

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη του lncRNA Gracile5 και του mRNA στόχου του  
με τεχνολογίες CRISPR στον καρκίνο**

**Study of the lncRNA Gracile5 and its mRNA target with  
CRISPR technologies in cancer**



Όνοματεπώνυμο: Σταμπούλογλου Ελένη

Πατρώνυμο: Κωνσταντίνος

Επιβλέπων καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος

Λάρισα 2022

## Τριμελής Επιτροπή

### Επιβλέπων καθηγητής

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

### Μέλη

- Λιαδάκη Καλλιόπη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Αντώνιο Γιακουντή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο ερευνητικό του έργο, καθώς και την αμέριστη συμπαράσταση, καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Στο ίδιο πλαίσιο, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Καλλιόπη Λιαδάκη και τον κύριο Δημήτριο Στάγκο για την συμμετοχή τους στην συμβουλευτική επιτροπή. Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, και ιδιαίτερα στις υποψήφιες διδάκτορες Μπεγκόλλι Ροντιόλα και Χατζηαγγέλου Μυρτώ, για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση στην διάρκεια της συνεργασίας μας. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ χρωστάω στην οικογένεια μου, που με υποστηρίζει σε κάθε μου βήμα και μου δίνει κουράγιο να ξεπερνώ τα εμπόδια.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Abstract .....	7
1. Εισαγωγή .....	8
1.1. Καρκίνος του στομάχου .....	8
1.1.1. Ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου .....	9
1.1.1.1. Μοριακή ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου.....	9
1.1.2. Διάγνωση και Θεραπεία.....	13
1.2. Μεταγραφικοί Παράγοντες στον Καρκίνο .....	14
1.2.1. Μεταγραφικός Παράγοντας CDX2 .....	14
1.2.1.1. Ο ρόλος του CDX2 στον γαστρικό καρκίνο.....	15
1.2.2. Μεταγραφικός Παράγοντας HNF4a .....	16
1.2.2.1. Ο ρόλος του HNF4a στον γαστρικό καρκίνο .....	16
1.3. Long Non Coding RNAs .....	19
1.3.1. Χαρακτηριστικά lncRNAs.....	19
1.3.2. Ρόλοι lncRNAs.....	20
1.3.3. lncRNAs και Καρκίνος .....	23
1.3.4. Τα lncRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες .....	25
2. Σκοπός .....	27
3. Υλικά και Μέθοδοι .....	28
3.1. Υλικά .....	28
3.1.1. Αλληλουχίες.....	28
3.1.2. Πλασμιδιακοί φορείς .....	28
3.1.3. Κυτταρικές σειρές.....	30
3.2. Μέθοδοι .....	31
3.2.1. Βιοπληροφορική Ανάλυση .....	31
3.2.2. Αντίδραση Λιγάσης .....	31
3.2.2.1. Αντίδραση Λιγάσης για shRNA.....	31
3.2.2.2. Αντίδραση Λιγάσης για sgRNA.....	32
3.2.3. Μετασχηματισμός Πλασμιδιακών Κατασκευών σε Βακτήρια.....	33
3.2.4. Διαγνωστική Πέψη και PCR.....	34
3.2.4.1. Διαγνωστικές PCR και Διαγνωστική Πέψη - shRNA .....	34
3.2.4.2. Διαγνωστική PCR – sgRNAs .....	35
3.2.5. Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών.....	38
3.2.5.1. Διαμόλυνση με την χρήση JetPrime.....	38
3.2.5.2. Διαμόλυνση με την χρήση λιποφεκταμίνης.....	40

3.2.6.	Απομόνωση RNA .....	41
3.2.7.	Κατεργασία με DNAάση .....	41
3.2.8.	Σύνθεση cDNA .....	42
3.2.9.	qPCR.....	43
3.2.10.	Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών .....	44
3.2.11.	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA .....	44
3.2.12.	Γονοτύπηση .....	45
4.	Αποτελέσματα.....	47
4.1.	Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	47
4.1.1.	Ανάλυση δεδομένων RNA seq για το Gracile και το γονίδιο στόχο του .....	47
4.1.2.	Ανάλυση στη βάση δεδομένων GEPIA .....	53
4.2.	Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των Gracile5 και GR5T σε συνθήκες υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2.....	57
4.3.	Έλεγχος πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2 στους υποκινητές των γονιδίων Gracile5 και GR5T σε πείραμα CHIP.....	60
4.4.	Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του Gracile5 και του GR5T σε πείραμα υπερέκφρασης με το σύστημα CRISPRa .....	61
4.5.	Κλωνοποίηση pLVTHM.....	65
4.6.	Κλωνοποίηση pX333 .....	68
4.7.	Έλεγχος αποτελεσματικότητας της παραγωγής shRNA από τον φορέα pLVTHM..	72
4.8.	Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίου GR5T έπειτα από παροδική μεταγραφική σίγηση σε κύτταρα AGS.....	73
4.9.	Έλεγχος φαινοτύπου κυττάρων AGS σε συνθήκες καταστολής του GR5T .....	74
4.10.	Γονοτύπηση .....	75
5.	Συζήτηση.....	77
6.	Παράρτημα.....	83
6.1.	Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου .....	83
6.2.	Κατηγορίες LncRNA .....	85
	Βιβλιογραφία.....	88

## Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ο πέμπτος, σε συχνότητα εμφάνισης, τύπος καρκίνου και μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά την γεωγραφική του κατανομή, την ηλικία εμφάνισης στα δύο φύλα και τα διαφορετικά μορφολογικά, ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά και γι' αυτό έχουν δημιουργηθεί πολλές κατηγοριοποιήσεις. Τα μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας οφείλονται στην καθυστερημένη διάγνωση της νόσου σε τελικό, μεταστατικό στάδιο, κυρίως λόγω του ασυμπτωματικού της χαρακτήρα σε αρχικά στάδια σε συνδυασμό με την έλλειψη κατάλληλων προγνωστικών και διαγνωστικών εργαλείων. Για τον λόγο αυτό, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων μοριακών βιοδεικτών για την έγκαιρη και εξειδικευμένη διάγνωση της ασθένειας, που ενδεχομένως να μπορούν να αξιοποιηθούν και ως θεραπευτικοί στόχοι. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non coding RNA/lncRNA) είναι μία σχετικά νέα κατηγορία μορίων για την οποία λίγα πράγματα είναι γνωστά. Παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς εμπλέκονται σε θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες, παρουσιάζουν κυτταρο-ειδικότητα και έχουν βρεθεί αρκετά των οποίων η διαφορική έκφραση συσχετίζεται με διάφορα είδη καρκίνου και, επομένως, αποτελούν υποψήφιοι βιοδείκτες για την διάγνωση πολλών μορφών καρκίνου, μεταξύ αυτών και του στομάχου. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη ενός lncRNA, του Gracile5, το οποίο μέσα από βιοπληροφορικές αναλύσεις έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στον καρκίνο του στομάχου, καθώς και ενός γειτονικού, πιθανού γονιδίου στόχου του το οποίο βρίσκεται υπό την μεταγραφική του ρύθμιση. Για την μελέτη των δύο γονιδίων πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων RNA-seq, έλεγχος έκφρασης σε καρκινικές σειρές έπειτα από υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στον γαστρικό καρκίνο και στην ρύθμιση της έκφρασης lncRNA, και ανάπτυξη των κατάλληλων μοριακών εργαλείων για τον έλεγχο των γονιδίων με τεχνολογίες RNAi και CRISPR Cas9.

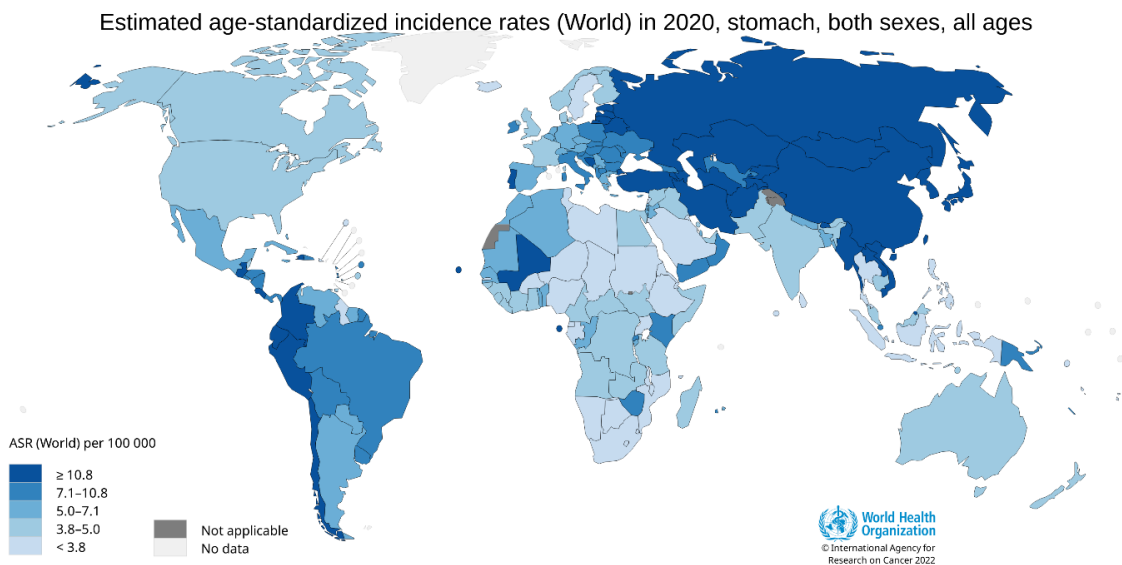
## Abstract

Stomach or gastric cancer is the fifth most common type of cancer and one of the most frequent reasons of mortality worldwide. It is characterized by great heterogeneity in regard to its geographical distribution, the age of appearance in both sexes and the different morphological, histological and molecular features and, because of these, several classifications have been created. The high mortality rates are due to late diagnosis of the disease, at the final, metastatic stage, mainly owing to its asymptomatic nature in the initial stages combined with the lack of appropriate prognostic and diagnostic tools. Therefore, it is deemed crucial the need to find novel molecular biomarkers for the timely and specialized diagnosis of gastric cancer, and which can have therapeutic potential. Long non coding RNAs are a relatively new class of molecules of which little is known. They have immense interest, as they are involved in fundamental cellular functions, are cell specific and several of them have been found whose differential expression correlates with various types of cancer and, for that reason, they are candidate biomarkers of many types of cancer, including gastric. The purpose of this thesis is to study one specific lncRNA called Gracile5 which has been found, through bioinformatic analysis, to be overexpressed in gastric cancer as well as a neighboring, potential target gene, which is under its transcriptional regulation. To study these genes a bioinformatic analysis of RNA-sequencing data was performed, expression levels were measured in cancer cell lines following the overexpression of certain transcription factors which are known to be involved in gastric cancer and the regulation of lncRNA expression and, finally, development of the appropriate molecular tools to manipulate the gene expression with RNAi and CRISPR Cas9 technologies.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Καρκίνος του στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου, ή αλλιώς γαστρικός καρκίνος, είναι η πέμπτη, σε συχνότητα, μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο, με 1.089.103 νέα περιστατικά το 2020, ενώ αποτελεί και την τρίτη, σε θνησιμότητα, συχνότερη μορφή καρκίνου με περίπου 769.000 θανάτους παγκοσμίως, δηλαδή 1 στους 13 θανάτους οφείλεται στον γαστρικό καρκίνο[1].



