



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Μελέτη του lncRNA RECUR1 με RNAi και CRISPR

προσεγγίσεις στον καρκίνο»

« Research on lncRNA RECUR1 with RNAi and CRISPR

methods in cancer »

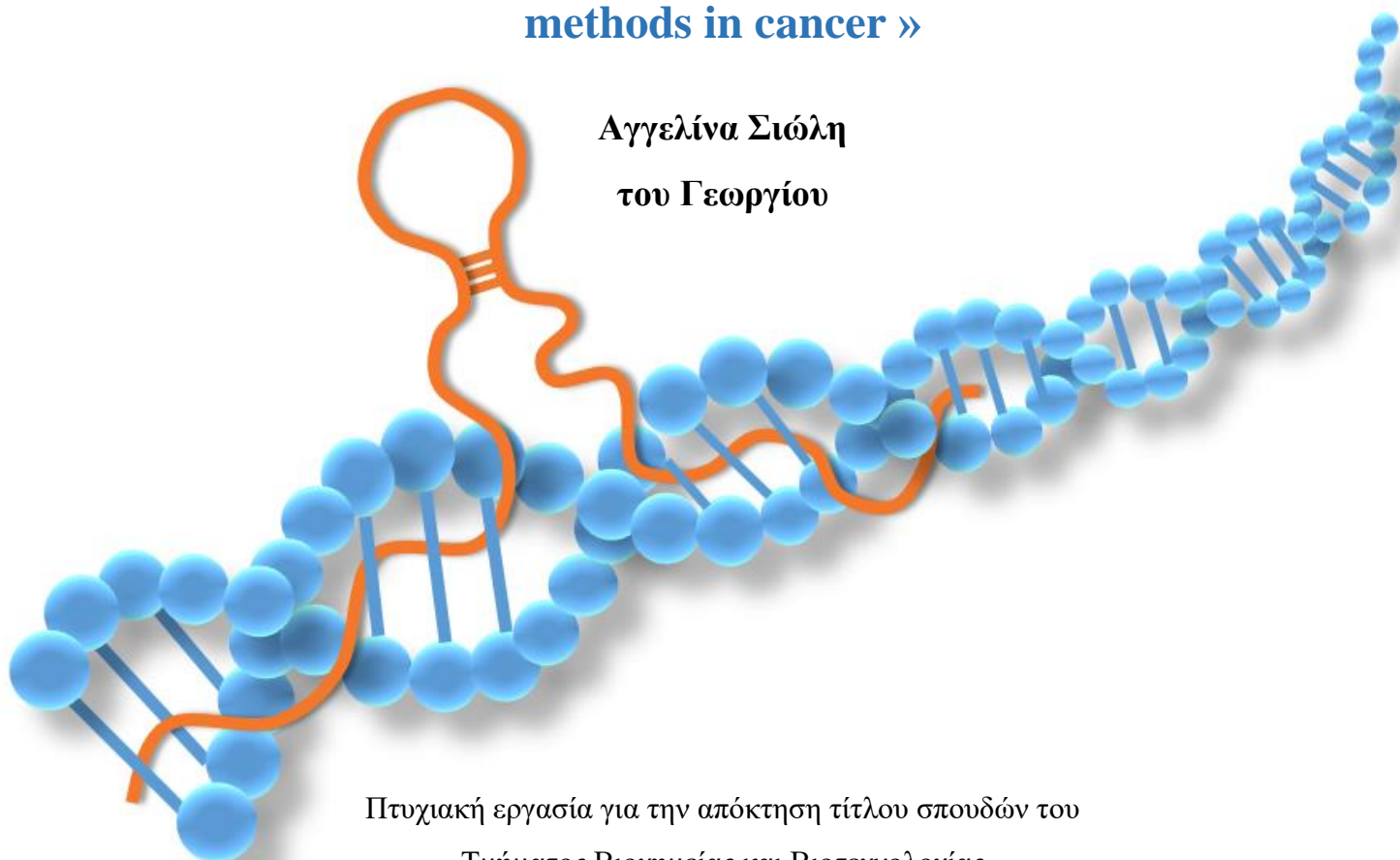
Αγγελίνα Σιώλη
του Γεωργίου

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

Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Γιακουντής Αντώνιος, Παπουτσοπούλου Σταματία, Τσίκου Δανιέλα

Λάρισα 2022



Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων καθηγητής)

Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή.....	8
1.1 Ο γαστρικός καρκίνος.....	8
1.1.1 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά γαστρικού καρκίνου.....	8
1.1.2 Μοριακή ταξινόμηση υποτύπων γαστρικού καρκίνου.....	10
1.1.3 Μέθοδοι διάγνωσης και θεραπείας.....	13
1.2 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA).....	15
1.2.1 Χαρακτηριστικά των lncRNA	15
1.2.2 Ταξινόμηση των lncRNA σύμφωνα με τον εντοπισμό στο γονιδίωμα	16
1.2.3 Ταξινόμηση lncRNA σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης.....	18
1.2.4 Ο ρόλος των <i>cis</i> -δραστικών lncRNA.....	21
1.3 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) στον καρκίνο.....	23
1.3.1 Η διαγνωστική και θεραπευτική αξία των lncRNA στο γαστρικό καρκίνο.....	24
2. Ερευνητική υπόθεση και σκοπός.....	26
3. Υλικά και πειραματικές μέθοδοι.....	27
3.1 Υλικά.....	27
3.1.1 Κυτταρικές σειρές	27
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη	27
3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς	28
3.1.4 Ένζυμα και αντιδραστήρια	31
3.1.5 Kit απομόνωσης/καθαρισμού DNA	33
3.1.6 Συσκευές και εργαλεία	34
3.2 Μέθοδοι	34
3.2.1 Κλωνοποίηση ενθεμάτων DNA και διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.....	34
3.2.2 Απομόνωση RNA και υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του lncRNA RECUR1.....	44

4. Αποτελέσματα	44
4.1 Αποτελέσματα βιοπληροφορικών αναλύσεων μέσω της βάσης δεδομένων GEPID	49
4.2 Πειραματικά αποτελέσματα	51
4.2.1 Παροδική σίγηση μέσω μηχανισμού παρεμβολής RNA των μεταγράφων του RECUR1 και του RECUR1 target	51
4.2.2 Σίγηση μέσω μηχανισμού παρεμβολής RNA των μεταγράφων του RECUR1 και RECUR1 target σε σταθερή καρκινική κυτταρική σειρά	56
4.2.3 Σταθερή σίγηση μέσω CRISPR knockout μηχανισμού του γονιδίου του RECUR1 και του RECUR1 target	58
5. Συζήτηση	62
6. Βιβλιογραφία	66

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο “Μελέτη του lncRNA RECUR1 με RNAi και CRISPR προσεγγίσεις στον καρκίνο” εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής από τον Φεβρουάριο του 2022 έως τον Ιούνιο του 2022.

Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αντώνιο Γιακουντή, που με εμπιστεύτηκε και μου ανέθεσε αυτήν την επιστημονική εργασία. Η αμείωτη στήριξή του και η εμπειρία που απέκτησα λόγω αυτής της ξεχωριστής ευκαιρίας που μου προσφέρθηκε αποτελεί γερό θεμέλιο, αλλά και ισχυρό κίνητρο να εξερευνήσω νέα ακαδημαϊκά περιβάλλοντα στον κλάδο των Μοριακών Βιοεπιστημών.

Αισθάνομαι ευγνώμων για την επικοινωνιακή συνεργασία που είχα με όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και θέλω να τους ευχαριστήσω για την ανιδιοτελή συμβολή τους στις πειραματικές μου προσπάθειες.

Αφιερώνω αυτή την πτυχιακή εργασία στην οικογένειά μου, που ανέκαθεν με στήριζε και με εμπύχωνε για να επιτύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο, του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, ο καρκίνος του στομάχου κατατάσσεται ως ο πέμπτος πιο συχνός τύπος καρκίνου στον άνθρωπο, ενώ την τελευταία πενταετία κατατάχθηκε έως τη δεύτερη θέση σε ό,τι αφορά τη θνησιμότητα. Αξίζει να αναφερθεί ότι, ο επιπολασμός του καρκίνου του στομάχου μεταξύ ηπείρων, την τελευταία πενταετία, εμφανίζει συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή, με το 77% των κρουσμάτων να βρίσκεται στην Ασία, περίπου 12% στην Ευρώπη και 5% στη Λατινική Αμερική. Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας οφείλονται στο γεγονός ότι υπάρχει έλλειψη διαγνωστικών εργαλείων, με τη γαστροσκόπηση να είναι η βασική μέθοδος διάγνωσης του καρκίνου του στομάχου. Ωστόσο, η γαστροσκόπηση αποτελεί επεμβατική μέθοδος, η οποία είναι επίπονη για τον ασθενή, ενώ ταυτόχρονα είναι οικονομικά ασύμφορη ως διαγνωστική μέθοδος ρουτίνας στο ασφαλιστικό και υγειονομικό σύστημα, με αποτέλεσμα να μην εφαρμόζεται προληπτικά στα πλαίσια των ετήσιων εξετάσεων των πολιτών ακόμα και σε Ασιατικές χώρες. Μια προσιτή λύση στο πρόβλημα αυτό έρχονται να προσφέρουν οι νέες τεχνολογίες αλληλούχησης και ανάλυσης του γονιδιωματικού προφίλ των ασθενών, τόσο στα πλαίσια της πρόληψης και της διάγνωσης, όσο και στην πρόγνωση και στην εύρεση εξατομικευμένης θεραπείας για τους ασθενείς. Πρόσφατες γονιδιωματικές μελέτες συνέβαλαν στη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου σε τέσσερις υποτύπους, βάσει του γενετικού υποβάθρου των ασθενών. Επίσης αποκάλυψαν την εκτεταμένη ύπαρξη γενετικών τόπων που μεταγράφουν μακρά μη κωδικοποιητικά RNA ή lncRNA (long non-coding RNA), τα οποία συμμετέχουν στην καρκινογένεση και στην εξέλιξη της νόσου. Ειδικότερα, τα lncRNA χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη πολυπλοκότητα δράσης, αλλά και από ιστοειδικότητα έκφρασης, καθιστώντας τα εξειδικευμένους μοριακούς δείκτες και θεραπευτικούς στόχους. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί ο χαρακτηρισμός και η διερεύνηση της δράσης ενός μη μελετημένου lncRNA, που ονομάστηκε RECUR1, μέσω RNAi και CRISPR προσεγγίσεων. Το RECUR1 (Regulatory cancer mutation lncRNA 1), σύμφωνα με μη δημοσιευμένα δεδομένα, εκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου και συγκεκριμένα στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής, επιβεβαιώνεται ότι το RECUR1, επάγει την έκφραση ενός γειτονικού κωδικοποιητικού ογκογονιδίου, συμμετέχοντας στην επαγωγή καρκινογένεσης.

Abstract

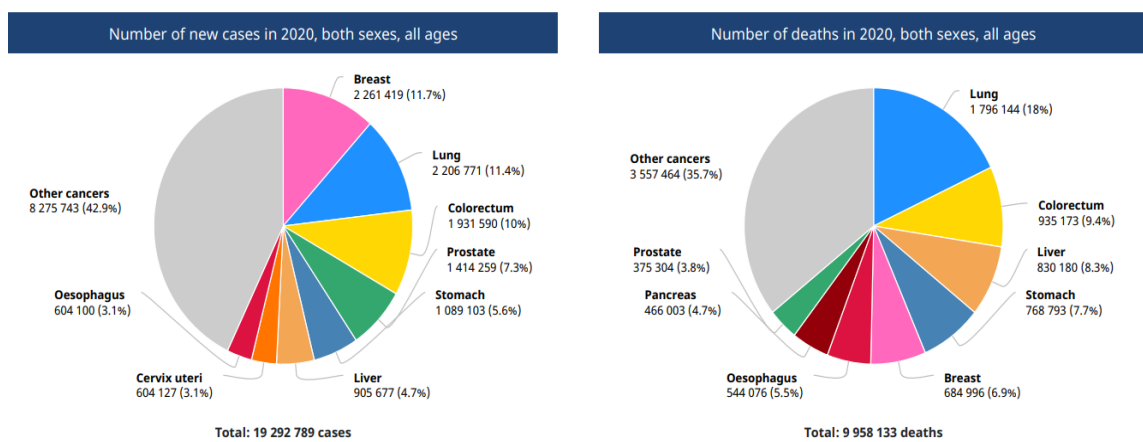
According to the International Agency for Research on Cancer (IARC) of the World Health Organization (WHO), gastric cancer ranks as the fifth most common type of cancer in humans, and in the last five years it has been ranked second in terms of mortality. It is worth noting that the prevalence of gastric cancer between continents in the last five years, shows a specific geographical distribution, with 77% of cases being in Asia, about 12% in Europe and 5% in Latin America. The high mortality rates are due to the fact that there is a lack of diagnostic tools, with gastroscopy being the main method of diagnosing gastric cancer. However, gastroscopy is an invasive method, which is painful for the patient, while at the same time it is financially unprofitable as a routine diagnostic method in the insurance and health system and as a result it is not applied prophylactically in the annual examinations of citizens even in Asian countries. An affordable solution to this problem is offered by new technologies for sequencing and analysis of patients' genomic profile, both in the context of prevention and diagnosis, as well as in the prognosis and finding of individualized treatment for patients. Recent genomic studies have contributed to the molecular classification of gastric cancer into four subtypes, based on the genetic background of the patients. They also revealed the widespread existence of genetic loci that transcribe long non-coding RNA or lncRNA (long non-coding RNA), which are involved in carcinogenesis and disease progression. In particular, lncRNA are characterized by a particular complexity of action, but also by expression specificity, making them specialized molecular markers and therapeutic targets. The purpose of this thesis was to characterize and investigate the activity of an unstudied lncRNA, named RECUR1, through RNAi and CRISPR approaches. RECUR1 (Regulatory cancer mutation lncRNA 1), according to unpublished data, is expressed in gastric cancer and specifically in gastric adenocarcinoma. According to the experimental results of the present thesis, it is confirmed that RECUR1 induces the expression of a neighboring coding oncogene, participating in the induction of carcinogenesis.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο γαστρικός καρκίνος

1.1.1 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά γαστρικού καρκίνου

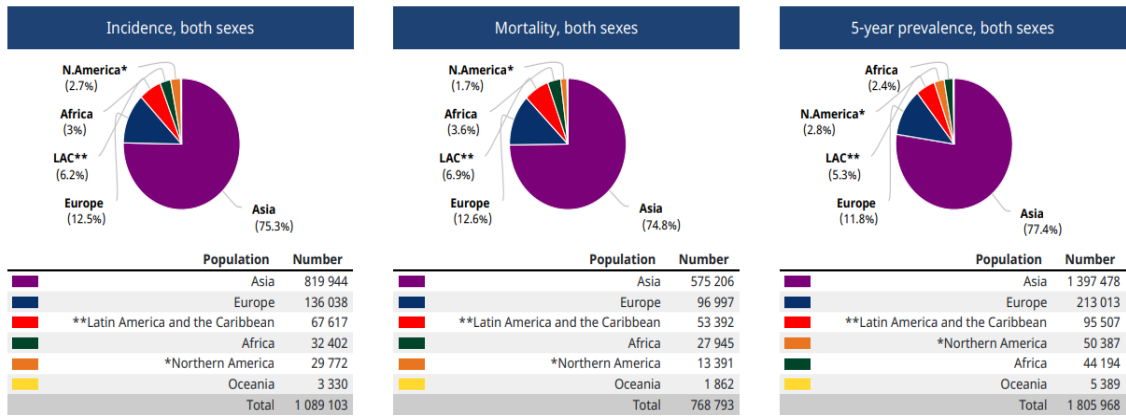
Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (GLOBOCAN) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 2020 ο καρκίνος του στομάχου, γνωστός και ως γαστρικός καρκίνος, αποτελούσε τον πέμπτο κατά συχνότητα εμφάνισης τύπο καρκίνου παγκοσμίως με 1.089.103 καταγεγραμμένες περιπτώσεις, ακολουθώντας τους καρκίνους του μαστού, του πνεύμονα και του προστάτη (*Εικόνα 1.1.*). Εντούτοις, ήταν ο τρίτος σε θνησιμότητα τύπος καρκίνου παγκοσμίως, με 768.793 καταγεγραμμένους θανάτους [1].



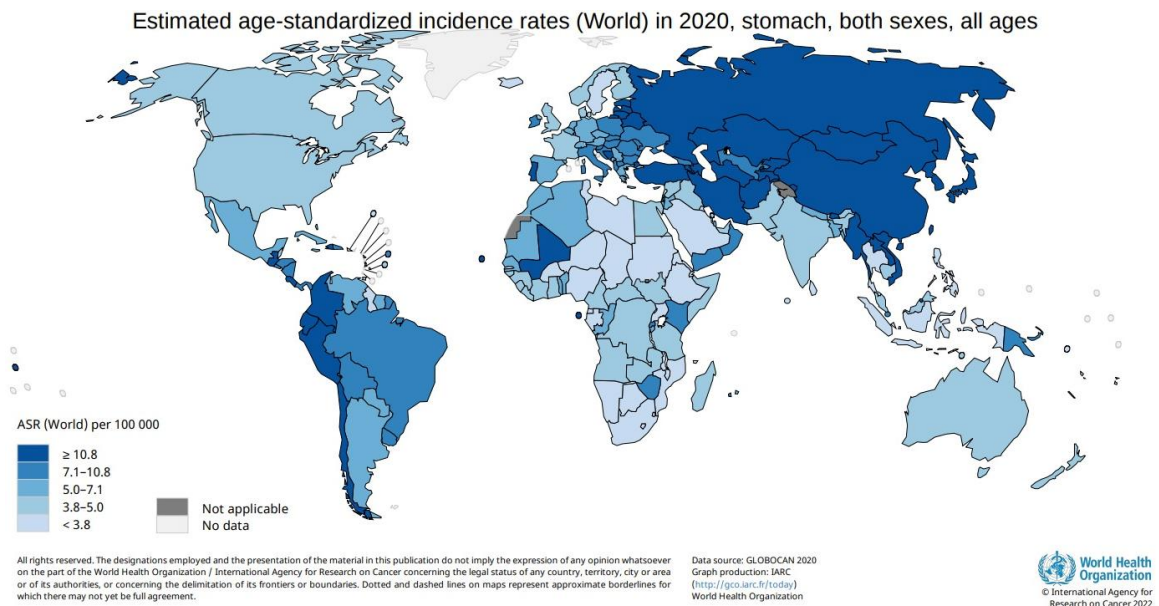
Εικόνα 1.1.: Κυκλικά διαγράμματα με τα ποσοστά συχνότητας εμφάνισης και θνησιμότητας ανά τύπο καρκίνου και για τα δύο φύλα παγκοσμίως. [2]

Ειδικότερα ως προς τη συχνότητα εμφάνισης, ο καρκίνος του στομάχου παρουσιάζει ανομοιόμορφη γεωγραφική κατανομή, με εμφανώς μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην Ασία (*Εικόνα 1.2.* και αναλυτικότερα *Εικόνα 1.3.*), στην οποία καταγράφηκε περίπου το 75,3% των νέων περιστατικών και το 74,8% των θανάτων και στα δύο φύλα παγκοσμίως. Ακολουθεί η Ευρώπη με 12,5 % νέων περιστατικών, καθώς και πολλές περιοχές της λατινικής Αμερικής με 6,2% [2].

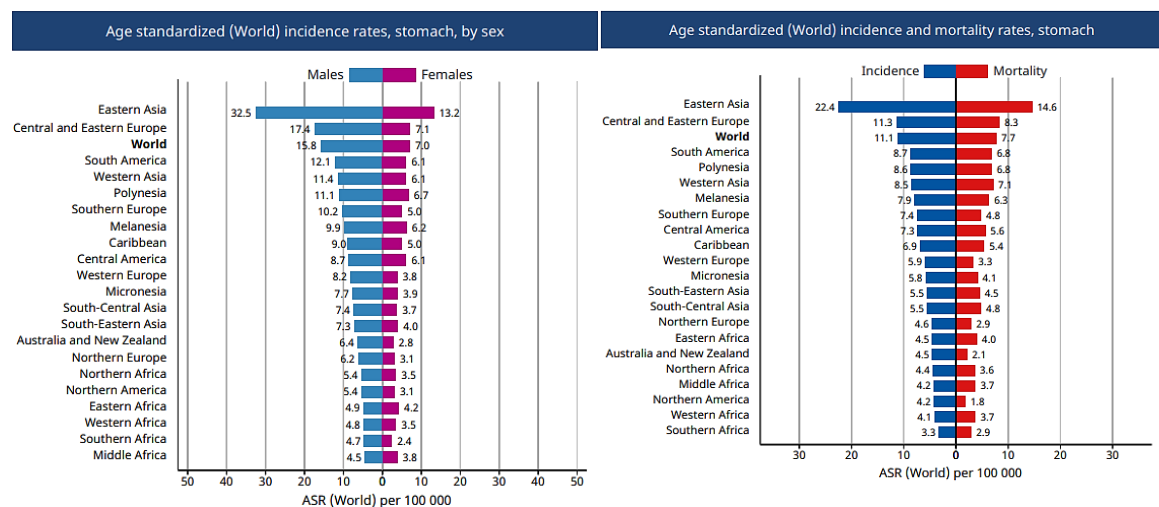
Αξίζει, ωστόσο, να αναφερθεί ότι η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου, δεν εμφανίζει μόνο ανομοιόμορφη γεωγραφική κατανομή, αλλά εμφανίζει και φυλετική διαφοροποίηση (*Εικόνα 1.4.*). Συγκεκριμένα, παγκοσμίως ο καρκίνος του στομάχου εμφανίζει διπλάσια συχνότητα εμφάνισης και υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στους άντρες εν συγκρίσει με τις γυναίκες [3].



Εικόνα 1.2: Κυκλικά διαγράμματα με τα ποσοστά των νέων περιστατικών, της θνησιμότητας και του πενταετή επιπολασμού για τον καρκίνο του στομάχου και για τα δύο φύλα παγκοσμίως [2].



Εικόνα 1.3.: Παγκόσμιος χάρτης με τη συχνότητα των νέων περιστατικών για τον καρκίνο του στομάχου και για τα δύο φύλα, ανά περιοχή, ανά 100.000 κατοίκους [2].



Εικόνα 1.4.: Διάγραμμα με τον αριθμό νέων περιστατικών και θανάτων για τον καρκίνο του στομάχου και για τα δύο φύλα, ανά περιοχή, ανά 100.000 κατοίκους [2].

Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας οφείλονται στο γεγονός ότι υπάρχει έλλειψη διαγνωστικών εργαλείων, με τη γαστροσκόπηση να είναι η βασική μέθοδος διάγνωσης του καρκίνου του στομάχου. Ωστόσο, η γαστροσκόπηση αποτελεί επεμβατική μέθοδος, η οποία είναι επίπονη για τον ασθενή, ενώ ταυτόχρονα είναι οικονομικά μη βιώσιμη ως διαγνωστική μέθοδος ρουτίνας στο ασφαλιστικό και υγειονομικό σύστημα, με αποτέλεσμα να μην εφαρμόζεται στα πλαίσια των ετήσιων εξετάσεων των πολιτών [4]. Συμπερασματικά, η καθυστερημένη διάγνωση συνδυαστικά με την ασυμπτωματική φύση των πρώιμων σταδίων και την υψηλή γενετική ετερογένεια του συγκεκριμένου καρκίνου, οδηγούν στην αυξημένη θνησιμότητα έναντι πιο συχνών μορφών της νόσου [5]. Συνεπώς, η εύρεση νέων, μη επεμβατικών βιοδεικτών έγκαιρης διάγνωσης με εξειδίκευση στα αρχικά στάδια του γαστρικού καρκίνου στα οποία οι ασθενείς δεν εμφανίζουν συμπτώματα, αποτελούν προτεραιότητα για τη συγκεκριμένη νεοπλασία [6].

