέτης της δράσης του μεταγράφου στον καρκίνο του στομάχου.



Εικόνα 33: Διαγράμματα volcano με σταθερή συνθήκη τους φυσιολογικούς ιστούς του στομάχου και συνθήκη υπό μελέτη τις καρκινικές σειρές(αριστερά) και τους καρκινικούς ιστούς στομάχου(δεξιά). Με κόκκινο απεικονίζονται τα αυξορυθμιζόμενα γονίδια και με πράσινο να μειορυθμιζόμενα γονίδια σε σύγκριση με τη συνθήκη μάρτυρα. Η μαύρη κουκίδα στην περιοχή των αυξορυθμιζομένων γονιδίων απεικονίζει το Gracile3. Η τιμή p-value(στατιστική σημαντικότητα) έχει προκύψει από t-test ανάλυση.

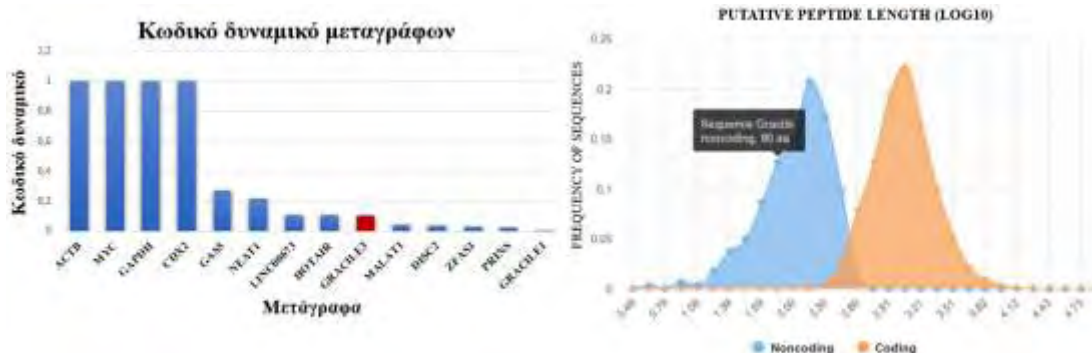
Η έκφραση του Gracile 3 ελέγχθηκε και σε άτομα που έπασχαν από καρκίνο του στομάχου και συγκεκριμένα σε βιοψίες τόσο στομάχου όσο και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού . Πιο συγκεκριμένα, έλεγχος των κανονικοποιημένων επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου έγινε σε 370 βιοψίες στομάχου ασθενών, 40 από τους οποίους απομονώθηκε παρακείμενος ιστός για τον έλεγχο έκφρασης του Gracile 3 (**Εικ. 34**). Η μεταγραφομική ανάλυση έδειξε σημαντική αύξηση της έκφρασης του Gracile 3 σε καρκινικά δείγματα σε σχέση με τους μη παθολογικούς ιστούς. Ακόμα, σημαντικό για την επιλογή του Gracile 3 ως στόχο στην παρούσα πτυχιακή εργασία αποτέλεσε το γεγονός ότι τα 370 δείγματα προέρχονταν από άτομα που κάλυπταν ένα μεγάλο φάσμα ηλικιών, σταδίων του καρκίνου, φύλου και εθνικότητας, οπότε η αυξημένη έκφραση του είναι καθολική και ανεξάρτητη από το στάδιο της νόσου ή το προφίλ του ασθενούς.



Εικόνα 34: Κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης (y άξονας) σε 370 καρκινικές βιοψίες στομάχου και 40 μη παθολογικές παρακείμενες (x άξονας).

3.2 Εκτίμηση κωδικοποιητικού δυναμικού

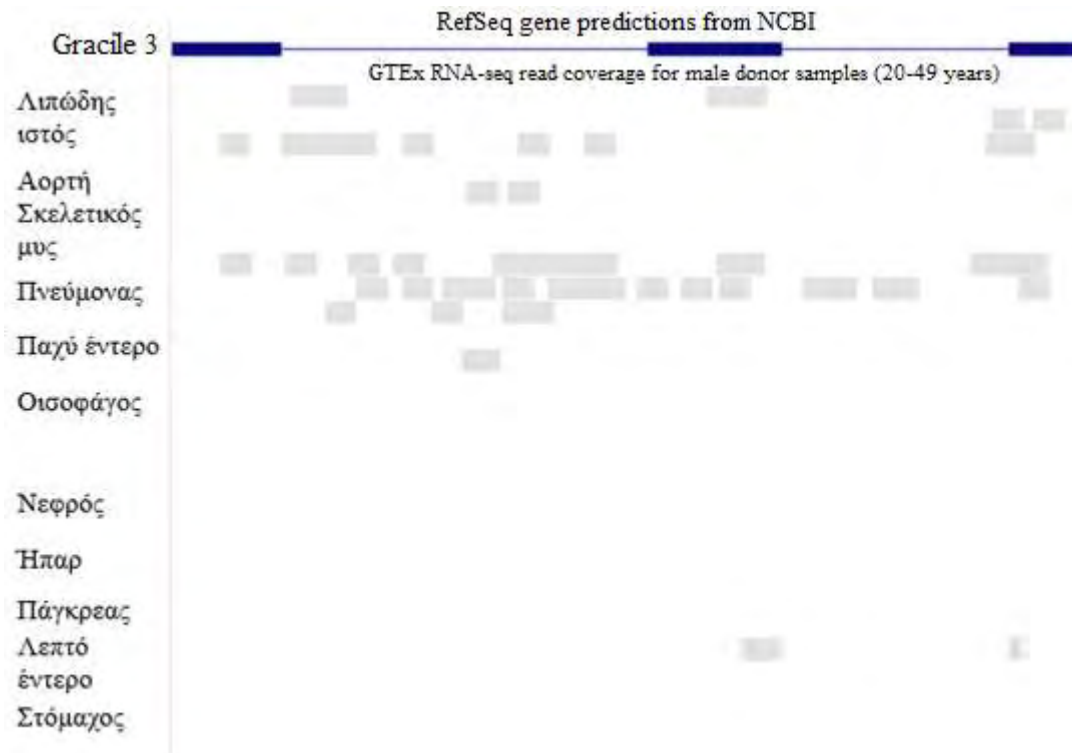
Σημαντικό βήμα για τον χαρακτηρισμό του γονιδίου είναι να επιβεβαιωθεί ότι το GRACILE3 ανήκει στην ομάδα των Long non-coding RNAs, ότι δηλαδή το μετάγραφο του δεν οδηγεί στην παραγωγή κάποιας λειτουργικής πρωτεΐνης. Με την εισαγωγή της αλληλουχίας του RNA του γονιδίου GRACILE3 στο πρόγραμμα CPC2 είναι δυνατή η ακριβής πρόβλεψη του κωδικού δυναμικού του αντίστοιχου μεταγράφου. Το CPC2 λαμβάνει υπόψιν χαρακτηριστικά των κωδικοποιητικών γονιδίων, όπως το μήκος και την ακεραιότητα του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, καθώς και τα κωδικόνια που φαίνεται να έχουν προτίμηση σε κωδικοποιητικά γονίδια. Το πρόγραμμα εξαγάγει διάφορες πληροφορίες για την εισαχθείσα αλληλουχία RNA, όπως την πιθανότητα να αποτελεί κωδικοποιητικό γονίδιο με τιμές από 0-1, το μήκος του πεπτιδίου που θα κωδικοποιούσε, το ισοηλεκτρικό σημείο (pI), την ακεραιότητα του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF integrity) και το Fickett score (Kang, 2017). Παράλληλα, για λόγους σύγκρισης έγινε η ίδια ανάλυση και για γονίδια που παράγουν γνωστές πρωτεΐνες, όπως τα ACTB, MYC, GAPDH, CDX2, καθώς και για γνωστά, πειραματικά επιβεβαιωμένα μη κωδικοποιητικά γονίδια, όπως τα GAS5, NEAT1, LINC00673, HOTAIR, MALAT1, DISC2, ZFAS1, PRINS, GRACILE1. Στο αριστερό διάγραμμα απεικονίζεται το κωδικό δυναμικό στον y άξονα, για κάθε μετάγραφο του x άξονα. Με βάση αυτό, το Gracile3 χαρακτηρίζεται ως μη κωδικό μετάγραφο με πιθανότητα μόλις 10% να κωδικοποιεί κάποια πρωτεΐνη, δηλαδή πιθανότητα ίση ή μικρότερη από πολλά γνωστά και πειραματικά επιβεβαιωμένα lncRNA. Στην δεξιά εικόνα ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων από τα οποία αποτελείται το κωδικοποιούμενο πεπτίδιο, το Gracile 3 κατατάσσεται στα μη κώδικα γονίδια, ενώ το υποτιθέμενο πεπτίδιο θα αποτελούνταν από 90 αμινοξέα (Εικ. 35).



Εικόνα 35: Ανάλυση κωδικοποιητικού δυναμικού μεταγράφων όπου στον x άξονα τα μετάγραφα και στον y άξονα η πιθανότητα τους να κωδικοποιούν για κάποιο πεπτίδιο (Αριστερό διάγραμμα). Κατανομή των κωδικών (πορτοκαλί) και μη κωδικοποιητικών (μπλε) γονιδίων ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων του πεπτιδίου που κωδικοποιούν (Δεξί διάγραμμα).

3.3 Ανάλυση έκφρασης σε ανθρώπινους ιστούς

Η απόδειξη ότι η έκφραση Gracile3 αυξάνει σημαντικά στον καρκίνο του στομάχου δεν είναι αρκετή για να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός διαγνωστικός δείκτης ή θεραπευτικός στόχος για την καταπολέμηση του καρκίνου. Πιθανή έκφραση του σε φυσιολογικό στόμαχο ή σε άλλον ανθρώπινο ιστό σε φυσιολογική ή σε κατάσταση καρκίνου εμποδίζει την εκμετάλλευση του για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς. Γι' αυτό έγινε μια ανάλυση έκφρασης του Gracile3 σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ιστούς χρησιμοποιώντας τον φυλλομετρητή UCSC παράλληλα με δεδομένα RNA-seq. Με βάση την παρακάτω εικόνα (Εικ. 36) από τον UCSC φαίνεται η δομή του γονιδίου Gracile 3 όπως έχει χαρακτηριστεί από την GENCODE και το ποσοστό συντήρησης των αλληλουχιών του γονιδίου ανάμεσα σε 100 διαφορετικά σπονδυλωτά. Ακόμα, απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου από RNA-seq δεδομένα σε ιστούς όπως ο λιπώδης, μυϊκός και όργανα όπως ο στόμαχος, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο, πνεύμονες και συκώτι ατόμων ποικίλων ηλικιών. Μετά από κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης μόνο το δείγμα του σπλαχνικού λιπώδους ιστού δείχνει πιο υψηλές τιμές έκφρασης, όμως οι περιοχές αυτές δεν συμπίπτουν με τις κωδικές περιοχές του γονιδίου και άρα δεν αντιστοιχούν στο μετάγραφο του Gracile3. Παρόλο που στην εικόνα φαίνονται ενδεικτικά κάποια από τα δείγματα της ανάλυσης RNA-seq, εξετάστηκαν συνολικά 49 διαφορετικοί ιστοί από πολλούς διαφορετικούς δότες και ηλικίες για την επιβεβαίωση της απουσίας έκφρασης του Gracile3 και δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική έκφραση στους ιστούς αυτούς.



Εικόνα 36: Έκφραση του μεταγράφου *Gracile3* σε φυσιολογικούς ιστούς. Φαίνεται η συντήρηση της αλληλουχίας σε σύγκριση με 100 σπονδυλωτά (το σκούρο χρώμα αντιστοιχεί σε συντηρημένες περιοχές), η δομή του γονιδίου (με λεπτή πράσινη γραμμή τα ιντρόνια, με πιο έντονη πράσινο τα εξώνια) και τα επίπεδα έκφρασης σε διάφορους ιστούς από δότες που καλύπτουν ένα ικανοποιητικό εύρος ηλικιών.

3.4 Ανάλυση συνταινίας-έκφρασης

Μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για την περιγραφή του ρόλου του *Gracile3* στον καρκίνο του στομάχου δεν περιλαμβάνει μόνο *ex vivo* πειράματα σε κυτταρικές σειρές. Το επόμενο βήμα είναι *in vivo* πειράματα σε ζωντανό ιστό, ωστόσο αυτά δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ανθρώπινο οργανισμό. Βασικός οργανισμός που αποτελεί μοντέλο διάφορων ασθενειών στον άνθρωπο είναι ο ποντικός. Απαραίτητη προϋπόθεση για την *in vivo* μελέτη του *Gracile3* στον καρκίνο του στομάχου είναι η ύπαρξη ορθόλογου γονιδίου στον ποντικό που επιβεβαιώνεται μέσω του φυλλομετρητή WashU. Σύμφωνα με την έκδοση 19 του ανθρώπινου γονιδιώματος, στην συνταινική περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου *Gracile 3* εντοπίζεται ένα γονίδιο το οποίο δεν εκφράζεται όμως σε κανένα φυσιολογικό ιστό στον ποντικό. Πιθανότατα πρόκειται για το μη κωδικοποιητικό μετάγραφο *Gracile3* το οποίο λόγω της ειδο-ειδικότητας του είναι προϊόν της εξέλιξης ίσως κάποιου ψευδογονιδίου (**Εικ. 37**).

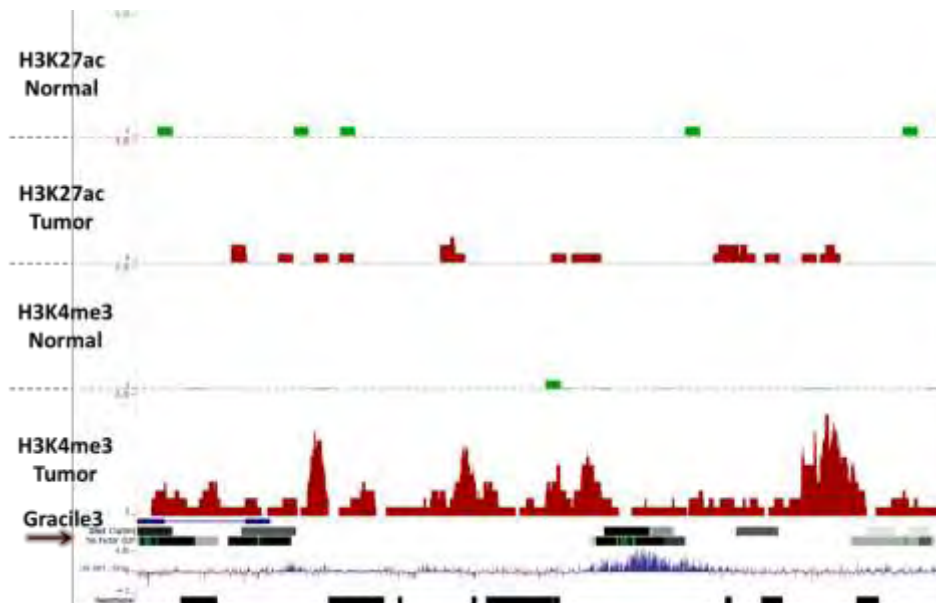


Εικόνα 37: Ανάλυση συνταινιάς- έκφρασης του *Gracile3* στον ποντικό με την χρήση του φυλλομετρητή WashU. Σύγκριση του γενετικού τόπου του *Gracile3* μεταξύ του ανθρώπινου γονιδιώματος (hg19 εμφανίζεται κάτω) και του ποντικού (mm9) . Η θέση εντοπισμού του *Gracile3* ορίζεται από το διακεκομμένο πλαίσιο και διακρίνεται η έκφραση του *Gracile3* καθώς και γειτονικών γονιδίων του σε φυσιολογικούς ιστούς στον ποντικό. Η έκφραση είναι μη ανιχνεύσιμη αλλά θα μπορούσε να στοιχειοθετήσει ένα πιθανό ορθόλογο γονίδιο του *Gracile3* με καρκινοειδική έκφραση όπως και στον άνθρωπο.