**Εικόνα 1.** Χάρτης απεικόνισης για το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου του στομάχου σε παγκόσμια κλίμακα το 2020, για τα δύο φύλα, και για όλες τις ηλικιακές ομάδες. [Ανάκτηση από WHO/Cancer Today 2020]

Οι περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου διαφέρουν τόσο στην γεωγραφική τους κατανομή όσο και στην εμφάνιση της νόσου μεταξύ των δύο φύλων. Όσον αφορά την γεωγραφική κατανομή, τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης εντοπίζονται στην Ανατολική Ασία, και κυρίως στην Ιαπωνία, την Κορέα και την Κίνα, με τα ποσοστά εμφάνισης να ξεπερνούν το 60%, καθώς και στην Ανατολική Ευρώπη [2]. Οι κυριότερες αιτίες εμφάνισης της νόσου σε αυτές τις χώρες είναι οι διατροφικές συνήθειες, ο τρόπος ζωής και η μόλυνση από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού [3, 4]. Ο γαστρικός καρκίνος είναι περισσότερο διαδεδομένος στους άνδρες, με την συχνότητα διάγνωσης να είναι δύο με τρεις φορές υψηλότερη σε σχέση με τις γυναίκες. Τα υψηλότερα ποσοστά πιθανώς σχετίζονται με φυλετικές διαφορές (φυλετικές στεροειδείς ορμόνες), με διαφορετικές επιγενετικές αλλαγές του ανοσοποιητικού



μεταξύ των δύο φύλων και λόγω καθυστέρησης στην ηλικία εμφάνισης της νόσου στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες [5]. Η συχνότερη ηλικία εμφάνισης γαστρικού καρκίνου είναι τα 60 χρόνια, και τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία αύξηση στην εμφάνιση της νόσου στις μικρότερες ηλικίες, κάτω των 50 ετών. Οι αιτίες πίσω από αυτό το φαινόμενο δεν είναι γνωστές, αν και πιθανολογείται ότι η αύξηση οφείλεται περισσότερο σε γενετικούς και μοριακούς παράγοντες, παρά σε περιβαλλοντικούς [6, 7]. Παρόλο που παρατηρείται μία συνεχής πτώση των περιπτώσεων εμφάνισης και των ποσοστών θνησιμότητας γαστρικού καρκίνου, παραμένει μία από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως [8, 9]. Η διάγνωση της ασθένειας τυπικά συμβαίνει στα τελικά στάδια, εξαιτίας του ασυμπτωματικού χαρακτήρα της νόσου στα αρχικά στάδια, με αποτέλεσμα το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών έως 5 έτη μετά την διάγνωση να είναι εξαιρετικά χαμηλό (20-40%) [10]. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η έγκαιρη διάγνωση, στα αρχικά στάδια της νόσου, ώστε να στέφεται με επιτυχία η θεραπευτική προσέγγιση που επιλέγεται σε κάθε περίπτωση.

#### 1.1.1.Ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου

Έχουν αναπτυχθεί πολλά συστήματα για τον χαρακτηρισμό και την ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου. Η ταξινόμηση μπορεί να στηρίζεται αποκλειστικά σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι διακριτά μεταξύ των διαφόρων τύπων. Τις τελευταίες δεκαετίες, η ανάπτυξη των μοριακών τεχνολογιών έχει βοηθήσει στην εύρεση των μεταλλάξεων που είναι χαρακτηριστικές για κάθε τύπο καρκίνου, και, έτσι, έχουν δημιουργηθεί και συστήματα ταξινόμησης που στηρίζονται σε αυτά τα μοριακά χαρακτηριστικά [11]. Ορισμένα από αυτά τα συστήματα αναλύονται παρακάτω.

##### 1.1.1.1.Μοριακή ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου

Ο γαστρικός καρκίνος φέρει γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που συμβάλλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου και επηρεάζουν την απόκριση στις θεραπείες. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και μοριακών μεθόδων υψηλής ανάλυσης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διάφορων συστημάτων μοριακής ταξινόμησης για τον γαστρικό καρκίνο [12].

Ο πιο ολοκληρωμένος μοριακός χαρακτηρισμός των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων δημιουργήθηκε από το ερευνητικό δίκτυο Άτλας του Καρκινικού Γονιδιώματος (TCGA) το 2014. Για την μελέτη αναλύθηκαν ιστοί πρώιμου γαστρικού αδενοκαρκινώματος από 295 ασθενείς, οι οποίοι δεν είχαν λάβει προηγουμένως κάποια

θεραπεία, με τη χρήση έξι διαφορετικών μοριακών μεθόδων αλληλούχηση εξονίων, αλληλούχηση mRNA, αλληλούχηση miRNA, προφίλ μεθυλίωσης DNA, συστοιχίες πρωτεϊνών αντίστροφης φάσης (RPPA) και ανάλυση αριθμού σωματικών αντιγράφων [13, 14]. Σύμφωνα με αυτό το δίκτυο ο γαστρικός καρκίνος κατηγοριοποιείται σε τέσσερις διακριτούς μοριακούς τύπους: θετικός στον ιό Epstein - Barr (EBV+), με αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI), γονιδιωματικά σταθερός (GC), και με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN).

### **EBV θετικός Τύπος**

Ο θετικός στον ιό Epstein – Barr τύπος γαστρικού καρκίνου αφορά περίπου στο 9% των ασθενών και ανιχνεύεται, κυρίως, σε άνδρες ασθενείς (81%). Εντοπίζεται συχνότερα στο εγγύς τμήμα του στομάχου, δηλαδή στην περιοχή του σώματος και του θόλου (62%), και ιστολογικά ανήκει στον διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου, σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren, ενώ χαρακτηριστικό του είναι το χαμηλό ποσοστό μετάστασης στους λεμφαδένες [15]. Αυτός ο υπότυπος χαρακτηρίζεται από ένα ιδιαίτερο γενετικό και επιγενετικό προφίλ, με εκτεταμένη υπερμεθυλίωση του DNA σε νησίδες CpG σε εκατοντάδες γονίδια, προκαλώντας την μεταγραφική σίγηση διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων [16, 17]. Για παράδειγμα, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου CDKN2A, το οποίο εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, έχει παρατηρηθεί σε όλα τα περιστατικά μελέτης με EBV+ γαστρικό καρκίνο [18, 19]. Επιπλέον, συχνές μεταλλάξεις που παρατηρούνται σε αυτό τον τύπο γαστρικού καρκίνου αφορούν το γονίδιο κινάση 3 της 4,5 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIK3CA) σε ποσοστό που φτάνει το 80%, το γονίδιο ARID1A, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που ανήκει στο σύμπλοκο SNF/SWI και συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, σε ποσοστό 47-55%, καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον BCL6-συγκатаστολέα (BROG), σε ποσοστό 23%. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται και ενίσχυση έκφρασης μίας ομάδας γονιδίων που χαρτογραφούνται στην περιοχή 9p24.1 και περιλαμβάνει την κινάση JAK2 (Janus Associated Kinase 2) και τα PD-L1 και PD-L2 (Programmed Death-Ligands) [20]. Η υπερέκφραση των μορίων PD-L1 και PD-L2 καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων συμβάλλοντας στην αποφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα [21, 22].

### **Αστάθεια Μικροδορυφόρων**

Ο γαστρικός καρκίνος με αστάθεια μικροδορυφόρων (Microsatellite Instability - MSI) εμφανίζεται με συχνότητα 22% και παρατηρείται κυρίως σε γυναίκες και σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας, με μέσο όρο ηλικίας εμφάνισης τα 72 έτη [23]. Εντοπίζεται ως επί το πλείστον στην περιφέρεια του στομάχου, δηλαδή στο άντρο και στον πυλωρό, ενώ σχετίζεται με τον εντερικό τύπο κατά Lauren και συνήθως συνεπάγεται καλή πρόγνωση για τον ασθενή [24]. Αυτός ο τύπος είναι το αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών που αποτελούνται από μικροδορυφόρους. Οι μικροδορυφόροι είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους 1 – 6 νουκλεοτιδίων [25]. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων προκύπτουν λόγω του ελλαττωματικού συστήματος μηχανισμού επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων του DNA (mismatch repair – MMR), το οποίο είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση του λάθους ζευγαρώματος βάσεων που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA [26-28]. Η ανεπάρκεια του συστήματος MMR οφείλεται κυρίως σε απενεργοποίηση λόγω μεταλλάξεων ή σε επιγενετική σίγηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό το σύστημα, με κυριότερη την επιγενετική σίγηση του ομόλογου MutL 1 (MLH1) λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή [29, 30]. Κατά την προσπάθεια μοριακού χαρακτηρισμού αυτού του τύπου γαστρικού καρκίνου, έχει βρεθεί πως 37 τουλάχιστον γονίδια φέρουν μεταλλάξεις και εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα το γονίδιο TP53 που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, γονίδια που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, στην μεταγραφική ρύθμιση και στην απόπτωση των κυττάρων κ.α. [31, 32].

### **Γονιδιωματική σταθερότητα**

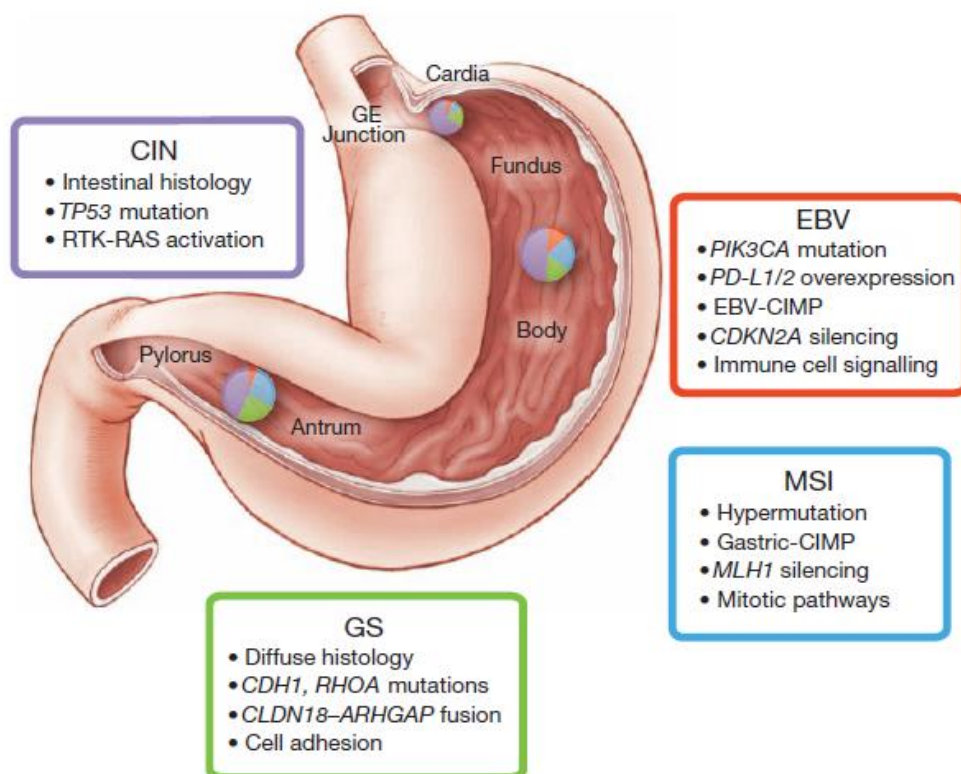
Ο γονιδιωματικά σταθερός (Genomically Stable – GS) τύπος γαστρικού καρκίνου αφορά περίπου το 20% των ασθενών / δειγμάτων που ελέγχθηκαν από τους ερευνητές του TCGA προγράμματος. Η διάγνωση με αυτό τον τύπο γίνεται σε άτομα μικρότερης ηλικίας, με μέσο όρο ηλικίας εμφάνισης τα 59 έτη, και κλινικά συσχετίζεται με τον διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου και με πιο επιθετική μορφή της νόσου [13, 23, 33]. Είναι δύσκολος ο χαρακτηρισμός βάσει των μεταλλάξεων που επικρατούν, διότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι σπάνιες, σποραδικές και σε χαμηλά ποσοστά. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στον συγκεκριμένο τύπο εντοπίζονται στο γονίδιο CDH1, το οποίο κωδικοποιεί για την E - καδερίνη, η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου και είναι μόριο απαραίτητο για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως την σηματοδότηση, την