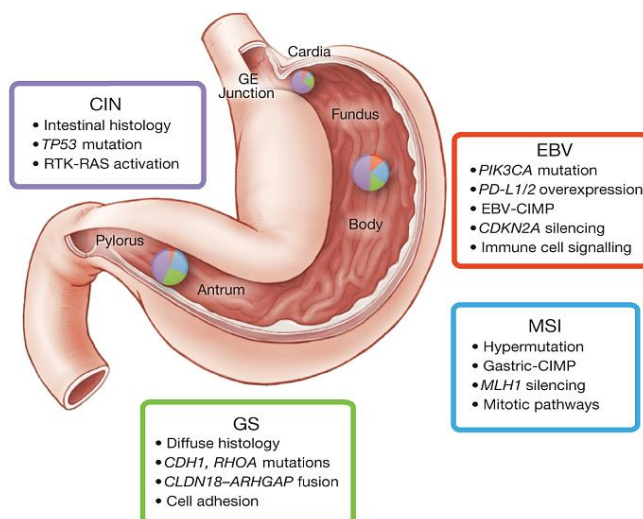
1.1.2 Μοριακή ταξινόμηση υποτύπων γαστρικού καρκίνου

Ο πλέον εξειδικευμένος τρόπος κατηγοριοποίησης των γαστρικών όγκων, βασίζεται σε μοριακά κριτήρια που προέκυψαν από την αλληλούχηση των γαστρικών καρκινικών βιοψιών. Η ταξινόμηση αυτή συμβάλλει στην εύρεση μοριακών υποτύπων, με απώτερο στόχο την αποτελεσματικότερη θεραπεία και ακριβέστερη πρόγνωση για το εκάστοτε ασθενή. Αυτό είναι εφικτό χάρις την εξέλιξη της τεχνολογίας και της ανάπτυξης γονιδιωματικών και μεταγραφομικών μεθόδων, μέσω των οποίων μπορούν να ταυτοποιηθούν διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες. Στην περίπτωση του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, το πιο διαδεδομένο σύστημα μοριακής ταξινόμησης στηρίζεται σε δεδομένα αλληλούχησης από την κοινοπραξία TCGA [7].

Μοριακή ταξινόμηση συστήματος TCGA

Με βάση τα TCGA δεδομένα, οι μοριακοί υπότυποι του γαστρικού καρκίνου δημιουργήθηκαν με την ανάλυση 295 δειγμάτων από πρωτοπαθή γαστρικά αδενοκαρκινώματα, από έξι διαφορετικές γονιδιωματικές προσεγγίσεις. Οι προσεγγίσεις αφορούν αναλύσεις αριθμού σωματικών επαναλήψεων (somatic copy number analysis, SCNA), μεθυλίωσης του DNA, αλληλούχησης των εξονίων, των mRNA και των miRNA. Οι υπότυποι αφορούν : 1) όγκους θετικούς στον ερπητοϊό Epstein-Barr (8,8% των

δειγμάτων), 2) όγκους με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (21,7% των δειγμάτων), 3) όγκους με γονιδιωματική σταθερότητα (19,7% των δειγμάτων) και 4) όγκους με χρωμοσωμική αστάθεια [8].



Εικόνα 1.5.: Σχηματική απεικόνιση των υποτύπων του γαστρικού αδενοκαρκινώματος και των βασικών χαρακτηριστικών τους, σύμφωνα τη μοριακή ταξινόμηση του συστήματος TCGA [8].

1) Όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (EBV +)

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) ανήκει στην κατηγορία των γάμμα-ερπητοϊών και είναι ευρέως γνωστός για την πρόκληση της λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο έχει την ικανότητα να μολύνει τα Β-λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες. Αν και το ποσοστό μόλυνσης των ενηλίκων είναι μεγαλύτερο από 90%, η μόλυνση από τον ιό δεν ισοδυναμεί με την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου, καθώς στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο ιός βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση [9]. Η μόλυνση από τον EBV έχει παρατηρηθεί περίπου σε 1 στους 10 ασθενείς με επιβεβαιωμένο γαστρικό καρκίνο, με το 70% να είναι άντρες ηλικίας κάτω των 60 ετών, με το ποσοστό αυτό να εμφανίζει αποκλίσεις εξαιτίας περιβαλλοντικών παραγόντων [10, 11]. Η ογκογόνος δράση του EBV είναι όμοια με τη δράση που έχει παρατηρηθεί στο λέμφωμα Hodgkin's, στο λέμφωμα Burkitt και στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα [12, 13]. Ωστόσο, στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου έχουν καταγραφεί γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες τροποποιούν τη λειτουργία σηματοδοτικών μονοπατιών του κυττάρου. Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια αφορούν τη διαμόρφωση της κυτταρικής προσκόλλησης, τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού, τη λειτουργία του άξονα των νευρικών

κυττάρων, καθώς και μονοπάτια τα οποία ελέγχονται από κυτοκίνες, είτε από κινάσες που ενεργοποιούνται με τη δράση μιτογόνων πρωτεϊνών [14]. Κατά συνέπεια, η μοναδικότητα αυτών των μοριακών χαρακτηριστικών δίνουν τη δυνατότητα εύρεσης εξειδικευμένης θεραπείας, βελτιώνοντας την πρόγνωση των ασθενών [15].

2) Όγκοι με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high)

Ως μικροδορυφόροι ορίζονται σύντομες επαναλήψεις έως και 6 νουκλεοτιδίων, οι οποίες βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα και είναι επιρρεπείς σε μεταλλάξεις. Οι γαστρικοί όγκοι με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) αφορούν συνήθως τον εντερικό υπότυπο και είναι συχνότεροι στις γυναίκες (56%), με μέση ηλικία διάγνωσης τα 72 έτη [16]. Χαρακτηριστικό αυτού του υποτύπου είναι η απώλεια λειτουργίας του μηχανισμού επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων (mismatch repair = MMR). Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό είναι το MLH1 (MutL homolog 1), MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 και PMS2, των οποίων η λειτουργία απενεργοποιείται, εξαιτίας της υπερμεθυλίωσης των υποκινητών τους [17]. Κατά συνέπεια, παρατηρείται η υπερσυσσώρευση μεταλλάξεων κυρίως σε μικροδορυφορικές περιοχές, με αποτέλεσμα την αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου, σε ογκογονίδια, με παραδείγματα τα γονίδια PIK3CA και ERBB3, αλλά σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα γονίδια TP53 και ARID1A [18].

3) Όγκοι με γονιδιωματική σταθερότητα (GS)

Στην τρίτη υποκατηγορία ανήκουν οι όγκοι στους οποίους δεν παρατηρούνται ανευπλοειδίες και σύμφωνα με αναλύσεις έχουν μειωμένο αριθμό σωματικών επαναλήψεων (SCNAs), ενώ ταυτόχρονα, δεν πληρούν τα κριτήρια των προαναφερθέντων υποκατηγοριών. Επιπλέον, η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 59 έτη, με τους γονιδιωματικά σταθερούς όγκους να είναι σε ποσοστό 73% διάχυτου τύπου, βάσει κατανομή Lauren [19]. Χαρακτηριστικές είναι οι μεταλλάξεις στα γονίδια ARID1A, CDH1 και RHOA. Το γονίδιο CDH1 είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της E-καδερίνης, μίας πρωτεΐνης, η οποία συμμετέχει αφενός στην κυτταρική προσκόλληση, αφετέρου συμμετέχει στη ρύθμιση του μονοπατιού Wnt, καθώς η διάσπαση της E-καδερίνης στην περίπτωση του καρκίνου, επιφέρει την αύξηση της ενεργής β-κατενίνης στο

κυτταρόπλασμα και τελικά την έκφραση ογκογονιδίων [20, 21]. Τέλος, το γονίδιο RHOA, κωδικοποιεί μία GTPάση, η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι Rho/ROCK, το οποίο ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση και την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, καθώς και των αποπτωτικών μηχανισμών [22].

4) Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN)

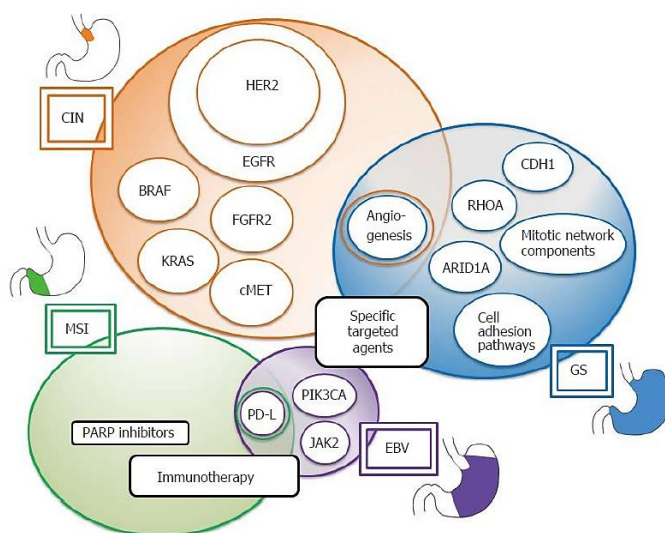
Στην τελευταία υποκατηγορία ανήκουν όλοι οι εναπομείναντες όγκοι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται, σε αντίθεση με την προηγούμενη υποκατηγορία, από υψηλό αριθμό SCNAs και παρουσία ανευπλοειδίας. Το 65% των περιπτώσεων αποτελούν εγγύ-αδενοκαρκινώματα, κυρίως εντερικού γαστρικού υπότυπου [23]. Στον υπότυπο αυτό έχουν παρατηρηθεί ανευπλοειδίες και τοπική ενίσχυση σε γονίδια του μονοπατιού RTK/RAS, όπως το γονίδιο ERBB2 (ενίσχυση έκφρασης 24%), τα KRAS/NRAS (ενίσχυση 18%), το EGFR (ενίσχυση 10%), τα ERBB3,FGFR2 και MET (ενίσχυση 8%). Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, όπως τα γονίδια της κυκλίνης E1, D1 και κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης CDK6. Άξιο αναφοράς θεωρούνται οι μεταλλάξεις οι οποίες έχουν καταγραφεί για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, το οποίο ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, καθώς και τους αποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου [24].

1.1.3 Μέθοδοι διάγνωσης και θεραπείας γαστρικού καρκίνου

Οι βασικότεροι μέθοδοι διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου αποτελούν: 1) οι αιματολογικές εξετάσεις και η πλήρης καταμέτρηση του αίματος (CBC), 2) η ενδοσκόπηση, 3) η αξονική και η μαγνητική τομογραφία, 4) η ακτινολογική μελέτη με τη χορήγηση βαρίου, 5) η ενδοσκοπική υπερηχογραφία, 6) η διαγνωστική λαπαροσκόπηση και 7) η λήψη βιοψίας, των οποίων τα αποτελέσματα εξετάζονται σε συνδυασμό με το οικογενειακό ιστορικό, την φυσική εξέταση και τον τρόπο ζωής του ασθενούς [25]. Ωστόσο, στην περίπτωση των αιματολογικών εξετάσεων οι βιοχημικοί δείκτες δεν ενδείκνυται για το μαζικό έλεγχο του πληθυσμού, καθώς δεν χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία. Για το λόγο αυτό, αξιοποιούνται και οι υπόλοιπες προαναφερθείσες επεμβατικές μέθοδοι, οι οποίες εμφανίζουν περιορισμούς στη

διαγνωστική τους ακρίβεια και στον εντοπισμό όγκων με διάμετρο μικρότερη από 3 εκατοστά [26, 27]. Επιπλέον, σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν στην Ενότητα 1.1.1, η πλειοψηφία των ασθενών διαγιγνώσκεται με γαστρικό καρκίνο σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, με τα ποσοστά αποτελεσματικότητας των αντικαρκινικών θεραπειών και άρα και των ποσοστών πρόγνωσης, να είναι μειωμένα[28]. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η εύρεση μοριακών βιοδεικτών, με στόχο την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία. Ως βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ογκοεπαγωγικό ή ογκοκατασταλτικό ρόλο, υπερμεθυλιωμένα τμήματα DNA, αλλά και μη-κωδικοποιητικά RNA, όπως miRNAs, piwi RNAs και lncRNA [29].

Οι συνηθέστερες αντικαρκινικές θεραπείες για τον γαστρικό καρκίνο αποτελούν: 1) η ολική ή μερική γαστρεκτομή, 2) η ενδοσκοπική εκτομή του βλεννογόνου ιστού, 3) η χορήγηση χημειοθεραπειών και 4) η ραδιοθεραπεία/ χημειοραδιοθεραπεία. Παράλληλα, το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε πιο εξειδικευμένες θεραπείες, αξιοποιώντας τα δεδομένα από τη μοριακή ταξινόμηση του συστήματος TCGA. Συγκεκριμένα μελετώνται: α) αντικαρκινικά φάρμακα, όπως αναστολείς κινασών σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία βασίζονται τα ορόσημα του καρκίνου, β) μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία στοχεύουν έναντι αυξητικών και ανοσοκατασταλτικών παραγόντων [30].



Εικόνα 1.6.: Σχηματική απεικόνιση της ανατομικής κατανομής των υποτύπων του γαστρικού αδενοκαρκινώματος και οι μοριακοί στόχοι εξειδικευμένων αντικαρκινικών θεραπειών [24].

1.2 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA)

Σύμφωνα με την κοινοπραξία ENCODE του 2005 και σύγχρονων μελετών, έως και το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι μεταγραφικά ενεργό, ενώ μόλις το 2% χρησιμεύει ως εκμαγείο για την παραγωγή πρωτεϊνών, με τα τελευταία χρόνια να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση σε μη μεταφραζόμενες, αλλά μεταγραφικά ενεργές γονιδιωματικές περιοχές [31, 32]. Τα μη-κωδικοποιητικά RNAs, αρχικά, ταξινομούνται σε δομικά, τα rRNA και τα tRNA, αλλά και σε ρυθμιστικά RNAs. Τα ρυθμιστικά RNAs ταξινομούνται περαιτέρω με βάση το μήκος της αλληλουχίας τους: 1) σε μικρά μη κωδικοποιητικά RNA με μήκος από 20 έως 50 νουκλεοτίδια (miRNA, siRNA, piRNA, cisRNA, telsRNA), 2) σε μη κωδικοποιητικά RNA μεσαίου μήκους με 50 έως 200 νουκλεοτίδια (snoRNA, prompts, tiRNA, snRNA) και 3) σε μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA), μήκους άνω των 200 νουκλεοτιδίων lncRNA [33].

1.2.1 Χαρακτηριστικά των lncRNA

Η ύπαρξη των lncRNA, έχει ταυτοποιηθεί σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στο *Helicobacter pylori*, αλλά και σε ιούς, όπως ο Epstein-Barr [34-36]. Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες, το ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει περισσότερα από 20.000 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν lncRNA [37]. Σε αυτά τα γονίδια συγκαταλέγονται lncRNA τα οποία μεταγράφονται από ιντρόνια άλλων γονιδίων με μερική ή ολική επικάλυψη μεταξύ των μεταγράφων τους και μεταγράφονται κυρίως από την πολυμεράση II του RNA (RNA Pol II). Στην συνέχεια, υπόκεινται ωρίμανση μέσω του ίδιου μηχανισμού με τα mRNA και συχνά φέρουν, όπως και τα τυπικά mRNA, 5' καλύπτρα και πολυαδενυλιωμένο 3' άκρο [38]. Τα επίπεδα έκφρασής τους είναι μειωμένα έναντι των mRNA, το οποίο ενδεχομένως οφείλεται στην ύπαρξη ανασταλτικών τροποποιήσεων στις ιστόνες των υποκινητών τους, αλλά και στην απορρύθμιση της RNA Pol II, μέσω ειδικών μοτίβων φωσφορυλίωσης του καρβοξυτελικού της άκρου [39, 40]. Παρά τις ομοιότητες που προαναφέρθηκαν, τα lncRNA αποτελούν ένα ρυθμιστικά και λειτουργικά ετερογενές σύνολο μεταγράφων, τα οποία διαφοροποιούνται τόσο ως προς τον εντοπισμό τους στο γονιδίωμα, όσο και ως προς τη δράση τους σε υποκυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, σύμφωνα με αναλύσεις του προφίλ έκφρασης των mRNA και των lncRNA σε 33 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, παρατηρήθηκε ότι τα lncRNA εμφανίζουν μεγαλύτερη ιστοειδικότητα έκφρασης, εν συγκρίσει με τα mRNA [41].

1.2.2 Ταξινόμηση των lncRNA σύμφωνα με τον εντοπισμό τους στο γονιδίωμα

Τα γονίδια των lncRNA, σύμφωνα με τον εντοπισμό τους στο γονιδίωμα, διακρίνονται σε εσογονιδιακά (intragenic) και μεσογονιδιακά (intergenic). Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στην αλληλοεπικάλυψη των γονιδίων των lncRNA με την αλληλουχία των mRNA γονιδίων. Πιο αναλυτικά, τα εσογονιδιακά lncRNA ταξινομούνται περαιτέρω σε μεσογονιδιακά (intergenic) και εσογονιδιακά (intragenic), με τα τελευταία να χωρίζονται περαιτέρω σε σημαίνοντα (sense), αντι-σημαίνοντα (anti-sense), ιντρονικά (intronic) και σε lncRNA τα οποία προκύπτουν από αμφίδρομους υποκινητές (bidirectional) [42].

1) Σημαίνοντα lncRNA (sense lncRNA)

Ως σημαίνοντα ορίζονται τα lncRNA, τα οποία μεταγράφονται από την κωδική αλυσίδα των mRNA γονιδίων και εμφανίζουν αλληλοεπικάλυψη με τα εξόνια και με τα ιντρόνια τους. Αν και η πλειοψηφία των lncRNA αποτελούν μη-κωδικοποιητικά RNA, έχουν παρατηρηθεί sense-lncRNA τα οποία χαρακτηρίζονται από ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση πεπτιδίων [43]. Μερικά παραδείγματα της δράσης αυτών των πεπτιδίων στα θηλαστικά είναι: α) το πεπτίδιο NoBody (από το lncRNA LINC01420), το οποίο συμμετέχει στον μηχανισμό αποδόμησης των mRNA, β) το πεπτίδιο Mtn (mitoregulin από το lncRNA LINC00116), το οποίο εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και δρα ενισχυτικά στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και γ) τα πεπτίδια (από το lncRNA LINC00961) τα οποία επάγουν την αγγειογένεση και αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που προσδένονται στην ακτίνη του κυτταροσκελετού [44-46].

2) Αντι-σημαίνοντα lncRNA (anti-sense lncRNA)

Όμοια με τα σημαίνοντα lncRNA, τα αντι-σημαίνοντα lncRNA εμφανίζουν αλληλοεπικάλυψη με τα εξόνια και με τα ιντρόνια των mRNA γονιδίων, αλλά μεταγράφονται από τη μη-κωδική τους αλυσίδα. Τα μετάγραφα αυτά χωρίζονται σε δύο επιμέρους υποκατηγορίες, τα cis-φυσιολογικά αντι-σημαίνοντα μετάγραφα (cis-NATs) και τα trans-φυσιολογικά αντι-σημαίνοντα μετάγραφα (trans-NATs) [47]. Τα cis-NATs, μέσω της συμπληρωματικότητάς τους αλληλεπιδρούν με το pre-mRNA είτε το ώριμο mRNA, το οποίο προκύπτει από την αντίστοιχη κωδική αλυσίδα. Στην περίπτωση ρύθμισης του pre-

mRNA, τα cis-NATs ρυθμίζουν τοπικά την χρωματίνη, επιτρέποντας την εναλλακτική συρραφή του mRNA[48]. Μία ακόμα περίπτωση cis-NATs αποτελούν τα SINEUPs, όπως το AS-Uchl1, το οποίο αλληλεπιδρά με το mRNA Uchl1 και ενισχύει την μετάφραση του, μέσω του βραχέος διάσπαρτου πυρηνικού στοιχείου B2 (SINEB2), το οποίο δρα ως επικράτεια τελεστή [49].

3) LncRNA από αμφίδρομους υποκινητές (bidirectional lncRNA)

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα lncRNA, των οποίων η αλληλουχία είτε βρίσκεται ανοδικά από ένα γονίδιο mRNA (LUATs) είτε επικαλύπτεται μερικώς με την 5' αμετάφραστη περιοχή του (uaRNAs). Η μεταγραφή των lncRNA πραγματοποιείται με αντίθετη φορά από το mRNA, μέσω ενός αμφίδρομου υποκινητή [50]. Οι αμφίδρομοι υποκινητές χαρακτηρίζονται από εξειδικευμένες αλληλουχίες και επιγενετικές τροποποιήσεις και εντοπίζονται σε γονιδιωματικές περιοχές οι οποίες περιέχουν γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν αναπτυξιακούς μεταγραφικούς παράγοντες ή εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [51].

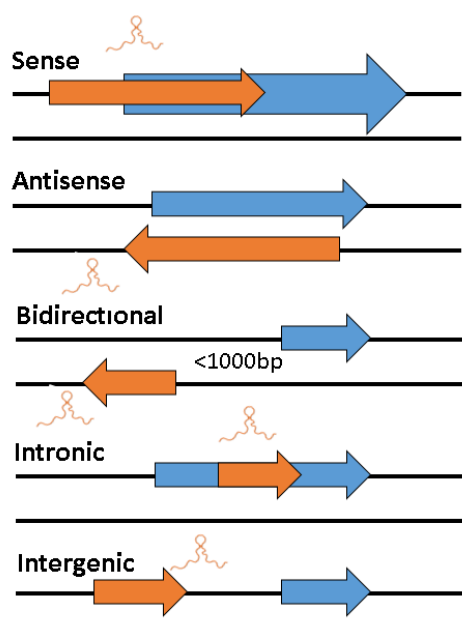
4) Ιντρονικά lncRNA (intronic lncRNA)

Τα ιντρονικά lncRNA προκύπτουν από τη μεταγραφή ενός ιντρονίου ενός κωδικού μεταγράφου, είτε ως αυτόνομο μετάγραφο είτε ως παραπροϊόν από την συρραφή των πρώιμων mRNA [52]. Υποκατηγορίες των ιντρονικών lncRNA αποτελούν τα κυκλικά lncRNA και sno-lncRNA, τα οποία ελέγχουν την συρραφή των αντιστοίχων κωδικών μεταγράφων [53].

5) Μεσογονιδιακά lncRNA (intergenic lncRNA/ lincRNA)

Τα μεσογονιδιακά lncRNA εντοπίζονται στη γονιδιωματική περιοχή μεταξύ δύο γονιδίων. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιείται με την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων της χρωματίνης, όπως H3K4-K36, οι οποίες παρατηρούνται σε μεταγραφικά ενεργές γονιδιωματικές περιοχές [54]. Η πλειοψηφία των lincRNA δρα στον πυρήνα, σε αντίθεση με άλλες κατηγορίες lncRNA, οι οποίες δρουν σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως θα εξηγηθεί στην επόμενη ενότητα. Πιο αναλυτικά, η δράση των lincRNA αφορά τη μεταγραφική, μεταφραστική και μετα-μεταφραστική

ρύθμιση γονιδίων [55]. Ένα παράδειγμα lincRNA αποτελεί το lincRNA-p21, του οποίου η έκφραση επάγεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, καθώς ο υποκινητής του γονιδίου linc-p21, φέρει αλληλουχίες αναγνώρισης και πρόσδεσης της. Ειδικότερα, η p53 προσδέεται στον υποκινητή του lincRNA-p21 σε περιπτώσεις βλάβης του DNA. Ως αποτέλεσμα το lincRNA-p21 στρατολογεί τον μεταγραφικό παράγοντα hnRNP-K σε υποκινητές γονιδίων, επάγοντας p53-εξαρτώμενη απόκριση [56].



Εικόνα 1.7.: Ταξινόμηση των lincRNA σύμφωνα με τον εντοπισμό τους στο γονιδίωμα, Σχεδιασμένο σύμφωνα με [104].

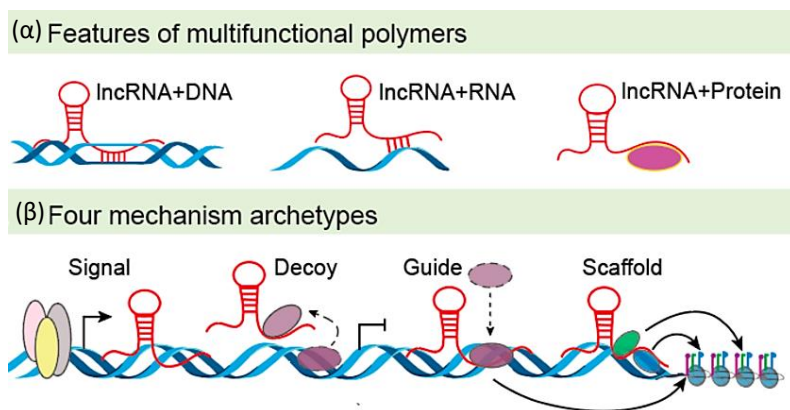
1.2.3 Ταξινόμηση των lincRNA σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους

Τα lincRNA μπορούν να αλληλεπιδράσουν, μέσω της αλληλουχίας τους ή των δευτεροταγών τους δομών, με μόρια DNA, RNA και πρωτεΐνες. Απώτερος στόχος αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, με *cis* ή *trans* τρόπο [57].