3.5 Ανάλυση δεδομένων ChiP-seq για εύρεση ρυθμιστικών στοιχείων του *Gracile3*

Για να είναι επιτυχής η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου με το σύστημα CRISPR-a, το sgRNA πρέπει να στοχεύει την περιοχή του υποκινητή του γονιδίου όπου φυσιολογικά προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του. Ο υποκινητής αποτελεί μια περιοχή ανοδικά του γονιδίου και περιέχει διάφορα μοτίβα αλληλουχιών μέσω των οποίων αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες και προσελκύει την RNA πολυμεράση. Η περιοχή αυτή συνεπώς, πρέπει να είναι προσβάσιμη σε αυτούς τους παράγοντες. Αυτό σημαίνει ότι ο υποκινητής εντοπίζεται σε ευχρωματινική περιοχή, δηλαδή η χρωματίνη σε αυτό το σημείο δεν είναι συμπυκνωμένη. Ο βαθμός συμπύκνωσης της χρωματίνης ελέγχεται από επιγενετικές τροποποιήσεις στις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων. Η βασική επιγενετική τροποποίηση που επάγει χαλάρωση στη δομή της χρωματίνης σε αυτή την περιοχή είναι η H3K4me3 (τρι-μεθυλίωση στη λυσίνη 4 της ιστόνης 3) και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αλληλεπίδρασης του αρνητικού φορτίου του DNA και του θετικού φορτίου των ιστονών, έτσι ώστε να επιτρέπεται η πρόσβαση από τους μεταγραφικούς παράγοντες. Η ανίχνευση των τροποποιήσεων που χαρακτηρίζουν τις περιοχές των υποκινητών γίνεται με την ανοσο-κατακρήμιση χρωματίνης χρησιμοποιώντας ως δόλωμα αντισώματα έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K4me3. Παράλληλα χρησιμοποιείται και αντίσωμα έναντι της τροποποίησης H3K27ac (ακετυλίωση στη

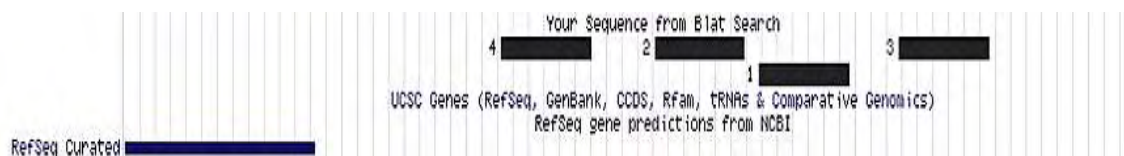
λυσίνη 27 της ιστόνης 3) που αντικατοπτρίζει τόσο περιοχές υποκινητών όσο και περιοχές ενισχυτών. Στην διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης εξετάστηκαν επίσης δείγματα από ένα υγιή άτομο (με πράσινο χρώμα) και από ένα άτομο που έπασχε από καρκίνο του στομάχου (με κόκκινο χρώμα) και σε κάθε άτομο εξετάστηκε τόσο η παρουσία του υποκινητή όσο η παρουσία του ενισχυτή. Υπενθυμίζεται ότι με βάση τις προηγούμενες αναλύσεις σχετικά με τα επίπεδα της μεταγραφής του *Gracile3*, σε φυσιολογικές καταστάσεις το μετάγραφο υπο-εκφράζεται σε σχέση με παθολογικές καταστάσεις καρκίνου του στομάχου. Έτσι, είναι αναμενόμενη αντίστοιχα η έντονη ενεργοποίηση του υποκινητή από μεταγραφικούς παράγοντες σε καρκινικούς ιστούς. Η ενεργή κατάσταση του υποκινητή φαίνεται με το ισχυρό σήμα που δίνει η επιγενετική τροποποίηση H3K4me3 στο δείγμα του ασθενούς ιστού, το οποίο εξαφανίζεται στο δείγμα του υγιούς ατόμου. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη ότι σε αυτή την περιοχή εντοπίζεται ο υποκινητής του γονιδίου, αφού σε φυσιολογική κατάσταση είναι ανενεργός και δεν μεταγράφεται το γονίδιο, ενώ σε παθολογική κατάσταση είναι ενεργός και παράγονται υψηλά επίπεδα του μεταγράφου το οποίο φαίνεται να έχει ρόλο σε αυτή την κατάσταση. Η εξέταση της τροποποίησης H3K27ac στο ίδιο σημείο επιβεβαιώνει την παρουσία του υποκινητή και όχι κάποιου πιθανού ενισχυτή που θα μπορούσε να είναι ενεργός σε παθολογική κατάσταση αλλά να ρυθμίζει κάποιο ανεξάρτητο του *Gracile3* γονίδιο (Εικ. 38).



Εικόνα 38: Αποτελέσματα ανάλυσης *ChIP-seq* στην περιοχή ανοδικά του γενετικού τόπου του *Gracile3* από δεδομένα υγιούς ατόμου (πράσινες μπάρες) και ασθενούς που πάσχει από καρκίνο του στομάχου (κόκκινες μπάρες). Και στα δυο διαφορετικά δείγματα έχει γίνει ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με δυο αντισώματα ειδικά για δυο τροποποιήσεις ιστονών, H3K27ac, H3K4me3.

Για το *Gracile 3* σχεδιάστηκαν 4 single guide RNAs που στοχεύουν στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται το αποτέλεσμα του blat των σχεδιασμένων αλληλουχιών σε σύγκριση με τη θέση που βρίσκονται στο γονιδίωμα. Η μπλε λωρίδα αντιστοιχεί στο γονίδιο του *Gracile3* που έχει προσανατολισμό μεταγραφής 3'→5', ενώ τα μαύρα έντονα ορθογώνια με τους

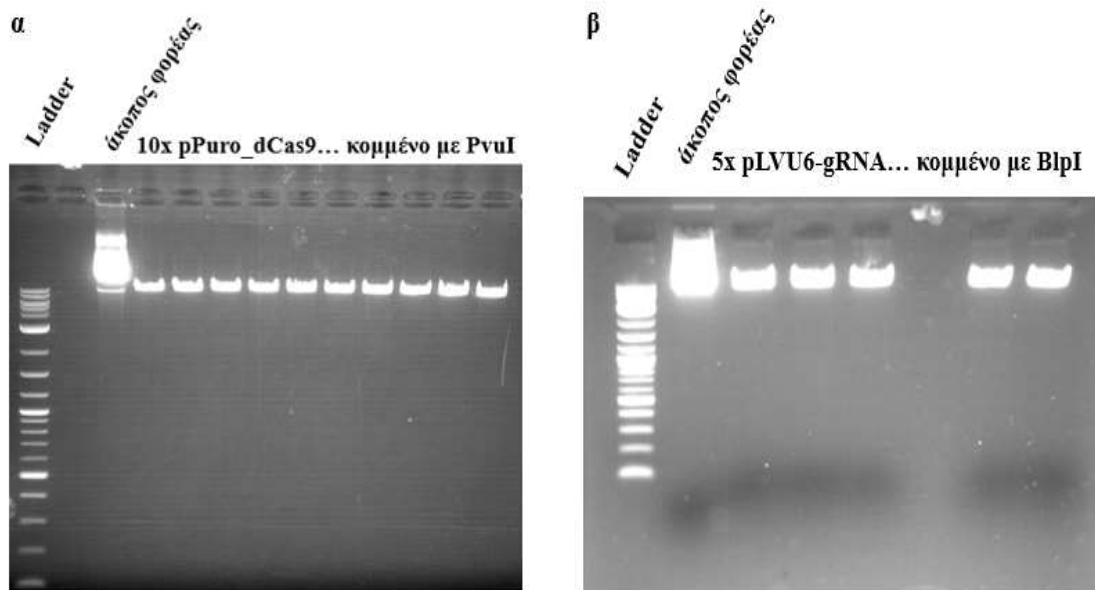
αριθμούς 1,2,3,4 αφορούν τα sgRNAs που φαίνεται ότι εντοπίζονται στην 5' περιοχή του γονιδίου.



Εικόνα 39: Ο εντοπισμός των σχεδιασμένων sgRNAs έναντι του *Gracile 3* συγκριτικά με τον υποκινητή του γονιδίου με βάση τον φιλλομετρική UCSC

3.6 Γραμμοποίηση των φορέων *pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1* & *pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP*

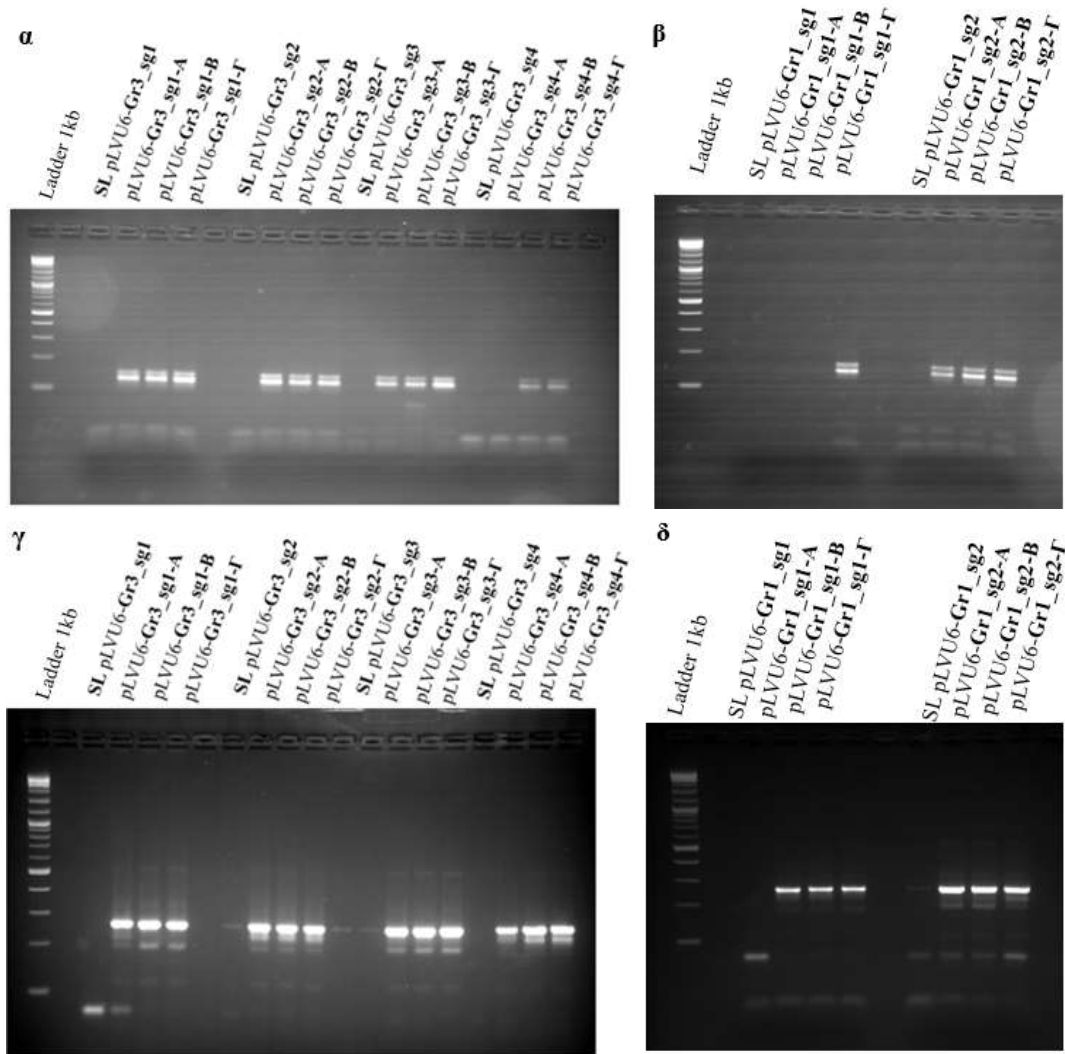
Η δημιουργία ενός συστήματος CRISPR-activation στον καρκίνο του στομάχου προϋποθέτει σε πρώτη φάση τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών καρκινικών σειρών στομάχου που να εκφράζουν όλους τους απαραίτητους τελεστές του συστήματος (π.χ. dCas9, VP64, T2A, βλ. εισαγωγή) και αφού επιλεγθούν οι επιθυμητοί κλώνοι και επιβεβαιωθεί η σταθερή έκφραση των παραγόντων εν συνεχεία να διαμολυνθούν με λεντιούς που να μεταφέρουν το δεύτερο πλασμίδιο, που θα υπερεκφράζει τον κλωνοποιημένο παράγοντα στόχευσης δηλαδή το sgRNA. Ο σταθερός μετασχηματισμός προϋποθέτει πέψη και γραμμοποίηση του πλασμιδίου για να γίνει πιο αποδοτική η ενσωμάτωση του σε τυχαία θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση του φορέα σε περιοχή που δεν επηρεάζεται η έκφραση των σημαντικών παραγόντων για την εφαρμογή του CRISPR-SAM. Το πρώτο πλασμίδιο, *pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1*, κόπηκε με το ένζυμο PvuI με μοναδική αλληλουχία αναγνώρισης (5'CGATCG3') στον φορέα στην περιοχή του γονιδίου ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη. Η δράση του ενζύμου στον φορέα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία 3' προεξεχόντων μονόκλωνων άκρων (κολλώδη άκρα). Στο δεύτερο πλασμίδιο, το *pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP*, πραγματοποιήθηκε διαδοχική πέψη με δυο διαφορετικά ένζυμα περιορισμού με σκοπό την απομάκρυνση ενός τμήματος και την δημιουργία της περιοχής ένθεσης του sgRNA. Στην εικόνα φαίνεται το gel αγαρόζης με την αντίδραση με το πρώτο ένζυμο, BspI, ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Σε κάθε gel αγαρόζης 2% φαίνεται η διαδρομή του δείκτη μοριακού βάρους 1kb (BioLabs) και του άκοπου φορέα ως δείγμα ελέγχου. Το πλασμιδιακό DNA όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται σε τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις: την υπερελικωμένη μορφή, όπου το DNA είναι συμπυκνωμένο και συμπαγές, την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση όπου προκαλούνται μονόκλινα σπασίματα του DNA, και τέλος την γραμμική διαμόρφωση όπου έχουν συμβεί δίκλωνες ρήξεις. Σε ένα gel ηλεκτροφόρησης αυτές οι τρεις διαμορφώσεις διαπερνούν με διαφορετική ευκολία τους πόρους της αγαρόζης, με την υπερελικωμένη να συναντά τους λιγότερους φραγμούς στην κίνηση της, στη συνέχεια ακολουθεί το ευθύγραμμο DNA, ενώ την μικρότερη απόσταση διανύει το ανοιχτό κυκλικό DNA. Στις διαδρομές, στις οποίες το δείγμα έχει κοπεί, η αντίστοιχη μπάνα φαίνεται στο ύψος του μοριακού μεγέθους του αντίστοιχου φορέα (**Εικ. 40**).