κυτταρική προσκόλληση, και τον πολλαπλασιασμό, καθώς και στο γονίδιο RHOA, το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο RHOA, που ανήκει στην οικογένεια των RHO GTPase και φυσιολογικά εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, στην διατήρηση του κυτταροσκελετού και στην μετανάστευση των κυττάρων [33-36]. Μία επιπλέον μετάλλαξη που έχει παρατηρηθεί είναι και η σύντηξη δύο γονιδίων, του CLDN18 που κωδικοποιεί την κλοδίνη 18 που είναι απαραίτητη για την δημιουργία στενοσυνδέσμων (tight junctions) μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, και του ARHGAP26 το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ARHGAP26 που έχει ρόλο ενεργοποιητή των Rho GTPase [37]. Το χημιακό προϊόν που παράγεται από την σύντηξη φαίνεται πως έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή των κυττάρων από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό τύπο και την ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων του στομάχου [38, 39].

### **Χρωμοσωμική αστάθεια**

Ο τελευταίος τύπος καρκίνος του στομάχου, σύμφωνα με την μοριακή ταξινόμηση κατά TCGA, χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal Instability – CIN) και περίπου 1 στους 2 ασθενείς (50%) έχει αυτό τον τύπο. Ανατομικά εμφανίζεται κυρίως στην περιοχή της γαστροοισοφαγικής συμβολής και της καρδιάς του στομάχου και συσχετίζεται με τον εντερικό τύπο κατά Lauren [40]. Η χρωμοσωμική αστάθεια είναι χαρακτηριστικό πολλών ειδών καρκίνου και αφορά δομικές ανακατατάξεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων ή αλλαγές στον αριθμό αυτών και μπορεί να οδηγεί σε ανευπλοειδία (μη φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων) ή πολυπλοειδία (αύξηση αριθμού συνόλου ομόλογων χρωμοσωμάτων) [41, 42]. Αυτός ο τύπος συνοδεύεται σε μεγάλο ποσοστό από μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 (71% περιπτώσεων), ενώ επίσης παρατηρείται και ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, όπως είναι το γονίδιο του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR), του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – VEGFR), καθώς και του ογκογονιδίου KRAS, από τα οποία κωδικοποιούνται πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι RTK/RAS/MAPK και εμπλέκονται στον

αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [43-45].



**Εικόνα 2.** Μοριακή ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου κατά TCGA. Στην εικόνα απεικονίζονται για καθέναν από τους τέσσερις υποτύπους ιστολογικά χαρακτηριστικά και γενετικές αλλαγές που τους διακρίνουν [13].

### 1.1.2. Διάγνωση και Θεραπεία

Τα συμπτώματα που σχετίζονται με γαστρικό καρκίνο, αν υπάρχουν, περιλαμβάνουν απώλεια βάρους, ναυτία, έμετος, ανορεξία και δυσπεψία, τα οποία είναι ασαφή, μη ειδικά και μπορεί να μην εμφανιστούν μέχρι τα τελικά στάδια της νόσου [46]. Για τον λόγο αυτό, τα ποσοστά διάγνωσης στα αρχικά στάδια είναι πολύ μικρά και σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών, της τάξεως του 70%, η ασθένεια αναπτύσσεται μέχρι τα προχωρημένα στάδια πριν γίνει η διάγνωση, ενώ τότε υπάρχει και η πιθανότητα μετάστασης, οπότε η συνολική πρόγνωση για τους ασθενείς είναι κακή [47]. Η διάγνωση πραγματοποιείται μέσω ενδοσκόπησης και λήψης βιοψίας για ιστολογική μελέτη και χρησιμοποιείται για την κλινική σταδιοποίηση, η οποία θα καθορίσει το είδος θεραπείας [48]. Η ανάγκη πρόωρης διάγνωσης οδήγησε κάποιες χώρες της Ασίας, όπως την Ιαπωνία και την Νότια Κορέα, να εφαρμόσουν πιλοτικά

πρόγραμμα πληθυσμιακού ελέγχου με γαστροσκόπηση για προληπτικούς λόγους, ωστόσο το κόστος είναι υψηλό και είναι δύσκολη η εφαρμογή ενός τέτοιου προγράμματος για την οικονομία μίας χώρας [49].

Η θεραπεία του γαστρικού καρκίνου περιλαμβάνει την χειρουργική αφαίρεση του όγκου και την χημειοθεραπεία, που μπορεί να είναι τοξική για τον οργανισμό. Παρόλο που έχει επιτευχθεί η παράταση της επιβίωσης των ασθενών με συνδυαστικές θεραπείες, ακόμα πάνω από το 70% των ασθενών καταλήγει στον θάνατο [50, 51]. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η εύρεση μη επεμβατικών μοριακών μεθόδων για την έγκαιρη διάγνωση και στοχευμένη αντιμετώπιση στα αρχικά στάδια του γαστρικού καρκίνου.

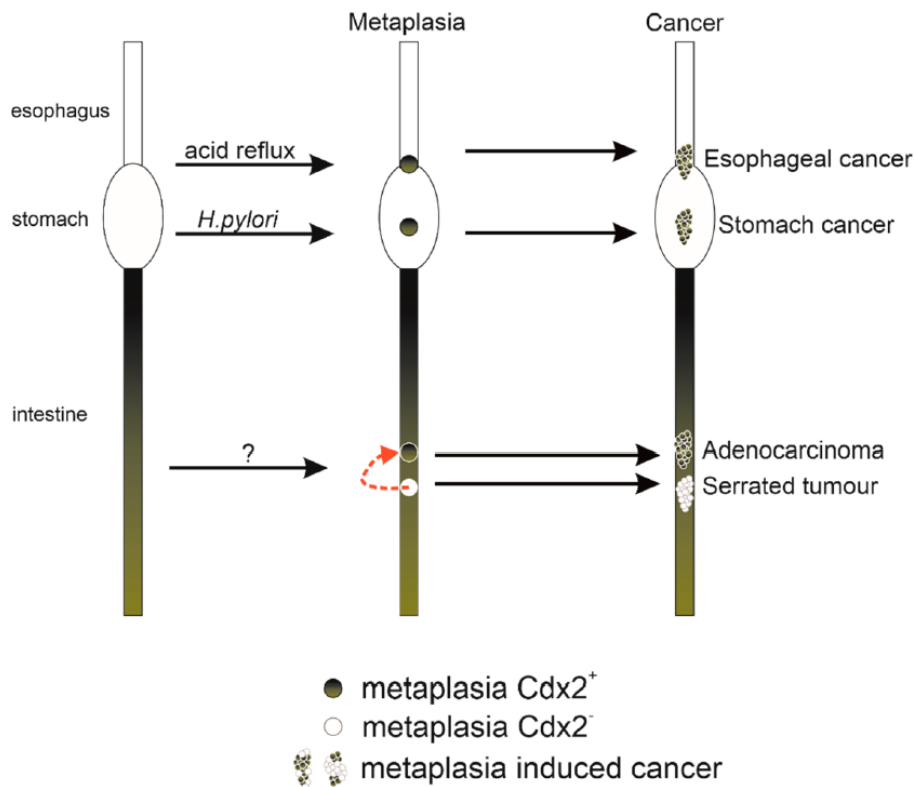
## 1.2. Μεταγραφικοί Παράγοντες στον Καρκίνο

### 1.2.1. Μεταγραφικός Παράγοντας CDX2

Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX2 (Caudal related homeobox transcription factor 2) ανήκει στην οικογένεια των ομοιοτικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την μορφογένεση και την ταυτότητα των κυττάρων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης [52]. Στον ποντικό κωδικοποιείται από το γονίδιο *Cdx2*, το οποίο είναι μέλος του συμπλέγματος ParaHOX γονιδίων και εκφράζεται κυρίως στο ενδόδερμα και τα παράγωγά του [53]. Στο γονιδίωμα των θηλαστικών εντοπίζονται τρία γονίδια που σχηματίζουν την οικογένεια ουραίου τύπου με ομοιοπλαίσιο (caudal type homeobox – Cdx), τα *Cdx1*, *Cdx2* και *Cdx4*, η έκφραση των οποίων ξεκινά σε εμβρυϊκούς ιστούς κατά το στάδιο της γαστριδίωσης και είναι απαραίτητη για την προσθιο-οπίσθια διαμόρφωση, ενώ κατά την εξέλιξη της κυοφορίας η έκφρασή τους σταδιακά μειώνεται [54]. Εξάίρεση αποτελεί το επιθήλιο του εντέρου, όπου η έκφραση των γονιδίων *Cdx1* και *Cdx2* είναι απαραίτητη για την δημιουργία της εντερικής οδού και έχουν ρόλο στην ομοίωση και λειτουργία του εντερικού επιθηλίου των ενηλίκων [55, 56]. Ο CDX2 είναι ο κυρίαρχος ρυθμιστής της εντερικής ταυτότητας, και αυτό αποδεικνύεται μετά από απώλεια λειτουργίας του ενός αλληλομόρφου σε έμβρυα (*Cdx2*<sup>+/-</sup>), στα οποία συμβαίνει μετα-διαφοροποίηση από εντερικό σε γαστρικό ενδόδερμα [57, 58].

### 1.2.1.1.Ο ρόλος του CDX2 στον γαστρικό καρκίνο

Φυσιολογικά, στο γαστρικό επιθήλιο δεν παρατηρείται έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2, ωστόσο υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν πως η έκτοπη έκφρασή του συνδέεται με την ανάπτυξη εντερικής μεταπλασίας στο στομάχι, η οποία έχει αναγνωριστεί ως ένας κύριος παράγοντας κινδύνου για την δημιουργία γαστρικού καρκίνου [59, 60]. Η εντερική μεταπλασία συνήθως ξεκινά μετά από ένα εξωγενές συμβάν, όπως είναι η μόλυνση από *H.pylori*, που προκαλεί βλάβη του ιστού και, κατά την διαδικασία της αναγέννησης του ιστού, μπορεί να συμβεί μεταδιαφοροποίηση σε άλλου τύπου ιστό που μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση και έκτοπη έκφραση του γονιδίου Cdx2 [61-63]. (Εικόνα 3)



**Εικόνα 3.** Απεικόνιση της διαδικασίας μεταπλασίας που προκαλείται από την έκτοπη έκφραση του CDX2 και εξελίσσεται σε γαστρικό καρκίνο [62].