Οι μηχανισμοί δράσης των lincRNA μπορούν να εμφανίσουν εξειδίκευση ως τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό. Ειδικότερα, τα lincRNA έχουν παρατηρηθεί στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια, στον ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά και ευρύτερα στο κυτταρόπλασμα [58, 59]. Ωστόσο, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθεί η ύπαρξη lincRNA, τα οποία δεν δρουν αποκλειστικά σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα, όπως το lincRNA HOTAIR [60]. Συγκεκριμένα, το lincRNA HOTAIR δρα και στον πυρήνα ως ρυθμιστής της χρωματίνης, αλλά και στο κυτταρόπλασμα ως συμπαράγοντας στο μηχανισμό αποδόμησης πρωτεϊνών, μέσω αλληλεπίδρασης με E3 λιγάσες της ουβικουτίνης [61]. Εξίσου σημαντική αποτελεί η ύπαρξη lincRNA σε εξωκυτταρικά κυστίδια, όπως τα εξωσώματα, με στόχο την διακυτταρική επικοινωνία. Το lincRNA TERRA εντοπίζεται σε εξωσώματα, με στόχο τη

ρύθμισης της έμφυτης ανοσίας, ενώ το MALAT1 και H19 έχουν εντοπιστεί σε εξωσώματα τα οποία συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [62-64].

Σύμφωνα με το πρωτεύοντα ρόλο τους, τα lncRNA διακρίνονται σε : 1) σηματοδοτικά lncRNA (signaling lncRNA), 2) lncRNA δολώματα (decoy lncRNA), 3) lncRNA οδηγούς (guide lncRNA) και 4) lncRNA ικρίώματα (scaffold lncRNA) [65, 66].



Εικόνα 1.8.: Κατηγοριοποίηση των lncRNA: (α) σύμπλοκα lncRNA με τμήματα DNA, RNA και πρωτεϊνών και (β) μηχανισμοί δράσης των lncRNA. Τροποποιημένη από [63].

1) Σηματοδοτικά lncRNA (signaling lncRNA)

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα lncRNA των οποίων η δράση τους χαρακτηρίζεται από ιστοειδικότητα, με τα επίπεδα τους να διαφοροποιούνται σύμφωνα με ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά ερεθίσματα, καθορίζοντας την απόκριση του κυττάρου. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των lncRNA ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, αποτελεί η αμεσότητα της δράσης τους, καθώς δεν απαιτείται η παραγωγή πρωτεϊνών [67]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι το lncRNA XIST, το οποίο στα θηλαστικά είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση ενός X χρωμοσώματος ως μεταγραφικά ενεργό, μέσω απενεργοποίησης των επιπλέον X χρωμοσωμάτων [68].

2) lncRNA δολώματα (decoy lncRNA)

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα lncRNA, τα οποία αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται σε μόρια RNA (RNA-binding proteins) και ταυτόχρονα αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες ή τροποποιητές της χρωματίνης. Ειδικότερα, τα lncRNA προσελκύουν τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες και τις αποδεσμεύουν από υποκινητές ή ενισχυτές γονιδίων, ρυθμίζοντας έτσι είτε θετικά είτε αρνητικά την μεταγραφή τους [69].

Ένα lncRNA το οποίο εντάσσεται στην κατηγορία αυτή είναι το lncRNA TERRA, το οποίο εντοπίζεται στα τελομερή των ευκαρυωτικών οργανισμών [70]. Συγκεκριμένα, η έκφραση του TERRA εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο και έχει παρατηρηθεί ότι στην φάση S του κυτταρικού κύκλου, η τελομεράση αποδεσμεύεται από το lncRNA και επιμηκώνει τα χρωμοσωμικά τελομερή [71]. Ένα επιπλέον παράδειγμα lncRNA δολώματος αποτελεί το lncRNA MALAT1 (Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), το οποίο στα κύτταρα των θηλαστικών εντοπίζεται σε πυρηνικά σφαιρίδια (speckles). Το MALAT1 προσελκύει παράγοντες συρραφής σερίνης/αργινίνης (serine/arginine splicing factors), οι οποίοι αν απελευθερωθούν απουσία του lncRNA, επάγουν το εναλλακτικό μάτισμα των mRNA στόχων [72]. Τέλος, τα lncRNA μπορούν να δεσμεύσουν και miRNA τα οποία αναστέλλουν τη μετάφραση mRNA μεταγράφων, μέσω συμπληρωματικότητας, λειτουργώντας ως lncRNA-σπόγγι (competing endogenous lncRNA). Επεξηγώντας, τα γονίδια των lncRNA αποτελούν ψευδογονίδια των αντίστοιχων mRNAs και μέσω αυτών προκύπτει ένα πιο εξειδικευμένο σύστημα ρύθμισης της μετάφρασής τους [73].

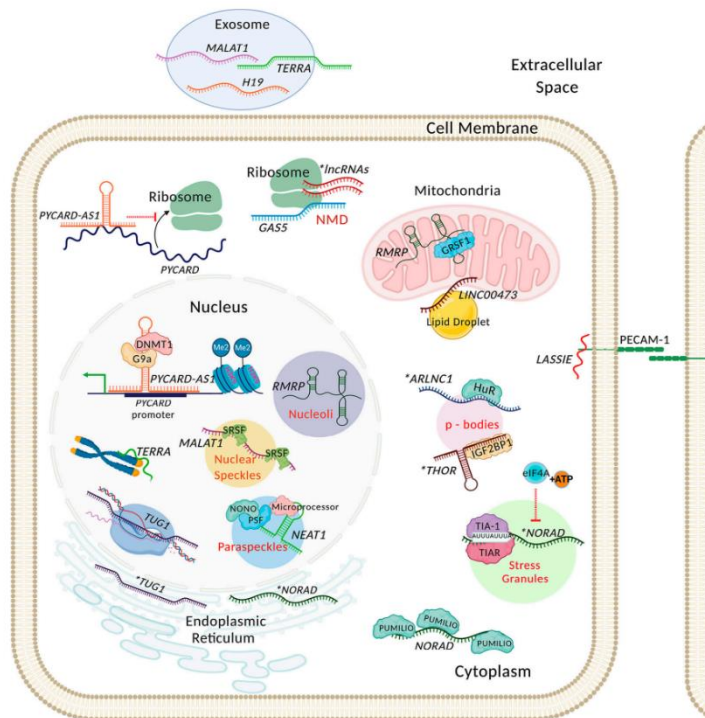
3) lncRNA οδηγό (guide lncRNA)

Ο μηχανισμός δράσης των lncRNA-οδηγών αφορά την πρόσδεση και τη μεταφορά πρωτεϊνικών συμπλόκων στις γονιδιωματικές περιοχές στόχους. Τα lncRNA-οδηγοί διαχωρίζονται περαιτέρω σε *cis*, όταν η περιοχή στόχος αποτελεί ένα γειτονικό γονίδιο του lncRNA γονιδίου και σε *trans*, όταν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταφέρεται σε απομακρυσμένα γονίδια. Η δράση των lncRNA-οδηγών μπορεί να διαφοροποιείται μεταξύ ιστών, αναπτυξιακών σταδίων ή παθολογικών καταστάσεων [74]. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται και τα lncRNA τα οποία κωδικοποιούνται και ρυθμίζουν τη μεταγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (mtlncRNA), όπως τα lncND5, lncND6 και lncCytb [75].

4) lncRNA κριώματα (scaffold lncRNA)

Ως lncRNA κριώματα χαρακτηρίζονται τα lncRNA τα οποία έχουν την ικανότητα δέσμευσης πληθώρας πρωτεϊνών, συμβάλλοντας στη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ειδικότερα, τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να επηρεάσουν τη διαμόρφωση της χρωματίνης, αλλά και τη μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων στόχων. Στην κατηγορία αυτή εντάσσεται το mamRNA, στο οποίο προσδένονται οι πρωτεΐνες Mm1 και Mei2, οι οποίες

δρουν ανταγωνιστικά μεταξύ τους και ρυθμίζουν την εναλλαγή μεταξύ του μηχανισμού μείωσης και μίτωσης [76]



Εικόνα 1.9.: Λειτουργία των lncRNA σύμφωνα με τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό. Πηγή [55].

1.2.4 Ο ρόλος των *cis*-δραστικών lncRNA

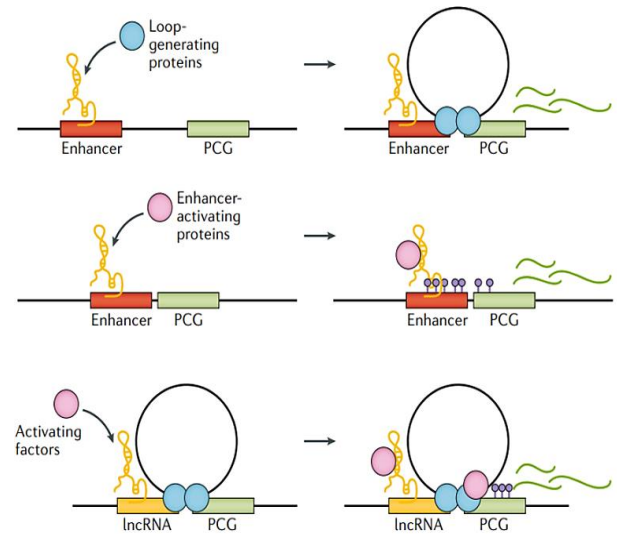
Σύμφωνα με τον τρόπο λειτουργίας τους τα lncRNA διαχωρίζονται σε *cis*-δραστικά και *trans*-δραστικά. Εξειδικεύοντας για τα *cis*-δραστικά lncRNA, η ρυθμιστική τους δράση εντοπίζεται πλησίον του γενετικού τους τόπου από τον οποίο μεταγράφονται [77]. Ωστόσο, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις lncRNA, τα οποία δεν τροποποιούν την έκφραση των γειτονικών τους γονιδίων, αλλά αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα τους [78]. Συνεπώς, για την πειραματική εξακρίβωση των *cis* δραστικών lncRNA, το γονίδιο του lncRNA είτε μεταφέρεται σε άλλο γενετικό τόπο είτε σε εισάγεται σε πλασμιδιακό φορέα και στην συνέχεια ελέγχεται η δράση του [79]. Η πλειοψηφία των *cis*-δραστικών lncRNA συμβάλλουν στη διαμόρφωση και στην τροποποίηση της χρωματίνης, αλλά και στον έλεγχο της μεταγραφής των mRNA γονιδίων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα *cis*-δραστικά lncRNA βρίσκονται γύρω από ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι το 30-60% των lncRNA γονιδίων εμφανίζουν αλληλοεπικάλυψη με αλληλουχίες ενισχυτών [80, 81].

Σύμφωνα με τους μηχανισμούς δράσης τους, τα *cis*-δραστικά lncRNA διαχωρίζονται κυρίως σε: 1) επαγωγικά (activating) και 2) κατασταλτικά (repressing). Συνολικά, έχει παρατηρηθεί ότι τα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς

παράγοντες και τροποποιητές της χρωματίνης, βρίσκονται κοντά σε γονίδια *cis*-δραστικών lncRNA [82].

1) *Cis*-δραστικά lncRNA με επαγωγική δράση

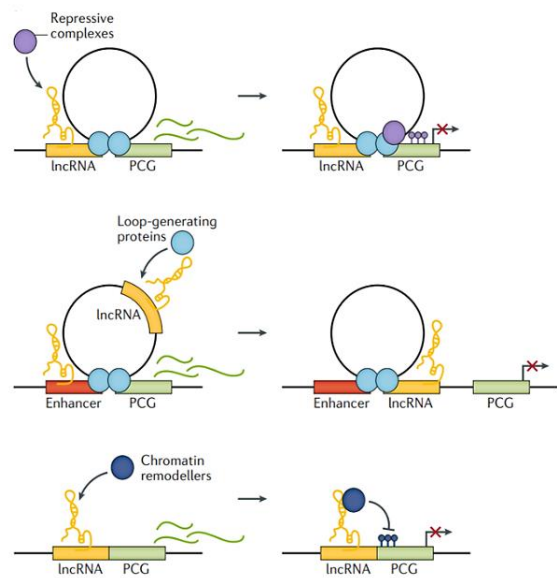
Τα *cis*-δραστικά lncRNA αυτής της κατηγορίας, όπως το CCAT1-L, μπορούν να ενισχύσουν την έκφραση των γονιδίων στόχων τους προσελκύοντας πρωτεΐνες, οι οποίες δημιουργούν χρωμοσωμικές θηλιές. Κατά συνέπεια, ο εγγύς στο lncRNA ενισχυτής θα μπορέσει να ενισχύσει το γονίδιο στόχο [83]. Ένας ακόμη τρόπος ενίσχυσης από *cis*-δραστικά lncRNA, όπως το UMLILO, αποτελεί η προσέλκυση μεταγραφικών ενεργοποιητών, το οποίο μπορεί συνδυαστεί με την προσέλκυση τροποποιητών της χρωματίνης [84].



Εικόνα 1.10.: Μηχανισμοί δράσης των *cis*-δραστικών lncRNA με επαγωγική δράση. Πηγή [99].

2) Κατασταλτικά *cis*-δραστικά lncRNA

Τα *cis*-δραστικά lncRNA δύναται να καταστείλουν της έκφραση των γονιδίων στόχων μέσω προσέλκυσης κατασταλτικών μεταγραφικών παραγόντων και ρυθμιστικών συμπλόκων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το lncRNA XIST, το οποίο αλληλεπιδρά με κατασταλτικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το σύμπλοκο PCR2 και τον παράγοντα SPEN, επάγοντας την τριμεθυλίωση των ιστονών και τελικά τη σίγηση των γονιδίων στόχων [85]. Επιπλέον, *cis*-δραστικά lncRNA όπως το PVT1, μπορούν να δράσουν ανταγωνιστικά έναντι των γονιδίων στόχων τους, προσελκύοντας τροποποιητές της χρωματίνης, με στόχο την ενίσχυση του lncRNA γονιδίου από τον εγγύς ενισχυτή [86].

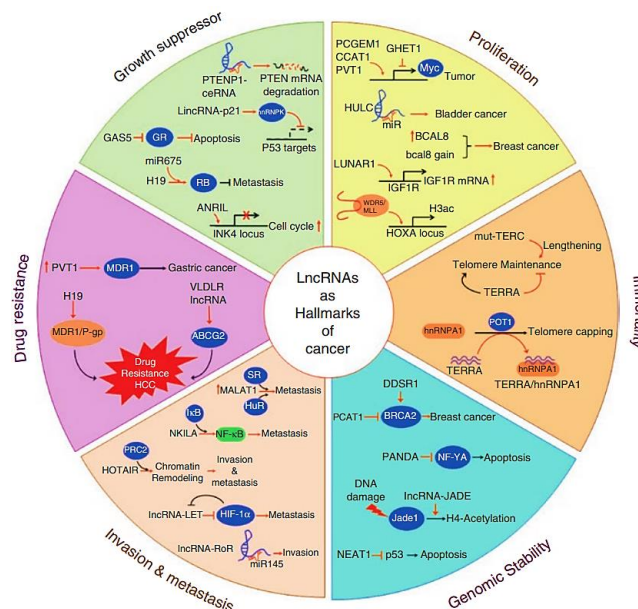


Εικόνα 1.11.: Μηχανισμοί δράσης των *cis*-δραστικών lncRNA με κατασταλτική δράση. Πηγή [99].

Τέλος, *cis*-δραστικά lncRNA μπορούν να καταστείλουν τη μεταγραφή γονιδίων μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων, προσελκύνοντας σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης [87].

1.3 Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) στον καρκίνο

Σύμφωνα με μεταγραφομική ανάλυση πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου, (PCAWT= Pan-Cancer Analysis of Whole Transcriptome), έχουν ταυτοποιηθεί lncRNA, των οποίων η έκφραση είναι απορυθμισμένη στον πρωτογενή όγκο και στο μικροπεριβάλλον του, επιδρώντας σε όλα τα ορόσημα του καρκίνου [88]. Η συσχέτιση των lncRNA με το καρκίνο οφείλεται στο γεγονός ότι, η έκφρασή τους ρυθμίζεται από βασικά για τον καρκίνο ογκοεπαγωγικά και ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα γονίδια p53 και MYC [89, 90]. Συγκεκριμένα, παρατηρείται υπερέκφραση των lncRNA με ογκοεπαγωγική δράση και στον αντίποδα μείωση της έκφρασης των lncRNA με ογκοκατασταλτική δράση [91]. Κατά συνέπεια, σε κυτταρικό επίπεδο, τα lncRNA μπορούν να ρυθμίσουν την ανάπτυξη και την μετάσταση των πρωτογενών όγκων, τροποποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια σε επιγενετικό, μεταγραφικό, αλλά και μεταφραστικό επίπεδο [92].



Εικόνα 1.12.: Λειτουργία των lncRNA στα ορόσημα του καρκίνου. Πηγή [101].

1.3.1 Η διαγνωστική και θεραπευτική αξία των lncRNA στο γαστρικό καρκίνο

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν και στην Ενότητα 1.2., η αιτιολογία της αυξημένης θνησιμότητας του γαστρικού καρκίνου αποτελεί η έλλειψη οικονομικά προσιτών και λιγότερα επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων. Η αιμοληψία και η ανίχνευση διαγνωστικών δεικτών στον ορό του αίματος, έχει προταθεί ως η ιδανικότερη και η λιγότερο επεμβατική λύση στη διάγνωση των καρκίνων [93].

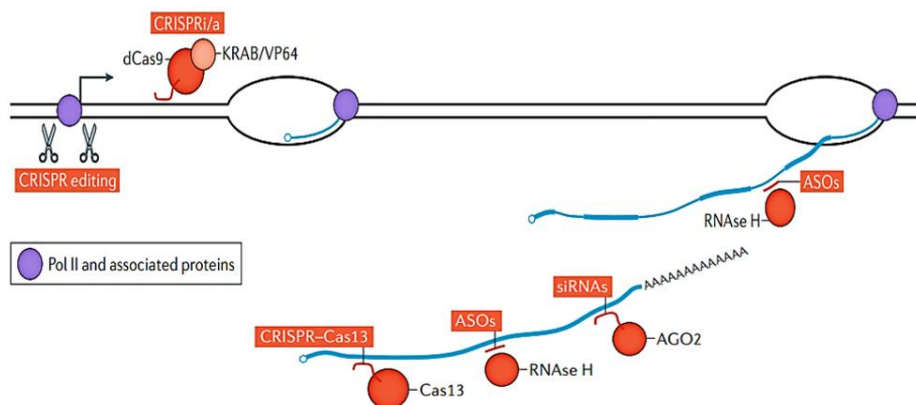
Υπενθυμίζοντας, στην υποενότητα 1.2.3 αναφέρθηκε ότι τα lncRNA δεν εντοπίζονται αποκλειστικά εντός των κυττάρων, αλλά έχουν ανιχνευθεί και σε εξωκυτταρικά κυστίδια, όπως τα εξωσώματα και τα αποπτωσώματα, στον ορό του αίματος [94, 95]. Συνεπώς, τα lncRNA, τα οποία εμφανίζουν απορυθμισμένη έκφραση στον καρκίνο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες και να ανιχνευθούν από τον ορό του αίματος με την χρήση μοριακών τεχνικών. Επιπλέον, τα lncRNA αποτελούν ιδανικούς καρκινικούς βιοδείκτες, καθώς χαρακτηρίζονται από ιστοειδικό τρόπο έκφρασης, ενώ παράλληλα η ανίχνευσή τους συμβάλλει στον άμεσο προσδιορισμό των δραστικών τους μορίων [96]. Ωστόσο, τα lncRNA ανιχνεύονται και σε άλλα σωματικά υγρά, όπως το σάλιο, τα ούρα και ειδικότερα για τον γαστρικό καρκίνο μπορούν ανιχνευθούν και από το γαστρικό υγρό [97].

Εκτός από τον τομέα της διάγνωσης, τα lncRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί βιοδείκτες για την εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών, της πιθανότητας μετάστασης, αλλά και της αποτελεσματικότητας των αντικαρκινικών θεραπειών. Πιο αναλυτικά στον τομέα της πρόγνωσης, τα επίπεδα έκφρασης των H19, HOTAIR, UCA1, PVT1 και TINCR lncRNA μπορούν να συσχετιστούν με την πενταετή επιβίωση των ασθενών και τα κλινικά χαρακτηριστικά των όγκων [98].

Εξίσου σημαντική αποτελεί η συμβολή των lncRNA στη θεραπεία του καρκίνου, εξαιτίας της ιστοειδικής τους έκφρασης και της εξειδικευμένης τους δράσης κατά την εξέλιξη της νόσου. Απώτερος στόχος αποτελεί η μείωση των παρενεργειών των αντικαρκινικών θεραπειών [99]. Πιο αναλυτικά, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις αξιοποιούν τη μέθοδο παρεμβολής του RNA (siRNA), συνθετικά αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (ASOs), συνθετικά μόρια τα οποία δρουν ανταγωνιστικά έναντι των lncRNA και συστήματα CRISPR-Cas [100, 101].

Στην περίπτωση της παρεμβολής RNA, τα siRNA στοχεύουν μέσω συμπληρωματικότητας τα lncRNA στόχους, με στόχο την αποδόμησή τους μέσω του

συμπλόκου RISC [102]. Στον αντίποδα, τα ASOs αποτελούν μονόκλιωνα τμήματα DNA, τα οποία αλληλεπιδρούν με τα πυρηνικά lncRNA και μέσω της RNAάσης επάγουν τομές στα μετάγραφα-στόχους, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης τους [103]. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνθετικά μόρια, τα οποία εμφανίζουν παρόμοιες δομές με τα lncRNA και ανταγωνίζονται με αυτά για την πρόσδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών[104]. Πολλά υποσχόμενες αποτελούν οι θεραπευτικές προσεγγίσεις οι οποίες αξιοποιούν τα συστήματα CRISPR-Cas, καθώς μπορούν να στοχεύουν με ακρίβεια στα γονίδια των lncRNA. Συγκεκριμένα, μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9 μπορεί να πραγματοποιηθεί η αποκοπή ενός τμήματος DNA από το γονίδιο του lncRNA [105, 106]. Υπάρχουν, ωστόσο, και πιο εξειδικευμένες μορφές του συστήματος, μέσω του οποίου πραγματοποιείται είτε ενεργοποίηση μέσω CRISPR-a είτε απενεργοποίηση μέσω CRISPR-i του γονιδίου του lncRNA στόχου. Στην περίπτωση του CRISPR-a, η νουκλεάση δεν είναι λειτουργική (dCas) και δεν προκαλεί τομές στο γονίδιο του lncRNA, αλλά ενισχύει την έκφρασή του, καθώς έχουν προστεθεί στη νουκλεάση μεταγραφικοί ενεργοποιητές [107]. Αντίστοιχα, στο σύστημα CRISPR-i, η νουκλεάση δεν προκαλεί τομές, αλλά λειτουργεί ως μεταφορέας ανασταλτικών πρωτεϊνικών συμπλόκων [108]. Αν και τα αποτελέσματα της στόχευσης των ογκοεπαγωγικών και ογκοκατασταλτικών lncRNA με τα προαναφερθέντα εργαλεία είναι ενθαρρυντικά, οι παραπάνω τεχνικές δεν έχουν εφαρμοστεί σε κλινική πράξη [109].



Εικόνα 1.13.: Θεραπευτικές προσεγγίσεις στόχευσης των lncRNA. Πηγή [99].

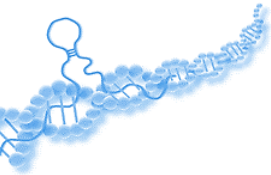


2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ

Καίριας σημασίας κρίνεται η συμμετοχή των lncRNA στην καρκινογένεση και στην εξέλιξη της νόσου. Ειδικότερα, τα lncRNA χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη πολυπλοκότητα δράσης, αλλά και από ιστοειδικότητα έκφρασης, καθιστώντας τα εξειδικευμένους μοριακούς δείκτες και θεραπευτικούς στόχους.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί ο χαρακτηρισμός και η διερεύνηση της δράσης ενός μη μελετημένου lncRNA, που ονομάστηκε RECUR1, μέσω RNAi και CRISPR προσεγγίσεων. Το RECUR1 (Regulatory cancer mutation lncRNA 1), σύμφωνα με μη δημοσιευμένα δεδομένα, υπερεκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου και συγκεκριμένα στο αδenoκαρκίνωμα του στομάχου. Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων, αξιοποιούνται τόσο πειραματικές όσο και βιοπληροφορικές μέθοδοι ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης του RECUR1 και του υπό μελέτη γονιδίου στόχου του σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και βιοψίες, μέσω μετασχηματισμού τους με την κατάλληλη κατασκευή shRNA. Απώτερος στόχος αποτελεί η μελέτη του φαινοτύπου των γαστρικών καρκινικών κυττάρων απουσία του RECUR1. Παράλληλα, δημιουργήθηκαν κατασκευές για τη μελλοντική σίγηση του RECUR1 και του υπό μελέτη γονιδίου στόχου του σε σταθερή καρκινική κυτταρική σειρά και με CRISPR knockout.