Εικόνα 40: Επιβεβαίωση της ένθεσης των sgRNAs στον φορέα pLVU6-gRNA με Ηλεκτροφόρηση gel αγαρόζης 2% (**α**) της πέψης του πλασμιδίου pPuro_dCas9 με PvuI σε 10 ίδιες αντιδράσεις και (**β**) της πέψης του πλασμιδίου pLVU6-gRNA με BspI σε 5 αντιδράσεις. Δείγμα από τις αντιδράσεις λήφθηκε στις 3 ώρες από την έναρξη της πέψης για την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε gel τρέχει επίσης ο δείκτης μοριακού μεγέθους 1kb (BioLabs) και δείγμα ελέγχου φορέα που δεν έχει υποστεί πέψη όπου φαίνονται οι διαφορετικές διαμορφώσεις του, ως μια έντονη λόγω έκθεσης ζώνη συγκριτικά με τις γραμμοποιημένες ζώνες των δειγμάτων.

3.7 Επιβεβαίωση ένθεσης των sgRNAs στον φορέα pLVU6-gRNA

Μετά την διαδοχική πέψη του pLVU6-gRNA και την απομόνωση του κομμένου φορέα πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης με τα τέσσερα διαφορετικά sgRNAs που σχεδιάστηκαν για να στοχεύουν μια ευρεία περιοχή γύρω από τον υποκινητή του Gracile3 καθώς και με τα υπόλοιπα δυο sgRNA που αντιστοιχούν στον υποκινητή του Gracile1 (αναφέρεται αναλυτικά σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία του εργαστηρίου). Τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης μετασχημάτισαν βακτηριακά στελέχη DH5α και για κάθε αντίδραση κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε παράλληλα και μια αντίδραση απουσία ενθέματος ως αρνητικός μάρτυρας (self-ligation δείγμα), ώστε να υπάρχει μια ένδειξη για την συχνότητα της επανασύνδεσης των άκρων του φορέα χωρίς να εισαχθεί το ένθεμα. Από κάθε τρυβλίο καλλιεργήθηκαν ξεχωριστά 3 υποψήφιες αποικίες για την μεταφορά του κλωνοποιημένου πλασμιδίου. Την απομόνωση των πλασμιδίων από τα βακτήρια ακολούθησαν δυο διαγνωστικές αντιδράσεις αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που θα επιβεβαίωναν την επιτυχή ένθεση των sgRNAs στα πλασμίδια. Στην πρώτη PCR, το αποτέλεσμα της οποίας φαίνεται στο gel ηλεκτροφόρησης της **Εικ. 41α**, χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών (1 για κάθε Gracile) που ενισχύουν ένα τμήμα 150 ζεύγη βάσεων, ενώ στην δεύτερη PCR, το αποτέλεσμα της οποίας φαίνεται στο gel ηλεκτροφόρησης της **Εικ. 41β**, χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν ένα τμήμα 250 ζεύγη βάσεων. Με αυτό τον τρόπο, επιβεβαιώθηκε διπλά η κλωνοποίηση των φορέων με τα αντίστοιχα sgRNAs.

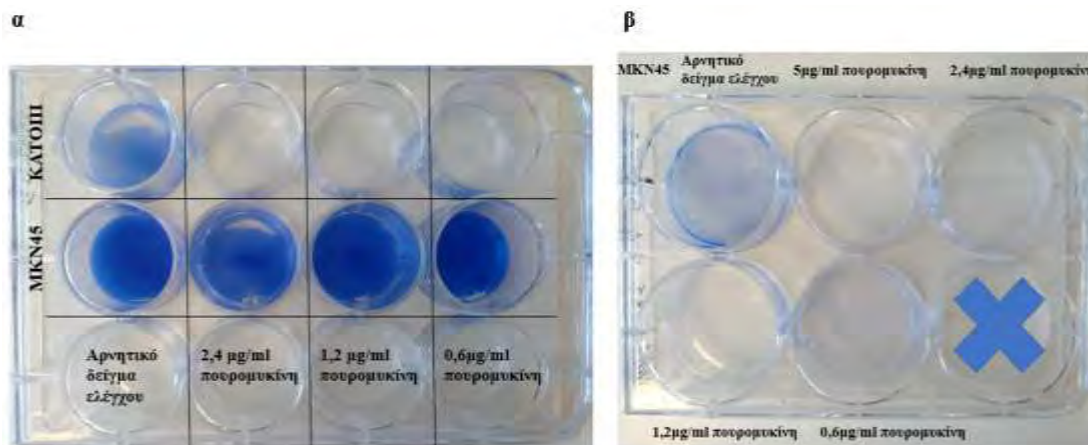


Εικόνα 41: Επιβεβαίωση της ένθεσης των sgRNAs στον φορέα pLVU6-gRNA με ηλεκτροφόρηση gel αгарόζης 1% από PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινήτες (α) pSiCOR_loxP_F/sgRNA(1-1/1-2/3-1/3-2/3-3/3-4)R και (β) sgRNA(1-1/1-2/3-1/3-2/3-3/3-4)F/pLVU6 R. Για κάθε ζεύγος εκκινήτων χρησιμοποιήθηκε αρνητικό δείγμα ελέγχου SL(self-ligation), ενώ σε κάθε gel ηλεκτροφόρησης η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί σε έναν δείκτη μοριακού μεγέθους 1kb(Biolabs).

3.8 Κατασκευή καμπύλης τοξικότητας κυττάρων στην πουρομυκίνη

Βασικό στάδιο για την δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών είναι η επιλογή των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων με την προσθήκη ενός κατάλληλου αντιβιοτικού. Τα κύτταρα που έχουν ενσωματώσει στο γενετικό τους υλικό το πλασμίδιο τηςdCas9 έχουν την δυνατότητα να εκφράζουν όλα τα συστατικά του συστήματος CRISPR-Cas9 που φέρει συμπεριλαμβανομένου του γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι της πουρομυκίνης. Έτσι, μόνο τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα θα είναι ανθεκτικά όταν στο θρεπτικό τους υλικό περιέχεται πουρομυκίνη, ενώ τα υπόλοιπα θα πεθάνουν. Συνήθως το εύρος των συγκεντρώσεων της πουρομυκίνης που είναι τοξικό για τα κύτταρα θηλαστικών είναι 0,5-5μg/ml. Ωστόσο, για κάθε κυτταρική σειρά η ακριβή συγκέντρωση διαφέρει με αποτέλεσμα να έχουμε πολλές ψευδώς θετικές αποικίες λόγω χαμηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικού είτε λίγες αποικίες λόγω πολύ αυστηρών

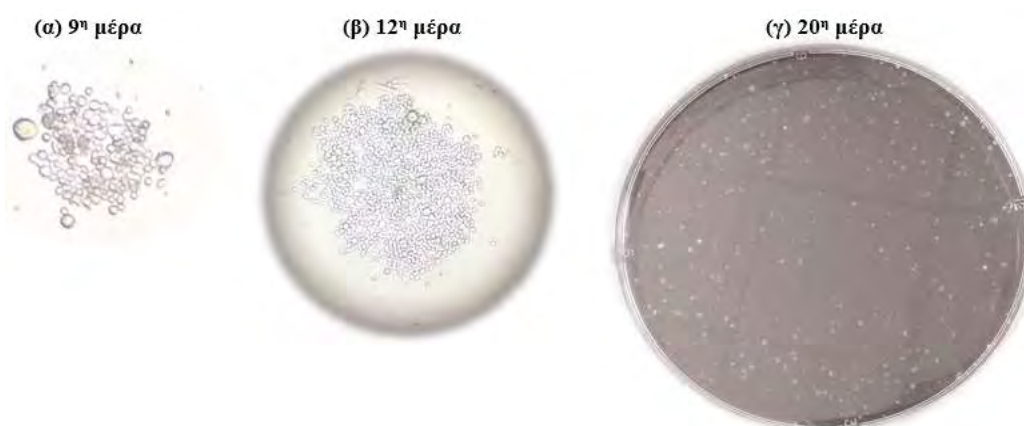
συνθηκών επιλογής . Σε τέτοιου είδους πειράματα πρώτα είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση της κατάλληλης συγκέντρωσης της πουρομυκίνης στην οποία τα κύτταρα δεν επιβιώνουν. Εξετάστηκαν δυο κυτταρικές σειρές θηλαστικών, ΚΑΤΟIII και ΜΚΝ45, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πουρομυκίνης (2,4μg/ml, 1,2 μg/ml, 0,6 μg/ml) σε ένα πιάτο με 12 θέσεις. Παράλληλα, δοκιμάστηκε και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου το οποίο περιλάμβανε τα καλλιεργούμενα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό RPMI απουσία πουρομυκίνης (Εικ. 42α). Δυο ημέρες μετά την προσθήκη της πουρομυκίνης τα κύτταρα που επέζησαν βάφονται με την χρωστική Coomassie blue που αναπτύσσει δεσμούς Van der Waals με τις πρωτεΐνες της επιφάνειας των κυττάρων. Και στις δυο κυτταρικές σειρές στο αρνητικό δείγμα ελέγχου τα ζωντανά κύτταρα φαίνονται με μπλε χρώμα που αντιστοιχεί στην χρωστική Coomassie. Στην περίπτωση των ΚΑΤΟIII κυττάρων σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις πουρομυκίνης τα κύτταρα δεν επιβιώνουν και αυτό φαίνεται από την αισθητή μείωση έως και εξαφάνιση του μπλε χρώματος. Αντίθετα, τα ΜΚΝ45 κύτταρα επιβιώνουν με ή χωρίς την παρουσία πουρομυκίνης στο θρεπτικό τους υλικό. Η επιβίωση των ΜΚΝ45 κυττάρων ανεξάρτητα από την συγκέντρωση πουρομυκίνης οδήγησε σε ένα δεύτερο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ποσότητα κυττάρων ΜΚΝ45 με την παρουσία πουρομυκίνης σε συγκεντρώσεις 5 μg/ml, 2,4 μg/ml, 1,2 μg/ml, 0,6 μg/ml σε ένα πιάτο με 6 θέσεις. Παρομοίως, την δεύτερη μέρα μετά την προσθήκη πουρομυκίνης στο θρεπτικό υλικό τα ζωντανά κύτταρα χρωματίστηκαν μπλε από την χρωστική Coomassie blue. Στην εικόνα 40β φαίνεται χαρακτηριστικά η απουσία μπλε χρώματος στις θέσεις που προστέθηκε πουρομυκίνη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, γεγονός που υποδεικνύει την θανάτωση όλων των κυττάρων υπό την παρουσία όλων των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων πουρομυκίνης.



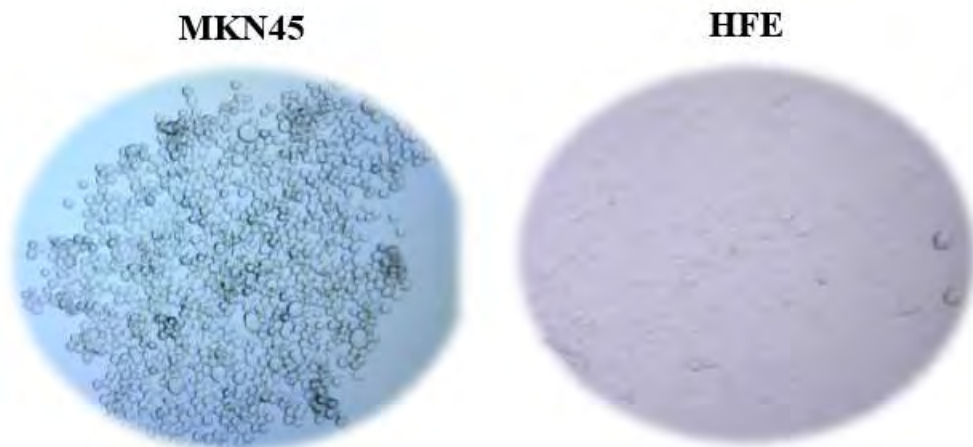
Εικόνα 42: Έλεγχος τοξικότητας κυττάρων ΚΑΤΟIII και ΜΚΝ45 παρουσία πουρομυκίνης. (α) στην πρώτη σειρά του πιάτου έχουν ενοφθαλμιστεί ΚΑΤΟIII κύτταρα χωρίς την παρουσία πουρομυκίνης, με 2,4μg/ml, 1,2μg/ml, 0,6μg/ml συγκέντρωση πουρομυκίνης (από αριστερά προς τα δεξιά της εικόνας), ενώ στην δεύτερη σειρά αναπτύσσονται ΜΚΝ45 κύτταρα με τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. (β) σε πιάτο με 6 θέσεις δοκιμάστηκε η ανθεκτικότητα των ΜΚΝ45 κυττάρων απουσία πουρομυκίνης και σε πουρομυκίνη συγκέντρωσης 5 μg/ml, 2,4 μg/ml, 1,2 μg/ml, 0,6 μg/ml. Η τελευταία θέση του πιάτου είναι κενή. Σε κάθε θέση έχει προστεθεί χρωστική Coomassie blue που προσδίδει το μπλε χρώμα στα ζωντανά κύτταρα.

3.10 Ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων κυττάρων MKN45, HFE45 μετά την προσθήκη πουρομυκίνης

Η εφαρμογή της επιλογής στα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα έγινε 2-3 μέρες μετά την γενετική τροποποίηση και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη τους σε οπτικό μικροσκόπιο. Την 9^η ημέρα μετά την προσθήκη πουρομυκίνης παρατηρήθηκαν MKN45 συσσωματώματα κυττάρων κυκλικού σχήματος των οποίων ο πληθυσμός αυξήθηκε αισθητά την 12^η ημέρα. Τα κύτταρα που φαίνονται αποκομμένα από την επιφάνεια του τρυβλίου είναι νεκρά κύτταρα που επιπλέουν στο θρεπτικό υλικό. Την 20^η ημέρα αυτές οι μάζες κυττάρων έχουν αυξηθεί τόσο ώστε οι αποικίες διακρίνονται με γυμνό μάτι (**Εικ. 43**). Σε αυτό το σημείο έγινε και η συλλογή ενός αριθμού κλώνων για την μεμονωμένη ανάπτυξη τους η οποία απαιτείται για την περαιτέρω αύξηση του αριθμού των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων και την μεγαλύτερη ποσότητα RNA που απομονώθηκε στη συνέχεια από αυτά προκειμένου να επιβεβαιωθεί πειραματικά η υπερέκφραση των τελεστών του συστήματος CRISPR-activation. Στην **εικόνα 44** φαίνονται σε μικροσκόπιο ένας κλώνος MKN45 κυττάρων και αντίστοιχα ένας κλώνος HFE45 κυττάρων που αναπτύσσονται μεμονωμένα. Τα φυσιολογικά κύτταρα επιθηλίου του στομάχου μορφολογικά είναι πεπλατυσμένα και μοιάζουν με μακριά ινίδια. Η ανάπτυξη MKN45 και HFE45 κλώνων μετά από περιορισμό της ανάπτυξης με την δράση του αντιβιοτικού υποδεικνύει την επιτυχή εισαγωγή του πλασμιδίου στα κύτταρα, την ενσωμάτωση του στο γενετικό τους υλικό και την έκφραση των συστατικών του.