Η έκτοπη έκφραση του CDX2, εφόσον συνδέεται με την εντερική μεταπλασία και, δεδομένου ότι αυτή αποτελεί μία προκαρκινική βλάβη του επιθηλίου του στομάχου, είναι πιθανό πως η έκφραση είναι παροδική και μειώνεται στα επόμενα

στάδια εξέλιξης της νόσου και ότι έχει ογκοεπαγωγικό ρόλο. Εναλλακτικά, μία άλλη πιθανότητα είναι πως η έκτοπη έκφραση αυτού έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο, όπως συμβαίνει και στον καρκίνο του παχέος εντέρου [64], υπόθεση που ενισχύεται από την διαπίστωση πως ασθενείς με γαστρικό καρκίνο και έκφραση του CDX2 έχουν καλύτερη πρόγνωση [65].

### 1.2.2.Μεταγραφικός Παράγοντας HNF4a

Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a (Hepatocyte nuclear factor 4a) είναι μέλος της εξελικτικά συντηρημένης υπεροικογένειας πυρηνικών υποδοχέων και εκφράζεται σε επιθηλιακούς ιστούς που προέρχονται από το ενδόδερμα, όπως είναι στο έντερο, το ήπαρ, το πάγκρεας και το στομάχι [66]. Τα θηλαστικά, εκτός από το γονίδιο HNF4a, διαθέτουν και ένα παράλογό του, το HNF4g, που εκφράζεται στους ίδιους ιστούς με εξαίρεση το ήπαρ. Παράγονται πολλές ισομορφές από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA που μεταγράφεται από το γονίδιο αυτό, ενώ επιπλέον, μπορούν να παραχθούν διαφορετικές ισομορφές διότι υπάρχουν δύο εναλλακτικοί υποκινητές, οι P1 και P2, η ενεργότητα των οποίων ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη από επιγενετικούς μηχανισμούς [67, 68]. Λειτουργεί ως ομοδιμερές το οποίο προσδένεται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες DNA, που αποτελούνται από άμεσα στοιχεία επανάληψης με ένα ή δύο νουκλεοτίδια ενδιάμεσα [69].

Ο HNF4a φαίνεται πως έχει κρίσιμο ρόλο στις λειτουργίες των οργάνων που αναφέρθηκαν παραπάνω και, ενώ δεν είναι απαραίτητος για την δέσμευση στην εκάστοτε κυτταρική γενεαλογία, είναι απαραίτητος για την εξειδίκευση σε μεταγενέστερα στάδια της διαφοροποίησης προς τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα [67]. Εμπλέκεται στην ρύθμιση της διαδικασίας μετάβασης από μεσεγχυματικά σε επιθηλιακά κύτταρα (Mesenchymal to Epithelial Transition – MET) και στην διατήρηση του επιθηλιακού φαινοτύπου, τόσο ρυθμίζοντας θετικά την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην δημιουργία κυτταρικών συνδέσμων, όσο και καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο EMT και στην διαμόρφωση μεσεγχυματικού χαρακτήρα [70, 71].

#### 1.2.2.1.Ο ρόλος του HNF4a στον γαστρικό καρκίνο

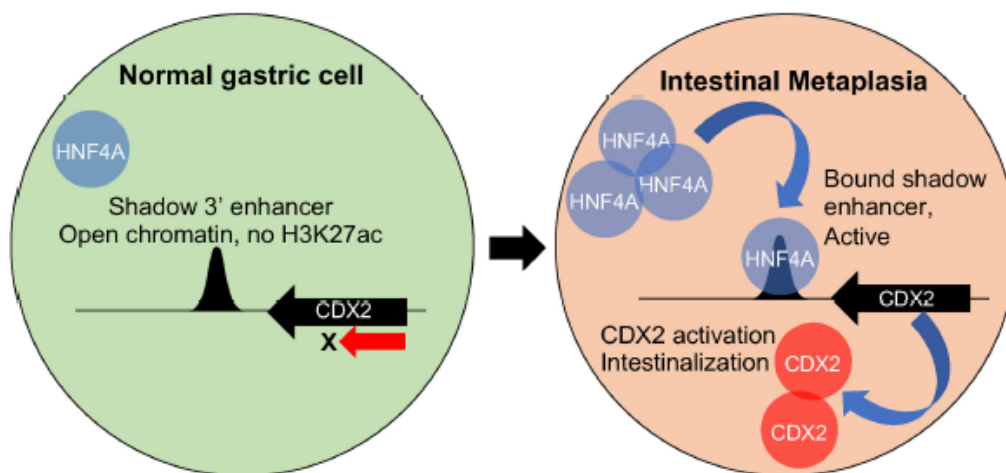
Φυσιολογικά, στον άνθρωπο ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a εκφράζεται σε ορισμένα μόνο είδη κυττάρων στο ώριμο επιθήλιο του στομάχου, ενώ στον ποντικό είναι απαραίτητος για την κυτταρική διαφοροποίηση και την ομοίωση του



επιθηλίου του στομάχου. Έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται στον γαστρικό καρκίνο και είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του όγκου *in vivo* και *in vitro* και για τον μεταβολισμό των γαστρικών καρκινικών κυττάρων, επομένως λειτουργεί ως ογκογονίδιο [72-74]. Επιπλέον, έχει βρεθεί μία ισομορφή του HNF4a της οποίας η μεταγραφή επάγεται από τον υποκινητή P1 και συσχετίζεται με μόλυνση από τον Eipstein Barr σε γαστρικό καρκίνο [75, 76]. Έχει προταθεί η χρήση του ως ειδικού βιοδείκτη για την διάκριση του γαστρικού καρκίνου από άλλα είδη καρκίνου λόγω της ειδικότητας που έχει για τον συγκεκριμένο τύπο [77].

Ο HNF4a συνεργάζεται με τον CDX2 και συμμετέχουν σε ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχει την έκφραση απαραίτητων γονιδίων για την ανάπτυξη και την ομοιόσταση του εντερικού επιθηλίου. Μάλιστα, φαίνεται πως υπάρχει τόσο σχέση αλληλορύθμισης μεταξύ των δύο μεταγραφικών παραγόντων όσο και θετική αυτορρύθμιση, διατηρώντας την έκφραση σταθερή στο εντερικό επιθήλιο [78]. Σε μοριακό επίπεδο, ο HNF4a αναγνωρίζει μοτίβα αλληλουχίας DNA τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε περιοχές δέσμευσης του CDX2, τα οποία μάλιστα εντοπίζονται συχνά σε ενεργούς ενισχυτές του εντερικού επιθηλίου. Η διακοπή έκφρασης του CDX2 διαταράσσει την αρχιτεκτονική της χρωματίνης και την πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως του HNF4a και αυτό είναι ένα δείγμα πως ο CDX2 διατηρεί προσβάσιμη την χρωματίνη στα εντερικά κύτταρα [79, 80]. Σε γαστρικά αδενοκαρκινώματα εντερικού τύπου, όπου ο HNF4a υπερεκφράζεται και αυτό συμβαίνει μέσω στόχευσης από τα ογκογονίδια KLF5, GATA4 και GATA6 που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου [81], βρέθηκε πως αυτός μπορεί άμεσα να ρυθμίσει την έκφραση του CDX2 και πιθανότατα προσδένεται και ενεργοποιεί έναν ενισχυτή του γονιδίου Cdx2, ενεργοποιώντας έκτοπα την έκφρασή του σε κύτταρα του στομάχου [82, 83]. **(Εικόνα 4)**

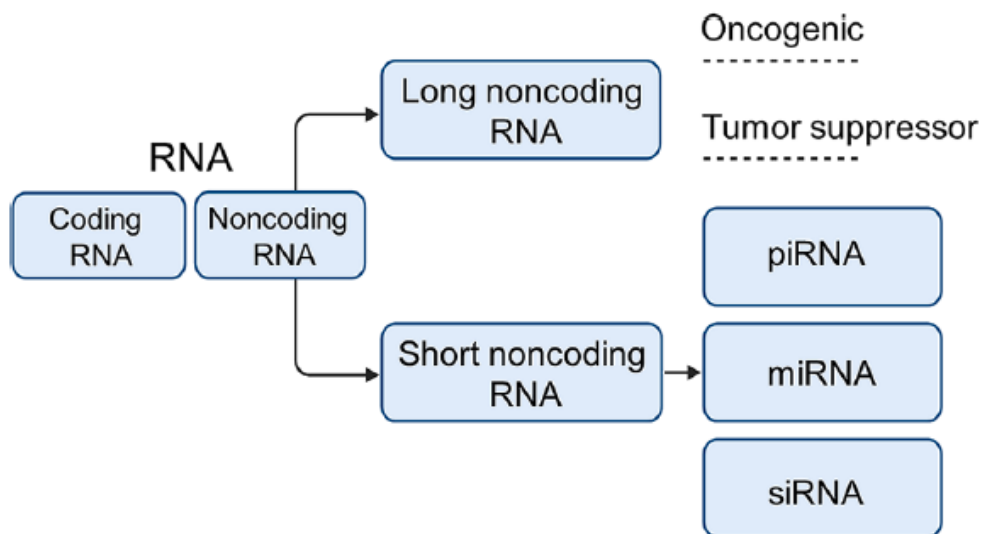
Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, καταδεικνύεται ο σημαντικός ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a στην έναρξη και την εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου, αν και πρέπει να τονιστεί ότι μέχρι στιγμής δεν έχουν μελετηθεί σε βάθος οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτοί δρουν. Μπορούν να αξιοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες στον γαστρικό καρκίνο, καθώς παρουσιάζουν εξειδίκευση για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου σε σχέση με άλλους [59, 74, 84]. Ωστόσο, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι αντικαρκινικών φαρμάκων, διότι εμπλέκονται φυσιολογικά σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες και σε διαφορετικούς ιστούς και η στόχευσή τους θα είχε πολλούς κινδύνους για την ζωή του ασθενούς. Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι η εύρεση καθοδικών στόχων αυτών των μεταγραφικών παραγόντων που να σχετίζονται αποκλειστικά με τον γαστρικό καρκίνο και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί, διαγνωστικοί και θεραπευτικοί βιοδείκτες. Από τους πιθανούς υποψήφιους στόχους τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNA/lncRNA) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον [85], αφού η ιστο- και καρκινοειδική έκφραση τους μπορεί να ρυθμίζεται από τους παραπάνω μεταγραφικούς παράγοντες.



**Εικόνα 4.** Μοντέλο ενεργοποίησης ενός ενισχυτή του Cdx2 από αυξημένα επίπεδα του HNF4a, επάγοντας την έκφραση του πρώτου, ο οποίος ενεργοποιεί την έκφραση εντερικών γονιδίων σε κύτταρα στομάχου [83].