Σε περίπτωση επιτυχούς σίγησης του RECUR1 και ταυτόχρονης σίγησης του υπό εξέταση γονιδίου στόχου του, θα αποδειχθεί η δράση του lncRNA. Επιπλέον, θα αποδειχθεί ότι το RECUR1 μπορεί να αποτελέσει διαγνωστικό εργαλείο και θεραπευτικό στόχο για το γαστρικό αδenoκαρκίνωμα.



3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Για τον χαρακτηρισμό και τη μελέτη της δράσης του εξεταζόμενου lncRNA μεταγράφου, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, όπως περιγράφονται στον *Πίνακα 3.1*:

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή	Μορφολογία
AGS (RRID:CVCL_0139)	Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά γαστρικού αδενοκαρκινώματος, με υπερδιπλοειδία, με το 60% των κυττάρων να περιέχουν 49 χρωμοσώματα. Απουσία μετάλλαξης του γονιδίου TP53. Παρουσία ετερόζυγων μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS, PIK3CA, CTNNB1 ^{1,2}	Επιθηλιακά
NUGC4 (RRID:CVCL_3082)	Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά πλήρως διαφοροποιημένου γαστρικού αδενοκαρκινώματος από μετάσταση με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου σε παραγαστρικούς λεμφαδένες. Απουσία μετάλλαξης του γονιδίου TP53 ¹	Σφαιρικά

Πίνακας 3.1: Οι ονομασίες, η περιγραφή και η μορφολογία των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας. 1 (ExPASy (SIB) - Cellosaurus), 2 (ATCC product catalogue).

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

Η κλωνοποίηση των πλασμιακών φορέων, που φέρουν το επιθυμητό ένθεμα, πραγματοποιήθηκε σε δεκτικά προς μετασχηματισμό βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη DH5a και Stb13.

Πιο αναλυτικά, τα βακτήρια *E.coli* DH5a [με γονότυπο F⁻, Φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk⁻,mk⁺), phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1 V] φέρουν τη μετάλλαξη recA1, η οποία αποτρέπει τον ομόλογο ανασυνδυασμό, από την ρεκομπινάση RecA, εξασφαλίζοντας την σταθερότητα του ενθέματος κατά την κλωνοποίηση του πλασμιακού φορέα. Μία ακόμη σημαντική μετάλλαξη αποτελεί η endA1, η οποία αναστέλλει τη δράση της ενδονουκλεάσης EndA.

Συνεπώς, ενισχύεται η απόδοση αντιγραφής του πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος εισάγεται μέσω μετασχηματισμού στα *E.coli* DH5a.

Όσον αφορά τα βακτήρια *E.coli* Stb13, τα βακτήρια αυτά [με γονότυπο *F –mcr B mrr hsd S20 (rB –, mB –) rec A13 sup E44 ara 14 gal K2 lac Y1 pro A2 rps L20 (Str R) xyl 5 λ –leu mtl 1*] έχουν σχεδιαστεί ειδικά για την κλωνοποίηση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που μπορούν να εισαχθούν σε λεντικούς φορείς. Αυτό επιτυγχάνεται χάρις την αναστολή του ομόλογου ανασυνδυασμού των μακρών τερματικών αλληλουχιών (LTRs). Ως αποτέλεσμα, εξασφαλίζεται η σταθερότητα του ενθέματος στο λεντικό φορέα, ενώ παράλληλα ενισχύεται η απόδοση αντιγραφής του πλασμιδιακού φορέα.

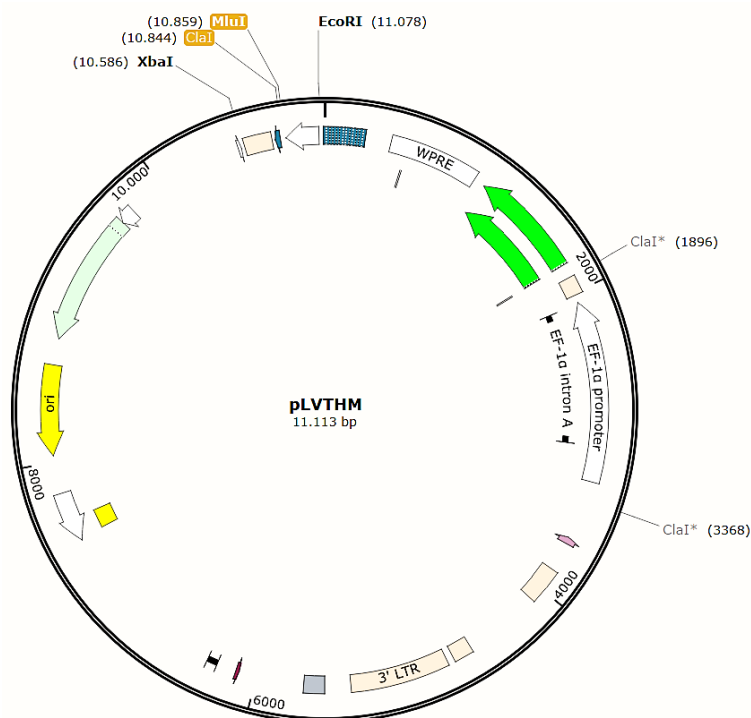
3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

Για την παροδική γενετική τροποποίηση των προαναφερθέντων κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pLVTHM (RRID:Addgene_12247) με μήκος 11087 bp, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 3.1*. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, στον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα εισήχθησαν αλληλουχίες, μέσω των οποίων θα επιτευχθεί ο σχηματισμός shRNA (short-hairpin RNA) στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Απώτερος στόχος αποτελεί η καταστολή, σε επίπεδο μεταγράφου, του υπό μελέτη lncRNA, RECUR1 και του γονιδίου στόχου του.

Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη (AmpR), με στόχο να επιλεγούν τα μετασχηματισμένα βακτήρια *E.coli* - του στελέχους Stb13 - με τον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM, ενώ το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του πλασμιδιακού φορέα στα ευκαρυωτικά κύτταρα των κυτταρικών σειρών. Αξιοσημείωτος κρίνεται ο υποκινητής H1, ο οποίος συμβάλλει στην έκφραση του ενθέματος (shRNA). Το shRNA εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ένζυμα περιορισμού ClaI και MluI. Η ιδιαιτερότητα του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM, εν συγκρίσει με τον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα pLVTH, αποτελεί η ύπαρξη μίας μοναδικής περιοχής πέψης από το ένζυμο ClaI, με τις δύο υπόλοιπες περιοχές πέψης (ClaI*) από το ίδιο ένζυμο να έχουν υποστεί μεθυλίωση από την μεθυλάση Dam, όπως φαίνεται *Εικόνα 3.1*. Συγκεκριμένα, η μεθυλάση Dam αναγνωρίζει την αλληλουχία GATC και μεθυλιώνει την αντίστοιχη αδενίνη.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι για τον έλεγχο της επίδρασης του λεντικού μετασχηματισμού στη μεταγραφή του γονιδίου του lncRNA RECUR1 και του γονιδίου

στόχου του, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή, μέσω λεντιών, του κενού πλασμιδιακού φορέα pLVTHM (RRID:Addgene_12247).

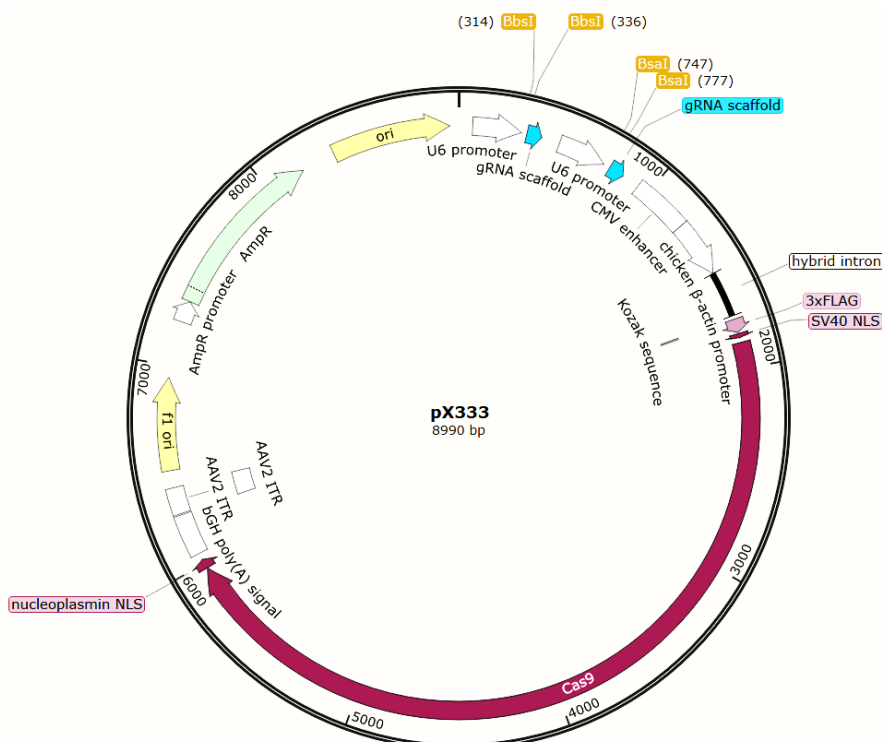


Εικόνα 3.1: Ο πλασμιδιακός φορέας pLVTHM. Πλασμιδιακός χάρτης: Addgene, αριθμός καταλόγου 12247 (<http://n2t.net/addgene:12247>, RRID:Addgene_12247). Από (Wiznerowicz, M., & Trono, D., 2003). Απεικόνιση με το λογισμικό SnapGene Viewer® (GSL Biotech LLC).

Για τον σταθερό μετασηματισμό της κυτταρικής σειράς, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pX333 (RRID:Addgene_64073) με μήκος 8990 bp, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 3.2*. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, στον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα εισήχθησαν αλληλουχίες sgRNA (single guide RNA), με απώτερο στόχο την καταστολή, μέσω της ενδονουκλεάσης Cas9, του γονιδίου του υπό μελέτη lncRNA, RECUR1 και του γονιδίου στόχου του.

Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη (AmpR), προκειμένου να επιλεγούν τα μετασηματισμένα βακτήρια *E.coli* –του στελέχους DH5a- με τον πλασμιδιακό φορέα pX333, ενώ η ετικέτα 3X FLAG χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση, μέσω ανοσοστυπώματος, παραγωγής της ενδονουκλεάσης Cas9. Η

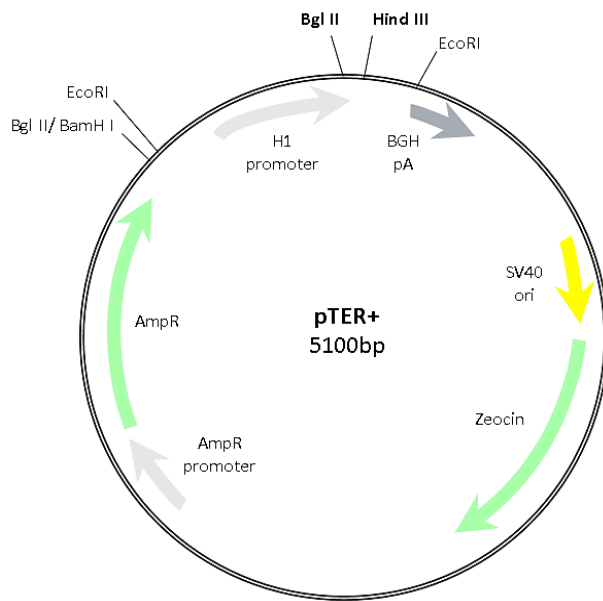
έκφραση των δύο sgRNA ελέγχεται αντίστοιχα από τον υποκινητή της πολυμεράσης του RNA, U6.



Εικόνα 3.2: Ο πλασμιδιακός φορέας pX333. Πλασμιδιακός χάρτης: Addgene, αριθμός καταλόγου 64073 (<http://n2t.net/addgene:64073> , RRID:Addgene_64073). Από (Maddalo, D. et al., 2014). Απεικόνιση με το λογισμικό SnapGene Viewer® (GSL Biotech LLC).

Για τον σταθερό μετασχηματισμό της κυτταρικής σειράς, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pTER+ (RRID:Addgene_66883) με μήκος 5100 bp, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 3.3*. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, στον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με ένζυμα περιορισμού Bgl II και Hind III και έχει αφαιρεθεί ένα τμήμα 750bp, εισήχθησαν αλληλουχίες για τη δημιουργία shRNA (short-hairpin RNA) στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Απώτερος στόχος αποτελεί η καταστολή, σε επίπεδο μεταγράφου, του υπό μελέτη lncRNA, RECUR1.

Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη (AmpR), με στόχο να επιλεγούν τα μετασχηματισμένα βακτήρια E.coli - του στελέχους DH5a - με τον πλασμιδιακό φορέα pTER+, ενώ το γονίδιο της ανθεκτικότητας στη ζεοκίνη χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του πλασμιδιακού φορέα στα ευκαρυωτικά κύτταρα των κυτταρικών σειρών. Αξιοσημείωτος κρίνεται ο υποκινητής H1, ο οποίος συμβάλλει στην έκφραση του ενθέματος (shRNA).



Εικόνα 3.3: Ο πλασμιδιακός φορέας *pTER+*. Πλασμιδιακός χάρτης: Addgene, αριθμός καταλόγου 66883 (<http://n2t.net/addgene:66883>), RRID:Addgene_66883).

Σχεδιασμένο σύμφωνα με Hoog G, Zarrizi R, von Stedingk K, Jonsson K, Alvarado-Kristensson M. FASEB J. 2011 Nov;25(11):3815-27. doi: 10.1096/fj.11-187484. Epub 2011 Jul 25. 10.1096/fj.11-187484).

3.1.4 Ένζυμα και αντιδραστήρια

Για αντιδράσεις πέψης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ένζυμα περιορισμού:

Ένζυμο περιορισμού	Περιγραφή
<p>ClaI (New England Biolabs)</p> <p>5'...A▼T C G A T...3' 3'...T A G C T A...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 µg/ml Recombinant Albumin, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Απενεργοποίηση στους 65°C για 20 λεπτά</p> <p>Συγκέντρωση: 10,000 Units/ml</p>
<p>MluI-HF (New England Biolabs)</p> <p>5'...A▼C G C G T...3' 3'...T G C G C A...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 µg/ml BSA, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Συγκέντρωση: 20,000 Units/ml</p>
<p>EcoRI (Takara)</p> <p>5'...G▼A A T T C...3' 3'...C T T A A G...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.15% Triton X-100, 0.01 BSA, 50% Glycerol</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Συγκέντρωση: 15 Units/µl</p>

<p>XbaI (Takara)</p> <p>5'...TCTAG A...3' 3'...AGATCT...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.15% Triton X-100, 0.01 BSA, 50% Glycerol</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Συγκέντρωση: 15 Units/μl</p>
<p>BbsI -HF (New England Biolabs)</p> <p>5'...GAAGAC(N)₂...3' 3'...CTTCTG(N)₆...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 500 μg/ml Recombinant Albumin, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Απενεργοποίηση στους 65°C για 20 λεπτά</p> <p>Συγκέντρωση: 20.000 Units/ml</p>
<p>BsaI (New England Biolabs)</p> <p>5'...GGTCTC(N)₁...3' 3'...CCAGAG(N)₅...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 500 μg/ml BSA, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Απενεργοποίηση στους 65°C για 20 λεπτά</p> <p>Συγκέντρωση: 20.000 Units/ml</p>
<p>Bgl II (Enzyquest)</p> <p>5'...AGATCT...3' 3'...TCTAGA...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 μg/ml BSA, 50% glycerol</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Συγκέντρωση: 10 Units/μl</p>
<p>Hind III (New England Biolabs)</p> <p>5'...AAGCTT...3' 3'...TTCGAA...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, 500 μg/ml BSA, pH 7.4 @ 25°C</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Συγκέντρωση: 20.000 Units/ml</p>
<p>EcoRI-HF (New England Biolabs)</p> <p>5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5'</p>	<p>Διάλυμα αποθήκευσης: 10 mM KPO₄, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 μg/ml BSA, 50% Glycerol, 0.15% Triton® X-100, pH 7 @ 25°C</p> <p>Αποθήκευση στους -20°C</p> <p>Απενεργοποίηση στους 65°C για 20 λεπτά</p>

Πίνακας 3.2: Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των πλασμιδιακών φορέων *pLVTHM*, *pX333* και *pTER+*. Από τον κατάλογο προϊόντων της New England BioLabs, Enzyquest και Takara

Για αντιδράσεις πέψης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα:

1) rCutSmart™ Buffer (10X, με 1X Buffer Components: 50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 100 μg/ml Recombinant Albumin, pH 7.9@25°C) του προμηθευτή New England BioLabs (NEB) και

2) Buffer M [10x, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 500 mM NaCl) του προμηθευτή Takara.

Για αντιδράσεις λιγάσης χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση του προμηθευτή New England BioLabs (NEB) με αριθμό καταλόγου M0202 και το διάλυμα T4 DNA Ligase Buffer (10X).

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε η KAPA Taq Standard πολυμεράση του προμηθευτή Kapa Biosystems και το διάλυμα KAPA Taq Buffer A (10x, Tris-ammonium sulphate-base, 15 mM MgCl₂ at 10x).

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal του προμηθευτή Kapa Biosystems, το οποίο περιέχει KAPA hot-start Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, MgCl₂, dNTPs.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό του RNA από κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNase I του προμηθευτή New England BioLabs (NEB) με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκαν η αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV και το αντιδραστήριο RNaseOUT™ του προμηθευτή Invitrogen.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp DNA Ladder του προμηθευτή Enzyquest και ο μάρτυρας μοριακού βάρους 1 kb Plus DNA Ladder και η χρωστική Gel Loading Dye, Purple (6X) του προμηθευτή New England BioLabs (NEB).

3.1.5 Kit απομόνωσης/καθαρισμού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια *E. coli* των στελεχών DH5a και Stb13 χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Plasmid isolation kit* του προμηθευτή *Macherey-Nagel*.

Για τον καθαρισμό DNA έπειτα από PCR χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit* του προμηθευτή *Macherey-Nagel*.

3.1.6 Συσσκευές και εργαλεία

Οι αντιδράσεις συμβατικής PCR πραγματοποιήθηκαν:

1. στον θερμοκυκλοποιητή *Bio-Rad T100 Thermal Cycler* με αριθμό καταλόγου #186-1096 και
2. στον θερμοκυκλοποιητή *Bio-Rad MJ Mini Gradient Thermal Cycler* με αριθμό καταλόγου #PTC-1148.

Οι αντιδράσεις ποσοτικής PCR πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή *CFX ConnectReal-Time PCR Detection System* με αριθμό καταλόγου # 1855200 / 1855201

Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις συσκευές:

1. Φυγόκεντρος *Eppendorf Centrifuge 5804/5804 R - Benchtop Centrifuge*
2. Φυγόκεντρος *HERMLE Labnet Z233 MK-2 High Performance Microcentrifuges*

Η ηλεκτροφόρηση της πηκτής αгарόζης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή *Bio-Rad PowerPac™ Basic Power Supply* με αριθμό καταλόγου #1645050. Η οπτική απεικόνιση της πηκτής αгарόζης πραγματοποιήθηκε στη συσκευή *MiniBIS Pro* της εταιρείας *Bio-imaginf Systems*.

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε στη συσκευή *UV-VIS Spectrophotometer Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd*

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων των νουκλεϊκών οξέων και οι λόγοι απορροφήσεων πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο *Quawell Q3000*.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κλωνοποίηση ενθεμάτων DNA και διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η μεταγραφική σίγηση του γονιδίου του lncRNA RECUR1 και του γονιδίου στόχου του mRNA στόχου του, μέσω RNAi, CRISPR knockout και CRISPR interference. Για τα πειράματα μεταγραφικής σίγησης του lncRNA RECUR1 και του mRNA στόχου σχεδιάστηκαν shRNA και sgRNA αντίστοιχα, τα οποία στοχεύουν τα προαναφερθέντα γονίδια. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα ενθέματα, ο πλασμιδιακός φορέας και τα κύτταρα (βακτηριακά και ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο εκάστοτε πείραμα.

Ένθεμα	Πλασμιδιακός φορέας	Βακτηριακό στέλεχος E.coli	Επιβεβαίωση ένθεσης	Καρκινική κυτταρική σειρά
sh2RECUR1	pLVTHM (πέψη με ClaI και MluI-HF)	Stb13	Διαγνωστική πέψη (με EcoRI και XbaI)	AGS, NUGC4
sh4RECUR1	pLVTHM (πέψη με ClaI και MluI-HF)	Stb13	Διαγνωστική πέψη (με EcoRI και XbaI)	AGS, NUGC4
sh1RECUR1-target	pLVTHM (πέψη με ClaI και MluI-HF)	Stb13	Διαγνωστική PCR	AGS
sh4RECUR1	pTER+ (πέψη με Bgl II και Hind III)	DH5a	Διαγνωστική πέψη (με EcoRI-HF)	
RECUR1_PM_KO_sgRNA1+sgRNA2	pX333 (πέψη με BbsI και BsaI)	DH5a	Διαγνωστική PCR	
RECUR1_target_FE_KO_sgRNA1+sgRNA2	pX333 (πέψη με BbsI και BsaI)	DH5a	Διαγνωστική PCR	

Πίνακας 3.3: Τα ενθέματα, οι πλασμιδιακοί φορείς και τα κύτταρα (βακτηριακά και ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο εκάστοτε πείραμα

1) Υβριδοποίηση ολινουκλεοτιδίων

Η δημιουργία των τμημάτων DNA ,που κωδικοποιούν για τα shRNA και sgRNA, τα οποία στοχεύουν το lncRNA RECUR1 και το γονίδιο στόχο του, πραγματοποιήθηκε μέσω υβριδοποίησης (annealing) των σημαίνων και αντισημαίνων ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων DNA με θερμική επεξεργασία. Απώτερος στόχος αποτελεί η δημιουργία δίκλωνων τμημάτων με μονόκλιωνα (κολλώδη) άκρα, τα οποία θα είναι συμπληρωματικά με τα μονόκλιωνα άκρα Τα δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν τα stocks από την επαναδιαλυτοποίηση, με ddH₂O των λυοφιλιωμένων shRNA και sgRNA εκκινητών, με τελική συγκέντρωση τα 100μM.

Η σύσταση της εκάστοτε αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια για την υβριδοποίηση των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων	Όγκος (V) σε μl
1) Σημαίνων ολιγονουκλεοτίδιο- 100μM	2 μl
2) Αντισημαίνων ολιγονουκλεοτίδιο- 100μM	2 μl
3) Ρυθμιστικό διάλυμα για την υβριδοποίηση(50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8)-Sigma Aldrich	96 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	100μl

Πίνακας 3.4: Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των δίκλωνων τμημάτων DNA, υπεύθυνα για την κωδικοποίηση των sgRNA και shRNA.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με νερό στους 95°C για 5 λεπτά ακριβώς και έπειτα έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου η θερμοκρασία ήταν ίση με 37°C.

2) Πέψη πλασμιδιακών φορέων

Η πέψη των πλασμιδιακών φορέων pX333 και pTER+ είχε ήδη πραγματοποιηθεί για παλαιότερα πειράματα. Ειδικότερα, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 3.3*, ο πλασμιδιακός φορέας pTER+ είχε υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα Bgl II και Hind III, με τελική συγκέντρωση τα 45,4 ng/μl, ενώ ο πλασμιδιακός φορέας pX333 υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BbsI για την εισαγωγή του sgRNA1. Η τελική του συγκέντρωση ήταν 51,5 ng/μl. Για την ένθεση και του sgRNA2 στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ο φορέας pX333 υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BsaI, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 3.2*.

Ο φορέας pLVTHM με συγκέντρωση 3,1μg/μl, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 3.1* υποβλήθηκε σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα ClaI και MluI-HF, με στόχο την εισαγωγή των κατάλληλων ενθεμάτων με συμπληρωματικά μονόκλιωνα άκρα. Ξεκινώντας τη διαδικασία της πέψης, η απαραίτητη ποσότητα του φορέα pLVTHM, χωρίστηκε σε δύο επιμέρους tube. Συγκεκριμένα, ο φορέας είχε συγκέντρωση 3,1μg/μl και η επιθυμητή ποσότητα για τη έναρξη της πέψης ήταν 1,5μg. Συνεπώς, το κάθε tube περιείχε 0,5 μl του φορέα pLVTHM. Η τελική του συγκέντρωση ήταν 41,9 ng/μl.