Εικόνα 43: Κύτταρα MKN45 γενετικά τροποποιημένα με το πλασμίδιο pPuro_dCas9-VP64 μετά την προσθήκη πουρομυκίνης. Οι εικόνες (α), (β) προέρχονται από οπτικό μικροσκόπιο, ενώ η (γ) είναι ορατή εικόνα του τρυβλίου με γυμνό μάτι.



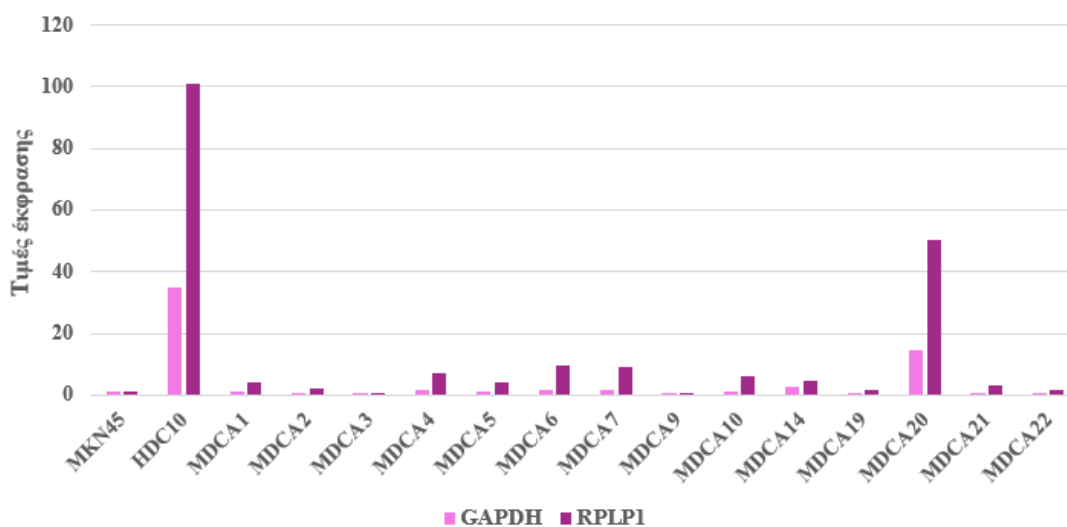
Εικόνα 44: Κλώνος κυττάρων MKN45(αριστερά) και HFE45(δεξιά) που έχουν επιβιώσει από την προσθήκη πουρομυκίνης λόγω ένθεσης του πλασμιδίου pPuro_dCas9-VP64. Εικόνες από μικροσκόπιο

3.10 Επιβεβαίωση γενετικά τροποποιημένων κυττάρων MKN45 & HFE45

Έπειτα από την επαρκή ανάπτυξη των μεμονωμένων κλώνων ακολούθησε απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων και συγκεκριμένα του RNA με σκοπό την αντίστροφη μεταγραφή του για την παραγωγή cDNA που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για μια ποσοτική PCR (qPCR). Παράλληλα, για κάθε κλώνο διατηρήθηκε αριθμός ζωντανών κυττάρων σε καλλιέργεια με σκοπό την επιλογή τους σε περίπτωση ταυτοποίηση του ως θετικό. Έτσι είναι εφικτή η ανίχνευση των επιπέδων των μεταγράφων που προκύπτουν από συστατικά του pPuro_dCas9-VP64 και πιο συγκεκριμένα της dCas9 πρωτεΐνης, ώστε να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματική τροποποίηση των κυττάρων και η επιτυχής δημιουργία σταθερών κλώνων MKN45 και HFE45 που να εκφράζουν σταθερά τα συστατικά του SAM CRISPRa συστήματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα, μετά από απομόνωση του RNA και σύνθεση του cDNA 14 κλώνων MKN45 (MDCA) και 12 κλώνων HFE45 (HFDCA) που είχαν τροποποιηθεί με το πλασμίδιο της dCas9 και αναπτύχθηκαν έπειτα από προσθήκη πουρομυκίνης έγινε qPCR με τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών με σκοπό την ενίσχυση των dCas9, VP64 και p65. Για κάθε κυτταρική σειρά ελέγχθηκε η έκφραση των γενετικών τόπων και σε δείγματα αρνητικού ελέγχου στα οποία δεν είχε γίνει γενετική τροποποίηση με σκοπό την εισαγωγή του πλασμιδίου. Το HDC1 αποτελεί σταθερό κλώνο από HEK κύτταρα ο οποίος χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας έκφρασης. Στο διάγραμμα της **εικόνας 45** φαίνεται μια επανάληψη του δείγματος MDCA20 για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της **εικόνας 46**. Σε κάθε διάγραμμα οι τιμές έκφρασης έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την αντίστοιχη έκφραση των GAPDH και RPLP1 γονιδίων που ορίζονται ως housekeeping λόγω της σταθερής έκφρασης τους σε κάθε κλώνο. Με σκούρο χρώμα φαίνεται η έκφραση του γονιδίου dCas9 κανονικοποιημένη ως προς την έκφραση του RPLP1, ενώ με πιο ανοιχτό χρώμα ως προς το GAPDH. Στα αποτελέσματα φαίνονται οι μηδενικές ή ελάχιστες τιμές έκφρασης στα δείγματα HFE45 και MKN45 οι οποίες οφείλονται σε θόρυβο της αντίδρασης λόγω σχηματισμού διμερών εκκινητών, ενώ την υψηλή έκφραση στον θετικό μάρτυρα HDC10 που υποδηλώνει έναν ιδανικό διαγονιδιακό κλώνο. Από τα εξεταζόμενα δείγματα, ικανοποιητική έκφραση της dCas9 εμφάνισαν τα δείγματα

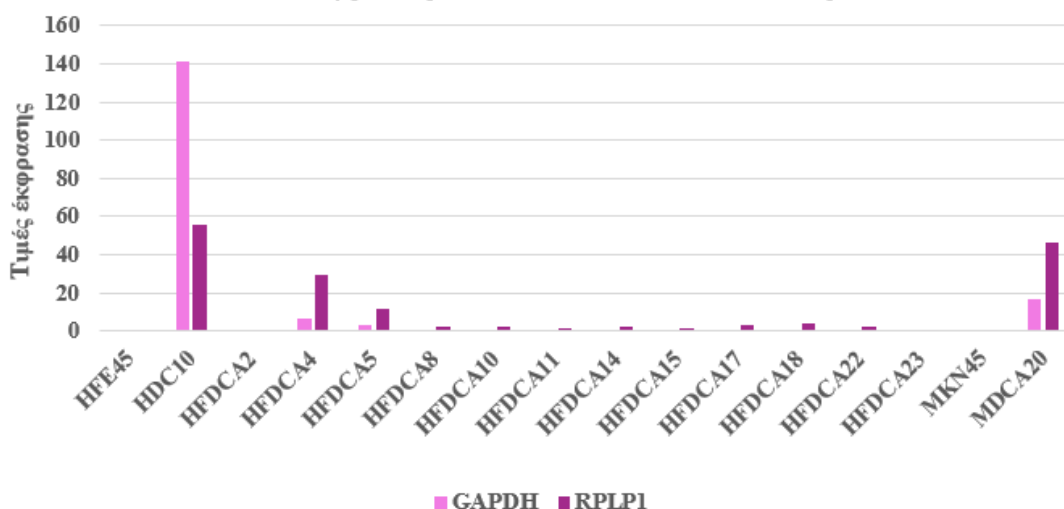
MDCA20 και HFDCa4 τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για το επόμενο βήμα των πειραμάτων.

Έκφραση dCas9 σε MDCA κύτταρα

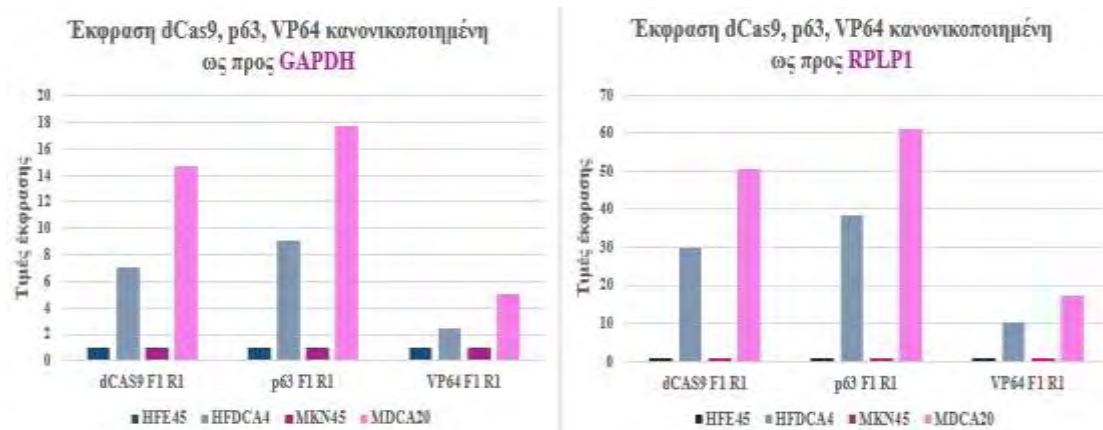


Εικόνα 45: Αποτελέσματα qPCR με ειδικούς εκκινητές που στοχεύουν το γονίδιο dCas9 του φορέα pPuro_dCas9-VP64... σε 14 γενετικά τροποποιημένους κλώνους MDCA. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη τροποποιημένα MKN45 κύτταρα και ως θετικός μάρτυρας το δείγμα HDC10. Οι τιμές έκφρασης με σκούρο χρώμα αντιστοιχούν σε κανονικοποιημένες τιμές με βάση την έκφραση του RPLP1, ενώ με ανοιχτό χρώμα φαίνονται τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης με βάση το GAPDH

Έκφραση dCas9 σε HFDCa κύτταρα



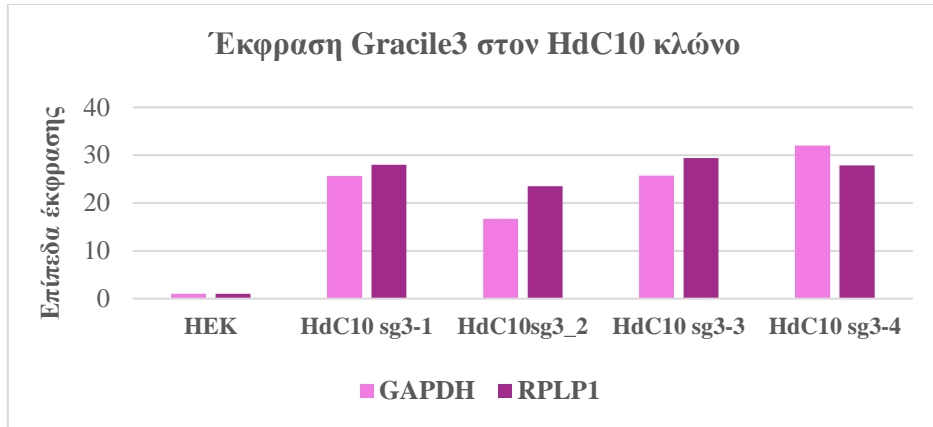
Εικόνα 46: Αποτελέσματα qPCR με ειδικούς εκκινητές που στοχεύουν το γονίδιο dCas9 του φορέα pPuro_dCas9-VP64... σε 12 γενετικά τροποποιημένους κλώνους HFDCa. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη τροποποιημένα HEK κύτταρα και ως θετικός μάρτυρας το δείγμα HDC10. Οι τιμές έκφρασης με σκούρο χρώμα αντιστοιχούν σε κανονικοποιημένες τιμές με βάση την έκφραση του RPLP1, ενώ με ανοιχτό χρώμα φαίνονται τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης με βάση το GAPDH.



Εικόνα 47: Αποτελέσματα qPCR με ειδικούς εκκινητές που στοχεύουν τα γονίδια dCas9, p63 και VP64 του φορέα pRuro_dCas9-VP64... στα δείγματα HFE45, HFDC4, MKN45 και MDCA20. Οι μπάρες με μωβ και μπλε χρώμα δείχνουν την έκφραση του dCas9 κανονικοποιημένη με βάση τα GAPDH και RPLP1 αντίστοιχα. Ομοίως, ισχύει και για τα p63 και VP64.

Γι' αυτούς τους κλώνους έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων p63 και VP64 που αποτελούν επίσης βασικά στοιχεία του φορέα. Στο διάγραμμα της **εικόνας 47** φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης και στους αρνητικούς μάρτυρες. Οι μπάρες με μωβ χρώμα αντιστοιχούν στην έκφραση του dCas9 γονιδίου κανονικοποιημένη με την έκφραση του GAPDH, ενώ με μπλε οι κανονικοποιημένες τιμές με βάση το RPLP1. Οι μπάρες με κόκκινο και πράσινο χρώμα αφορούν τα επίπεδα έκφρασης του p63 κανονικοποιημένα ως προς τα GAPDH και RPLP1 αντίστοιχα. Ομοίως με κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα φαίνεται η κανονικοποιημένη έκφραση του VP64 γενετικού τύπου με βάση τα GAPDH και RPLP1 αντίστοιχα. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σημειώθηκαν στο γονίδιο VP64, ενώ οι κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης ως προς το GAPDH ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες κανονικοποιημένες τιμές ως προς το RPLP1.

Έπειτα, έγινε εισαγωγή των σχεδιασμένων sgRNAs που παρήχθησαν σε μεγάλες ποσότητες προηγουμένως, στα κύτταρα HdC10 για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της επαγωγής της μεταγραφής του Gracile 3. Η διαδικασία περιλάμβανε την παραγωγή λεντιών που να φέρουν τα αντίστοιχα sgRNAs και στη συνέχεια την μόλυνση των κυττάρων με τους ιούς. Απομόνωση του RNA και σύνθεση του cDNA των κυττάρων προηγήθηκαν της ποσοτικοποίησης των επιπέδων μεταγραφής του Gracile 3 τα οποία κανονικοποιήθηκαν με τα GAPDH (ροζ μπάρες) και RPLP1 (μωβ μπάρες). Σύμφωνα με την **Εικόνα 48**, κάθε sgRNA οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του Gracile 3 στα HdC10 κύτταρα.



Εικόνα 48: Επίπεδα έκφρασης του Gracile 3 κανονικοποιημένα ως προς τα γονίδια GAPDH(ανοιχτό ροζ) και RPLP1(μωβ) στον θετικό σταθερό κλώνο HdC10 έπειτα από ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω των sgRNAs. Χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό δείγμα ελέγχου HEK κύτταρα που δεν έχουν τροποποιηθεί με την dCas9. Η εισαγωγή των sgRNAs έγινε με λεντιούς.