### 1.3. Long Non Coding RNAs

Με την πρόοδο των μεθόδων αλληλούχησης, έχει πλέον διαπιστωθεί πως το ανθρώπινο γονιδίωμα διαθέτει τόσο γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (2% μεταγραφήματος) όσο και γονίδια που μεταγράφονται και παράγουν μη κωδικά (Non coding) RNA (98% μεταγραφήματος) [86]. Σύμφωνα με το μέγεθος τους, τα μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNAs) διακρίνονται σε μικρά ncRNA, με μέγεθος  $\leq 200$  νουκλεοτίδια, και σε μεγάλα (long) ncRNAs (lncRNAs), που έχουν μέγεθος  $> 200$  νουκλεοτίδια. (Εικόνα 5) Στα μικρά ncRNA ανήκουν τα micro-RNA (miRNAs), τα αλληλοεπιδρώντα με PIWI RNA (piRNAs), τα μικρά πυρηνικά RNA (small nuclear RNAs – snRNAs) κ.α., τα οποία έχουν μελετηθεί αρκετά και είναι γνωστές πολλές από τις λειτουργίες τους φυσιολογικά και σε παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, λίγα πράγματα είναι γνωστά για τα lncRNAs και μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ‘μεταγραφικός θόρυβος’ και παραπροϊόντα της μεταγραφής [86-88].



**Εικόνα 5.** Ταξινόμηση RNA σε κωδικοποιητικά (coding) και μη κωδικοποιητικά (non-coding). Τα non-coding RNA διακρίνονται περαιτέρω, με βάση το μέγεθός τους, σε μεγάλα (long) και μικρά (short) non-coding RNA [89].

#### 1.3.1. Χαρακτηριστικά lncRNAs

Τα lncRNAs, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι μόρια RNA μήκους άνω των 200 νουκλεοτιδίων και αφορούν το 80% των μη κωδικοποιητικών RNA. Έχουν χαρακτηριστικά των μορίων mRNA, όπως ότι μεταγράφονται από την πολυμεράση του RNA II, φέρουν 5' καλύπτρα, 3' πολύ-αδενυλιωμένη (poly(A)) ουρά και εναλλακτικό

μάτισμα (splicing) [90, 91]. Ωστόσο, εκφράζονται σε χαμηλά ποσοστά και η πρωτοταγής δομή τους είναι λιγότερο συντηρημένη εξελικτικά [92], συνήθως δεν διαθέτουν ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (Open reading frame – ORF), αν και έχουν βρεθεί lncRNA, τα οποία κωδικοποιούν για μικρά πεπτίδια [93], ενώ ασκούν τις ρυθμιστικές τους λειτουργίες μέσω της τρισδιάστατης διαμόρφωσής τους [94]. Η έκφραση των lncRNA είναι ειδοειδική, ιστοειδική, κυτταροειδική και πολύ συχνά καρκινοειδική, ενώ ρυθμίζεται αυστηρά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Η έκτοπη και απορυθμισμένη έκφρασή τους έχει βρεθεί να συνδέεται με μία πλειάδα ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων, μεταξύ αυτών και του καρκίνου [95, 96]. Συγκεκριμένα, στον καρκίνο έχουν βρεθεί lncRNA τα οποία εμπλέκονται σε όλες τις διαδικασίες που θεωρούνται ορόσημα του καρκίνου, δηλαδή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση, στην μετατροπή των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (Epithelial to mesenchymal transition – EMT), στην μετάσταση, στην αγγειογένεση και στον μεταβολισμό [97].

### 1.3.2. Ρόλοι lncRNAs

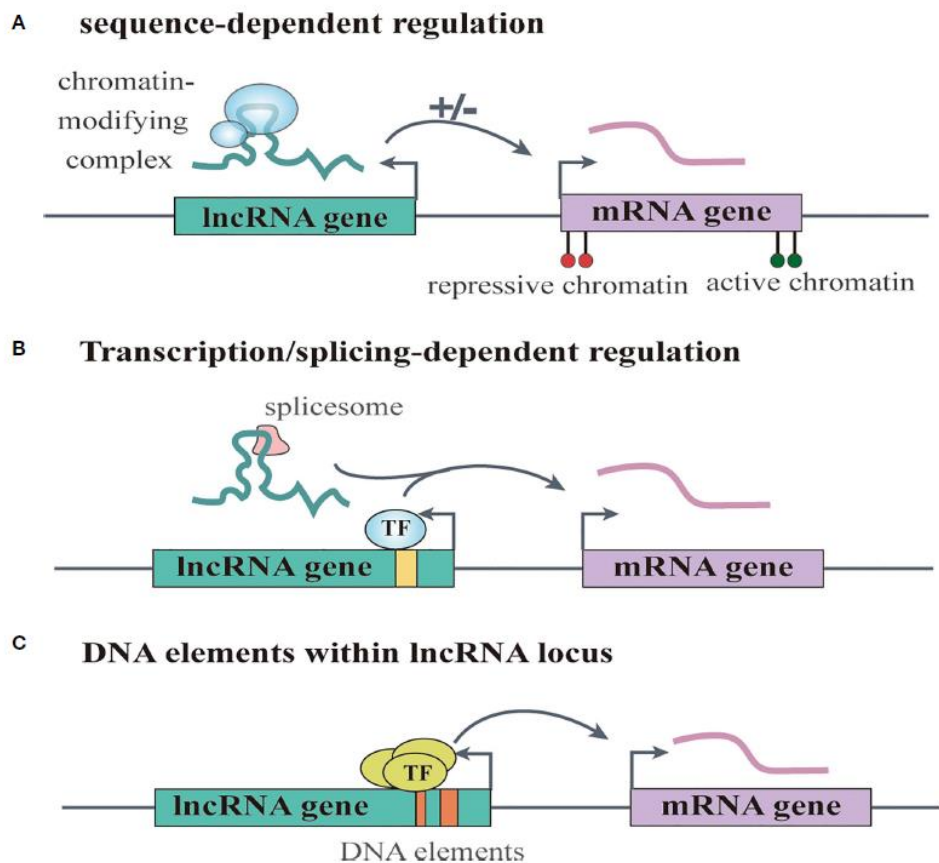
Τα lncRNAs έχουν πολλούς και διακριτούς ρόλους μέσα στο κύτταρο και ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους ως προς το γονίδιο στόχο διακρίνονται σε *cis* δραστικά lncRNA, τα οποία ελέγχουν και επηρεάζουν την κατάσταση της χρωματίνης και την έκφραση γειτονικών γονιδίων, και σε *trans* δραστικά lncRNA, που ρυθμίζουν πολλαπλούς καθοδικούς στόχους σε όλο το γονιδίωμα. [98, 99].

Όσον αφορά τα *cis* δραστικά lncRNA, υπάρχουν τουλάχιστον τρεις πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους αυτά λειτουργούν για να τροποποιήσουν την γονιδιακή έκφραση γειτονικά του γενετικού τόπου όπου εντοπίζονται. **(Εικόνα 6)**

1. Το lncRNA εμπλέκεται στην επιγενετική ρύθμιση γειτονικών γονιδίων, μέσω της αλληλεπίδρασης του με ρυθμιστικά στοιχεία/τροποποιητές της χρωματίνης και της προσέλευσής τους στο σημείο διευκολύνοντας ή εμποδίζοντας την πρόσδεσή τους τοπικά. Επιπλέον, το αρνητικό φορτίο του RNA εξουδετερώνει το θετικό φορτίο των ιστονών, με αποτέλεσμα το άνοιγμα της χρωματίνης στο σημείο και την άμεση ενεργοποίηση της έκφρασης των γειτονικών γονιδίων [100, 101]. **(Εικόνα 6A)**
2. Το lncRNA αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, αλλά και με την ίδια την μεταγραφική μονάδα, και είτε μεσολαβεί στην προσέλευση και την σταθεροποίηση της πρόσδεσης αυτών σε ρυθμιστικά στοιχεία

(υποκινητές και ενισχυτές), ενισχύοντας την μεταγραφή των γειτονικών γονιδίων, είτε εμποδίζει την πρόσδεσή τους ή προκαλεί αλλαγές στην κατάσταση της χρωματίνης, καταστέλλοντας την έκφραση των γειτονικών γονιδίων. Επίσης, εμπλέκονται και στο εναλλακτικό μάτισμα των μεταγράφων των γειτονικών γονιδίων, μέσω της στρατολόγησής της ‘μηχανής’ ματίσματος στο σημείο της μεταγραφής [102, 103]. (Εικόνα 6B)

3. Η λειτουργία του lncRNA ως *cis* ρυθμιστικού στοιχείου βασίζεται αποκλειστικά σε ρυθμιστικές αλληλουχίες, όπως υποκινητές και ενισχυτές που εντοπίζονται στον γονιδιακό τόπο του lncRNA και δεν εξαρτάται από την μεταγραφή αυτού [104, 105]. (Εικόνα 6C)



**Εικόνα 6.** Ρόλοι των *cis* δραστικών lncRNA [106].

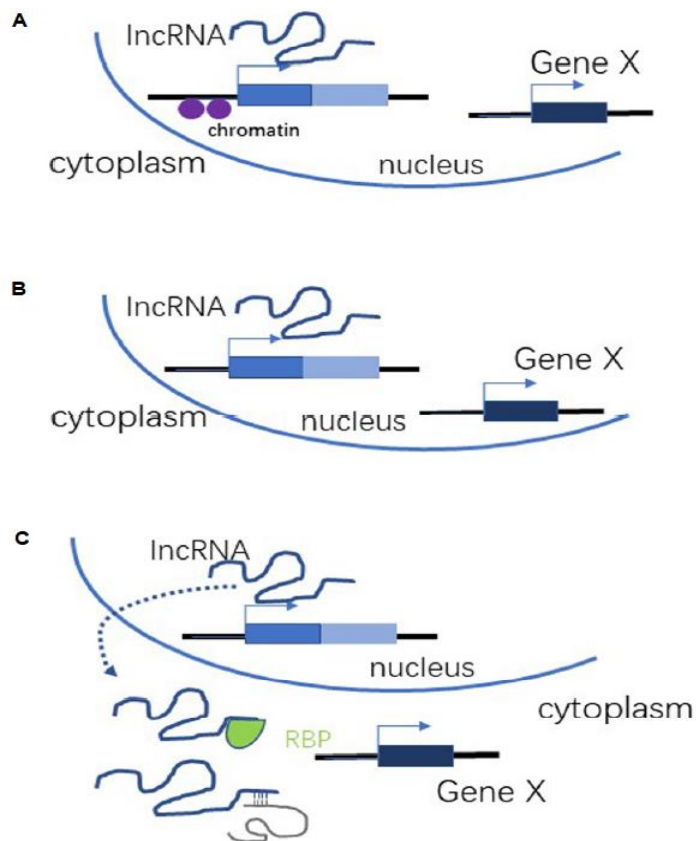
Υπάρχουν και lncRNA τα οποία δρουν σε σημείο απομακρυσμένο από τον γενετικό τους τόπο και για τον λόγο αυτό ονομάζονται *trans* δραστικά lncRNA. Αυτά διαμορφώνουν τουλάχιστον τρεις κατηγορίες. (Εικόνα 7)

1. Υπάρχουν *trans* δραστικά lncRNA που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε απομακρυσμένα σημεία του χρωμοσώματος αλληλεπιδρώντας με υποκινητές,