Ο διαχωρισμός της απαραίτητης ποσότητας του φορέα, εξίσου σε δύο tubes των 1,5 ml, έγινε προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι τα περιοριστικά ένζυμα θα πραγματοποιήσουν πέψη σε όλους τους πλασμιδιακούς φορείς κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Συνεπώς, η πέψη πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: την πρώτη ημέρα έγινε

πέψη του φορέα με το ένα περιοριστικό ένζυμο (πχ. ClaI) και τη δεύτερη ημέρα της διαδικασίας έγινε πέψη του φορέα με το δεύτερο περιοριστικό ένζυμο (πχ. MluI-HF). Για την πραγματοποίηση της δεύτερης πέψης, προηγήθηκε η ηλεκτροφόρηση της πρώτης αντίδρασης πέψης του φορέα σε πηκτή αραρόζης 1% και η απομόνωσή του γραμμικού φορέα μέσω το *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit* του προμηθευτή *Macherey-Nagel*.

Η αντίδραση της εκάστοτε πέψης, με συνολικό όγκο τα 50μl (με εξαίρεση την δεύτερη πέψη του φορέα pX333 με τελικό όγκο τα 60μl), πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 5 ώρες. Αξίζει να αναφερθεί ότι 3 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης της πέψης πάρθηκε το 10% της αντίδρασης (5 μl) από το κάθε tube και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αραρόζης 1%. Η ηλεκτροφόρηση αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η πορεία της εκάστοτε αντίδρασης και η πιθανή ύπαρξη κυκλικού πλασμιδίου. Για το λόγο αυτό στις 3 ώρες προστέθηκε, στην κάθε αντίδραση, 1μl επιπλέον από το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο.

Η σύσταση της εκάστοτε αντίδρασης φαίνεται στους παρακάτω πίνακες:

Αντιδραστήρια πέψης pLVTHM- Ημέρα 1	Όγκος (V) σε μl
1) Ρυθμιστικό διάλυμα-rCutSmart, New England Biolabs,10X	5 μl
2) Πλασμιδιακός φορέας pLVTHM, 3,1 μg/μl	0,5 μl
3) Ένζυμο ClaI/MluI-HF , New England Biolabs,10.000 Units, 37°C	1,5 μl
4) ddH2O	43 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Αντιδραστήρια πέψης pLVTHM- Ημέρα 2	Όγκος (V) σε μl
1) Ρυθμιστικό διάλυμα-rCutSmart, New England Biolabs,10X	5 μl
2) Πλασμιδιακός φορέας pLVTHM, 14,5 μg/μl	33 μl
3) Ένζυμο MluI-HF /ClaI, New England Biolabs,10.000 Units, 37°C	1 μl
4) ddH2O	11 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Αντιδραστήρια πέψης pX333	Όγκος (V) σε μl
1) Ρυθμιστικό διάλυμα-rCutSmart, New England Biolabs,10X	6 μl
2) Πλασμιδιακός φορέας pX333 με ένθεμα το sgRNA1 RECUR1/RECUR1 target	50 μl
3) Ένζυμο BsaI, New England Biolabs,10.000Units, 37°C	2 μl
4) ddH2O	2 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	60 μl

Πίνακες 3.5-3.7: Τα αντιδραστήρια και τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των πλασμιδιακών φορέων pLVTHM, pX333 και pTER+.

3) Αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση λιγάσης συμβάλλει στην ενζυμική ένθεση των shRNA και sgRNA στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, όπως φαίνεται στον *Πίνακα 3.3*, μέσω των συμπληρωματικών μονόκλωνων άκρων τους.

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε συσκευή PCR, για 16 ώρες στους 16°C και η επιθυμητή συγκέντρωση του πλασμιδιακού φορέα είναι 50ng/μl. Απαραίτητη κρίνεται και η δημιουργία ενός δείγματος ελέγχου, το οποίο δεν θα περιέχει το αντίστοιχο ένθεμα. Το δείγμα αυτό θα αποτελέσει αρνητικός μάρτυρας για τη διαγνωστική PCR ή τη διαγνωστική πέψη, προκειμένου να βρεθούν οι βακτηριακοί κλώνοι, οι οποίοι θα περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα και το επιθυμητό ένθεμα.

Η σύσταση της εκάστοτε αντίδρασης φαίνεται στους παρακάτω πίνακες:

Αντιδραστήρια	Αντίδραση λιγάσης στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM	
	pLVTHM+sh2RECUR1/sh4RECUR1/sh1RECUR1 target	Self-ligation pLVTHM
1) Δίκλωνο τμήμα shRNA-eurofins - genomics	2 μl	-
2) Λιγάση T4 – Enzyquest – 400Units/μl	0,5 μl	0,5 μl
3) Ρυθμιστικό διάλυμα T4 – New England Biolabs- 10X	1 μl	1 μl
4) Πλασμιδιακός φορέας pLVTHM από πέψη με ClaI και MluI-HF – 41,9ng/μl	1 μl	1 μl
5) ddH ₂ O	5,5 μl	7,5 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10μl	10μl

Αντιδραστήρια	Αντίδραση λιγάσης στον πλασμιδιακό φορέα pX333				
	pX333 sgRNA1 RECUR1/ RECUR1 target	Self-ligation pX333	pX333 sgRNA1 +2 RECUR1	pX333 sgRNA1+2 RECUR1 target	Self-ligation pX333 sgRNA1
1) Δίκλωνο τμήμα sgRNA-eurofins - genomics	4 μl	-	4 μl	4 μl	-
2) Λιγάση T4 – Enzyquest – 400Units/μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
3) Ρυθμιστικό διάλυμα T4 – New England Biolabs- 10X	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
4) Φορέας pX333, πέψη με BbsI-HF – 24,4ng/μl	2 μl	2 μl	-	-	-
4) Φορέας pX333 +sgRNA1 RECUR1, πέψη με BsaI-HF – 64,8 ng/μl	-	-	0,8 μl	-	RECUR 1 0,8 /
4) Φορέας pX333+sgRNA1 RECUR1 target πέψη με BsaI-HF – 49,9 ng/μl	-	-	-	1 μl	RECUR 1 target 1 μl
5) ddH ₂ O	11 μl	15 μl	12,2	12	16,2/16
Τελικός όγκος αντίδρασης	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl

Αντιδραστήρια για την αντίδραση λιγάσης του φορέα pTER+	Όγκος (V) σε μl
1) Δίκλωνο τμήμα sh4RECUR1 – eurofins - genomics	4 μl
2) Λιγάση T4– Enzyquest – 400Units/μl	0,5 μl
3) Ρυθμιστικό διάλυμα T4 – New England Biolabs- 10X	1 μl
4) Πλασμιδιακός φορέας pTER+ από πέψη με Bgl-II και Hind III– 46,6 ng/μl	1,1 μl
5) ddH ₂ O	3,4 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10μl

Πίνακες 3.8-3.10: Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση λιγάσης των πλασμιδιακών φορέων pLVTHM, pX333 και pTER+.

4) Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli*

Επόμενο στάδιο αποτελεί ο μετασχηματισμός βακτηρίων με τα προϊόντα από την αντίδραση λιγάσης. Συγκεκριμένα, ο μετασχηματισμός των βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli* πραγματοποιείται μέσω θερμικού σοκ. Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας είναι τα εξής:

1. Αρχικά, οι σωλήνες τύπου erpendorf, οι οποίοι περιέχουν 50μl των δεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli*, μεταφέρονται από τους -80°C στον πάγο για 5 λεπτά.
2. Στην συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, 5μl από το προϊόν από την αντίδραση λιγάσης στους σωλήνες με τα 50μl των βακτηρίων *Escherichia coli*.
3. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στον πάγο και μετά τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο αυστηρά για 50 δευτερόλεπτα στους 42°C. Στο θερμικό σοκ δημιουργούνται παροδικές οπές στην μεμβράνη των βακτηρίων, προκειμένου να εισέλθει σε αυτά ο πλασμιδιακός φορέας από την αντίδραση λιγάσης.
4. Έπειτα τα δείγματα μεταφέρονται ξανά στον πάγο για 2 λεπτά, έτσι ώστε να επανέλθει η συνοχή της πλασματικής μεμβράνης.
5. Στην συνέχεια, προστίθενται –υπό ασηπτικές συνθήκες- σε κάθε δείγμα 950μl θρεπτικού LB Broth χωρίς αμπικιλίνη, με τον τελικό όγκο του εκάστοτε δείγματος να ισούται με 1ml.
6. Ο όγκος αυτός μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37°C, στις 160 στροφές το λεπτό, για 50 λεπτά. Όπως αναφέρθηκε και στην [υποενότητα 3.1.3](#), η αμπικιλίνη αποτελεί το αντιβιοτικό το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την διαλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Ωστόσο, τα βακτήρια αναπτύσσονται αρχικά

απουσία του αντιβιοτικού, προκειμένου να εκφράσουν –όσα βακτήρια έχουν μετασχηματιστεί με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα- το γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

7. Παράλληλα, τοποθετούνται σε επωαστήρα στους 37°C ο αντίστοιχος αριθμός τρυβλίων, τα οποία έχουν ως θρεπτικό LB Broth και 100μg/ml αμπικιλίνη.
8. Τέλος, γίνεται –υπό ασηπτικές συνθήκες- επίστρωση 350μl, από το κάθε δείγμα σε ένα τρυβλίο petri και τοποθετούνται όλα τα τρυβλία της πειραματικής διαδικασίας στον επωαστήρα στους 37°C για 16 ώρες.

Από τα παραπάνω τρυβλία επιλέγονται βακτηριακοί κλώνοι και δημιουργούνται υγρές καλλιέργειες, σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 2-4 ml θρεπτικού LB Broth, οι οποίοι τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37°C, στις 210 στροφές λεπτό, για 16 ώρες.

5) Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα

Μετά το πέρας των 16 ωρών, οι υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται προκειμένου να εξεταστεί η επιτυχία της ένθεσης των DNA ολιγονουκλεοτιδίων – που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή shRNA ή sgRNA- στους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται η απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα από τον εκάστοτε κλώνο, μέσω: 1) εργαστηριακού πρωτοκόλλου και 2) του εμπορικά διαθέσιμου kit - NucleoSpin® Plasmid isolation kit- της εταιρείας Macherey-Nagel.

Για τη διεξαγωγή του εργαστηριακού πρωτοκόλλου της αλκαλικής λύσης παρασκευάζονται τα κάτωθι ρυθμιστικά διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα I (Lysis buffer I)	Ρυθμιστικό διάλυμα II (Lysis buffer II)	Ρυθμιστικό διάλυμα III (Lysis buffer III)
a) 50mM Tris : 2,5 ml από 1 M απόθεμα (για 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα)	a) 1% SDS : 1 ml από 10 % SDS απόθεμα (για 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα)	a) 60ml 5M οξικό κάλιο (49,07g οξικού καλίου σε 100ml H ₂ O)
b) 10mM EDTA : 1 ml από 0,5 M απόθεμα (για 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα)	b) 0,2M NaOH : 400 μl 5M NaCl (για 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα)	b) 11,5ml άνυδρου οξικού οξέος
c) ddH ₂ O : 46,5 ml	c) ddH ₂ O : 8,6 ml	c) ddH ₂ O: 28,5ml

Πίνακας 3.11: Τα συστατικά των ρυθμιστικών διαλυμάτων για την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα μέσω εργαστηριακού πρωτοκόλλου.

Τα βήματα του εργαστηριακού πρωτοκόλλου είναι τα εξής:

1. Έχοντας συμπληρωθεί οι 16 ώρες επώασης από τη διαλογή των αποικιών, οι υγρές καλλιέργειες μεταφέρονται, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε σωλήνες τύπου erpendorf των 2ml.
2. Ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων στους 4°C στα 13.000 rpm για 2 λεπτά. Παράλληλα, δημιουργείται σε ένα falcon των 15ml, το **Ρυθμιστικό διάλυμα II**, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σε επόμενο βήμα του πρωτοκόλλου. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται την ίδια ημέρα, παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου και δεν επαναχρησιμοποιείται τις επόμενες ημέρες.
3. Απορρίπτεται το υπερκείμενο από το κάθε δείγμα και στην συνέχεια προστίθενται σε κάθε δείγμα 100μl MIX, το οποίο περιέχει 100μl Buffer I και 0,4μl RNaseA (στόχος της RNase A αποτελεί η διάσπαση μορίων RNA και η αύξηση της καθαρότητας του DNA στα δείγματα)
4. Τα δείγματα αναδεύονται σε μηχανήμα vortex, έως ότου διαλυτοποιηθεί εντελώς το ίζημα της βακτηριακής καλλιέργειας.
5. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 200μl από το Buffer II, αναδεύεται ελαφρώς και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Στην συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται 150μl από το Buffer III, αναδεύεται ελαφρώς και γίνεται επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
7. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιείται φυγοκέντριση στους 4°C στα 13.000 rpm για 15 λεπτά.
8. Το υπερκείμενο, από το κάθε σωλήνα τύπου erpendorf, συλλέγεται προσεκτικά (χωρίς να γίνει συλλογή του ιζήματος) και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf των 1,5ml. Στο υπερκείμενο αυτό περιέχεται ο πλασμιδιακός φορέας.
9. Σε κάθε νέο σωλήνα προστίθενται 1ml 100% αιθανόλης, αναδεύεται ελαφρώς και γίνεται επώαση για τουλάχιστον 20 λεπτά στους -80°C.
10. Στην συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρονται από τους -80°C στον πάγο και πραγματοποιείται φυγοκέντριση στους 4°C στα 13.000 rpm για 20 λεπτά.
11. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο και στο εκάστοτε δείγμα προστίθενται 600μl 70% αιθανόλης.
12. Ακολουθεί φυγοκέντριση στους 4°C στα 13.000 rpm για 5 λεπτά.

13. Μετά την φυγοκέντριση, αφαιρείται το υπερκείμενο με πιπέτα των 1000μl (ρυθμισμένη στα 600μl) και οι υπολειπόμενες ποσότητες αιθανόλης αφαιρέθηκαν χρησιμοποιώντας πιπέτα των 100μl.
14. Οι σωλήνες τύπου erpendorf έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου με ανοικτό καπάκι, έως ότου έχει εξατμιστεί εντελώς οποιαδήποτε εναπομείνασα ποσότητα αιθανόλης.
15. Η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (το οποίο αφορά τον πλασμιδιακό φορέα), έγινε με την προσθήκη 100μl WFI (Water for injection)
16. Τέλος, τα δείγματα θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 65°C για 5 λεπτά και αναδεύονται σε συσκευή vortex.

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης στους πλασμιδιακούς φορείς των δίκλωνων τμημάτων DNA, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των sgRNA και shRNA, πραγματοποιείται: 1) διαγνωστική PCR και 2) διαγνωστική πέψη με ένζυμα περιορισμού. Στον [Πίνακα 3.3](#) αναγράφονται οι μέθοδοι επιβεβαίωσης και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της ένθεσης της DNA κατασκευής στους πλασμιδιακούς φορείς pLVTHM, pTER+ και pX333.

6) Διαγνωστικές μέθοδοι επιβεβαίωσης ένθεσης της DNA κατασκευής στον πλασμιδιακό φορέα

A) Διαγνωστική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (διαγνωστική PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται ως διαγνωστική μέθοδος, προκειμένου να ενισχυθεί η περιοχή στην οποία αναμένεται να εισέλθει η DNA κατασκευή. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται εκκινητές οι οποίοι υβριδίζουν στην αλληλουχία εκατέρωθεν του σημείου ένθεσης. Συνεπώς, το προϊόν της αντίδρασης, στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης, θα έχει ως μέγεθος - σε ζεύγη βάσεων- ίσο με το άθροισμα του μεγέθους της ενδιάμεσης αλληλουχίας του πλασμιδιακού φορέα και του μεγέθους της DNA κατασκευής. Η διαφορά αυτή γίνεται αντιληπτή μέσω ηλεκτροφόρησης των αποτελεσμάτων της PCR, σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Πιο αναλυτικά, για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται ως δείγμα ο απομονωμένος πλασμιδιακός φορέας από το προηγούμενο πρωτόκολλο, το οποίο δείγμα έχει προηγουμένως αραιωθεί 30 φορές. Για την αραιώση αυτή, λαμβάνεται 1μl από το δείγμα και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf, στον οποίο προστίθενται και 29μl WFI. Η επιθυμητή συγκέντρωση του DNA υποστρώματος για την αντίδραση είναι τα 10ng/μl και τελικό όγκο αντίδρασης τα 50μl. Τα αντιδραστήρια, τα οποία απαιτούνται για το κάθε δείγμα, αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	Όγκος (V) σε μl
1) Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Ταq Πολυμεράσης - 10X - 1,5Mm Mg at 1X – Roche	5 μl
2) Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) – 10mM	0,5 μl
3) Σημαίνων εκκινητής– 10 mM- eurofins genomics	1 μl
4) Αντισημαίνων εκκινητής – 10 mM- eurofins genomics	1 μl
5) KAPA Ταq πολυμεράση - 5 U/μL – Roche	0,15 μl
6) Αποστειρωμένο H ₂ O	41,35 μl
7) DNA υπόστρωμα (αραιωμένος 1:30 πλασμιδιακός φορέας)	1 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Πίνακας 3.12: Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της διαγνωστικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (διαγνωστική PCR)

B) Διαγνωστική πέψη πλασμιδιακού φορέα με ένζυμα περιορισμού

Η διαγνωστική πέψη χρησιμοποιείται ως μέθοδος επιβεβαίωσης της ένθεσης της DNA κατασκευής στον πλασμιδιακό φορέα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται ένζυμα περιορισμού τα οποία αναγνωρίζουν και διασπών δεσμούς υδρογόνου και φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε αλληλουχίες εκατέρωθεν του σημείου ένθεσης. Τα ένζυμα περιορισμού τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται *Πίνακα 3.3*. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης αποτελούν τα 50 μl. Στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης της DNA κατασκευής, θα προκύψουν δύο προϊόντα: το ένα προϊόν έχει μέγεθος - σε ζεύγη βάσεων- ίσο με το άθροισμα του μεγέθους της ενδιάμεσης αλληλουχίας του πλασμιδιακού φορέα και του μεγέθους της DNA κατασκευής, ενώ το δεύτερο προϊόν είναι η εναπομείνασα αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα. Ωστόσο, στην μη επιτυχημένη ένθεση προκύπτει αποκλειστικά η ενδιάμεση αλληλουχία από την περιοχή πέψης – η οποία διαφέρει περίπου 50 ζεύγη βάσεων από τη περίπτωση επιτυχημένης ένθεσης - και η υπόλοιπη αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα. Η διαφορά αυτή γίνεται αντιληπτή μέσω ηλεκτροφόρησης των αποτελεσμάτων της πέψης, σε πηκτική αγαρόζη. Απαραίτητη κρίνεται, ωστόσο, και η χρήση θετικού και αρνητικού μάρτυρα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα του

ίδιου πλασμιδιακού φορέα, το οποίο έχει ήδη υποστεί πέψη, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα το οποίο δεν έχει υποστεί πέψη με ένζυμο περιορισμού.

Τα αποτελέσματα και των δύο διαγνωστικών τεχνικών ηλεκτροφορούνται σε πηκτική αγαρόζης 1% και 2%.

7) Επιμόλυνση ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών

Η διαδικασία επιμόλυνσης των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών με τους προαναφερθέντες πλασμιδιακούς φορείς, πραγματοποιήθηκε μέσω λεντιών, όπως έχει αναλυθεί σε παλαιότερες πτυχιακές εργασίες.

3.2.2 Απομόνωση RNA και υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του lncRNA RECUR1

Έπειτα από την επιμόλυνση των καρκινικών κυττάρων, απομονώθηκε από αυτά η ολική ποσότητα RNA. Απώτερος στόχος αποτελεί ο υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του lncRNA RECUR1 και ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σίγησης του lncRNA τόσο σε επίπεδο γονιδίου, όσο και σε επίπεδο μεταγράφου. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων του RECUR1 πραγματοποιείται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR).

Οι πειραματικές διαδικασίες οι οποίες απαιτούνται για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων είναι οι κάτωθι:

1) Απομόνωση RNA από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές

1. Το εκάστοτε κυτταρόλυμα, το οποίο προέκυψε από την κυτταροκαλλιέργεια των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf των 1,5ml.
2. Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό, προστίθενται σε κάθε δείγμα 1ml Trizol Reagent[®], ένα μείγμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελεί ισχυρό αποδιατακτικό πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να απενεργοποιεί τη δράση ενζύμων, όπως οι RNAσες. Συνεπώς, εξασφαλίζεται η ακεραιότητα του RNA το οποίο θα ποσοτικοποιηθεί.
3. Τα δείγματα παραμένουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πάγο.

4. Σε κάθε tube προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε vortex για 30 δευτερόλεπτα.
5. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 14.000rpm στους 4°C.
6. Στο στάδιο αυτό, το κάθε δείγμα εμφανίζει δύο φάσεις. Με την χρήση μικροπιπέτας μεταφέρονται 480μl από την υδατική φάση (άνω φάση) σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf των 1.5 ml. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται εντός απαγωγού.
7. Στην συνέχεια, προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλης και 5 μl γλυκογόνου
8. Τα δείγματα αναδεύονται ήπια με το χέρι 1-2 φορές, παραμένουν στον πάγο για 10 min και μετά φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στα 14.000 rpm στους 4°C.
9. Μετά τη φυγοκέντριση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μl 70% παγωμένης αιθανόλη και ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα 14.000 rpm στους 4°C.
10. Το υπερκείμενο αφαιρείται αρχικά με πιπέτα των 1000 μl (ρυθμισμένη στα 500 μl) και στην συνέχεια με πιπέτα των 200 μl (ρυθμισμένη στα 150 μl), με προσοχή χωρίς διαταραχθεί το ίζημα το οποίο αποτελεί το RNA από τα κύτταρα. Εφόσον αφαιρεθεί το υπερκείμενο, οι σωλήνες παραμένουν με ανοικτό καπάκι σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη.
11. Τέλος, πραγματοποιείται η επαναδιαλυτοποίηση του κάθε ιζήματος με την προσθήκη 50 μl RNase free H₂O. Στην συνέχεια, τα δείγματα θερμαίνονται για 3 λεπτά στους 65 °C και ακολουθεί ανάδευση με vortex, καταβύθιση με spin, και μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο.

2) Επεξεργασία δειγμάτων RNA με DNAση

Πραγματοποιείται επεξεργασία των δειγμάτων RNA, τα οποία προέκυψαν από την προηγούμενη πειραματική διαδικασία, με το ένζυμο DNAση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται προκειμένου να διασπαστούν όλα τα μόρια DNA από το κυτταρόλυμα.

Η ποσότητα RNA, η οποία χρησιμοποιείται από το κάθε δείγμα, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10μg, σε μία αντίδραση με τελικό όγκο 30μl.

1. Η κάθε αντίδραση περιέχει τις εξής ποσότητες αντιδραστηρίων:

Αντιδραστήρια για την επεξεργασία RNA δειγμάτων με DNAση	Όγκος (V) σε μl
1) Buffer, 10X, Thermo Scientific for DNase I	3 μl
2) DNase I, ThermoFischer Scientific	1 μl
3) Invitrogen RNaseOUT™	0,5 μl
4) Total nucleic acid	25 μl
5) RNA H ₂ O	0,5 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	30 μl

Πίνακας 3.13: Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των RNA δειγμάτων με το ένζυμο DNAση

2. Με την προσθήκη των αντιδραστηρίων στα 25μl του κάθε δείγματος, τα δείγματα αναδεύονται με vortex για 3 λεπτά
3. Έπειτα, τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 37°C.
4. Στην συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο και προστίθενται στο καθένα 40 μl οξικό νάτριο grade 3M pH 5.6 και 330 μl WFI, με στόχο ο τελικός όγκος να ισούται με 400 μl.
5. Επιπλέον, γίνεται προσθήκη 400 μl φαινόλης/χλωροφόρμιου (σε αναλογία 1:1) από την κάτω φάση στον απαγωγό και γίνεται ανάδευση με vortex για 1 λεπτό.
6. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 14.000 rpm στους 4°C.
7. Με την χρήση μικροπιπέτας λαμβάνονται 380 μl από με πολλή προσοχή από το υπερκείμενο και μεταφέρονται σε άδεια tube με τα αντίστοιχα ονόματα.
8. Στην συνέχεια, προστίθενται 1000 μl 100 % παγωμένη αιθανόλη και 5μl γλυκογόνο, ανακινούνται 4-5 φορές και τοποθετούνται στους – 80°C τουλάχιστον για 1 ώρα.
9. Ύστερα, ακολουθεί φυγοκέντριση για 30 λεπτά στα 14.000 rpm στους 4°C.
10. Αφαιρείται όλο το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
11. Προστίθενται σε κάθε δείγμα 500 μl 70 % παγωμένη αιθανόλη και γίνεται φυγοκέντριση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 14.000 rpm στους 4°C.
12. Το υπερκείμενο αφαιρείται αρχικά με πιπέτα των 1000 μl (ρυθμισμένη στα 500 μl) και στην συνέχεια με πιπέτα των 200 μl (ρυθμισμένη στα 150 μl), με προσοχή χωρίς διαταραχθεί το ίζημα το οποίο αποτελεί το RNA από τα κύτταρα. Εφόσον αφαιρεθεί το υπερκείμενο, οι σωλήνες παραμένουν με

ανοικτό καπάκι σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη.