4. Συζήτηση

Ο καρκίνος απασχολεί την επιστημονική κοινότητα τόσο ως προς την διάγνωση όσο και στην εύρεση πιθανών στόχων που θα συμβάλλουν στην εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών ανάλογα με τα φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί τον πέμπτο πιο συχνό τύπο καρκίνου παγκοσμίως, ενώ παράλληλα συνοδεύεται από πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που τον κατατάσσουν στην τρίτη θέση, καθώς ένα μεγάλο ποσοστό των περιστατικών αυτής της νόσου τελικά δεν επιβιώνουν εξαιτίας της έλλειψης έγκαιρης διάγνωσης.. Ο μεγαλύτερος αριθμός κρουσμάτων παρατηρείται σε Ασιατικούς πληθυσμούς, ενώ ο επιπολασμός της νόσου στην Αμερική είναι πολύ χαμηλότερος. Η υψηλή θνησιμότητα που προκαλείται από τον καρκίνο του στομάχου οφείλεται στην χαμηλή ευαισθησία των υπάρχοντων διαγνωστικών μεθόδων των αρχικών σταδίων του καρκίνου και στην αναποτελεσματική θεραπεία των πιο σοβαρών και σταδίων της νόσου (Strong, 2018). Η γενετική παραλλακτικότητα και η εμπλοκή πολλαπλών γονιδίων στην εκδήλωση και ανάπτυξη του καρκίνου οδηγεί στη συνεχή μελέτη πιθανών στόχων που θα συμβάλλουν ως διαγνωστικοί δείκτες ή ως θεραπευτικοί στόχοι. Εκτός από τα κωδικοποιητικά γονίδια στα οποία είχαν επικεντρωθεί οι μελέτες, σημαντικούς ρόλους φαίνεται να έχουν και τα μη κωδικοποιητικά γονίδια τα οποία τελικά καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό του γονιδιώματος. Τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα χωρίζονται σε μικρού και μεγάλου μήκους και έχει βρεθεί ο σημαντικός βιολογικός τους ρόλος τόσο στα θηλαστικά όσο και σε άλλους οργανισμούς, όπως τα φυτά (siRNAs). Ωστόσο, αυτός ο τομέας αποτελεί ακόμα ένα σχετικά ανεξερεύνητο πεδίο και έγκειται η ανάγκη για πιο λεπτομερή μελέτη του (Zhang, 2016).

Οι μέθοδοι θεραπείας των ασθενειών κατά κύριο λόγο εστιάζουν σε φάρμακα τα οποία στοχεύουν κυτταρικούς μεταβολίτες, πρωτεΐνες ή ακόμα και ολόκληρα κύτταρα ή στην χειρουργική αφαίρεση του όγκου η οποία πολλές φορές είναι αναποτελεσματική για την ολική θεραπεία. Η ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας συμβάλλει στην στόχευση και διόρθωση μεταλλάξεων που οδηγούν σε αυξημένη ή μειωμένη έκφραση μεταγράφων σε σχέση με φυσιολογικές καταστάσεις και αλλοιώνουν την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων (Park, 2015). Οι μέθοδοι τροποποίησης του γενετικού υλικού στηρίζονται σε πρωτεΐνες που να έχουν τη δυνατότητα να οδηγούνται εξειδικευμένα σε ειδικές περιοχές του γονιδιώματος και προκαλούν τις κατάλληλες αλλαγές, ώστε να αποκατασταθεί η φυσιολογική αλληλουχία του γενετικού τόπου. Οι πρώτες δοκιμασμένες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν βασίζονταν στην ενδονουκλεάση περιορισμού FokI η οποία δρα σε διμερή και αναγνωρίζει ειδική αλληλουχία στην οποία προκαλεί δίκλωνες ρήξεις. Ο συνδυασμός της καταλυτικής της δράσης με τα μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου που προσδίδουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με αλληλουχίες DNA τις οποίες ορίζει ο ερευνητής. Παρόλα αυτά, η χρονοβόρα και υψηλού κόστους παραγωγή των υλικών για την εξειδικευμένη στόχευση των αλληλουχιών σε συνδυασμό με τον περιορισμό των επιτρεπόμενων στόχων έφερε την ανάγκη για ανάπτυξη άλλων τεχνικών επεξεργασίας του DNA οι οποίες να αγνοούν αυτούς τους περιορισμούς και να χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό επιτυχίας (Chandrasegaran, 2017; Gaj, 2014).

Το σύστημα CRISPR-Cas9 αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό αντιμετώπισης και εξάλειψης του ξένου DNA ικής προέλευσης σε βακτήρια και αρχαία. Η ική αλληλουχία ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του ξενιστή με την βοήθεια ενδογενών

Cas πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια μιας πρώτης μόλυνσης, ενώ κατά μια δεύτερη μόλυνση ένα μη κωδικοποιητικού RNA (crRNA) κατευθύνει μια ενδονουκλεάση Cas9 του προκαρυώτη στην περιοχή στόχο και προκαλεί ρήξεις στο δίκλωνο DNA. Σημαντικό τμήμα του συστήματος αποτελεί άλλο ένα RNA (tracrRNA) που συμβάλλει στον σχηματισμό του συμπλόκου Cas9-crRNA (Xiao-Jie, 2015). Η αναγνώριση όμοιων αλληλουχιών με την αλληλουχία στόχο από την Cas9 ελέγχεται από μια ειδική αλληλουχία PAM που εντοπίζεται καθοδικά από την αλληλουχία στόχο και επιτρέπει την αναγνώριση της από της Cas9. Τροποποιήσεις του αρχικού συστήματος, όπως η δημιουργία ενός single guide RNA αντί για δυο διαφορετικά crRNA-tracrRNA και η προσθήκη ενός DNA δότη που να ανταλλάσσει την φυσιολογική με την λανθασμένη αλληλουχία μετά την πέψη για την επιδιόρθωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βοηθούν στην κατευθυνόμενη χρήση του συστήματος (Sontheimer, 2015). Ωστόσο, η διαφορετική ακολουθία DNA δεν αποτελεί πάντα την αιτία για έναν παθολογικό φαινότυπο αλλά σε κάποιες περιπτώσεις η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης προκαλούν ανωμαλίες στην φυσιολογική λειτουργία. Η πρόκληση μεταλλάξεων στην Cas9 μπορεί να δημιουργήσει μια deadCas9 πρωτεΐνη της οποίας η καταλυτική δράση είναι ανενεργή και μπορεί να μεταφέρει μεταγραφικούς παράγοντες, είτε ενεργοποιητές είτε καταστολείς σε ρυθμιστικά στοιχεία και να μεταβάλλουν την μεταγραφική ενεργότητα ενός γενετικού τόπου (Brocken, 2018).

Εδώ επιχειρήσαμε να επάγουμε την μεταγραφή ενός μακρού μη κωδικοποιητικού RNA, που ονομάσαμε Gracile3, του οποίου η έκφραση σε καρκινικά δείγματα στομάχου είναι σημαντικά πιο αυξημένη σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς, στην συντριπτική πλειοψηφία των οποίων η έκφραση του είναι μη ανιχνεύσιμη. Η στατιστικά αυξημένη έκφραση του γονιδίου ταυτοποιήθηκε μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης μεταγραφομικών δεδομένων από αλληλούχηση RNA φυσιολογικών δειγμάτων σε σύγκριση με καρκινικές κυτταρικές σειρές και καρκινικές βιοψίες. Η κατασκευή των volcano plots συνέβαλε στην κατηγοριοποίηση του Gracile 3 στα στατιστικώς υπερεκφραζόμενα γονίδια στα καρκινικά δείγματα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά. Επίσης, η καταγραφή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου σε 400 βιοψίες ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του στομάχου καθώς και σε 40 βιοψίες από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό επιβεβαίωσε την αυξημένη έκφραση σε παθολογικές καταστάσεις. Η παραπάνω μελέτη αφορούσε άτομα και των δυο φύλων, ποικίλων ηλικιών και εθνικοτήτων, ενώ παράλληλα διέφερε και το στάδιο της ασθένειας τους υποδεικνύοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα του μεταγράφου είναι καθολικό χαρακτηριστικό της νόσου. Αυτά τα συμπεράσματα αποτελούν ένα ισχυρό κίνητρο για την μελέτη του συγκεκριμένου μεταγράφου, αφού η δράση του επηρεάζει καθολικά τον καρκίνο του στομάχου ανεξάρτητα ηλικίας, εθνικότητας ή σταδίου της νόσου. Αρχικά, κύριος στόχος είναι η υπερέκφραση του γονιδίου στόχου σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές στομάχου με σκοπό την παρατήρηση πιθανής αλλαγής στον φαινότυπο τους και την απόκτηση καρκινικών ιδιοτήτων. Παράλληλα, επιχειρήθηκε η αύξηση του αριθμού των μεταγράφων του Gracile3 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου στις οποίες τα επίπεδα του μεταγράφου να είναι χαμηλά προκειμένου να εξεταστεί η επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων. Χαρακτηριστικά του μεταγράφου που επιτρέπουν την μελέτη του είναι η μηδενική ή ελάχιστη έκφραση του σε υπόλοιπους φυσιολογικούς ιστούς, καθώς μελλοντικά είναι θεμιτή η μεταφορά των πειραμάτων σε *in vivo* συστήματα και η έκφραση του σε άλλους ιστούς μπορεί να

δημιουργούσε προβλήματα. Βέβαια, για τα *in vivo* πειράματα δεν είναι εφικτή η χρήση του ανθρώπινου οργανισμού για λόγους βιοηθικής. Αντίθετα, απαιτούνται πειραματόζωα τα οποία να χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για ποικίλες ανθρώπινες ασθένειες και να δίνουν αποτελέσματα που να μπορούν να συσχετιστούν με την ανθρώπινη συμπεριφορά. Ο ιδανικός οργανισμός-πειραματόζωο που χρησιμοποιείται ευρέως αποτελεί ο ποντικός. Ωστόσο, για να είναι εφικτή η μελέτη του συγκεκριμένου lncRNA πρέπει πρώτα να διαπιστωθεί η παρουσία ενός ομόλογου γονιδίου στον ποντικό. Με αναλύσεις βιοπληροφορικής επιβεβαιώθηκε η απουσία έκφρασης του Gracile3 σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς και η ύπαρξη ομόλογου γονιδίου στον ποντικό. Εναλλακτική πειραματική μεθοδολογία που μπορεί να εφαρμοστεί ακόμα και με απουσία ενός ομόλογου Gracile3 γονιδίου στον ποντικό είναι η αξιοποίηση ανθρωπίνων κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν το lncRNA σε πειράματα ξενογραφίας στον ποντικό.

Προκειμένου να γίνουν εφικτά αυτά τα πειράματα μελλοντικά, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε ένα σύστημα ενδογενούς υπερέκφρασης γονιδίων που στηρίζεται στην μέθοδο CRISPR/Cas9-activation. Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι HFE45 & MKN45 οι οποίες αφορούν φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου και καρκινική στομάχου με μετάσταση σε πάγκρεας αντίστοιχα που δεν εμφανίζουν έκφραση του γονιδίου. Μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντισώματα ειδικά για τροποποιήσεις των ιστονών και αλληλούχηση ανιχνεύθηκε η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου με βάση την οποία έγινε σχεδιασμός και επιλογή 4 sgRNAs. Το ποσοστό επιτυχίας της επαγωγής της μεταγραφής επηρεάζεται από το sgRNA. Τα sgRNAs που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν γιατί προτεινόταν από τα περισσότερα λογισμικά που εξετάστηκαν, οπότε έχουν και αρκετές πιθανότητες να έχουν αποτελεσματική δράση. Η επιτυχής κλωνοποίηση του φορέα pLVU6-gRNA επιβεβαιώθηκε από δυο διαφορετικές PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων. Έπειτα από γενετική τροποποίηση των κυττάρων με το πλασμίδιο υπερέκφρασης της dCas9 και των λοιπών μεταγραφικών ενεργοποιητών του συστήματος SAM ελέγχθηκαν 12 διαφορετικοί κλώνοι HFDC4 και 14 κλώνοι MDCA με παράλληλη χρήση αρνητικών και θετικών δειγμάτων ελέγχου. Τα αποτελέσματα από την έκφραση του dCas9 γονιδίου ξεχώρισαν τους κλώνους HFDC4 και MDCA20 που παρουσίασαν την υψηλότερη σχετική έκφραση. Παρόλο που οι παραπάνω κλώνοι χαρακτηρίζονται ως θετικοί στην σταθερή έκφραση των απαραίτητων υλικών για την εφαρμογή του SAM CRISPR συστήματος, παρουσιάζουν αισθητά χαμηλότερη έκφραση τους συγκριτικά με τον θετικό μάρτυρα HDC10. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την δημιουργία του HDC10 είχαν χρησιμοποιηθεί 30μg φορέα για την διαμόλυνση, ενώ για τις σειρές MDCA και HFDC4 η ποσότητα του φορέα που ήταν διαθέσιμη ήταν 7μg για κάθε κυτταρική σειρά. Η αυξημένη ποσότητα του φορέα ευνοεί μεγαλύτερο αριθμό ενθέσεων του στο πυρηνικό γονιδίωμα των ανθρώπινων κυττάρων που συνεπάγεται αυξημένα επίπεδα έκφρασης των στοιχείων του πλασμιδίου. Ωστόσο, η ενίσχυση των γενετικών τόπων p65 και VP64 στα θετικά δείγματα και στα αρνητικά δείγματα ελέγχου υποδηλώνει μια επιτυχημένη προσπάθεια δημιουργίας κλώνων HFE45 και MKN45 που εκφράζουν με σταθερό τρόπο τα συστατικά του επιθυμητού πλασμιδίου. Στη συνέχεια ακολούθησε παραγωγή λεντιών που να φέρουν κλωνοποιημένα pLVU6 με τα Gracile3- sgRNAs και μόλυνση του HdC10 (κύτταρα HEK) με αυτά. Η ανίχνευση των επιπέδων των μεταγράφων Gracile3 που επιτεύχθηκε

με ποσοτική qPCR απέδειξε την επαγωγή της μεταγραφικής ικανότητας του γενετικού τόπου σε σύγκριση με τα κύτταρα HEK αρνητικού ελέγχου. Συγκεκριμένα, οι κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης υποδεικνύουν αύξηση των μεταγράφων έως και 30 φορές σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα των sgRNAs ως προς την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου.

Επόμενο βήμα για να ολοκληρωθεί η διαδικασία είναι η διαμόλυνση των σταθερών κυτταρικών σειρών HDCA4 & MDCA20 με τα sgRNAs, όπως έγινε για την κυτταρική σειρά HdC10. Αφού επιβεβαιωθεί η ενίσχυση της μεταγραφής του Gracile 3 απαιτείται η παρατήρηση των πιθανών αλλαγών του φαινοτύπου των κυττάρων που προκαλούνται από την δράση των μεταγράφων. Σε αυτό το στάδιο περιλαμβάνεται και ο μοριακός χαρακτηρισμός των επιπτώσεων της επαγωγής στα επίπεδα έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων με RNA-seq τόσο στα φυσιολογικά κύτταρα HFE45 όσο και στα καρκινικά MKN45 για την πιθανή επίδραση του μεταγράφου στην εμφάνιση καρκινικής συμπεριφοράς. Αποτελέσματα που υποδεικνύουν την επαγόμενη από το Gracile3 δυσπλασία οδηγούν στην ένεση των κυττάρων σε ποντίκια, ώστε να γίνει η συσχέτιση των παρατηρήσεων και σε ζωντανό οργανισμό. Η δημιουργία αυτού του εργαλείου θέτει τα θεμέλια για την έρευνα νέων υποψήφιων lncRNAs για την μελέτη της επίδρασης τους στον καρκίνο του στομάχου. Κύριος μελλοντικός σκοπός αποτελεί η ανακάλυψη μιας αποτελεσματικής θεραπευτικής προσέγγισης που θα μειώσει τα υψηλά ποσοστά της θνησιμότητας του καρκίνου του στομάχου.