ενισχυτές ή πρωτεΐνες που εντοπίζονται σε αυτούς, επηρεάζοντας την κατάσταση της χρωματίνης και την ενεργότητα της RNA πολυμεράσης [107, 108]. (Εικόνα 7A)

2. Ορισμένα lncRNA οργανώνουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης και δυναμικά υποπυρηνικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες, συμβάλλοντας στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και στην χωρική οργάνωση της γονιδιακής έκφρασης [109, 110]. (Εικόνα 7B)

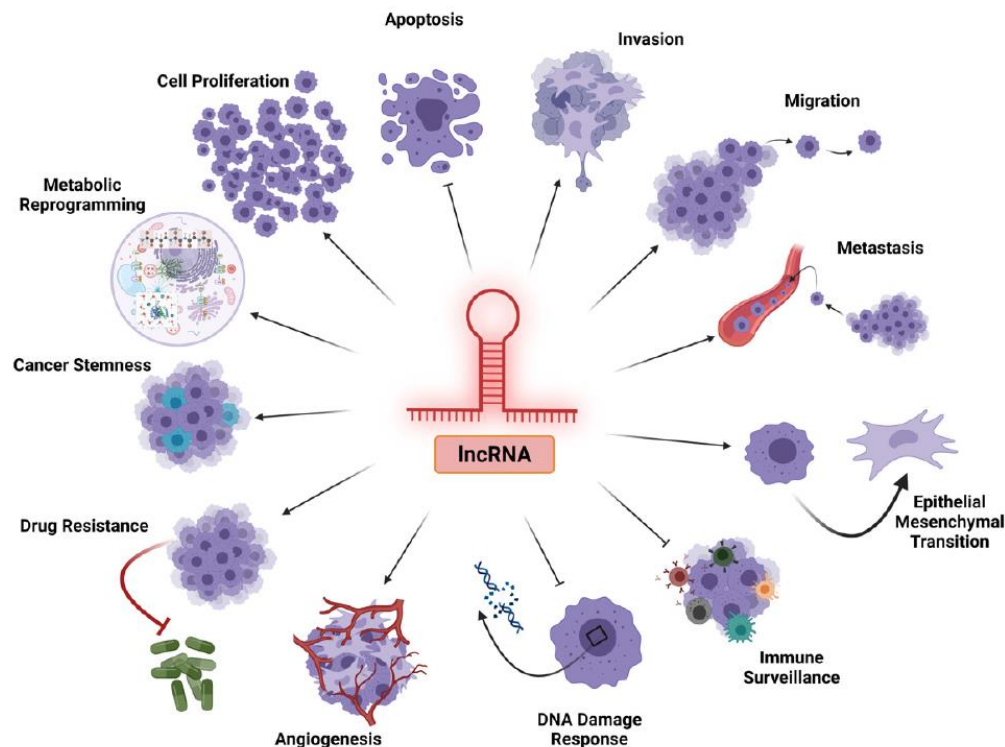
3. Κάποια lncRNA αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες ή/ και RNA μόρια, όπως miRNA, και ρυθμίζουν την έκφραση και την σταθερότητα των mRNA γονιδίων στόχων τους [111, 112]. (Εικόνα 7C)



Εικόνα 7. Ρόλοι των *trans* δραστικών lncRNA [113].

### 1.3.3.LncRNAs και Καρκίνος

Η πρόοδος των τεχνολογιών για την μελέτη των lncRNA τα τελευταία χρόνια και το ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν αυτά έχουν βοηθήσει στην ανακάλυψη ολοένα και περισσότερων βασικών βιολογικών διεργασιών, απαραίτητων για την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση, στις οποίες εμπλέκονται τα lncRNA, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η μετατροπή των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (Epithelial to mesenchymal transition – EMT), διεργασίες οι οποίες αποτελούν ορόσημα για την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου [114, 115]. (Εικόνα 8) Ο καρκίνος είναι κατά βάση μία γενετική ασθένεια και πλέον είναι κατανοητό πως μεταλλάξεις σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος συνεισφέρουν στην δημιουργία της νόσου, ενώ και γενετικοί τόποι που έχει βρεθεί μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης ότι φέρουν μεταλλάξεις και εμπλέκονται στην καρκινογένεση, συχνά φιλοξενούν μη κωδικοποιητικά στοιχεία και ιδιαίτερα lncRNA [116]. Υπάρχουν παραδείγματα lncRNA που εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνου και λειτουργούν είτε ογκοεπαγωγικά είτε ογκοκατασταλτικά [117].



**Εικόνα 8.** Οι πολλαπλοί ρόλοι των lncRNA στην ογκογένεση και την εξέλιξη του όγκου, λειτουργώντας είτε ογκοεπαγωγικά είτε ογκοκατασταλτικά [118].

Πιο συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί πολλά lncRNA των οποίων η αλλαγή του προφίλ έκφρασης συμβάλλει στην δημιουργία του γαστρικού καρκίνου. Το lncRNA H19 έχει βρεθεί πως αυξορρυθμίζεται στον γαστρικό καρκίνο και συσχετίζεται με κακή πρόγνωση των ασθενών. Φυσιολογικά, η έκφρασή του είναι αυξημένη κατά την εμβρυογένεση και μετά την γέννηση μειώνεται κατακόρυφα, ενώ εμπλέκεται και στην ρύθμιση της λειτουργίας του επιθηλίου. Στον γαστρικό καρκίνο, προωθεί τον πολλαπλασιασμό, την διήθηση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του στομάχου μέσω ποικίλων μηχανισμών [119, 120]. Ένα άλλο lncRNA το οποίο αυξάνεται στον γαστρικό καρκίνο είναι το HOTAIR, η αυξημένη έκφραση του οποίου προωθεί την μετάσταση και την διαφυγή από το ανοσοποιητικό. Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης ρυθμίζεται μέσω της στρατολόγησης του συμπλόκου Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) από το HOTAIR, για την σίγηση γονιδίων στόχων λόγω σταθεροποίησης της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 27 της ιστόνης H3 (H3K27me3). Το συγκεκριμένο lncRNA επάγει το φαινόμενο EMT, με καταστολή της έκφρασης του γονιδίου E-καδερίνης (E-cadherin) και, επιπλέον, καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου HER2 μέσω ανταγωνισμού για την πρόσδεση σε miRNA. Τα επίπεδα έκφρασης του HOTAIR φαίνεται πως σχετίζονται με την πρόγνωση για γαστρικό καρκίνο [115, 121, 122]. Το lncRNA ANRIL ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των γαστρικών καρκινικών κυττάρων, γιατί συμμετέχει στη ρύθμιση των μονοπατιών mTOR και CDK6/E2F1 μέσω επιγενετικής σίγησης κατασταλτικών miRNA με στρατολόγηση του συμπλόκου PRC2 [123, 124]. Το lncRNA MALAT-1, το οποίο εμπλέκεται με την διαδικασία της μετάστασης σε πολλούς καρκίνους, στον γαστρικό καρκίνο αλληλεπιδρά με το EZH2, ένζυμο μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών, και εμποδίζει την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου πρωτοκαδερίνη (protocadherin) 10, προωθώντας έτσι την μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, προωθεί και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής και στρατολόγησης του παράγοντα ματίσματος 2/εναλλακτικού παράγοντα ματίσματος (SF2/ASF) [125, 126].

Πέρα από τα ογκοεπαγωγικά, έχουν βρεθεί και αρκετά lncRNA τα οποία έχουν ογκοκατασταλτικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο. Το lncRNA MEG3 (Maternally expressed gene) εκφράζεται συχνά σε χαμηλά επίπεδα σε γαστρικούς καρκινικούς ιστούς και συνδέεται με κακή πρόγνωση των ασθενών. Το MEG3 διεγείρει την απόπτωση μέσω της αλληλεπίδρασης με miRNAs για την ενεργοποίηση της έκφρασης



της πρωτεΐνης Bcl-2 και επάγοντας την μεταγραφή του γονιδίου για την έκφραση της πρωτεΐνης p53 [126-128]. Ένα άλλο lncRNA του οποίου η έκφραση μειώνεται στον γαστρικό καρκίνο είναι το GAS5 (Growth arrest specific 5), το οποίο φυσιολογικά καταστέλλει την κυτταρική διαίρεση και επάγει την απόπτωση μειώνοντας τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 και της κυκλίνης CDK1, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [129, 130].

#### 1.3.4. Τα LncRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες

Όπως ενδεχομένως έχει γίνει κατανοητό μέχρι τώρα, τα lncRNA έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στην εξέλιξη διαφορετικών τύπων καρκίνου και για τον λόγο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η χρήση τους ως προγνωστικοί, διαγνωστικοί και θεραπευτικοί δείκτες για τη νόσο. Τα χαρακτηριστικά που διαθέτουν και τα καθιστούν ιδανικά ως βιοδείκτες είναι τα ακόλουθα. (1) Χαρακτηρίζονται από ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης και μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τα mRNAs, επομένως είναι ιδανικά για την εξειδικευμένη διάγνωση του καρκίνου. (2) Είναι εύκολη η ανίχνευσή τους με PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR/RT-PCR) σε σωματικά υγρά ασθενών, όπως στα ούρα, στο πλάσμα και στο γαστρικό υγρό, τα οποία περιέχουν εξωσώματα, μικρά κυστίδια που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα και περιέχουν, μεταξύ άλλων, lncRNA σε υψηλά ποσοστά. (3) Εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διεργασίες της καρκινογένεσης και η στόχευσή τους είναι μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση [131-133]. Ήδη τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν αναφορές για συγκεκριμένα lncRNA τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί και διαγνωστικοί μοριακοί βιοδείκτες για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού (**Πίνακας 1, 2**) και αναμένεται η ευρεία εφαρμογή τους σε κλινικό επίπεδο [134, 135].

**Πίνακας 1.** LncRNA ως διαγνωστικοί βιοδείκτες στον γαστρικό καρκίνο [135].

Clinical application	LncRNA	Expression	Diagnosis accuracy
Diagnostic biomarker	H19	up	AUC was 0.838; p<0.001; sensitivity, 82.9%; specificity, 72.9%
	FAM49B-AS, GUSBP11 and CTDHUT	up	The combined area under curve of these lncRNAs was 0.818
	lnc-GNAQ-6:1	down	AUC was 0.732
	UCA1	up	AUC was 0.759; The sensitivity and specificity were 93.20% and 78.63%
	B3GALT5-AS1	up	AUC was 0.816
	HOTAIR	up	AUC was 0.8416; The sensitivity and specificity were 66.67 and 87.04%
	lncUEG1	up	AUC was 0.8406
	PANDAR, FOXD2-AS1, and SMARCC2	up	The AUC of the combinative diagnostic value of these three lncRNAs was 0.839
	TINCR, CCAT2, AOC4P, BANCR, and LINC00857	up	The AUC of the combinative diagnostic value of these five lncRNAs was 0.91

*Πίνακας 2.* LncRNA ως προγνωστικοί βιοδείκτες στον γαστρικό καρκίνο [135].