13. Τέλος, πραγματοποιείται η επαναδιαλυτοποίηση του κάθε ιζήματος με την προσθήκη 30 μl RNase free H_2O . Στην συνέχεια, τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 65 °C και ακολουθεί ανάδευση με vortex και μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο.

3) Σύνθεση cDNA

1. Από το κάθε δείγμα RNA απαιτούνται 1000 ng , τα οποία διαλυτοποιούνται με WFI, έως ότου ο τελικός όγκος (V_T) είναι 10 μl .
2. Στα αραιωμένα δείγματα, προστίθενται 1 μl dNTPs 10mM και 1 μl από τον επιθυμητό εκκινητή. Συγκεκριμένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι εξής εκκινητές: α) τυχαίοι (random), β) ολιγομερή θυμίνης (oligodT) και γ) ειδικοί (specific).
3. Στην συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται για 5 λεπτά στους 65°C, με στόχο την αποδιάταξη των RNA και την προσκόλληση των εκκινητών.

Αντιδραστήρια σύνθεσης cDNA - MIX	Όγκος (V) σε μl
1) Buffer – M-MLV RT Buffer 5X- Thermoscientific	4 μl
2) DTT – 100mM	2 μl
3) Invitrogen RNaseOUT™	0,5 μl
4) ddH ₂ O (for RNA)	0,5 μl
5) M-MLV RT – 200U/ μl - Invitrogen™	1 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	8 μl

Πίνακας 3.14: Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση cDNA από τα RNA δείγματα

4. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο, αναδεύονται με vortex και προστίθενται 8 μl από το **MIX**, το οποίο περιέχει τα εξής για το κάθε δείγμα:
5. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για 2 ώρες στους 37 °C.
6. Μετά το πέρας των 2 ωρών προστίθενται 380 μl ddH₂O και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C. Από τα δείγματα αυτά, χρησιμοποιούνται 4 μl για την πραγματοποίηση qPCR.

4) Πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης, των μεταγράφων του RECUR1 και του γονιδίου στόχου του, πραγματοποιείται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR). Από τα δείγματα cDNA χρησιμοποιούνται 4μl, με τελικό όγκο αντίδρασης τα 20μl. Για την ποσοτικοποίηση, μέσω φθορισμού, των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται η χρωστική SYBR™ Green, η οποία προσδένεται στο δίκλωνο DNA.

Η σύσταση της εκάστοτε αντίδρασης είναι η εξής:

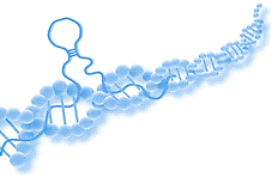
Αντιδραστήρια qPCR	Όγκος (V) σε μl
1) Δείγμα cDNA	4 μl
2) KAPA SYBR™ Green Mix- Roche	10 μl
3) Σημαίνων και αντισημαίνων εκκινητής	2 μl
4) WFI (Water for Injection)	4 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	20μl

Πίνακας 3.15: Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)

Οι συνθήκες για την αντίδραση qPCR είναι οι εξής:

Θερμοκρασία σε °C	Χρονική διάρκεια	Επαναλήψεις	Τελικός όγκος σε μl
95 °C	5 min	45 κύκλους	20 μl
95 °C	20 sec		
58°C	20 sec		
72 °C	15 sec		
55 °C	5 sec		
95 °C	50 sec		
12 °C	∞		

Πίνακας 3.16: Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)

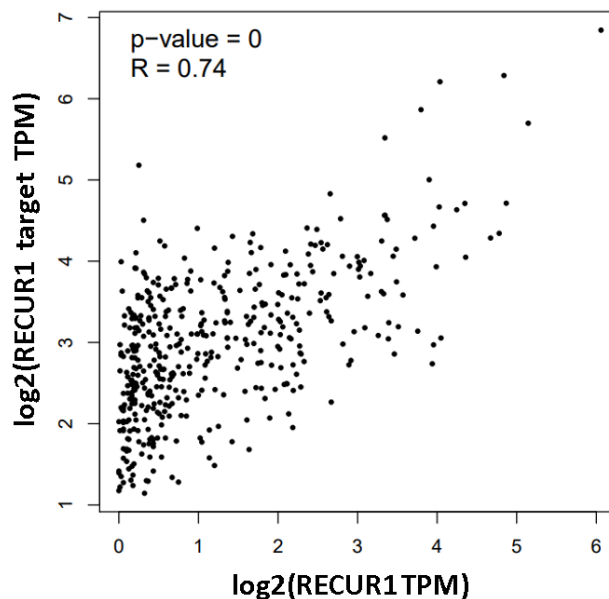


4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα βιοπληροφορικών αναλύσεων μέσω της βάσης δεδομένων GEPIA

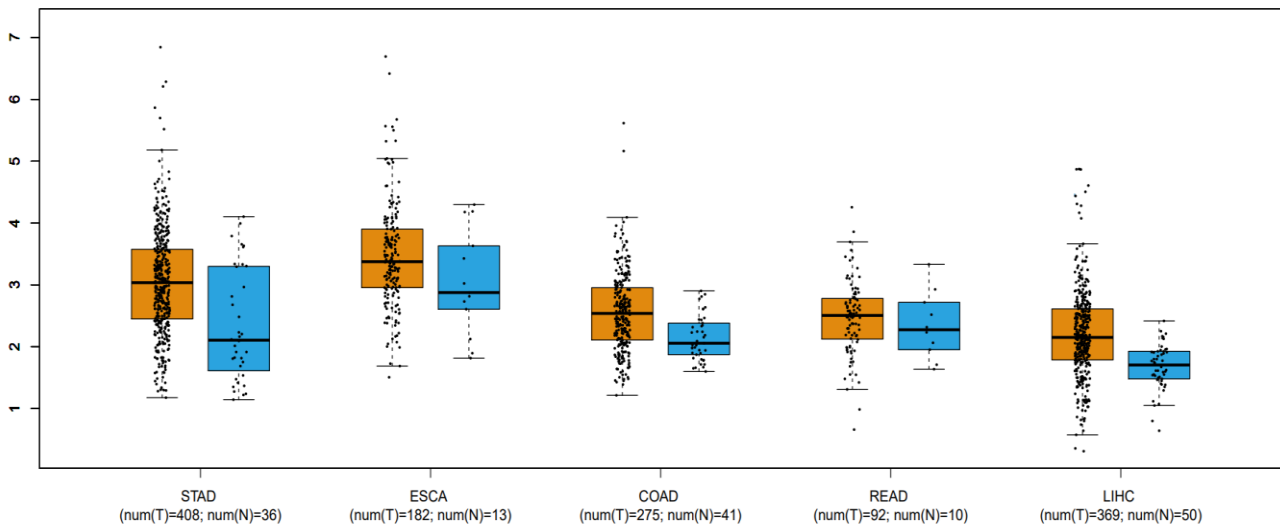
Όπως αναφέρθηκε και στην δεύτερη ενότητα της παρούσας πτυχιακής, σκοπός αυτής αποτελεί η εύρεση της δράσης του lncRNA RECUR1 στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Σύμφωνα με μη δημοσιευμένα δεδομένα και βιοπληροφορικές αναλύσεις το γονίδιο του RECUR1 φαίνεται να βρίσκεται στην ίδια τοπολογικά σχετιζόμενη περιοχή (TAD = topologically associated domain) με ένα πρωτογονογονίδιο, το οποίο στην συνέχεια θα αναφέρεται ως RECUR1 target. Κατά συνέπεια, ελέγχθηκε ο ρόλος του lncRNA στην έκφραση του παραπάνω πρωτογονογονιδίου στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, στο οποίο και υπερεκφράζεται.

Ξεκινώντας, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων GEPIA, στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα φανερώνεται η θετική και στατιστικά σημαντική συσχέτιση της λογαριθμημένης και κανονικοποιημένης έκφρασης του γονιδίου του lncRNA RECUR1 και του RECUR1 target (*Εικόνα 4.1*, p-value= 0.001, συντελεστής Pearson: R=0.74).



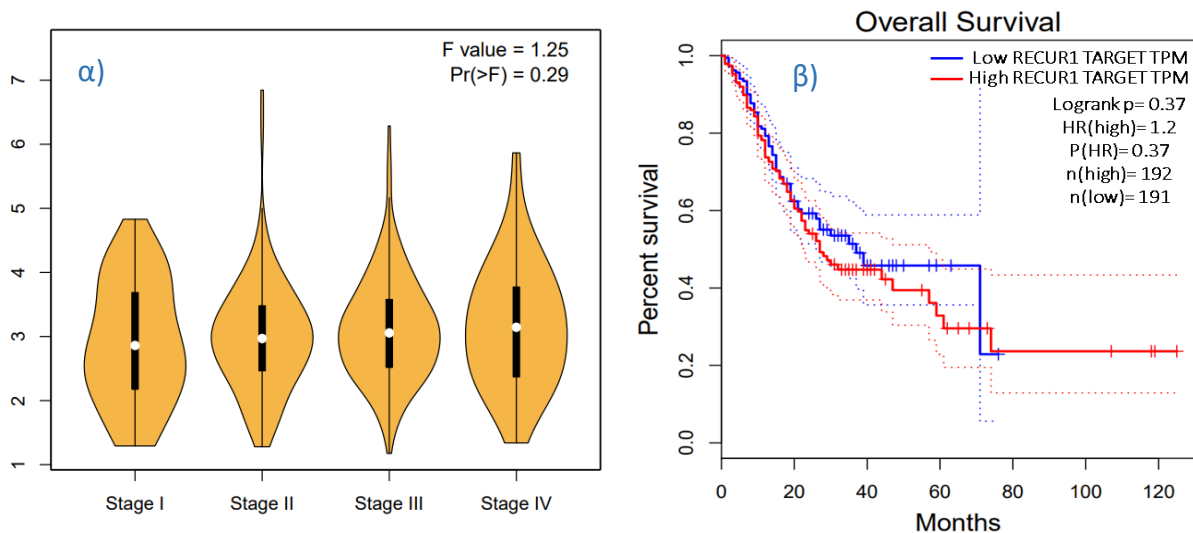
Εικόνα 4.1: Ανάλυση συσχέτισης λογαριθμημένης έκφρασης RECUR1 και γονιδίου στόχου (RECUR1 target) στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων RNA-seq ανά TPM (Transcript per million). Από τη βάση δεδομένων GEPIA.

Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του διαγράμματος boxplot (*Εικόνα 4.2*), το γονίδιο στόχος του RECUR1 target παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση έκφρασης στην περίπτωση του γαστρικού αδενοκαρκινώματος (STAD), εν συγκρίσει με τον αντίστοιχο φυσιολογικό παρακαρκινικό ιστό. Ωστόσο, σε κανέναν από τους ιστούς του διαγράμματος δεν είναι στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης RECUR1 target.



Εικόνα 4.2: Διάγραμμα boxplot στο οποίο απεικονίζεται η έκφραση του γονιδίου στόχου του *RECURI* (*RECURI target*) σε πέντε τύπους γαστρεντερικού καρκίνου. Με πορτοκαλί απεικονίζεται η έκφραση σε καρκινικούς ιστούς, ενώ με μπλε απεικονίζεται η έκφραση σε φυσιολογικούς παρακαρκινικούς ιστούς (*TCGA normal*). *STAD*= γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (*stomach adenocarcinoma*), *ESCA*= καρκίνος του οισοφάγου (*esophageal cancer*), *COAD*=αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (*colon adenocarcinoma*), *READ*= αδενοκαρκίνωμα του ορθού (*rectum adenocarcinoma*), *LIHC*= ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (*liver hepatocellular carcinoma*), *num(N)*=*Normal* και *num(T)*=*Tumor*. Από τη βάση δεδομένων *GEPIA*.

Πιο αναλυτικά, στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα η αυξημένη έκφραση του *RECURI target* παρατηρείται ήδη από το αρχικό στάδιο του καρκίνου (stage I), και παραμένει αυξημένη έως και το τελικό στάδιο (stage IV), όπως φαίνεται και στο violin plot (Εικόνα 4.3 α), $F \text{ value}=1,25$). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη διαγνωστική σημαντικότητα του συγκεκριμένου γονιδίου, καθώς η αυξημένη έκφρασή του παρατηρείται στα αρχικά καρκινικά στάδια και έτσι καθίσταται δυνατή η έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Όσον αφορά τη συσχέτιση της έκφρασης του *RECURI target* με την επιβίωση των ασθενών, από το διάγραμμα Kaplan - Meier φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση στην ολική επιβίωση (Εικόνα 4.3 β)).



Εικόνα 4.3: α) Διάγραμμα (violin plot) των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου του *RECURI* (*RECURI* target) στα διαφορετικά κλινικά στάδια του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, με τη μέθοδο one-way ANOVA. β) Διάγραμμα Kaplan – Meier για τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου του *RECURI* (*RECURI* target) με τα ποσοστά επιβίωσης ασθενών με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Οι ασθενείς έχουν κατηγοριοποιηθεί σε ασθενείς (n=192) με υψηλή έκφραση του *RECURI* target (κόκκινη γραμμή) και σε ασθενείς (n=191) με χαμηλή έκφραση του *RECURI* target (μπλε γραμμή). Mantel-Cox test, με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Από τη βάση δεδομένων GEPIA.

4.2 Πειραματικά αποτελέσματα

4.2.1 Παροδική σίγηση μέσω μηχανισμού παρεμβολής RNA των μεταγράφων του *RECURI* και του *RECURI* target

Για την πειραματική διερεύνηση της δράσης του μη μελετημένου lncRNA *RECURI* στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, πραγματοποιήθηκε η σίγησή του, μέσω του μηχανισμού RNAi. Στόχος ήταν ο έλεγχος πιθανών φαινοτυπικών αλλαγών των καρκινικών κυττάρων, καθώς και των πιθανών αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων του *RECURI* target, εξαιτίας της σίγησης. Για την επίτευξη όσων προαναφέρθηκαν, σχεδιάστηκαν δύο shRNA, τα οποία ονομάστηκαν sh2RNA *RECURI* και sh4RNA *RECURI* και στοχεύουν αντίστοιχα το τρίτο και πέμπτο εξόνιο του γονιδίου του *RECURI*.

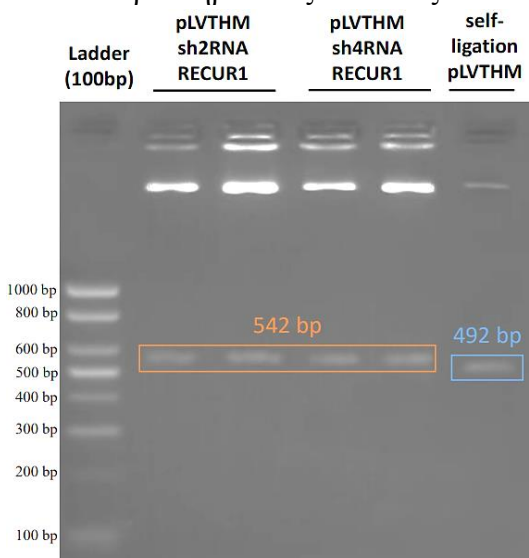
Όπως αναφέρθηκε και στην *υποενότητα 3.1.3* και στον *Πίνακα 3.3* οι αλληλουχίες, μέσω των οποίων θα συντεθούν τα προαναφερθέντα shRNA, εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM.

Η επιβεβαίωση της ένθεσης των αλληλουχιών στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM, πραγματοποιήθηκε σε δείγματα, τα οποία προέκυψαν από την αλκαλική λύση υγρών καλλιεργειών από μοναδιαίες βακτηριακές αποικίες Stb13, οι οποίες μετασχηματίστηκαν με την παραπάνω κατασκευή. Παράλληλα, απομονώθηκε δείγμα από μία αποικία από μετασχηματισμένα Stb13 βακτήρια, τα οποία έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα, χωρίς την επιθυμητή ένθεση (self-ligation). Το δείγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε στη διαγνωστική πέψη ως αρνητικός μάρτυρας.

1) Επιβεβαίωση ένθεσης shRNA RECUR1 στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM μέσω διαγνωστικής πέψης

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη, το οποίο πρωτόκολλο αναλύθηκε στις μεθόδους, με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI, των οποίων οι περιοχές αναγνώρισης και πέψης φαίνονται στην *Εικόνα 3.1* και στον *Πίνακα 3.2*. Επεξηγώντας, τα 50μl της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 2%, χρησιμοποιώντας 10μl χρωστικής για την φόρτωση (loading diy). Η πυκνότητα της πηκτής επιλέχθηκε διότι παρατηρείται διαφορά 50bp μεταξύ θετικών και αρνητικών βακτηριακών κλώνων. Ειδικότερα, στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας, προκύπτει ως προϊόν ένα τμήμα DNA με μήκος 542bp (στην *Εικόνα 4.4* εντός πορτοκαλί πλαισίου), ενώ απουσία ενθέματος το προϊόν έχει μήκος 492bp (στην *Εικόνα 4.4*, εντός μπλε πλαισίου) όμοια με τον αρνητικό μάρτυρα. Απαραίτητη για την εξακρίβωση του μήκους των αλληλουχιών είναι η χρήση μάρτυρα μοριακού βάρους με διαφορά αλληλουχιών 100bp και με εύρος από τα 100bp έως τα 1000bp. Στην *Εικόνα 4.4* φαίνονται τα αποτελέσματα της πέψης για την αλληλουχία sh2RNA και sh4RNA RECUR1 από δύο βακτηριακούς κλώνους αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, είναι εμφανές πώς όλοι οι

κλώνοι είναι θετικοί και περιέχουν την επιθυμητή αλληλουχία.

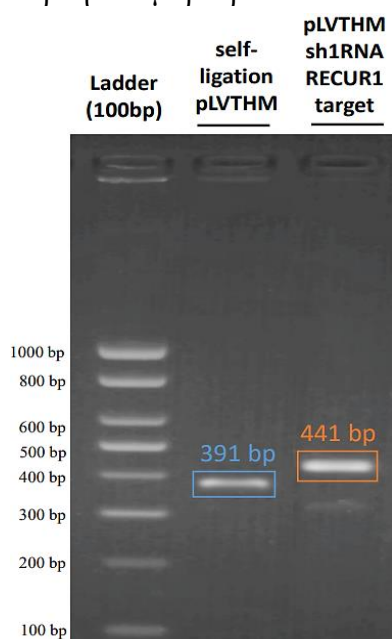


Εικόνα 4.4: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων διαγνωστικής πέψης του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM από mini preparation, με ένθεμα είτε το sh2RNA RECUR1, είτε το sh4RNA RECUR1, είτε απουσία ενθέματος (self-ligation) από μετασχηματισμένα βακτήρια E.coli, του στελέχους Stb13.

2) Επιβεβαίωση ένθεσης shRNA RECUR1 target στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM μέσω διαγνωστικής PCR

Αντίστοιχα, δημιουργήθηκε shRNA, το οποίο ονομάστηκε sh1RNA, έναντι του RECUR1 target με στόχο να συγκριθούν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων στην περίπτωση απευθείας σίγησης του, με την έμμεση σίγηση, εξαιτίας της σίγησης του RECUR1. Για την επιβεβαίωση των θετικών κλώνων πραγματοποιήθηκε, εναλλακτικά, διαγνωστική PCR, όπως αναλύθηκε στις μεθόδους, με την χρήση των εκκινητών H1 και SP6. Οι εκκινητές αυτοί ενισχύουν εκατέρωθεν της περιοχής ένθεσης της αλληλουχίας για την παραγωγή του sh1RNA RECUR1 target.

Επεξηγώντας, τα 50μl της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%, χρησιμοποιώντας 10μl χρωστικής για την φόρτωση (loading diy). Η πυκνότητα της πηκτής επιλέχθηκε διότι παρατηρείται διαφορά 50bp μεταξύ θετικών και αρνητικών βακτηριακών κλώνων. Ειδικότερα, στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας, προκύπτει ως προϊόν ένα τμήμα DNA με μήκος 441bp (στην [Εικόνα 4.5](#) εντός πορτοκαλί πλαισίου), ενώ απουσία ενθέματος το προϊόν έχει μήκος 391bp (στην [Εικόνα 4.5](#), εντός μπλε πλαισίου) όμοια με τον αρνητικό μάρτυρα. Απαραίτητη για την εξακρίβωση του μήκους των αλληλουχιών είναι η χρήση μάρτυρα μοριακού βάρους με διαφορά αλληλουχιών 100bp και με εύρος από τα 100bp έως τα 1000bp. Στην [Εικόνα 4.5](#) φαίνονται τα αποτελέσματα της διαγνωστικής PCR ενός βακτηριακού κλώνου, ο οποίος αποδεικνύεται ότι φέρει την επιθυμητή αλληλουχία, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τον αρνητικό μάρτυρα.



Εικόνα 4.5: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης της διαγνωστικής PCR (με σημαίνων εκκινητή τον H1: 5'TCGCTATGTGTTCTGGGAAA 3' και αντισημαίνων εκκινητή τον SP6: 5'ATTAGGTGACACTATAG 3') από την ενίσχυση του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM, με ένθεμα είτε το sh1RNA RECUR1 target, είτε απουσία ενθέματος (self-ligation) από μετασχηματισμένα βακτήρια E.coli, του στελέχους Stb13.

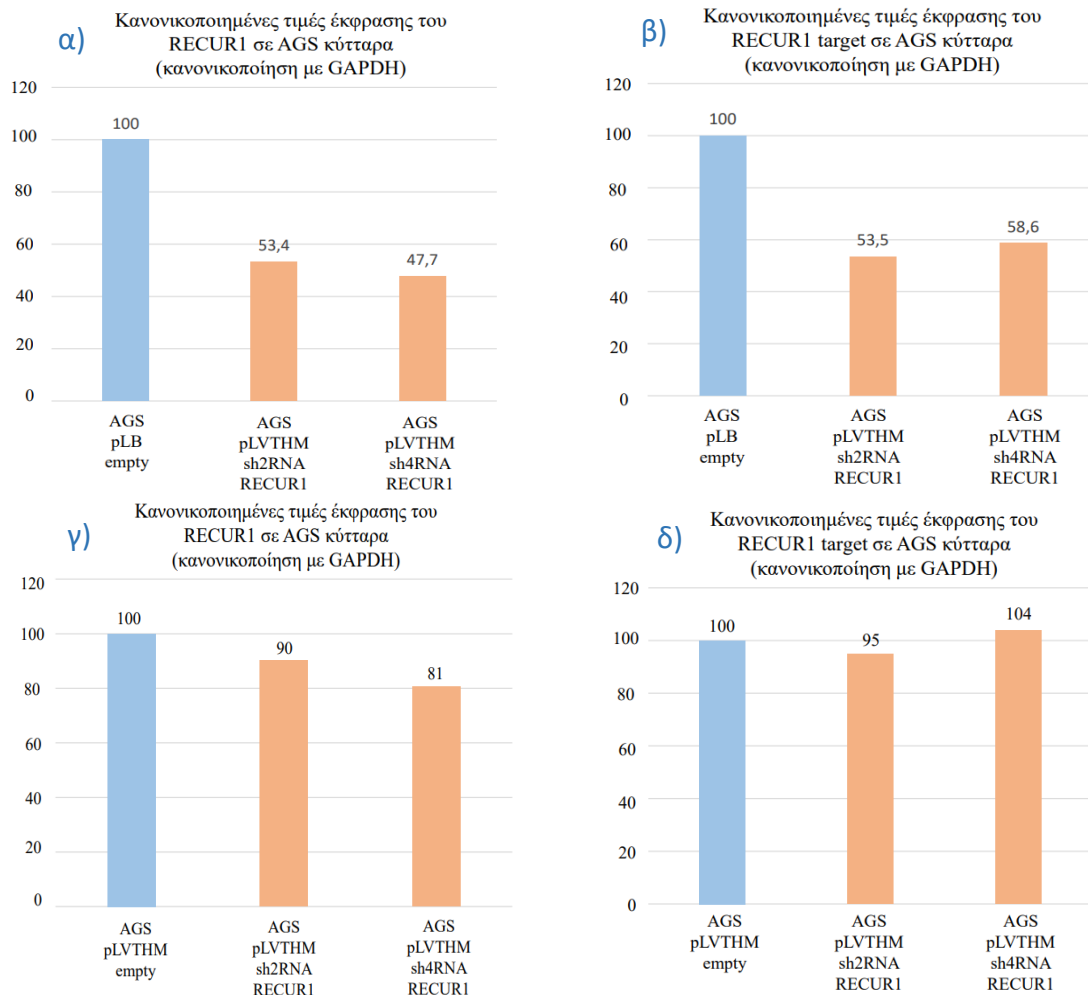
3) Επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων RECUR1 και RECUR1 target σε κυτταρική σειρά γαστρικού αδενοκαρκινώματος

Οι κατασκευές του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM με shRNA αλληλουχίες, οι οποίες αναλύθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, εισήχθησαν στην κυτταρική σειρά του ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος, AGS. Ειδικότερα, η εισαγωγή των κατασκευών στα AGS κύτταρα πραγματοποιήθηκε μέσω λεντιών δεύτερης γενιάς, οι οποίοι παράχθηκαν σε επιθηλιακά κύτταρα HEK. Τα αποτελέσματα της παροδικής σίγησης των μεταγράφων του RECUR1 και RECUR1 target ποσοτικοποιήθηκαν μέσω qPCR, χρησιμοποιώντας RNA δείγματα των AGS κυττάρων, τα οποία επεξεργάστηκαν με DNAση και μετατράπηκαν σε cDNA. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και RECUR1 target κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης του ιδιοσυστατού γονιδίου GAPDH.