Η επιτυχία της επαγόμενης μεταγραφής μέσω του CRISPRa συστήματος έχει δοκιμαστεί και σε προηγούμενες επιστημονικές μελέτες.

Οι Maeder et al. χρησιμοποίησαν την συζευγμένη με τον μεταγραφικό παράγοντα VP64 dCas9 με σκοπό της μεταβολή της έκφρασης ενδογενών γονιδίων σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HEK293. Τα sgRNAs σχεδιάστηκαν σύμφωνα με την αλληλουχία του υποκινητή του κωδικού γονιδίου NTF3 από την έκφραση του οποίου προκύπτει μια πρωτεΐνη της οικογένειας των νευροτροφινών. Η στόχευση των ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιακού τόπου οδήγησαν σε σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του έως και 25 φορές (Maeder, 2013).

Παρόλα αυτά, τεχνικές CRISPRa δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο για την στόχευση κωδικών αλλά και μη κωδικών γονιδίων που φαίνεται να συμμετέχουν σε μονοπάτια που προάγουν τον καρκίνο.

Σε μία προσπάθεια μελέτης των παραγόντων που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα των ασθενών σε χημειοθεραπευτικές μεθόδους έναντι του καρκίνου αξιοποιήθηκε το SAM CRISPRa σύστημα με σκοπό την μεταγραφική ενεργοποίηση lncRNAs και την ταυτοποίηση του ρόλου τους. Σχεδιάστηκαν 4 διαφορετικά sgRNAs από τα οποία το ένα οδήγησε σε πολύ μικρή αύξηση των επιπέδων του lncRNA TUNA, ενώ τα υπόλοιπα 3 προκάλεσαν δραστική αύξηση των επιπέδων του μεταγράφου έως και 30 φορές (Bester, 2018).

Συνεπώς, το ποσοστό της μεταγραφικής ενεργοποίησης που επιτυγχάνεται δεν οφείλεται αποκλειστικά στον αριθμό των μεταγραφικών ενεργοποιητών που χρησιμοποιούνται, αλλά κομβικό ρόλο παίζει και ο σχεδιασμός των sgRNAs. Με βάση αυτό, οι παρακάτω ερευνητικές μελέτες μεν πέτυχαν χαμηλότερο ποσοστό αύξησης της μεταγραφής lncRNAs των οποίων η συμπεριφορά μεταβάλλεται στον καρκίνο,

αλλά το γεγονός αυτό δεν τα καθιστά λιγότερο έγκυρα ως προς την αποτελεσματικότητα του SAM συστήματος.

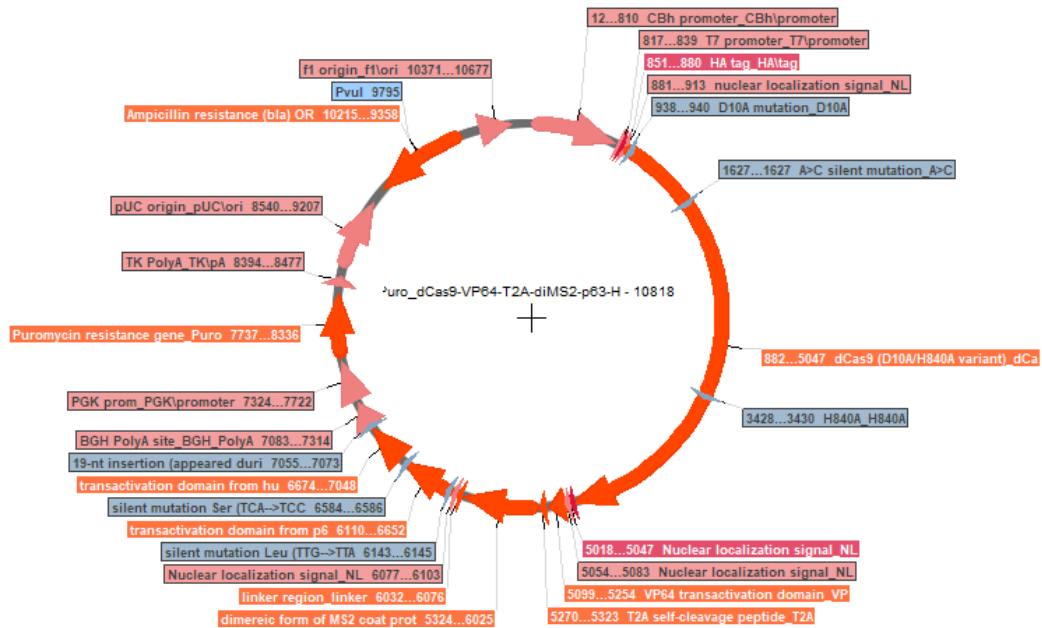
Ένα ακόμα μετάγραφο που χρησιμοποιήθηκε για υπερ-έκφραση είναι το πυρηνικό long non-coding RNA, NEAT1. Ο ρόλος του σχετίζεται με την δημιουργία υποκυτταρικών σωματιδίων που εντοπίζονται στον πυρήνα και είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης RNA-πρωτεϊνών. Τα σωματίδια αυτά φαίνεται να ελέγχουν την έκφραση γονιδίων κατά τη διαφοροποίηση, ική μόλυνση και κατά την απόκριση σε στρεσογόνες καταστάσεις. Σε καταστάσεις καρκίνου ο αριθμός των μεταγράφων του εμφανίζεται πιο αυξημένος σε σύγκριση με φυσιολογικές συνθήκες. Η υπερ-έκφραση του NEAT1, που επιτεύχθηκε με το SAM σύστημα οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων RNA έως και 4 φορές (Yamazaki, 2018).

Επίσης, στον καρκίνο του προστάτη έχει παρατηρηθεί αύξηση των μεταγράφων του PCGEM1 και σε μια προσπάθεια περιγραφής του μηχανισμού δράσης αξιοποιήθηκε το SAM σύστημα, ώστε να γίνει υπέρ-έκφραση του στόχου και αποκάλυψη του ρόλου του. Η δράση των μεταγραφικών παραγόντων στην μεταγραφή του γονιδίου οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του μεταγράφου έως και 1,4 φορές σε σχέση με δείγματα αρνητικού ελέγχου (Ho, 2016). Τα παραπάνω ερευνητικά αποτελέσματα τονίζουν από τη μια, την αποτελεσματικότητα του dCas9 SAM συστήματος στην επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων στόχων και από την άλλη, την εγκυρότητα και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας όπου επιτεύχθηκε η αύξηση των επιπέδων του Gracile 3 έως και 30 φορές συγκριτικά με τα δείγματα αρνητικού ελέγχου.

Μελλοντικό στόχο αποτελεί η αύξηση του αριθμού των μεταγράφων του Gracile 3 στον σταθερό κλώνο MKN45 και HFE45, όπως έγινε για τον κλώνο των HEK κυττάρων, και στη συνέχεια μια ανάλυση RNA-seq με βάση την οποία θα φαίνονται οι αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης γονιδίων που προκαλούνται από την αλλαγή της έκφρασης του Gracile 3. Έπειτα, παρατήρηση του φαινοτύπου τόσο των καρκινικών όσο και των φυσιολογικών κυττάρων μετά την επαγωγή του μεταγράφου, αναμένεται να αποκαλύψει την σημασία του Gracile 3 τόσο στην προαγωγή του καρκινικού φαινοτύπου όσο και στην εκδήλωση της καρκινογένεσης αντίστοιχα. Η παρούσα πτυχιακή εργασία δεν στοχεύει μόνο στην μελέτη του ρόλου ενός υποψήφιου lncRNA στον καρκίνο του στομάχου, αλλά στην δημιουργία ενός εργαλείου για την μελέτη ενός μεγάλου αριθμού lncRNAs και τον ρόλο που έχουν στον καρκίνο του στομάχου.

Παράρτημα

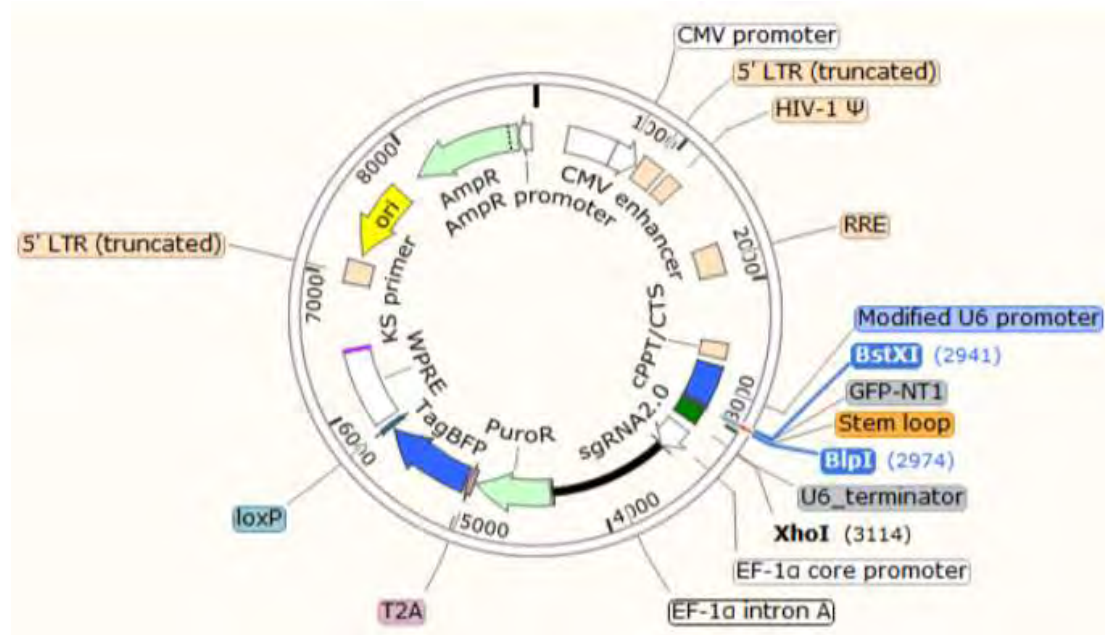
pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1



Το πρώτο βασικό πλασμίδιο για την δημιουργία ενός CRISPR Sam activation συστήματος είναι αυτό που φέρει την dCas9 και τα υπόλοιπα συστατικά που συμβάλλουν στην επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου στόχου. Επομένως, ο παρακάτω φορέας φαίνεται ότι περιέχει το γονίδιο της Ca9 πρωτεΐνης που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Streptococcus pyogenes* που όμως φέρει δυο μεταλλάξεις, την D10A και την H840A, που παρεμποδίζουν την δράση νουκλεάσης ή νικάσης. Ο ρόλος της dCas9 εδράζεται στον πυρήνα, οπότε είναι απαραίτητη η παρουσία του σήματος που θα την οδηγήσει σε αυτό το σημείο του κυττάρου μετά την παραγωγή της στο κυτταρόπλασμα. Αυτό ισχύει και για τους άλλους παράγοντες που συμμετέχουν στο σύστημα SAM, αφού ο ρόλος τους συσχετίζεται με την αλληλεπίδραση με το DNA του κυττάρου. Εκτός από το γονίδιο της dCas9, στον φορέα περιέχεται η VP64, που αποτελεί ένα τετραμερές της ιικής πρωτεΐνης VP16 που φυσιολογικά εντοπίζεται στους ερπητοϊούς και ο ρόλος του αφορά την αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες του κυττάρου ξενιστή επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων. Πάνω στον φορέα επίσης διακρίνονται η MS2 coat protein (MCP) που απομονώνεται από τον βακτηριοφάγο MS2 ο οποίος μολύνει βακτήρια *Escherichia coli* και άλλα εντεροβακτήρια, και τις επικράτειες ενεργοποίησης των p65 και HSF1 που αποτελούν τους μεταγραφικούς παράγοντες από ανθρώπινο οργανισμό των οποίων η συσσώρευση στην αλληλουχία-στόχο θα προάγει την μεταγραφή του. Εκτός από αυτά, απαραίτητο για την παραγωγή τους στα κύτταρα θηλαστικών είναι ένα T2A elf cleaving peptide το οποίο προέρχεται από τον *thomosa asigna* virus 2A και παίζει ρόλο στην πέψη της πολυπρωτεΐνης που θα περιλαμβάνει τα παραπάνω στοιχεία. Τα προηγούμενα υπόκεινται στον έλεγχο του ισχυρού CBh υποκινητή που προκύπτει από την σύζευξη του CMV early enhancer και του τροποποιημένου υποκινητή της β-ακτίνης από το κοτόπουλο. Κατά την γενετική τροποποίηση των κυττάρων θηλαστικών είναι σημαντικό να επιλεγθούν μόνο τα κύτταρα που έβαλαν τον φορέα, οπότε το πλασμίδιο πρέπει να περιέχει ένα γονίδιο που

να προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό στα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα. Στην περίπτωση του pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1 το γονίδιο αυτό δίνει το πλεονέκτημα της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή (PGK Mouse phosphoglycerate kinase 1 promoter). Ακόμα, για κάθε παραγόμενο mRNA από τον φορέα αντιστοιχεί και μια αλληλουχία πολύ-U που κατά την μεταγραφή θα αποτελεί την πολύ-A ουρά στο 3' άκρο του. Γι' αυτό και το πλασμίδιο περιέχει δυο τέτοιες αλληλουχίες, την BGH polyA site για το πολυκιστρονικό mRNA των συστατικών του SAM system και την TK polyA site για το mRNA του γονιδίου ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη. Η δημιουργία των σταθερών κυτταρικών σειρών με αυτόν τον φορέα προϋποθέτει την απομόνωση του σε μεγάλες ποσότητες. Ο καλύτερος τρόπος γι' αυτό είναι ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τον φορέα και καλλιέργεια τους, έτσι με κάθε διπλασιασμό των προκαρυωτικών κυττάρων θα πολλαπλασιάζεται και ο αριθμός των αντιγράφων του πλασμιδίου. Το παραπάνω οφείλεται και στο γεγονός ότι τα πλασμίδια μέσα σε βακτηριακά κύτταρα αντιγράφονται ανεξάρτητα από το γονιδιωματικό DNA. Η αλληλουχία pUC ori αναφέρεται στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής του φορέα στα μετασχηματισμένα κύτταρα που οδηγεί στην παραγωγή 500 αντιγράφων του ανά κύτταρο. Μια επιπλέον παρόμοια περιοχή, η f1 ori, συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA όταν τα βακτηριακά κύτταρα έχουν μολυνθεί με τον βακτηριοφάγο f, διασφαλίζοντας έτσι την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων του πλασμιδίου ακόμα και με την απρόοπτη μόλυνση από τον βακτηριοφάγο. Όπως και στην περίπτωση της εισαγωγής του φορέα σε κύτταρα θηλαστικών, έτσι και στην περίπτωση μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων, είναι επιθυμητή η επιβίωση των βακτηρίων που έβαλαν επιτυχώς τον φορέα. Αυτό επιτυγχάνεται με το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και την ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό. Τέλος να αναφερθεί ότι το πλασμίδιο περιέχει και αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού που επιτρέπουν την περαιτέρω διαμόρφωση του με άλλα στοιχεία σύμφωνα με τις μεθόδους του ανασυνδυασμένου DNA.

pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BF



Προκειμένου να γίνει επιτυχώς η μεταγραφική ενεργοποίηση από το σύμπλεγμα παραγόντων που θα μεταφερθούν από το pPuro_dCas9-VP64-T2A-diMS2-p65-HSF1, απαραίτητος είναι ο σχεδιασμός ενός sgRNA που θα στοχεύει την περιοχή του υποκινητή του επιθυμητού γονιδίου. Το sgRNA θα μεταφερθεί στα κύτταρα θηλαστικών μέσω ενός άλλου πλασμιδίου, του pLV-U6-gRNA diMS2 (BspI-XhoI)-EF1Alpha-Puro-T2A-BFP. Η εισαγωγή της αλληλουχίας του guideRNA στον φορέα γίνεται στην περιοχή που περιβάλλεται από δυο αλληλουχίες αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού BspXI & BspI. Επιλέγεται αυτή περιοχή, ώστε η κατασκευή να βρίσκεται μεταγραφικά υπό τον έλεγχο των U6 promoter και U6 terminator. Στον U6 υποκινητή προσδέεται η RNA pol III και αυτό σημαίνει ότι το μετάγραφο που θα προκύψει δεν θα πολυαδενυλιωθεί και είναι ιδανική για την μετάγραφή μικρότερων σε μέγεθος αλληλουχιών. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα παραχθεί σε μεγάλες ποσότητες μέσω της περιοχής ορί από *Escherichia coli*, που θα έχουν επιβιώσει εξαιτίας του γονιδίου ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη. Κάποια από τα υπόλοιπα στοιχεία του φορέα συμμετέχουν στην παραγωγή ισοματιών που να περιέχουν το πλασμίδιο, ώστε σε επόμενο στάδιο να το μεταφέρουν σε κύτταρα θηλαστικών στα οποία θα γίνει το CRISPR activation. Ο ισχυρός υποκινητής από τον Human cytomegalovirus (CMV) ελέγχει την μετάγραφο ενός τμήματος της συντηρημένης 5' UTR περιοχής του HIV και μιας άλλης αλληλουχίας της 5' UTR, την HIV-1 Ψ. Η 5' UTR του HIV έχει παρατηρηθεί ότι εμπλέκεται σε πολλά στάδια αντιγραφής του ιού, καθώς και στον έλεγχο της μετάφρασης. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία HIV-1 Ψ φαίνεται να έχει ανασταλτικό ρόλο στην μετάφραση και επομένως, σε αυτό το φορέα οι δυο αλληλουχίες έχουν διαχωριστεί παρεμποδίζοντας την ανασταλτική δράση του HIV-1 Ψ. Ακόμα, κάτω από τον έλεγχο του ίδιου υποκινητή βρίσκεται το RRE (Rev Response Element) από τον HIV-1 και το CPPT (central polyurine tract). Το πρώτο αποτελεί μια συντηρημένη περιοχή στο γονίδιο ενν του HIV-1 και παρουσία της Rev πρωτεΐνης τότε τα mRNA που περιέχουν το RRE εξέρχονται από τον πυρήνα και

επιτρέπεται η μετάφραση και το πακετάρισμα του ιού σε ισωμάτια. Το CPP είναι σημαντικό μετά τον σχηματισμό των ισωματίων και μαζί με το WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element) αυξάνουν την απόδοση της επιτυχούς διαμόλυνσης των κυττάρων θηλαστικών με τα παραγόμενα ισωμάτια. Το WPRE μεταγράφεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του EF-1α του οποίου η μεταγραφική δραστηριότητα αυξάνεται αισθητά όταν ακολουθείται από μια ιντρονική περιοχή του EF-1α. Ο ίδιος υποκινητής είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη, επιτρέποντας στα ευκαρυωτικά κύτταρα που έβαλαν τον φορέα να επιβιώσουν, και του γονιδίου αναφοράς BFP(Blue Fluorescent Protein).

Βιβλιογραφία

Ahn Jinwoo, Urist Marshall, Prives Carol, The Chk2 protein kinase, *DNA Repair* (2004) 3: 1039–1047. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.033

Ajani Jaffer A., Lee Jeeyun, Sano Takeshi, Janjigian Yelena Y., Fan Daiming, Song Shumei, Gastric adenocarcinoma, *Nature Reviews/Primer* (2017) 3(17036): 1-19. doi:10.1038/nrdp.2017.36

Amitai Gil, Sorek Rotem, CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action, *Nature Reviews / Microbiology* (2016) 14: 67–76. doi:10.1038/nrmicro.2015.14

Amodio Nicola, Raimondi Lavinia, Juli Giada, Stamato Maria Angelica, Caracciolo Daniele, Tagliaferri Pierosandro, Tassone Pierfrancesco, MALAT1: a druggable long non-coding RNA for targeted anti-cancer approaches, *Journal of Hematology & Oncology* (2018), 11(63). doi:10.1186/s13045-018-0606-4

Aryan Azadeh, Anderson Michelle A. E., Myles Kevin M., Adelman Zach N., TALEN-Based Gene Disruption in the Dengue Vector *Aedes aegypti*, *PLoS ONE* (2013) 8(3): e60082. doi:10.1371/journal.pone.0060082

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S. ... Horvath P. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* (2007), 315(5819), 1709–1712. doi:10.1126/science.1138140

Bartel David P, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*. (2004), 116(2):281-97

Bass Adam J. et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma, *Nature* (2014), 513(7517): 202–209. doi:10.1038/nature13480

Beckman Robert A, Loeb Lawrence A. Evolutionary Dynamics and Significance of Multiple Subclonal Mutations in Cancer, *DNA repair* (2017), 56:7-15. doi:10.1016/j.dnarep.2017.06.002

Bester

Bester A. C., Lee J. D., Chavez A., Lee Y.-R., Nachmani D., Vora S., Victor J., Sauvageau M., Rinn J. L., Provero P., Church G. M., Clohessy and Pandolfi P. P., An Integrated Genome Wide CRISPR Approach to Functionalize lncRNAs in Drug Resistance, *Cell* (2018), 173(3): 649–664.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.03.052.

Bi Honghao, Yang Bing, Gene Editing With TALEN and CRISPR/Cas in Rice, *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (2017), Volume 149:81-98. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.04.006

Bortesi Luisa, FischeRainer, The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond, *Biotechnology Advances* (2015) 33:41-52. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.006

Brocken D. J.W., Tark-Dame M., Dame R. T., dCas9: A Versatile Tool For Epigenome Editing, *Curr. Issues Mol. Biol.* (2018) 26:15-32. doi:10.21775/cimb.026.015

Carroll D, Genome Engineering with Targetable Nucleases, *Annu. Rev. Biochem.* (2014) 83:14.1–14.31. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035418

Chandrasegaran S., Carroll D., Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering, *J Mol Biol* (2016) 428(5 Pt B): 963–989. doi:10.1016/j.jmb.2015.10.014

Chen M, Fan L, Zhang S-M, Li Y, Chen P, Peng X, ... Li P-D. LINC01939 inhibits the metastasis of gastric cancer by acting as a molecular sponge of miR-17-5p to regulate EGR2 expression, *Cell Death & Disease* (2019), 10(70):1-13. doi:10.1038/s41419-019-1344-4

- Chen T., Xu X.-Y., Zhou P.-H., Emerging molecular classifications and therapeutic implications for gastric cancer, *Chin J Cancer* (2016). 35:49 DOI 10.1186/s40880-016-0111-5
- Chen Zhuo, Liu Shengnan, Xia Yuan, Wu Kejian, MiR-31 Regulates Rho-Associated Kinase-Myosin Light Chain (ROCK-MLC) Pathway and Inhibits Gastric Cancer Invasion: Roles of RhoA, *Medical Science Monitor* (2016), 22: 4679-4691. doi:10.12659/MSM.898399
- Chia N.Y., Tan P. Molecular Classification of Gastric Cancer, *Ann Oncol.* (2016) 27(5):763-9. doi: 10.1093/annonc/mdw040.
- Chin Lynda, Gray Joe W., Translating insights from the cancer genome into clinical practice, *Nature* (2008 April), 452:553-563. doi:10.1038/nature06914
- Claire Viillard, Bruno Larrive'e, Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets, *Angiogenesis* (2017) 20:409–426 DOI 10.1007/s10456-017-9562-9
- Cohen Jeffrey I., EPSTEIN–BARR VIRUS INFECTION, *Medical Progress* (2000 August), 343(7):481-492. doi:10.1056/NEJM200008173430707
- Costa F.F. Non-coding RNAs: New players in eukaryotic biology, *Gene* (2005), 357:83– 94. doi:10.1016/j.gene.2005.06.019
- David Muriel, Petit Dominique, Bertoglio Jacques, Cell cycle regulation of Rho signaling pathways, *Cell Cycle* (2012), 11(16):3003-3010. doi:10.4161/cc.21088
- Doudna Jennifer A., Charpentier Emmanuelle, The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, *Science* (2014 November), 346(6213): 1077-1086. doi:10.1126/science.1258096
- Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus M H, Chandrasegaran S, Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research* (2005), 33(18): 5978–5990. doi:10.1093/nar/gki912
- Ecco G, Imbeault M, Trono D, KRAB zinc finger proteins, *Development* (2017), 144:2719-2729. doi:10.1242/dev.132605
- Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, Yokoyama M, Tamai K, Yamanami H, ... Satoh K. Enhanced Expression of Long Non-Coding RNA HOTAIR Is Associated with the Development of Gastric Cancer, *PLOS One* (2013), 8(10): e77070. doi: 10.1371/journal.pone.0077070
- Fatica A, Bozzoni I, Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development, *NATURE REVIEWS / GENETICS* (2014), 15:7-21. doi:10.1038/nrg3606
- Fidler Isaiah J., Kripke Margaret L., The challenge of targeting metastasis, *Cancer Metastasis Rev* (2015), 34:635–641. doi: 10.1007/s10555-015-9586-9
- Figueiredo C.M., Camargo C., Leite M., Fuentes-Pananá E.M., Rabkin C. S., Machado J. C. Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification, *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori* (2017), 277-304. DOI 10.1007/978-3-319-50520-6_12
- Fonkoua L. K., Yee N. S., Molecular Characterization of Gastric Carcinoma: Therapeutic Implications for Biomarkers and Targets, *Biomedicines* (2018), 6:32. doi:10.3390/biomedicines6010032
- Gaj T., Gersbach C.A., Barbas III C. F., ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends Biotechnol.* (2013), 31(7): 397–405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- Geisler Sarah, Collier Jeff, RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2013), 14(11):699-712. doi:10.1038/nrm3679
- Gibb Ewan A., Brown Carolyn J., Lam Wan L., The functional role of long non-coding RNA in Human carcinomas, *Molecular Cancer* (2011), 10(38):1-17. doi:10.1186/1476-4598-10-38
- Guitart Jr Joan Ramon, Johnson Jodi L., Chien Wade W., Research Techniques Made Simple: The Application of CRISPR/Cas9 and Genome Editing in Investigative Dermatology, *Journal of Investigative Dermatology* (2016), 136(9): e87–e93. doi:10.1016/j.jid.2016.06.007.

Gullo Irene, Carneiro Fátima, Oliveira Carla, Almeida Gabriela M., Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications, *Pathobiology* (2017), 85(1-2):50-63. doi: 10.1159/000473881

Guo J, Yu W, Su H & Pang X, Genomic landscape of gastric cancer: molecular classification and potential targets, *Sci China Life Sci.* (2016) doi: 10.1007/s11427-016-0034-1

Gupta Rajnish A., Shah Nilay, Wang Kevin C., Kim Jeewon, ..., Chang Howard Y., Long noncoding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis, *Nature* (2010) 464(7291): 1071–1076. doi:10.1038/nature08975.

Ha M., Kim V.N., Regulation of microRNA biogenesis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2014), 15: 509-524. doi:10.1038/nrm3838

Hanahan Douglas, Weinberg Robert A., The Hallmarks of Cancer, *Cell* (2000), 100: 57–70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Ho Tsui-Ting, Jianguo Huang, Nanjiang Zhou, Ziqiang Zhang, Pratirodh Koirala, Xinchun Zhou, Fangting Wu, Xianfeng Ding & Yin-Yuan Mo, Regulation of PCGEM1 by p54/nrb in prostate cancer, *Scientific RepoRts* (2016), 6. DOI: 10.1038/srep34529

Huang Jin-Zhou, Chen Min, Chen De, Gao Xing-Cheng, Zhu Song, Huang Hongyang, Hu Min, Zhu Huifang, Yan Guang-Rong, A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth, *Molecular Cell* (2017), 68(1):171-184. doi:10.1016/j.molcel.2017.09.015

Huang, Y-H, Su J, Lei Y, Brunetti L, Gundry M C, Zhang X, ... Goodell M A (2017) DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A. *Genome Biology* (2017), 18(1). doi:10.1186/s13059-017-1306-z

Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N. Non-coding RNAs: hope or hype? *TRENDS in Genetics* (2005), 21(5):289-297. doi:10.1016/j.tig.2005.03.007

Jansen Ruud., van Embden Jan. D. A., Gaastra Wim., Schouls Leo. M., Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Molecular Microbiology* (2002) 43(6):1565–1575

Jiang Fuguo, Doudna Jennifer A., CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms, *Annual Reviews Biophys.* (2017), 46:505-529. doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E., A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity, *Science* (2012), 337(6096): 816–821. doi:10.1126/science.1225829

Joung J. Keith, Sander Jeffrey D., TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2012), 14(1), 49–55. doi:10.1038/nrm3486

Kalluri Raghu and Weinberg Robert A., The basics of epithelial-mesenchymal transition, *The Journal of Clinical Investigation* (2009) 119(6):1420-1428.

Kang Hyunseon C., Menias Christine O., Gaballah Ayman H., Shroff Stuti, Taggart Melissa W., Garg Naveen, Elsayes Khaled M., Beyond the GIST: Mesenchymal Tumors of the Stomach, *RadioGraphics* (2013) 33:1673–1690. doi: 10.1148/rg.336135507

Kang Y. J., Yang D. C., Kong L., Hou M., Meng Y. Q., Wei L., Gao G. 2017. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research* (2017), 45(Web Server issue): W12–W16.

Karimi Parisa, Islami Farhad, Anandasabapathy Sharmila, Freedman Neal D., Kamangar Farin, Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2014 May) 23(5):700–713. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-1057.