Clinical application	LncRNA	Expression	Clinical significance
Prognostic biomarker	CASC19	up	Higher pathologic TNM stage, pathologic T stage, lymph node metastasis, and poor overall survival
	SNHG6	up	Invasion depth, lymph node metastasis, distant metastasis and TNM stage
	MIR100HG	up	TNM stage, tumor invasion, lymph node metastasis, and distant metastasis
	Sox2ot	up	TNM stage, tumor depth, lymph node metastasis, and distant metastasis
	MALAT1	up	Distant metastasis
	NEAT1	up	Clinical stage, histological type, lymph node metastasis, and distant metastasis
	SNHG8	up	Predicts poor prognosis, shorter survival time
	CTD-2510F5.4		Pathological grade, vascular or nerve invasion, AJCC TNM stage and OS, shorter MST

## 2. Σκοπός

Ο καρκίνος του στομάχου χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, λόγω της έλλειψης ασφαλών, γρήγορων και οικονομικών μεθόδων ανίχνευσης σε πρόωρο στάδιο. Επομένως, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων, μη επεμβατικών, προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών για την έγκαιρη ανίχνευση της νόσου. Μία πολλά υποσχόμενη τάξη μορίων που μπορούν να αξιοποιηθούν στην μοριακή διαγνωστική είναι τα lncRNA, τα οποία διακρίνονται για την εξειδικευμένη έκφρασή τους σε επίπεδο κυττάρων και ιστών και για την διαφορεική τους έκφραση σε διάφορα είδη καρκίνου, και στον γαστρικό.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη και ο χαρακτηρισμός ενός lncRNA, που ονομάζεται Gracile5 (Gastric Cancer Induced lincRNA 5) και ενός υποψήφιου γονιδίου στόχου του, του Gracile5 target (GR5T). Στα πλαίσια μελέτης πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA και με τη χρήση της βάσης δεδομένων GEPIA. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης των δύο γονιδίων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές έπειτα από υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων, που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην καρκινογένεση του στομάχου, καθώς και με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι αυτών. Επιπροσθέτως, κατασκευάστηκαν μοριακά εργαλεία για την μελέτη των δύο γονιδίων μέσω πειραμάτων υπερέκφρασης, παροδικής καταστολής και μέσω μεταλλαξογένεσης. Για τον σκοπό αυτό, κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς μόρια shRNA και sgRNA και πραγματοποιήθηκε γενετική τροποποίηση καρκινικών κυτταρικών σειρών για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων λόγω απουσίας των Gracile5 και GR5T.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1.Υλικά

##### 3.1.1.Αλληλουχίες

Για την μελέτη και τον χαρακτηρισμό του lncRNA και του γονιδίου στόχου του, χρησιμοποιούνται η τεχνική παροδικής αποσιώπησης του γονιδίου (RNAi) και τεχνικές CRISPR-Cas9, είτε για απενεργοποίηση των γονιδίων (knockout) είτε μία παραλλαγή του συστήματος, το CRISPR Activation, για ενεργοποίηση και υπερέκφραση των γονιδίων. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάζονται αλληλουχίες short hairpin RNA (shRNA) ειδικές για το Gracile5 και το γονίδιο στόχο του, οι οποίες φέρουν κατάλληλα άκρα και μπορούν να ενσωματωθούν στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM. Ακόμα, σχεδιάζονται αλληλουχίες single guide RNA (sgRNA), δύο για την στόχευση του Gracile5 και του γονιδίου στόχου του, οι οποίες φέρουν κατάλληλα άκρα για την ενσωμάτωσή τους στον πλασμιδιακό φορέα pX333, ο οποίος χρησιμοποιείται για την δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τα δύο sgRNA και καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων στόχων.

##### 3.1.2.Πλασμιδιακοί φορείς

###### **pLVTHM**

Ο πλασμιδιακός φορέας pLVTHM (μέγεθος 11.113 ζεύγη βάσεων) είναι ένα σύστημα που στηρίζεται σε λεντιϊκό φορέα και χρησιμοποιείται για την επαγόμενη έκφραση siRNA σε σταθερές μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Επιπλέον, αξιοποιείται και ως σύστημα παροδικής έκφρασης για τον άμεσο έλεγχο των αποτελεσμάτων μετά από καταστολή ενός γονιδίου στόχου. Η αλληλουχία περιλαμβάνει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη για την επιλογή των μετασηματισμένων βακτηριακών αποικιών με τον πλασμιδιακό φορέα, γονίδιο για την έκφραση της φθορίζουσας χρωστικής GFP, που επιβεβαιώνει την διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών μετά από παρατήρηση σε μικροσκόπιο. Επιπλέον, περιέχει τις κατάλληλες αλληλουχίες για την επαγόμενη από την δοξυκυκλίνη έκφραση του

shRNA, ωστόσο στα παρόντα πειράματα δεν αξιοποιήθηκε το συγκεκριμένο σύστημα. Περιλαμβάνει, επίσης, τις κατάλληλες αλληλουχίες για την ενσωμάτωση των shRNA.

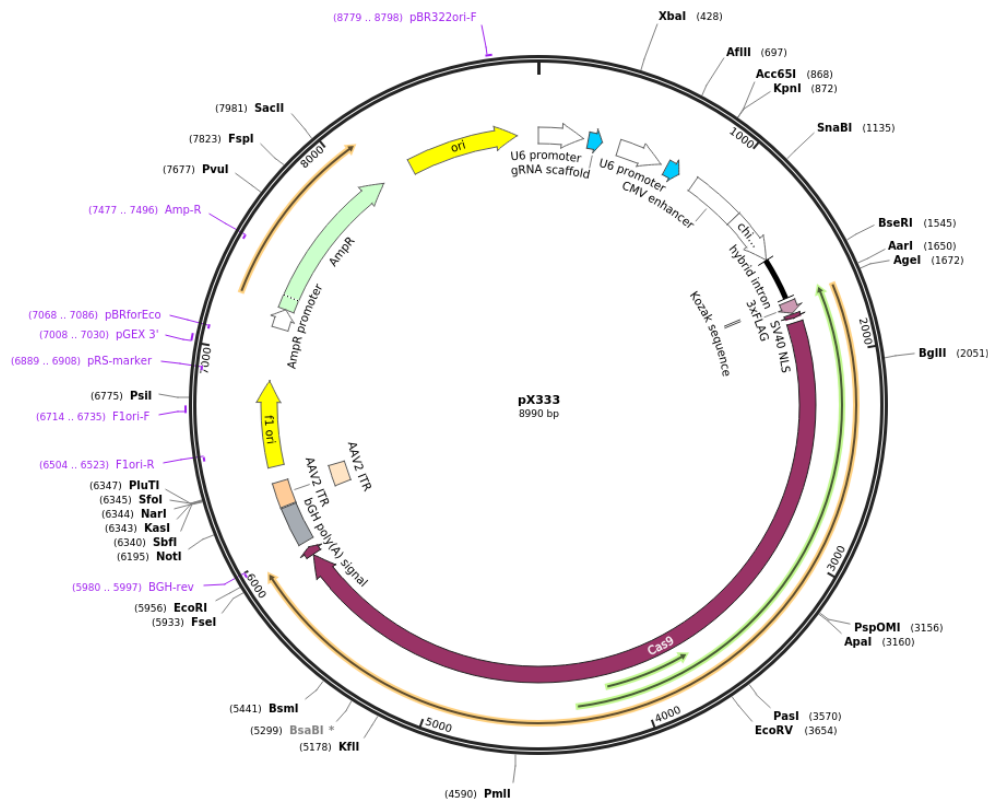
Created with SnapGene®



**Εικόνα 9.** Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM. Αριθμός καταλόγου Addgene 12247.

### **pX333**

Ο πλασμιδιακός φορέας pX333 με μέγεθος 8.890 ζεύγη βάσεων χρησιμοποιείται για την διαδοχική έκφραση δύο sgRNA από ανεξάρτητους υποκινητές U6. Επιπλέον, φέρει και το γονίδιο της Cas9 πρωτεΐνης, το οποίο μεταγράφεται από τον υποκινητή Cbh. Φέρει, επιπλέον, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών αποικιών με τον πλασμιδιακό φορέα. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται για την παροδική έκφραση της Cas9 και των δύο sgRNA σε κύτταρα.



**Εικόνα 10.** Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pX333. Αριθμός καταλόγου Addgene 64073.

### 3.1.3.Κυτταρικές σειρές

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιούνται οι εξής κυτταρικές σειρές:

- HEK, προέρχεται από εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού και χρησιμοποιείται για την παραγωγή λεντιών.
- AGS, προέρχεται από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα με επιθηλιακή μορφολογία.
- LDC10, προέρχεται από την κυτταρική σειρά LS174T, από καρκίνο του παχέος εντέρου, στην οποία έχει επιτευχθεί σταθερή ενσωμάτωση του συστήματος έκφρασης dCas9 (dead Cas) για υπερέκφραση γονιδίων στόχων.
- AGDC16, προέρχεται από την κυτταρική σειρά AGS στην οποία έχει επιτευχθεί σταθερή ενσωμάτωση του συστήματος έκφρασης dCas9 (dead Cas) για υπερέκφραση γονιδίων στόχων.
- HFE145, προέρχεται από φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου.

## 3.2. Μέθοδοι

### 3.2.1. Βιοπληροφορική Ανάλυση

Για την επιλογή και την μελέτη ενός lncRNA που να φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον γαστρικό καρκίνο, έγινε ανάλυση δεδομένων RNA-seq από φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς διαφόρων τύπων καρκίνου, από δείγματα βιοψίας διαφορετικών υποτύπων γαστρικού καρκίνου και από διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες. Παράλληλα, ελέγχθηκε και η έκφραση ενός πιθανού γονιδίου στόχου του συγκεκριμένου lncRNA και έγινε προσπάθεια συσχέτισης της έκφρασης των δύο μεταγράφων σε διαφορετικές συνθήκες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό υπολογιστικού φύλλου Microsoft Excel. Για την στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε Student's t-test και Ανάλυση Διακύμανσης δύο παραγόντων (two way ANOVA), με  $p < 0.05$  να θεωρείται στατιστικά σημαντικό. Επιπλέον, έγινε και χρήση του εργαλείου GEPIA, το οποίο αξιοποιείται για το προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς και την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων.

### 3.2.2. Αντίδραση Λιγάνσης

#### 3.2.2.1. Αντίδραση Λιγάνσης για shRNA

Για την κλωνοποίηση των shRNA, το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων με την ανάμειξη 2  $\mu\text{L}$  sense oligo (100 mM), 2  $\mu\text{L}$  antisense oligo (100 mM) και 96  $\mu\text{L}$  Διαλύματος Υβριδοποίησης (Annealing Buffer), (KAc 100 mM, Hepes-KOH 30 mM/pH 7.4, MgAc 2 mM) και επώαση για 5 λεπτά στους 95 °C. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε διαδοχική πέψη του πλασμιδιακού φορέα pLVTHM με τα ένζυμα περιορισμού MluI-High Fidelity και ClaI της εταιρίας New England BioLabs (NEB), για την δημιουργία κατάλληλων μονόκλωνων άκρων του φορέα για την ενσωμάτωση του ενθέματος (**Πίνακας 3**).