Τα αποτελέσματα της παροδικής σίγησης των μεταγράφων του RECUR1, μέσω των sh2RNA και sh4RNA RECUR1. Σύμφωνα με την *Εικόνα 4.6 α)* η έκφραση του RECUR1 μειώθηκε κατά 46,6% με το sh2RNA RECUR1 και 52,3% με το sh4RNA RECUR1, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (pLB empty). Συγχρόνως, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 target, εξαιτίας της παροδικής σίγησης των μεταγράφων του RECUR1, μέσω των sh2RNA και sh4RNA RECUR1 (*Εικόνα 4.6 β)*). Σύμφωνα με την *Εικόνα 4.6 β)* η έκφραση του RECUR1 target μειώθηκε κατά 46,5%, εξαιτίας της παροδικής σίγησης του RECUR1 με το sh2RNA RECUR1 και 41,4% , εξαιτίας της παροδικής σίγησης του RECUR1 με το sh4RNA RECUR1, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (pLB empty).

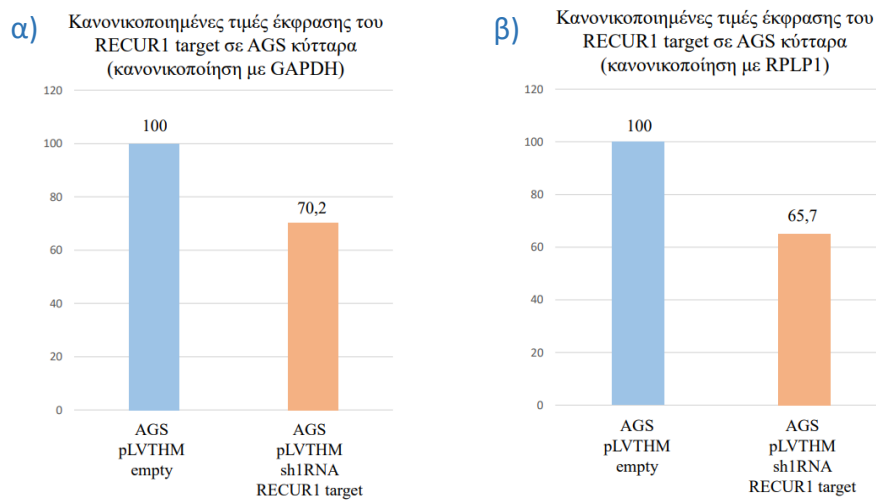
Αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 4.6 γ)* η έκφραση του RECUR1 μειώθηκε κατά 10% με το sh2RNA RECUR1 και 19% με το sh4RNA RECUR1, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (pLVTHM empty). Ωστόσο, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 4.6 δ)* δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του RECUR1 target, σε σύγκριση με τον αντίστοιχο αρνητικό μάρτυρα (pLVTHM empty).

Οι κατασκευές του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM με shRNA αλληλουχίες εισήχθησαν και στην κυτταρική σειρά του ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος, NUGC4, στην οποία δεν παρατηρήθηκε σίγηση.



Εικόνα 4.6: Διαγράμματα κανονικοποιημένων τιμών έκφρασης του: α) RECUR1 και β) RECUR1 target, με αρνητικό μάρτυρα τον κενό πλασμιδιακό φορέα pLB και του γ) RECUR1 και δ) RECUR1 target, με αρνητικό μάρτυρα τον κενό πλασμιδιακό φορέα pLVTHM. Οι κατασκευές εισήχθησαν σε κύτταρα AGS, ύστερα από την παροδική σίγηση με τον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM και ένθεμα το sh2RNA RECUR1 ή το sh4RNA RECUR1. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης του ιδιοσυστατου γονιδίου GAPDH.

Προχωρώντας, τα αποτελέσματα της παροδικής σίγησης των μεταγράφων του RECUR1 target, μέσω του sh1RNA RECUR1 target φαίνονται στην *Εικόνα 4.7*. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο κενός πλασμιδιακός φορέας pLVTHM. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 target κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης των ιδιοσυστατων γονιδίων GAPDH (*Εικόνα 4.7 α*) και RPLP1(*Εικόνα 4.7 β*). Σύμφωνα με την *Εικόνα 4.7 α*) η έκφραση του RECUR1 target μειώθηκε κατά 29,8%, ενώ σύμφωνα με την *Εικόνα 4.7 β*) η έκφραση του RECUR1 target μειώθηκε κατά 34,3 %, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (pLVTHM empty).



Εικόνα 4.7: Διαγράμματα κανονικοποιημένων τιμών έκφρασης του RECURI1 target σε κύτταρα AGS, ύστερα από την παροδική σίγηση με τον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM και ένθεμα το sh1RNA RECURI1 target. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης του ιδιοσυστατου γονιδίου: α) GAPDH και β) RPLP1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο κενός πλασμιδιακός φορέας pLVTHM.

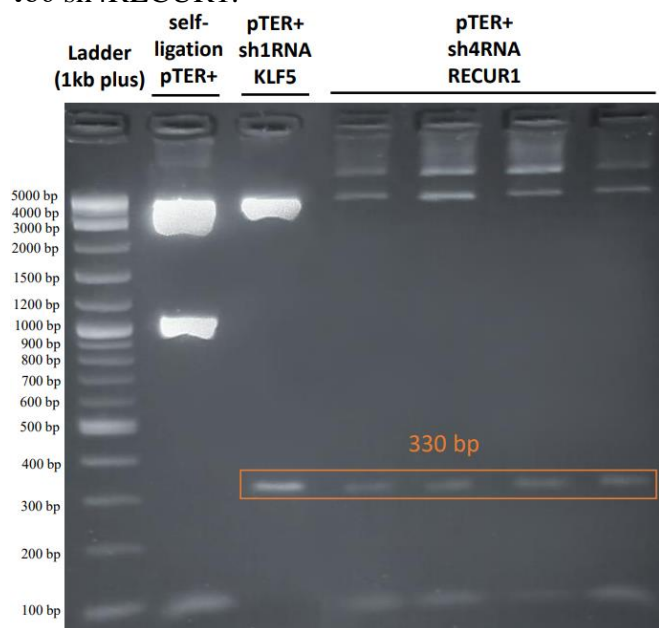
4.2.2 Σίγηση μέσω μηχανισμού παρεμβολής RNA των μεταγράφων του RECURI1 και RECURI1 target σε σταθερή καρκινική κυτταρική σειρά

Εξαιτίας της επιτυχούς παροδικής σίγησης των μεταγράφων του RECURI1 σε κυτταρικές σειρές γαστρικού αδενοκαρκινώματος, χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του sh4RNA RECURI1, με στόχο να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της σίγησης και ο φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων, στην περίπτωση σταθερής σίγησης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της αλληλουχίας του sh4RNA RECURI1 με τα αντίστοιχα συμπληρωματικά άκρα για τον πλασμιδιακό φορέα pTER+, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με τα ένζυμα περιορισμού Bgl II και Hind III.

1) Επιβεβαίωση ένθεσης shRNA RECURI1 στον πλασμιδιακό φορέα pTER+ μέσω διαγνωστικής πέψης

Πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη, το οποίο πρωτόκολλο αναλύθηκε στις μεθόδους, με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI, του οποίου η περιοχή αναγνώρισης και πέψης φαίνονται στην *Εικόνα 3.3* και στον *Πίνακα 3.2*. Επεξηγώντας, τα 50μl της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%, χρησιμοποιώντας 10μl χρωστικής για την φόρτωση (loading diy). Ειδικότερα, στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας, προκύπτει ως προϊόν ένα τμήμα DNA με μήκος 330bp (στην *Εικόνα 4.8*

εντός πορτοκαλί πλαισίου) και ο υπόλοιπος πλασμιδιακός φορέας στα 5000bp περίπου. Ωστόσο, απουσία ενθέματος προκύπτει προϊόν στα 1000bp, καθώς δεν έχει αφαιρεθεί το τμήμα μήκους 750bp από τον πλασμιδιακό φορέα εξαιτίας της πέψης με τα δύο ένζυμα περιορισμού. Επιπλέον, ως δεύτερο προϊόν παρατηρείται ο εναπομείναντας πλασμιδιακός φορέας στα 4000bp περίπου. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε έχει εύρος από 100bp έως τις 5000bp. Στην *Εικόνα 4.8* φαίνονται τα αποτελέσματα της πέψης για την αλληλουχία sh4RNA RECUR1 από τέσσερις βακτηριακούς κλώνους. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα από βακτηριακό κλώνο με τον κενό πλασμιδιακό φορέα pTER+ (self-ligation pTER+), ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα ήδη γνωστού θετικού κλώνου από παλαιότερο πείραμα (pTER+ sh1RNA KLF5). Σύμφωνα με την *Εικόνα 4.8* αποδεικνύεται πώς και οι τέσσερις προς έλεγχο βακτηριακοί κλώνοι είναι θετικοί, περιέχοντας την αλληλουχία για την παραγωγή του sh4RECUR1.

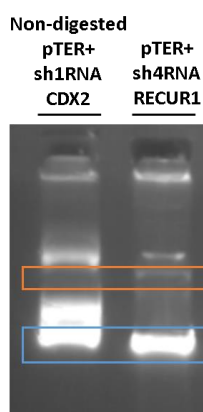


Εικόνα 4.8: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης διαγνωστικής πέψης με το ένζυμο EcoRI-HF του πλασμιδιακού φορέα pTER+ με ένθεμα το sh4RECUR1 από μετασχηματισμένα βακτήρια E.coli του στελέχους DH5a.

2) Γραμμικοποίηση πλασμιδιακού φορέα pTER+ μέσω ενζύμου περιορισμού

Για την εισαγωγή της κατασκευής pTER+ sh4RNA RECUR1 σε καρκινικά κύτταρα και τη μελλοντική δημιουργία σταθερών καρκινικών κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε γραμμικοποίηση του πλασμιδιακού φορέα pTER+, μέσω του ενζύμου περιορισμού ScaI για 5 ώρες. Συγκεκριμένα, η γραμμικοποίηση πραγματοποιείται προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα ένθεσης του πλασμιδιακού φορέα στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων. Το πρωτόκολλο για τη πραγματοποίηση της πέψης αναλύεται στις μεθόδους της πτυχιακής. Στην *Εικόνα 4.9* παρατηρείται η ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της προαναφερθείσας πέψης στις 4 ώρες. Ως αρνητικός μάρτυρας

χρησιμοποιήθηκε δείγμα, από παλαιότερο πείραμα, του πλασμιδιακού φορέα pTER+ , το οποίο δεν έχει υποστεί πέψη με κάποιο ένζυμο περιορισμού (Non-digested pTER+ sh1CDX2). Συγκεκριμένα, στον αρνητικό μάρτυρα παρατηρούνται και οι τρεις πιθανές διαμορφώσεις του πλασμιδιακού φορέα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, το μεγαλύτερο ποσοστό του δείγματος pTER+ sh4RNA RECUR1 είναι σε γραμμική μορφή, όπως φαίνεται στο μπλε πλαίσιο.



Εικόνα 4.9: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης της πέψης, με το ένζυμο ScaI, του πλασμιδιακού φορέα pTER+ με ένθεμα το sh4RECUR1, με στόχο τη γραμμικοποίησή του. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε παλαιότερο δείγμα, το οποίο δεν έχει υποστεί πέψη με κάποιο ένζυμο περιορισμού (Non-digested pTER+ sh1CDX2). Η γραμμική μορφή των δειγμάτων βρίσκεται εντός του μπλε πλαισίου.

4.2.3 Σταθερή σίγηση μέσω CRISPR knockout μηχανισμού του γονιδίου του RECUR1 και του RECUR1 target

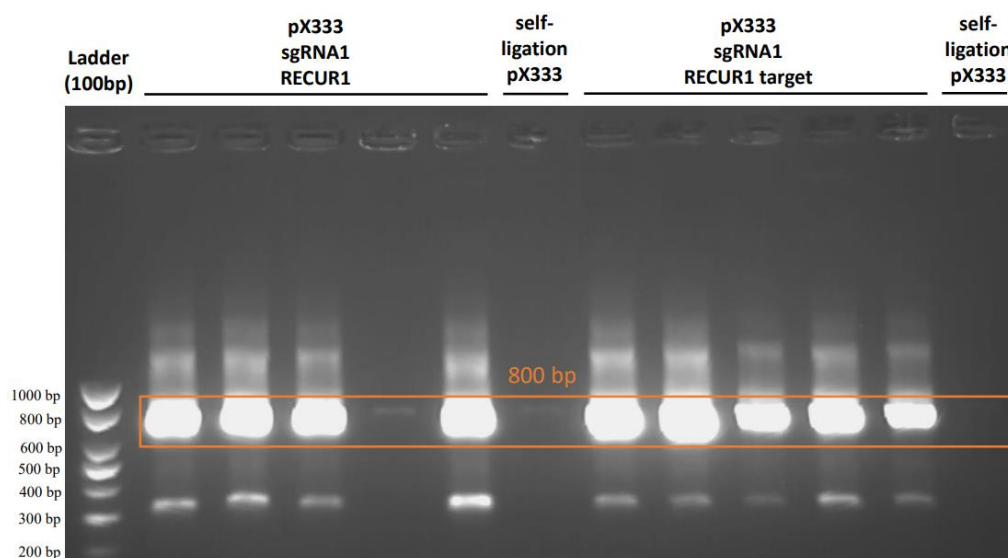
Παράλληλα, δημιουργήθηκε κατασκευή για τη μελλοντική σταθερή σίγηση των γονιδίων του RECUR1 και RECUR1 target, μέσω CRISPR knockout μηχανισμού, σε κυτταρικές σειρές γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν δύο sgRNA τα οποία στοχεύουν τον υποκινητή του γονιδίου το RECUR1 (sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1). Αντίστοιχα, σχεδιάστηκαν δύο sgRNA τα οποία στοχεύουν το πρώτο εξόνιο του γονιδίου το RECUR1 target (sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1 target). Η εισαγωγή των προαναφερθέντων αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pX333, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BbsI για την εισαγωγή του εκάστοτε sgRNA1.

1) Επιβεβαίωση ένθεσης των sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1 και sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1 target στον πλασμιδιακό φορέα pX333, μέσω διαγνωστικής PCR

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης των sgRNA1 και sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα pX333 στους βακτηριακούς κλώνους, πραγματοποιήθηκαν τρεις διαγνωστικές PCR.

Η πρώτη διαγνωστική PCR διεξήχθη προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ένθεση του εκάστοτε sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα pX333 αντίστοιχα για τις δύο κατασκευές.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ως εκκινήτης η σημαίνουσα αλληλουχία του sgRNA1 (sense sgRNA1) με προσανατολισμό 5' προς 3' και η σημαίνουσα αλληλουχία του εκκινήτη All-in-one, ο οποίος υβριδίζει καθοδικά του σημείου ένθεσης, στην αντισημαίνουσα αλυσίδα με προσανατολισμό 3' προς 5', στον πλασμιδιακό φορέα pX333. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης φαίνεται στην *Εικόνα 4.10*. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της διαγνωστικής PCR, σε πηκτή αγαρόζης 1%, χρησιμοποιώντας 10μl χρωστικής για την φόρτωση (loading diy). Στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης, προκύπτει προϊόν στα 800bp (στην *Εικόνα 4.10* εντός πορτοκαλί πλαισίου), ενώ απουσία ενθέματος δεν προκύπτει κάποιο προϊόν. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ένα δείγμα από βακτηριακό κλώνο, ο οποίος περιέχει τον κενό πλασμιδιακό φορέα pX333 (self-ligation pX333). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της *Εικόνας 4.10*, οι θετικοί κλώνοι για το sgRNA1 RECUR1 είναι οι 1-3 και 5, ενώ για το sgRNA1 RECUR1 target όλοι οι βακτηριακοί κλώνοι είναι θετικοί.

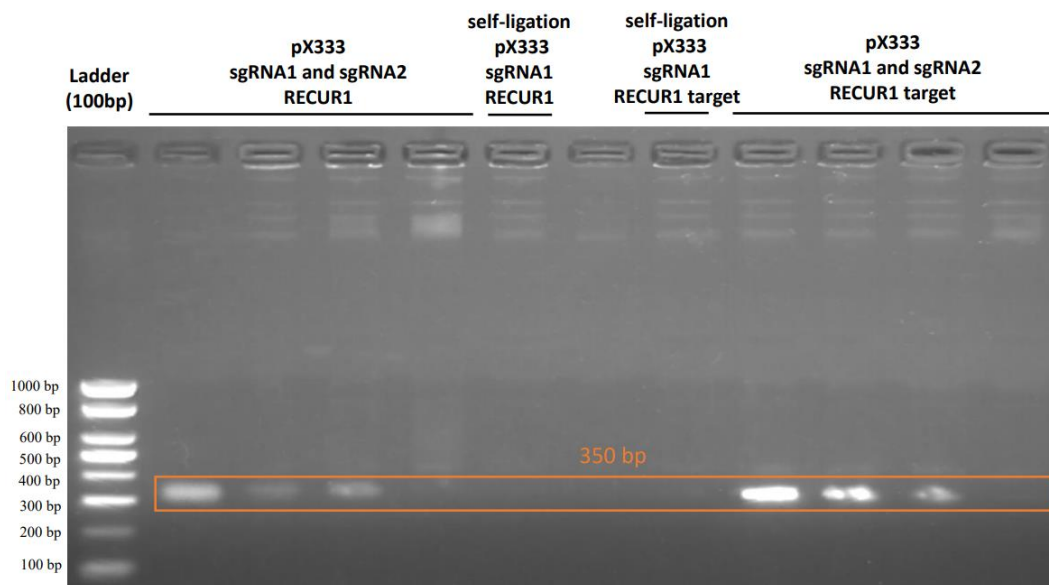


Εικόνα 4.10: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων από την πρώτη διαγνωστική PCR του πλασμιδιακού φορέα pX333, με ένθεμα είτε το sgRNA1 RECUR1, είτε το sgRNA1 RECUR1 target, είτε απουσία ενθέματος (self-ligation)

Από αυτά τα δείγματα επιλέχθηκε ένα θετικό δείγμα για το RECUR1 και ένα θετικό δείγμα για το RECUR1 target. Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BsaI για 5 ώρες και υποβλήθηκαν σε αντίδραση λιγάσης για την ένθεση και των αντίστοιχων sgRNA2.

Η δεύτερη διαγνωστική PCR πραγματοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί αντίστοιχα η ένθεση των sgRNA2. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ως εκκινήτης η

σημαίνουσα αλληλουχία του sgRNA2 (sense sgRNA2) με προσανατολισμό 5' προς 3' και η σημαίνουσα αλληλουχία του εκκινητή All-in-one, ο οποίος υβριδίζει καθοδικά του σημείου ένθεσης, στην αντισημαίνουσα αλυσίδα με προσανατολισμό 3' προς 5', στον πλασμιδιακό φορέα pX333. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της διαγνωστικής PCR, σε πηκτική αгарόζης 1%. Στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης, προκύπτει προϊόν στα 350bp (στην *Εικόνα 4.11* εντός πορτοκαλί πλαισίου), ενώ απουσία ενθέματος δεν προκύπτει κάποιο προϊόν. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ένα δείγμα από βακτηριακό κλώνο, ο οποίος περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα pX333 και το αντίστοιχο sgRNA1 (self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 και self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 target). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της *Εικόνας 4.11*, οι τρεις πρώτοι βακτηριακοί κλώνοι, για την κάθε κατασκευή, περιέχουν την αλληλουχία του αντίστοιχου sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα pX333.

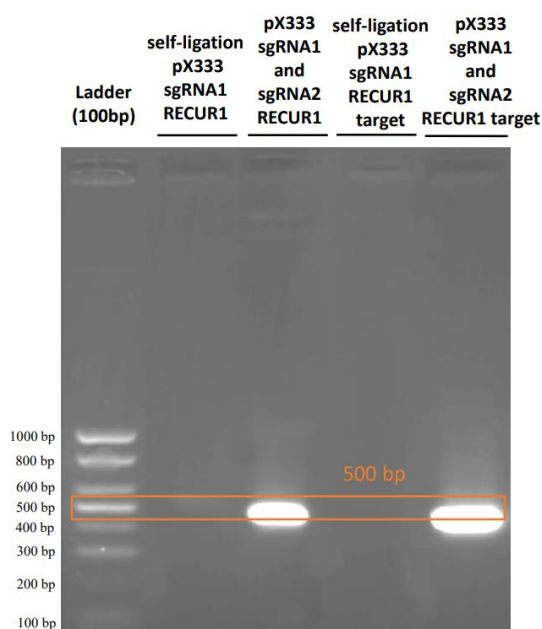


Εικόνα 4.11: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων από τη δεύτερη διαγνωστική PCR του πλασμιδιακού φορέα pX333, με ένθεμα είτε το sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1, είτε το sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1 target, είτε απουσία ενθέματος (self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 και self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 target)

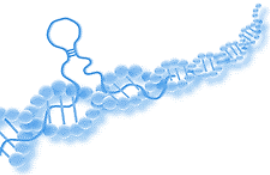
Από αυτά τα δείγματα επιλέχθηκε ένα θετικό δείγμα για το RECUR1 και ένα θετικό δείγμα για το RECUR1 target για τη διεξαγωγή της τρίτης διαγνωστικής PCR.

Η τρίτη διαγνωστική PCR πραγματοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ταυτόχρονη ένθεση των sgRNA1 και 2 για την κάθε κατασκευή. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν η σημαίνουσα αλληλουχία του sgRNA1 (sense sgRNA1) με

προσανατολισμό 5' προς 3' και η αντισημαινόμενη αλληλουχία του sgRNA2 (antisense sgRNA2) με προσανατολισμό 3' προς 5', στον πλασμιδιακό φορέα pX333. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της διαγνωστικής PCR, σε πηκτική αгарόζης 1%. Στην περίπτωση επιτυχούς ένθεσης, προκύπτει προϊόν στα 500bp (στην *Εικόνα 4.12* εντός πορτοκαλί πλαισίου), ενώ απουσία ένθεσης δεν προκύπτει προϊόν. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ένα δείγμα από βακτηριακό κλώνο, ο οποίος περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα pX333 και το αντίστοιχο sgRNA1 (self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 και self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 target). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της *Εικόνας 4.12*, οι βακτηριακοί κλώνοι που επιλέχθηκαν περιέχουν, για την κάθε κατασκευή, ταυτόχρονα την αλληλουχία sgRNA1 και του αντίστοιχου sgRNA2, στον πλασμιδιακό φορέα pX333.

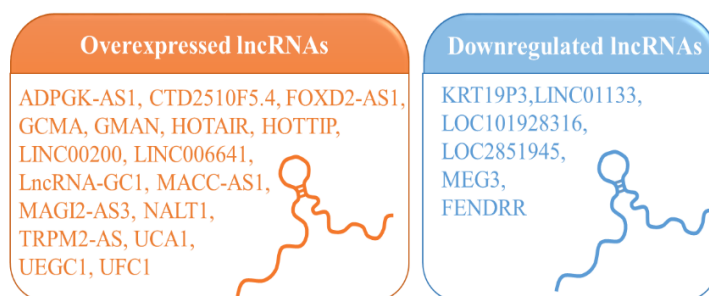


Εικόνα 4.12: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων από την τρίτη διαγνωστική PCR του πλασμιδιακού φορέα pX333, με ένθεμα είτε το sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1, είτε το sgRNA1 και sgRNA2 RECUR1 target, είτε απουσία ενθέματος (self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 και self-ligation pX333 sgRNA1 RECUR1 target)



5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν και στην εισαγωγή της παρούσας πτυχιακής, γίνεται κατανοητή η αναγκαιότητα εύρεσης διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων, στα πλαίσια αντιμετώπισης του γαστρικού καρκίνου. Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων, μπορούν να αξιοποιηθούν – ως εξειδικευμένα μοριακά εργαλεία – τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA, καθώς συμμετέχουν στην ανάπτυξη, στην ανθεκτικότητα σε θεραπείες και στην μετάσταση των πρωτογενών όγκων, τροποποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια σε επιγενετικό, μεταγραφικό, αλλά και μεταφραστικό επίπεδο. Στην *Εικόνα 5.1* αναγράφονται τα lncRNAs, των οποίων η έκφραση απορρυθμίζεται και έχει συσχετιστεί με τον γαστρικό καρκίνο [110]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ως διαγνωστικοί δείκτες προτείνονται τα lncRNA H19, HOTAIR, MALAT1, GAPLINC, ANRIL, FENDRR, UCA1 [111].