Kim Hyongbum and Kim Jin-Soo, A guide to genome engineering with programmable nucleases, *Nature Reviews/Genetics* (2014) 15:321-334. doi:10.1038/nrg3686

Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D, Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F., Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex, *Nature* (2015), 517(7536): 583–588. doi:10.1038/nature14136

Lamouille Samy, Xu Jian, Derynck Rik, Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition, *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014 March) 15(3): 178–196. doi:10.1038/nrm3758

Langowski John L., Zhang Xueqing, Wu Lingling, Mattson Jeanine D., Chen Taiying, Smith Kathy, Basham Beth, McClanahan Terrill, Kastelein Robert A., Oft Martin, IL-23 promotes tumour incidence and growth, *Nature* (2006) 442:461-465. doi:10.1038/nature04808

Lawrence S. Young and Alan B. Rickinson. EPSTEIN–BARR VIRUS: 40 YEARS ON. *NATURE REVIEWS / CANCER* (2004), 4:757-768. doi:10.1038/nrc1452

Lee Ciaran M., Flynn Rowan, Hollywood Jennifer A., Scallan Martina F., Harrison Patrick T., Correction of the DF508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair, *BioResearch Open Access* (2012), 1(3):99- 108. doi:10.1089/biores.2012.0218

Lee Eva Y.H.P. and Muller William J., Oncogenes and Tumor Suppressor Genes, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2010), 2(10):a003236–a003236. doi:10.1101/cshperspect.a003236

Lei C., Du F., Sun L., Li T., Li T., Min Y., ... Fan D. miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6. *Cell Death and Disease* (2017), 8(10): e3101. doi:10.1038/cddis.2017.493

Li F., Shi J., Xu Z., Yao X., Mou T., Yu J., ... Li G. S100A4-MYH9 Axis Promote Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by Inducing TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Cancer* (2018), 9(21):3839–3849. doi:10.7150/jca.25469

Li H. L., Fujimoto N., Sasakawa N., Shirai S., Ohkame T., Sakuma T., ... Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* (2015), 4(1):143–154. doi:10.1016/j.stemcr.2014.10.013

Li L., Krymskaya L., Wang J., Henley J., Rao A., Cao L.-F., ... DiGiusto D. L. Genomic Editing of the HIV-1 Coreceptor CCR5 in Adult Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Using Zinc Finger Nucleases. *Molecular Therapy* (2013), 21(6):1259–1269. doi:10.1038/mt.2013.65

Lifshitz, V., & Frenkel, D. TGF- β , *Handbook of Biologically Active Peptides* (2013), 1647–1653. doi:10.1016/b978-0-12-385095-9.00225-6

Loewen Gregory, Jayawickramarajah Janarthanan, Zhuo Ying, Shan Bin, Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer, *Journal of Hematology & Oncology* (2014), 7:90 doi:10.1186/s13045-014-0090-4

Lupo A, Cesaro E, Montano G, Zurlo D, Izzo P, Costanzo P. KRAB-Zinc Finger Proteins: A Repressor Family Displaying Multiple Biological Functions, *Current Genomics* (2013), 14(4):268-278.

Lupo Angelo, Cesaro Elena, Montano Giorgia, Zurlo Diana, Izzo Paola, Costanzo Paola, KRAB-Zinc Finger Proteins: A Repressor Family Displaying Multiple Biological Functions, *Current Genomics* (2013) 14(4): 268-278

Maeder Morgan L, Linder Samantha J, Cascio Vincent M, Fu Yanfang, Ho Quan H, Joung J Keith, CRISPR RNA–guided activation of endogenous human genes, *Nature Methods* (2013) 10(10):977–979. doi:10.1038/nmeth.2598

- Makarova Kira S., Wolf Yuri I, Alkhnbashi Omer S., Costa Fabrizio et al., An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems, *Nature Reviews Microbiology* (2015) 13:722-736. doi:10.1038/nrmicro3569
- Mali Prashant, Esvelt Kevin M, Church George M, Cas9 as a versatile tool for engineering biology, *Nature Methods* (2013) 10(10): 957–963. doi:10.1038/nmeth.2649
- Marraffini Luciano A., CRISPR-Cas immunity in prokaryotes, *Nature* (2015) 526(7571): 55–61. doi:10.1038/nature15386
- McCracken Kyle W. and Wells James M., Mechanisms of embryonic stomach development, *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2017), 66:36–42. doi:10.1016/j.semcd.2017.02.004
- Mercer J, Mahmoudi M, Bennett M, DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (2007) 621(1-2), 75–86. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.02.011
- Mineur Laurent, Jaegle Enric, Pourel Nicolas and Garcia Robin (2012). Critical Normal Tissue and Radiation Injury: The Stomach, Modern Practices in Radiation Therapy, Dr. Gopishankar Natanasabapathi (Ed.), ISBN:978-953-51-0427-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/modern-practices-in-radiationtherapy/critical-normal-tissue-and-radiation-injury-the-stomach>
- Mojica Francisco J. M., Cesar Dı́ez-Villaseñor, Soria Elena and Juez Guadalupe, Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria, *Molecular Microbiology* (2000) 36(1): 244–246
- Mojica Francisco J.M., Ce’ sar Dı́ez-Villaseñ or, Jesu’ s Garcı́ a-Martı́ nez, Soria Elena, Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution* (2005), 60(2):174–182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
- Molinari Francesca, Frattini Milo, Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal Cancer, *Frontiers in Oncology* (2014) 3(326):1-8. doi: 10.3389/fonc.2013.00326
- Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I. targeted DNA demethylation in vivo using dCas9–peptide repeat and scFv–tet1 catalytic domain fusions, *Nature Biotechnology* (2016) 34(10):1060-1068. doi:10.1038/nbt.3658
- Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, ... Wigler M. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity, *Genome Research* (2010) 20(1):68-80. doi: 10.1101/gr.099622.109
- Nemudryi A. A., Valetdinova K. R., Medvedev S. P., Zakian S. M., TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery, *Acta Naturae*. (2014) 6(3):19-40.
- Nin mg, Baojian L, Hui Z, Linli W, Yongli S, Yanting X, Ke H, Shubin C, Xiaoxiao Z, Yang C, Duanqing P, Guangjin P. Transcription Activator-like Effector Nuclease (TALEN)-mediated Gene Correction in Integration-free β -Thalassemia Induced Pluripotent Stem Cells, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2013) 288(48):34671–34679. doi: 10.1074/jbc.M113.496174
- Niu Guilian, Wright Kenneth L, Huang Mei, Song Lanxi, Haura Eric, Turkson James, Zhang Shumin, Wang Tianhong, Sinibaldi Dominic, Coppola Domenico, Heller Richard, Ellis Lee M, Karras James, Bromberg Jacqueline, Pardoll Drew, Jove Richard, Yu Hua, Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis, *Oncogene* (2002) 21:2000 – 2008. doi: 10.1038/sj.onc.1205260
- O’Connor Anthony, O’Moráin Colm, Digestive Function of the Stomach, *Digestive Diseases* (2014) 32(3):186-191. doi: 10.1159/000357848
- Parasramka M.A., Maji S, Matsuda A, Yan I.K., Patel T, Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma, *Pharmacology & Therapeutics* (2016), 161:67–78. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.004

- Park Sook Ryun, Management of gastric cancer: East vs west, *Curr Probl Cancer* (2015), 39(6):315-341. doi:10.1016/j.currprobcancer.2015.10.005
- Peng W, Feng J, Long noncoding RNA LUNAR1 associates with cell proliferation and predicts a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma, *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2016), 77:65–71. doi:10.1016/j.biopha.2015.12.001
- Perez-Pinera P, Kocak D D, Vockley C M, Adler A F, Kabadi A M, Polstein L R, ... Gersbach CA. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors, *Nature Methods* (2013) 10(10):973-976. doi:10.1038/NMETH.2600
- Polk D. Brent, Peek, Jr Richard M., Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond, *Nature Reviews/Cancer* (2010) 10:403-414. doi:10.1038/nrc2857
- Porteus Matthew H., Carroll Dana, Gene targeting using zinc fingernucleases, *Nature | Biotechnology* (2005 August), 23(8):267-973 doi:10.1038/nbt1125
- Qu Z, Adelson D. L, Evolutionary conservation and functional roles of ncRNA, *Frontiers in GENETICS* (2012), 3(215). doi: 10.3389/fgene.2012.00205
- Ran F Ann, Hsu Patrick D., Wright Jason, Agarwala Vineeta, Scott David A., Zhang Feng, Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nature/Protocols* (2013), 8(11):2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Riquelme I, Saavedra K, Espinoza JA, Weber H, García P, Nervi B, Garrido M, Corvalán A H, Roa JC and Bizama C, Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathwaydriven targeted therapy, *Oncotarget* (2015) 6 (28): 24750-24779
- Röcken Christoph, Molecular classification of gastric cancer, *EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS* (2017), 17 (3):293–301 doi:10.1080/14737159.2017.1286985
- Salehi Saeede, Taheri Mohammad Naser, Azarpira Negar, Zare Abdolhossein, Behzad-Behbahani Abbas, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (2017), 21(12): 3120–3140. doi:10.1111/jcmm.13238
- Samson Julie E., Magadán Alfonso H., Sabri Mourad and Moineau Sylvain, Revenge of the phages: defeating bacterial defences, *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY* (2013), 11:675-687. doi:10.1038/nrmicro3096
- Sander Jeffrey D., Joung J. Keith, CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting, *Nature Biotechnology* (2014), 32(4):347–355. doi:10.1038/nbt.2842
- Sanjeevaiah A, Cheedella N, Hester C, and Porembka M R. Gastric Cancer: Recent Molecular Classification Advances, Racial Disparity, and Management Implications, *American Society of Clinical Oncology* (2018), 14(4):217-224. DOI: 10.1200/JOP. 17.00025
- Santosh B, Varshney A, Yadava P.K, Non-coding RNAs: biological functions and applications, *Cell Biochem Funct* (2014). doi: 10.1002/cbf.3079
- Shih J-W, Chiang W-F, Wu A T H, Wu M-H, Wang L-Y, Yu Y-L, ... Kung H-J, Long noncoding RNA LncHIFCAR/MIR31HG is a HIF-1 α co-activator driving oral cancer progression, *Nature Communications* (2017)., 8:15874. doi:10.1038/ncomms15874
- Shukla VK, Doyon Y, Miller J C, DeKolver R C, Moehle E A, Worden S E, ... Urnov F D. Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases, *Nature* (2009), 459(7245): 437–441. doi:10.1038/nature07992
- Siddiqui Imtiaz A., Sanna Vanna, Ahmad Nihal, Sechi Mario, Mukhtar Hasan, Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy, *Annals of the New York Academy of Sciences* (2015), 1348(1), 20–31. doi:10.1111/nyas.12811

- Singha V, Braddicka D, Dhar P K, Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology, *Gene* (2016), doi:10.1016/j.gene.2016.11.008
- Smidler AL, Terenzi O, Soichot J, Levashina EA, Marois E Targeted Mutagenesis in the Malaria Mosquito Using TALE Nucleases, *PLoS ONE* (2013) 8(8):e74511. doi:10.1371/journal.pone.0074511
- Song Z, Wu Y, Yang J, Yang D and Fang X, Progress in the treatment of advanced gastric cancer, *Tumor Biology* (2017), 39(7). DOI: 10.1177/1010428317714626
- Sontheimer E. J., Barrangou R., The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution, *HUMAN GENE THERAPY* (2015), 26(7):413-424. DOI: 10.1089/hum.2015.091
- Soybel D. I. Anatomy and Physiology of the Stomach. *Surgical Clinics of North America* (2005), 85(5): 875–894. doi:10.1016/j.suc.2005.05.009
- Stratton Michael R, Campbell Peter J., and Futreal P. Andrew, The cancer genome, *Nature* (2009) 458(7239): 719–724. doi:10.1038/nature07943
- Strong Vivian E., Progress in gastric cancer, *Updates in Surgery* (2018). doi:10.1007/s13304-018-0543-3
- Trimarchi T, Bila E, Ntziachristos P, Fabbri G, Dalla-Favera R, Tsigirgos A, Aifantis I. Genome-wide Mapping and Characterization of Notch-Regulated Long Noncoding RNAs in Acute Leukemia, *Cell* (2014), 158: 593–606. doi:10.1016/j.cell.2014.05.049
- Urnov Fyodor D., Rebar Edward J., Holmes Michael C, Zhang H. Steve, Gregory Philip D., Genome editing with engineered zinc finger nucleases, *Nature Reviews/Genetics* (2010), 11:636-646. doi:10.1038/nrg2842
- Van Belkum Alex, Scherer Stewart, Van Alphen Loek, Verbrugh Henri, Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (June 1998), 62(2): 275–293
- Wang Haifeng, La Russa Marie, and Qi Lei S., CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond, *Annu. Rev. Biochem.* (2016), 85:227–64
- Wang J, Wu P, Liu M, Liao Z, Wang Y, Dong Z, & Chen X D. An advanced near real dynamic in vitro human stomach system to study gastric digestion and emptying of beef stew and cooked rice. *Food & Function* (2019). doi:10.1039/c8fo02586j
- Wei Chuanxian, Liu Jiyong, Yu Zhongsheng, Zhang Bo, Gao Guanjun, Jiao Renjie, TALEN or Cas9 -- rapid, efficient and specific choices for genomic modifications, *Journal of Genetics and Genomics* (2013), 40(6):281-289. doi: 10.1016/j.jgg.2013.03.013
- Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey J A, Gao A C, ... Xie K. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* (2003), 22(3):319–329. doi:10.1038/sj.onc.1206122
- Weinstein I Bernard and Joe Andrew K. Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *NATURE CLINICAL PRACTICE ONCOLOGY* (2006), 3(8):448-457. doi:10.1038/nconpc0558
- Wu M-C, Cheng H-H, Yeh T-S, Li Y-C, Chen T-J, Sit W Y, ... Wang W-C. (2019) KDM4B is a coactivator of c-Jun and involved in gastric carcinogenesis. *Cell Death & Disease* (2019), 10(2). doi:10.1038/s41419-019-1305-y
- Xiao-Jie L, Hui-Ying X., Zun-Ping K., Jin-Lian C., Li-Juan J., CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy, *J Med Genet* (2015), (52):289–296. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102968
- Xu Peng, Tong Ying, Liu Xiu-zhen, Wang Ting-ting, Cheng Li, Wang Bo-yu, Lv Xiang, Huang Yue, Liu De-pei, Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2–654 (C>T) mutation in β -thalassemia-derived iPSCs, *Scientific Reports* (2015) 5(1). doi:10.1038/srep12065

- Tomohiro Yamazaki, Chikako Fujikawa, Ayaka Kubota, Akinari Takahashi, Tetsuro Hirose, CRISPR-mediated NEAT1 lncRNA upregulation induces formation of intact paraspeckles, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2018), 504:218e224 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.158>
- Ye G, Huang K, Yu J, Zhao L, Zhu X, Yang Q, ... Qi X. MicroRNA-647 Targets SRF-MYH9 Axis to Suppress Invasion and Metastasis of Gastric Cancer. *Theranostics* (2017), 7(13):3338–3353. doi:10.7150/thno.20512
- Yokota I, Sasaki Y, Kashima L, Idogawa M and Tokino T., Identification and characterization of early growth response 2, a zinc-finger transcription factor, as a p53-regulated proapoptotic gene. *International Journal of Oncology* (2010), 37(6): 1407-1416. doi:10.3892/ijo_00000792
- Zhang M., Du X., Noncoding RNAs in gastric cancer: Research progress and prospects, *World J Gastroenterol* (2016), 22(29): 6610-6618. doi: 10.3748/wjg.v22.i29.6610
- Zhang Wei, TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics. *Chinese Journal of Cancer* (2014). doi:10.5732/cjc.014.1011
- Zhang Z, Zhu Z, Watabe K, Zhang X, Bai C, Xu M, Wu F, and Mo Y-Y. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. *Cell Death and Differentiation* (2013) 20: 1558–1568. doi:10.1038/cdd.2013.110
- Zhao J, Du P, Cui P, Qin Y, Hu C, Wu J, ... Huang G. LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene* (2018), 37(30):4094–4109. doi:10.1038/s41388-018-0250-z
- Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, ... Lin S. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods* (2013), 10(4):329–331. doi:10.1038/nmeth.2374