Εικόνα 5.1: LncRNA των οποίων η έκφραση ενισχύεται (πορτοκαλί πλαίσιο) ή καταστέλλεται (μπλε πλαίσιο) στο γαστρικό καρκίνο. Τροποποιημένο από [110].

Πιο αναλυτικά, στον γαστρικό καρκίνο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το lncRNA HOTAIR, το οποίο κωδικοποιείται από τη γονιδιωματική περιοχή HOXC [112]. Η υπερέκφρασή του επάγει τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων σε γειτονικούς λεμφαδένες, το οποίο συνδέεται με κακή πρόγνωση για τον ασθενή. Συγκεκριμένα, το HOTAIR, μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, ενισχύει την έκφραση γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην εναλλαγή των καρκινικών κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά και το αντίστροφο, ενώ παράλληλα επάγει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεασών MMP1, MMP3 [113]. Ακόμη, αναστέλλει την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μεταφέροντας ως lncRNA-οδηγός το σύμπλοκο PCR2, το οποίο υπερμεθυλιώνει την ιστόνη 3 (H3K27me3) [114]. Το lncRNA MALAT-1, αποτελεί ένα ακόμη lncRNA, το οποίο υπερεκφράζεται στον γαστρικό καρκίνο και επάγει την αγγειογένεση ή το αγγειακό μιμητισμό, δηλαδή τη δημιουργία αγγείων από καρκινικά κύτταρα, διευκολύνοντας τη λεμφική διήθηση των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων. Τα παραπάνω επιτυγχάνονται μέσω της β κατενίνης, η οποία επιδρά σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι ERK/MMP και FAK/paxillin [115]. Επιπλέον, το MALAT1

στον γαστρικό καρκίνο, μπορεί να δράσει και ως lncRNA-σπόγγος για το miRNA-23b-3p, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στην αυτοφαγία και στις χημειοθεραπείες [116]. Ομοίως, το lncRNA PVT1 συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπείες [117].

Σημαντική κρίνεται και η καταστολή της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων στο γαστρικό καρκίνο. Η απενεργοποίηση του lncRNA FENDRR, στον γαστρικό καρκίνο, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεασών MMP2 και MMP9, αλλά και της φимπρονεκτίνης 1, συμβάλλοντας στη λεμφική διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [118]. Παράλληλα, εξαιτίας της απενεργοποίησης του FENDRR, μειώνεται η έκφραση των γονιδίων TET2 (tet methylcytosine dioxygenase 2) και RASSF1A (Ras association domain family protein 1 isoform A), με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης και την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [119]. Επιπλέον, το γονίδιο του lncRNA MEG3 είναι υπερμεθυλιωμένο στον γαστρικό καρκίνο. Κατά συνέπεια, το ογκοεπαγωγικό miRNA-181a επάγει την υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2 [120].

Ωστόσο, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθεί ότι, η μόλυνση από: 1) το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Helicobacter pylori*, στο οποίο αναλογούν το 90% των παγκόσμιων περιστατικών γαστρικού καρκίνου και 2) τον ιό *Epstein-Barr* (EBV), τροποποιεί τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA στο γαστρικό καρκίνο [121-123].

Ως αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας επιλέχθηκε το lncRNA RECUR1, το οποίο υπερεκφράζεται στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Απώτερος στόχος αποτελεί η διερεύνηση της δράσης του και η συσχέτισή του με το ογκογονίδιο (RECUR1 target), το οποίο βρίσκεται στην ίδια τοπολογικά σχετιζόμενη περιοχή.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν βιοπληροφορικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων GEPIA. Στην [Εικόνα 4.1](#) φανερώνεται η θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του RECUR1 με το RECUR1 target στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, αποτελώντας την πρώτη ένδειξη ότι το RECUR1 ελέγχει την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου στόχου.

Όπως αναλύθηκε και στην [Ενότητα 4.1](#) το RECUR1 target ενδείκνυται ως διαγνωστικός δείκτης για τον γαστρικό καρκίνο ([Εικόνα 4.2](#) και [Εικόνα 4.3 α](#)), χωρίς ωστόσο να συσχετίζεται σημαντικά με την ολική επιβίωση ([Εικόνα 4.3 β](#)). Το γεγονός αυτό δεν αναιρεί το κλινικό ενδιαφέρον του συγκεκριμένου γονιδίου, καθώς η συνολική

επιβίωση των ασθενών αποτελεί πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Κατά συνέπεια, η συνολική επιβίωση επηρεάζεται από πολλές κλινικές παραμέτρους όπως η επανεμφάνιση του όγκου, η ταχύτητα εξέλιξης της νόσου, η διαφοροποίηση και σταδιοποίηση της νεοπλασίας, συνεπώς η αξιολόγηση του προγνωστικού δυναμικού του RECUR1 θα πρέπει να διευρυνθεί ώστε να συμπεριλάβει όλες αυτές τις παραμέτρους.

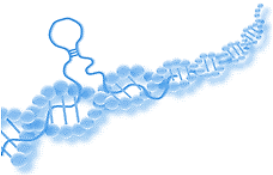
Στην συνέχεια, η δράση του RECUR1 εξετάστηκε και σε πειραματικό επίπεδο, μέσω παροδικής σίγησης. Όπως αναλύθηκε και στην [Ενότητα 3.1.3](#) η γενετική τροποποίηση της ανθρώπινης καρκινικής κυτταρικής σειράς AGS πραγματοποιήθηκε με την χρήση λεντιών. Ειδικότερα, οι λεντιοί έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM, στον οποίο είχε προηγηθεί η ένθεση της αλληλουχία του anti-RECUR1 ή του anti-RECUR1 target shRNA.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qPCR, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι το ποσοστό σίγησης του RECUR1 target ήταν όμοιο με το ποσοστό σίγησης της έκφρασης του RECUR1 ([Εικόνα 4.6](#)). Υπενθυμίζοντας, με τη χρήση του κενού πλασμιδιακού φορέα pLB ως αρνητικό μάρτυρα, επετεύχθη 50% σίγηση της έκφρασης του RECUR1, με τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 target να εμφανίζει, αντίστοιχα, 47% σίγηση ([Εικόνα 4.6 α και β](#)). Ομοίως, με τη χρήση του κενού πλασμιδιακού φορέα pLVTHM ως αρνητικό μάρτυρα, η μείωση των επιπέδων έκφρασης του RECUR1 κατά 10%, είχε ως αποτέλεσμα τη σίγηση της έκφρασης του RECUR1 target κατά 5% ([Εικόνα 4.6 γ και δ](#)). Από τα παραπάνω δεδομένα, γίνεται κατανοητό ότι η σίγηση του RECUR1 target σχετίζεται απόλυτα με την αποτελεσματικότητα της σίγησης του RECUR1. Συνεπώς, αποδεικνύεται και πειραματικά ότι το RECUR1 πράγματι ελέγχει την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου στόχου, RECUR1 target.

Προεκτείνοντας, όπως έχει ήδη αναλυθεί σε παλαιότερη πτυχιακή εργασία, το RECUR1 δρα στον πυρήνα αλληλεπιδρώντας με την χρωματίνη, ενώ παράλληλα εμφανίζει υψηλή σταθερότητα, ιδιότητα που σε μοριακό επίπεδο μπορεί να συσχετιστεί με την δημιουργία ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (scaffold lncRNA). Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα και της παρούσας πτυχιακής, ενισχύεται ο ρόλος του RECUR1 ως *cis*-δραστικό lncRNA, ελέγχοντας θετικά την έκφραση του γειτονικού του κωδικοποιητικού στόχου.

Εν όψει των παραπάνω, αναμένεται μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν οι κατασκευές σταθερής σίγησης, οι οποίες δημιουργήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας

πτυχιακής, προκειμένου να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της σίγησης του RECUR1 και του RECUR1 target και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των καρκινικών σειρών του γαστρικού αδενοκαρκινώματος.



6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer statistics for the year 2020: An overview*. Int J Cancer, 2021.
3. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
4. Zhu, J., et al., *[Progress on screening for gastric cancer]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2020. **42**(7): p. 603-608.
5. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications*. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
6. Arnold, M., et al., *Is gastric cancer becoming a rare disease? A global assessment of predicted incidence trends to 2035*. Gut, 2020. **69**(5): p. 823-829.
7. Chia, N.Y. and P. Tan, *Molecular classification of gastric cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(5): p. 763-9.
8. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
9. Dunmire, S.K., K.A. Hogquist, and H.H. Balfour, *Infectious Mononucleosis*. Curr Top Microbiol Immunol, 2015. **390**(Pt 1): p. 211-40.
10. Shinozaki-Ushiku, A., A. Kunita, and M. Fukayama, *Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review)*. Int J Oncol, 2015. **46**(4): p. 1421-34.
11. Camargo, M.C., et al., *Anti-Helicobacter pylori Antibody Profiles in Epstein-Barr virus (EBV)-Positive and EBV-Negative Gastric Cancer*. Helicobacter, 2016. **21**(2): p. 153-7.
12. Xu, M., et al., *Genome sequencing analysis identifies Epstein-Barr virus subtypes associated with high risk of nasopharyngeal carcinoma*. Nat Genet, 2019. **51**(7): p. 1131-1136.
13. Sun, K., et al., *EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 583463.
14. Zhao, J., et al., *Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells*. Cancer, 2013. **119**(2): p. 304-12.
15. Gasenko, E., et al., *Clinicopathological characteristics of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer in Latvia*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2019. **31**(11): p. 1328-1333.
16. Sakata, K., et al., *Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability*. Br J Cancer, 2002. **86**(4): p. 564-7.
17. Baretta, M. and D.T. Le, *DNA mismatch repair in cancer*. Pharmacol Ther, 2018. **189**: p. 45-62.
18. Puliga, E., et al., *Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows*. Cancer Treat Rev, 2021. **95**: p. 102175.
19. Ling, Y., et al., *Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer*. Comput Struct Biotechnol J, 2020. **18**: p. 3301-3308.
20. Richards, F.M., et al., *Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(4): p. 607-10.
21. Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros, *Wnt signaling in cancer*. Oncogene, 2017. **36**(11): p. 1461-1473.
22. Aznar, S., et al., *Simultaneous tyrosine and serine phosphorylation of STAT3 transcription factor is involved in Rho A GTPase oncogenic transformation*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(10): p. 3282-94.
23. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology*. Neoplasia, 2017. **19**(5): p. 412-420.
24. Garattini, S.K., et al., *Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications*. World J Gastrointest Oncol, 2017. **9**(5): p. 194-208.

25. *Gastric Cancer Treatment (PDQ(R)): Patient Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002: Bethesda (MD).
26. Im, W.J., et al., *Tumor size as a prognostic factor in gastric cancer patient*. *J Gastric Cancer*, 2012. **12**(3): p. 164-72.
27. Tavakoli, F., et al., *Gastric Cancer Diagnosis: From Imaging Techniques to Biochemical Biomarkers*. *Curr Mol Med*, 2021. **21**(5): p. 355-375.
28. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(suppl 5): p. v38-v49.
29. de Mello, R.A., et al., *Current and potential biomarkers in gastric cancer: a critical review of the literature*. *Future Oncol*, 2021. **17**(25): p. 3383-3396.
30. Song, Z., et al., *Progress in the treatment of advanced gastric cancer*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(7): p. 1010428317714626.
31. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 57-74.
32. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 101-8.
33. Zhang, P., et al., *Non-Coding RNAs and their Integrated Networks*. *J Integr Bioinform*, 2019. **16**(3).
34. Wen, Y., et al., *Roles of long noncoding RNAs in bacterial infection*. *Life Sci*, 2020. **263**: p. 118579.
35. Wang, Z., Y. Zhao, and Y. Zhang, *Viral lncRNA: A regulatory molecule for controlling virus life cycle*. *Noncoding RNA Res*, 2017. **2**(1): p. 38-44.
36. Szczesniak, M.W., et al., *Comparative genomics in the search for conserved long noncoding RNAs*. *Essays Biochem*, 2021. **65**(4): p. 741-749.
37. Fang, S., et al., *NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(D1): p. D308-D314.
38. Wu, H., L. Yang, and L.L. Chen, *The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation*. *Trends Genet*, 2017. **33**(8): p. 540-552.
39. Schlackow, M., et al., *Distinctive Patterns of Transcription and RNA Processing for Human lincRNAs*. *Mol Cell*, 2017. **65**(1): p. 25-38.
40. Mele, M., et al., *Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs*. *Genome Res*, 2017. **27**(1): p. 27-37.
41. Zuckerman, B. and I. Ulitsky, *Predictive models of subcellular localization of long RNAs*. *RNA*, 2019. **25**(5): p. 557-572.
42. Dahariya, S., et al., *Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells*. *Mol Immunol*, 2019. **112**: p. 82-92.
43. Xing, J., et al., *LncRNA-Encoded Peptide: Functions and Predicting Methods*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 622294.
44. Stein, C.S., et al., *Mitoregulin: A lncRNA-Encoded Microprotein that Supports Mitochondrial Supercomplexes and Respiratory Efficiency*. *Cell Rep*, 2018. **23**(13): p. 3710-3720 e8.
45. Spencer, H.L., et al., *The LINC00961 transcript and its encoded micropeptide, small regulatory polypeptide of amino acid response, regulate endothelial cell function*. *Cardiovasc Res*, 2020. **116**(12): p. 1981-1994.
46. D'Lima, N.G., et al., *A human microprotein that interacts with the mRNA decapping complex*. *Nat Chem Biol*, 2017. **13**(2): p. 174-180.
47. Magistri, M., et al., *Regulation of chromatin structure by long noncoding RNAs: focus on natural antisense transcripts*. *Trends Genet*, 2012. **28**(8): p. 389-96.
48. Gonzalez, I., et al., *A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature*. *Nat Struct Mol Biol*, 2015. **22**(5): p. 370-6.

49. Toki, N., et al., *SINEUP long non-coding RNA acts via PTBP1 and HNRNPK to promote translational initiation assemblies*. *Nucleic Acids Res*, 2020. **48**(20): p. 11626-11644.
50. Lepoivre, C., et al., *Divergent transcription is associated with promoters of transcriptional regulators*. *BMC Genomics*, 2013. **14**: p. 914.
51. Hamazaki, N., et al., *Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development*. *Development*, 2015. **142**(5): p. 910-20.
52. Zhang, Y., et al., *Circular intronic long noncoding RNAs*. *Mol Cell*, 2013. **51**(6): p. 792-806.
53. Yin, Q.F., et al., *Long noncoding RNAs with snoRNA ends*. *Mol Cell*, 2012. **48**(2): p. 219-30.
54. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. *Nature*, 2009. **458**(7235): p. 223-7.
55. Wong, X., T.H. Loo, and C.L. Stewart, *LINC complex regulation of genome organization and function*. *Curr Opin Genet Dev*, 2021. **67**: p. 130-141.
56. Huarte, M., et al., *A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response*. *Cell*, 2010. **142**(3): p. 409-19.
57. Guttman, M. and J.L. Rinn, *Modular regulatory principles of large non-coding RNAs*. *Nature*, 2012. **482**(7385): p. 339-46.
58. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCcation: lncRNA localization and function*. *J Cell Biol*, 2021. **220**(2).
59. Benhalevy, D., D.G. Anastasakis, and M. Hafner, *Proximity-CLIP provides a snapshot of protein-occupied RNA elements in subcellular compartments*. *Nat Methods*, 2018. **15**(12): p. 1074-1082.
60. Ayupe, A.C., et al., *Global analysis of biogenesis, stability and sub-cellular localization of lncRNAs mapping to intragenic regions of the human genome*. *RNA Biol*, 2015. **12**(8): p. 877-92.
61. Noh, J.H., et al., *Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. **9**(3): p. e1471.
62. Zhang, P., et al., *Exosome-mediated delivery of MALAT1 induces cell proliferation in breast cancer*. *Onco Targets Ther*, 2018. **11**: p. 291-299.
63. Wang, Z., et al., *Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) constitutes a nucleoprotein component of extracellular inflammatory exosomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(46): p. E6293-300.
64. Iempridee, T., *Long non-coding RNA H19 enhances cell proliferation and anchorage-independent growth of cervical cancer cell lines*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017. **242**(2): p. 184-193.
65. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. *Mol Cell*, 2011. **43**(6): p. 904-14.
66. Cheng, J.T., et al., *Insights into Biological Role of lncRNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition*. *Cells*, 2019. **8**(10).
67. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm*. *Cancer Res*, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
68. Pontier, D.B. and J. Gribnau, *Xist regulation and function explored*. *Hum Genet*, 2011. **130**(2): p. 223-36.
69. Sun, Q., Q. Hao, and K.V. Prasanth, *Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression*. *Trends Genet*, 2018. **34**(2): p. 142-157.
70. Azzalin, C.M., et al., *Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends*. *Science*, 2007. **318**(5851): p. 798-801.
71. Porro, A., et al., *Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(20): p. 4808-17.

72. Arun, G., D. Aggarwal, and D.L. Spector, *MALAT1 Long Non-Coding RNA: Functional Implications*. *Noncoding RNA*, 2020. **6**(2).
73. Thomson, D.W. and M.E. Dinger, *Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy*. *Nat Rev Genet*, 2016. **17**(5): p. 272-83.
74. Rinn, J.L. and H.Y. Chang, *Genome regulation by long noncoding RNAs*. *Annu Rev Biochem*, 2012. **81**: p. 145-66.
75. Zhao, Y., et al., *The effects of mitochondria-associated long noncoding RNAs in cancer mitochondria: New players in an old arena*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018. **131**: p. 76-82.
76. Andric, V., et al., *A scaffold lncRNA shapes the mitosis to meiosis switch*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 770.
77. Werner, M.S. and A.J. Ruthenburg, *Nuclear Fractionation Reveals Thousands of Chromatin-Tethered Noncoding RNAs Adjacent to Active Genes*. *Cell Rep*, 2015. **12**(7): p. 1089-98.
78. Andersen, R.E., et al., *The Long Noncoding RNA Pnky Is a Trans-acting Regulator of Cortical Development In Vivo*. *Dev Cell*, 2019. **49**(4): p. 632-642 e7.
79. Hacisuleyman, E., et al., *Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre*. *Nat Struct Mol Biol*, 2014. **21**(2): p. 198-206.
80. De Santa, F., et al., *A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers*. *PLoS Biol*, 2010. **8**(5): p. e1000384.
81. Vucicevic, D., et al., *Long ncRNA expression associates with tissue-specific enhancers*. *Cell Cycle*, 2015. **14**(2): p. 253-60.
82. Ponjavic, J., et al., *Genomic and transcriptional co-localization of protein-coding and long non-coding RNA pairs in the developing brain*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(8): p. e1000617.
83. Xiang, J.F., et al., *Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus*. *Cell Res*, 2014. **24**(5): p. 513-31.
84. Fanucchi, S., et al., *Immune genes are primed for robust transcription by proximal long noncoding RNAs located in nuclear compartments*. *Nat Genet*, 2019. **51**(1): p. 138-150.
85. da Rocha, S.T. and E. Heard, *Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation*. *Nat Struct Mol Biol*, 2017. **24**(3): p. 197-204.
86. Cho, S.W., et al., *Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element*. *Cell*, 2018. **173**(6): p. 1398-1412 e22.
87. Bumgarner, S.L., et al., *Toggle involving cis-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(43): p. 18321-6.
88. Carlevaro-Fita, J., et al., *Cancer lncRNA Census reveals evidence for deep functional conservation of long noncoding RNAs in tumorigenesis*. *Commun Biol*, 2020. **3**(1): p. 56.
89. Kim, T., et al., *Role of MYC-regulated long noncoding RNAs in cell cycle regulation and tumorigenesis*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. **107**(4).
90. Baldassarre, A. and A. Masotti, *Long non-coding RNAs and p53 regulation*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(12): p. 16708-17.
91. Zhu, S., et al., *Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library*. *Nat Biotechnol*, 2016. **34**(12): p. 1279-1286.
92. Li, H., et al., *Characterization of differentially expressed genes involved in pathways associated with gastric cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0125013.
93. Zhang, L., et al., *Serum lnc34a is a potential prediction biomarker for bone metastasis in hepatocellular carcinoma patients*. *BMC Cancer*, 2021. **21**(1): p. 161.
94. Akers, J.C., et al., *Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies*. *J Neurooncol*, 2013. **113**(1): p. 1-11.
95. Dai, J., et al., *Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**(1): p. 145.

96. Du, Z., et al., *Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(7): p. 908-13.
97. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
98. Momtazmanesh, S. and N. Rezaei, *Long Non-Coding RNAs in Diagnosis, Treatment, Prognosis, and Progression of Glioma: A State-of-the-Art Review*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 712786.
99. Nandwani, A., S. Rathore, and M. Datta, *LncRNAs in cancer: Regulatory and therapeutic implications*. Cancer Lett, 2021. **501**: p. 162-171.
100. Lange, M., R. Begolli, and A. Giakountis, *Non-Coding Variants in Cancer: Mechanistic Insights and Clinical Potential for Personalized Medicine*. Noncoding RNA, 2021. **7**(3).
101. Gil, N. and I. Ulitsky, *Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs*. Nat Rev Genet, 2020. **21**(2): p. 102-117.
102. Yang, F., et al., *Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells*. FEBS J, 2012. **279**(17): p. 3159-65.
103. Renganathan, A. and E. Felley-Bosco, *Long Noncoding RNAs in Cancer and Therapeutic Potential*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1008**: p. 199-222.
104. Warner, K.D., C.E. Hajdin, and K.M. Weeks, *Principles for targeting RNA with drug-like small molecules*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(8): p. 547-558.
105. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
106. Awwad, D.A., *Beyond classic editing: innovative CRISPR approaches for functional studies of long non-coding RNA*. Biol Methods Protoc, 2019. **4**(1): p. bpz017.
107. Perez-Pinera, P., et al., *RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors*. Nat Methods, 2013. **10**(10): p. 973-6.
108. Qi, L.S., et al., *Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression*. Cell, 2013. **152**(5): p. 1173-83.
109. Wang, J., et al., *Long noncoding RNAs in gastric cancer: functions and clinical applications*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 681-97.
110. Sasahara, M., M. Kanda, and Y. Kodera, *Update on molecular biomarkers for diagnosis and prediction of prognosis and treatment responses in gastric cancer*. Histol Histopathol, 2021. **36**(8): p. 817-832.
111. Fattahi, S., et al., *LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: A novel approach to personalized medicine*. J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3189-3206.
112. Rinn, J.L., et al., *Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
113. Xu, Z.Y., et al., *Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR suppresses tumor invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer*. Int J Biol Sci, 2013. **9**(6): p. 587-97.
114. Qu, X., et al., *HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) in cancer*. Cancer Lett, 2019. **454**: p. 90-97.
115. Li, Y., et al., *Long non-coding RNA MALAT1 promotes gastric cancer tumorigenicity and metastasis by regulating vasculogenic mimicry and angiogenesis*. Cancer Lett, 2017. **395**: p. 31-44.
116. YiRen, H., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 regulates autophagy associated chemoresistance via miR-23b-3p sequestration in gastric cancer*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 174.
117. Zhang, X.W., et al., *Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **462**(3): p. 227-32.

118. Xu, T.P., et al., *Decreased expression of the long non-coding RNA FENRR is associated with poor prognosis in gastric cancer and FENRR regulates gastric cancer cell metastasis by affecting fibronectin1 expression.* J Hematol Oncol, 2014. **7**: p. 63.
119. He, Z., et al., *The FENRR/miR-214-3P/TET2 axis affects cell malignant activity via RASSF1A methylation in gastric cancer.* Am J Transl Res, 2018. **10**(10): p. 3211-3223.
120. Peng, W., et al., *Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression.* J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**: p. 79.
121. Yousefi, L., et al., *Dysregulation of lncRNA in Helicobacter pylori-Infected Gastric Cancer Cells.* Biomed Res Int, 2021. **2021**: p. 6911734.
122. Alipour, M., *Molecular Mechanism of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer.* J Gastrointest Cancer, 2021. **52**(1): p. 23-30.
123. Nasr, R., et al., *The Crosstalk between Microbiome and Immune Response in Gastric Cancer.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(18).