**Πίνακας 3.** Σύσταση αντίδρασης πέψης για προετοιμασία του φορέα pLVTHM

Συστατικά	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	1,5 $\mu\text{g}$
CutSmart Buffer (10X), NEB	5 $\mu\text{L}$
Ένζυμο περιορισμού, NEB	1,5 $\mu\text{L}$

ddH <sub>2</sub> O	43 $\mu$ L
V <sub>Τελικό</sub>	50 $\mu$ L

Ακολουθήσε η αντίδραση λιγάσης για την ενσωμάτωση του εκάστοτε ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα, η οποία πραγματοποιείται στους 16 °C για 16 ώρες (**Πίνακας 4**). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και αντίδραση λιγάσης χωρίς την παρουσία ενθέματος και χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

**Πίνακας 4.** Σύσταση αντίδρασης λιγάσης φορέα pLVTHM

Συστατικά	Ποσότητα
Ένθεμα dsOligo	2 $\mu$ L
Πλασμιδιακός φορέας pLVTHM	50 ng
T4 ligase (400 u/ $\mu$ L), EnzyQuest	0,5 $\mu$ L
T4 ligase buffer (10X), NEB	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τα 1 $\mu$ L
V <sub>Τελικό</sub>	10 $\mu$ L

### 3.2.2.2. Αντίδραση Λιγάσης για sgRNA

Για την κλωνοποίηση των single guide RNA (sgRNA), το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων με την ανάμειξη 2  $\mu$ L sense oligo (100 mM), 2  $\mu$ L antisense oligo (100 mM) και 96  $\mu$ L Διαλύματος Υβριδοποίησης και επώαση για 5 λεπτά στους 95 °C. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pX333 με το ένζυμο περιορισμού BbsI (NEB), για την δημιουργία κατάλληλων μονόκλωνων άκρων του φορέα για την ενσωμάτωση του sgRNA1. Μετά την επιβεβαίωση εισαγωγής του sgRNA1 (η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω), πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BsaI (NEB), για την δημιουργία κατάλληλων μονόκλωνων άκρων του φορέα για την ενσωμάτωση του sgRNA2.



**Πίνακας 5.** Σύσταση αντίδρασης πέψης του φορέα pX333

Συστατικά	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	5 µg
CutSmart Buffer (10X), NEB	5 µL
BsaI, NEB	1,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	43 µL
V <sub>Τελικό</sub>	50 µL

Ακολουθήσε η αντίδραση λιγάσης για την ενσωμάτωση του εκάστοτε ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα, η οποία πραγματοποιείται στους 16 °C για 16 ώρες (Πίνακας 6). Επιπλέον, πραγματοποιείται και αντίδραση λιγάσης χωρίς την παρουσία ενθέματος και χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

**Πίνακας 6.** Σύσταση αντίδρασης λιγάσης φορέα pLVTHM

Συστατικά	Ποσότητα
Ένθεμα dsOligo	4 µL
Πλασμιδιακός φορέας pX333	50 ng
T4 ligase (400 u/µL), EnzyQuest	1 µL
T4 ligase buffer (10X), NEB	2 µL
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τα 20 µL
V <sub>Τελικό</sub>	20 µL

### 3.2.3.Μετασχηματισμός Πλασμιδιακών Κατασκευών σε Βακτήρια

Μετά την αντίδραση λιγάσης, ακολουθήσε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με την διαδικασία του θερμικού σοκ (heatshock). Συγκεκριμένα, για τον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM με ένθεμα shRNA χρησιμοποιείται το στέλεχος Stbl3 για την ελαχιστοποίηση των γεγονότων ανασυνδυασμού, ενώ για τον πλασμιδιακό φορέα pX333 με ένθεμα sgRNAs το στέλεχος DH5a. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν απομονωμένες αποικίες για την δημιουργία υγρών καλλιιεργειών (2 mL θρεπτικό LB με αμπικιλίνη και ολονύχτια επώαση στους 37 °C) και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε πρώτο στάδιο με αλκαλική λύση και, μετά από ανακαλλιέργεια των θετικών κλώνων, με το NucleoSpin Plasmid mini kit for plasmid DNA της εταιρίας Macherey-Nagel.

### 3.1.4. Διαγνωστική Πέψη και PCR

#### 3.2.4.1. Διαγνωστικές PCR και Διαγνωστική Πέψη - shRNA

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης των shRNA στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR σε απομονωμένα πλασμίδια με κατάλληλους εκκινητές (primers), οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί ώστε να υβριδίζουν σε αλληλουχίες του φορέα (**Πίνακας 7**).

**Πίνακας 7.** Πρωτόκολλο διαγνωστικής PCR για επιβεβαίωση ένθεσης shRNA.

Συστατικά	Ποσότητα (μL)
Πλασμιδιακό DNA	1
dNTPs (10 mM)	0,5
(Forward) Sp6 primer (10 μM)	1
(Reverse) H1 primer (10 μM)	1
Taq polymerase (5 u/μL), Kapa Biosystems	0,15
Taq buffer (10X), Kapa Biosystems	5
ddH <sub>2</sub> O	41,35
V <sub>Τελικό</sub>	50

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	2 λεπτά
Αποδιάταξη	95	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	55	10 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72	30 δευτερόλεπτα
Κύκλοι	25	
Τελική επιμήκυνση	72	2 λεπτά

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης πραγματοποιείται, επιπλέον, και διαγνωστική πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον **πίνακα 8** και πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, στους 37 °C για 2 ώρες.

**Πίνακας 8.** Πρωτόκολλο διαγνωστικής πέψης για επιβεβαίωση ένθεσης shRNA.

Συστατικά	Ποσότητα (μL)
Πλασμιδιακό DNA	5

M buffer (10X), Takara	5
XbaI, Takara	1
EcoRI, Takara	1
ddH <sub>2</sub> O	38
V <sub>Τελικό</sub>	50

Στη συνέχεια, τα δείγματα και στις δύο περιπτώσεις ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τον καλό διαχωρισμό των ζωνών, καθώς στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος, δηλαδή ένθεση του shRNA, το προϊόν που προκύπτει αντιστοιχεί σε μία ζώνη που διαφέρει κατά 50 ζεύγη βάσεων σε σχέση με τον μη ανασυνδυασμένο φορέα. Πριν την ηλεκτροφόρηση, στα δείγματα προστίθενται 10  $\mu$ L Loading Dye 6X, ενώ ταυτόχρονα ηλεκτροφορείται και πλασμίδιο, στο οποίο κατά το στάδιο της αντίδρασης λιγάσης δεν είχε ένθεμα και επανακυκλοποιήθηκε (self ligation), ως αρνητικός μάρτυρας.

#### 3.2.4.2. Διαγνωστική PCR – sgRNAs

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης του πρώτου single guide RNA (sg1RNA) στον πλασμιδιακό φορέα pX333 πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR σε απομονωμένα πλασμίδια με κατάλληλους εκκινητές (primers), εκ των οποίων ο ένας υβριδίζει σε αλληλουχία του φορέα και ο άλλος είναι η μονόκλωνη αλληλουχία του νοηματικού (sense) ολιγονουκλεοτιδίου που χρησιμοποιήθηκε και για την παρασκευή του δίκλωνου μορίου guide RNA (**Πίνακας 9**).

**Πίνακας 9.** Πρωτόκολλο διαγνωστικής PCR για επιβεβαίωση ένθεσης sgRNA1.

Συστατικά	Ποσότητα ( $\mu$ L)
Πλασμιδιακό DNA	1
dNTPs (10 mM)	0,5
Πρόσθιος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1
Ανάστροφος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1
Taq polymerase (5 u/ $\mu$ L), Kapa Biosystems	0,15
Taq buffer (10X), Kapa Biosystems	5
ddH <sub>2</sub> O	41,35
V <sub>Τελικό</sub>	50

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	2 λεπτά
Αποδιάταξη	95	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	60	15 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72	40 δευτερόλεπτα
Κύκλοι	25	
Τελική επιμήκυνση	72	2 λεπτά

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, αφού πρώτα προστέθηκαν σε αυτά 10  $\mu$ L Loading Dye 6X. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα δείγμα self ligation ως αρνητικός μάρτυρας.

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης του δεύτερου single guide RNA (sgRNA2) στον πλασμιδιακό φορέα pX333 πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR σε απομονωμένα πλασμίδια με κατάλληλους εκκινητές (primers), εκ των οποίων ο ένας υβριδίζει σε αλληλουχία του φορέα και ο άλλος είναι η μονόκλωνη αλληλουχία του νοηματικού (sense) ολιγονουκλεοτιδίου που χρησιμοποιήθηκε και για την παρασκευή του δίκλωνου μορίου guide RNA (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Πρωτόκολλο διαγνωστικής PCR για επιβεβαίωση ένθεσης sgRNA2.

Συστατικά	Ποσότητα ( $\mu$ L)
Πλασμιδιακό DNA	1
dNTPs (10 mM)	0,5
Πρόσθιος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1
Ανάστροφος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1
Taq polymerase (5 u/ $\mu$ L), Kapa Biosystems	0,15
Taq buffer (10X), Kapa Biosystems	5
ddH <sub>2</sub> O	41,35
V <sub>Τελικό</sub>	50

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
--------	------------------	----------

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95	2 λεπτά
<b>Αποδιάταξη</b>	95	10 δευτερόλεπτα
<b>Υβριδοποίηση</b>	60	15 δευτερόλεπτα
<b>Επιμήκυνση</b>	72	25 δευτερόλεπτα
<b>Κύκλοι</b>	25	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72	2 λεπτά

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, αφού πρώτα προστέθηκαν σε αυτά 10  $\mu$ L Loading Dye 6X. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα δείγμα self ligation ως αρνητικός μάρτυρας.

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης και των δύο single guide RNA στον φορέα πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR σε απομονωμένα πλασμίδια με εκκινητές, εκ των οποίων ο ένας είναι η μονόκλωνη αλληλουχία του νοηματικού (sense) ολιγονουκλεοτιδίου που χρησιμοποιήθηκε και για την παρασκευή του δίκλωνου μορίου guide RNA 1 (sgRNA1) και ο δεύτερος είναι η μονόκλωνη αλληλουχία του αντινοηματικού (Antisense) ολιγονουκλεοτιδίου που χρησιμοποιήθηκε και για την παρασκευή του δίκλωνου μορίου guide RNA 2 (sgRNA2) (**Πίνακας 11**).

**Πίνακας 11.** Πρωτόκολλο διαγνωστικής PCR για επιβεβαίωση ένθεσης και των δύο sgRNA.

Συστατικά	Ποσότητα ( $\mu$ L)
Πλασμιδιακό DNA	1
dNTPs (10 mM)	0,5
Πρόσθιος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1
Ανάστροφος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1
Taq polymerase (5 u/ $\mu$ L), Kapa Biosystems	0,15
Taq buffer (10X), Kapa Biosystems	5
ddH <sub>2</sub> O	41,35
V <sub>Τελικό</sub>	50

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
--------	------------------	----------

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95	2 λεπτά
<b>Αποδιάταξη</b>	95	10 δευτερόλεπτα
<b>Υβριδοποίηση</b>	60	15 δευτερόλεπτα
<b>Επιμήκυνση</b>	72	30 δευτερόλεπτα
<b>Κύκλοι</b>	25	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72	2 λεπτά

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, αφού πρώτα προστέθηκαν σε αυτά 10  $\mu$ L Loading Dye 6X. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα δείγμα self ligation ως αρνητικός μάρτυρας.

### 3.2.5. Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

#### 3.2.5.1. Διαμόλυνση με την χρήση JetPrime

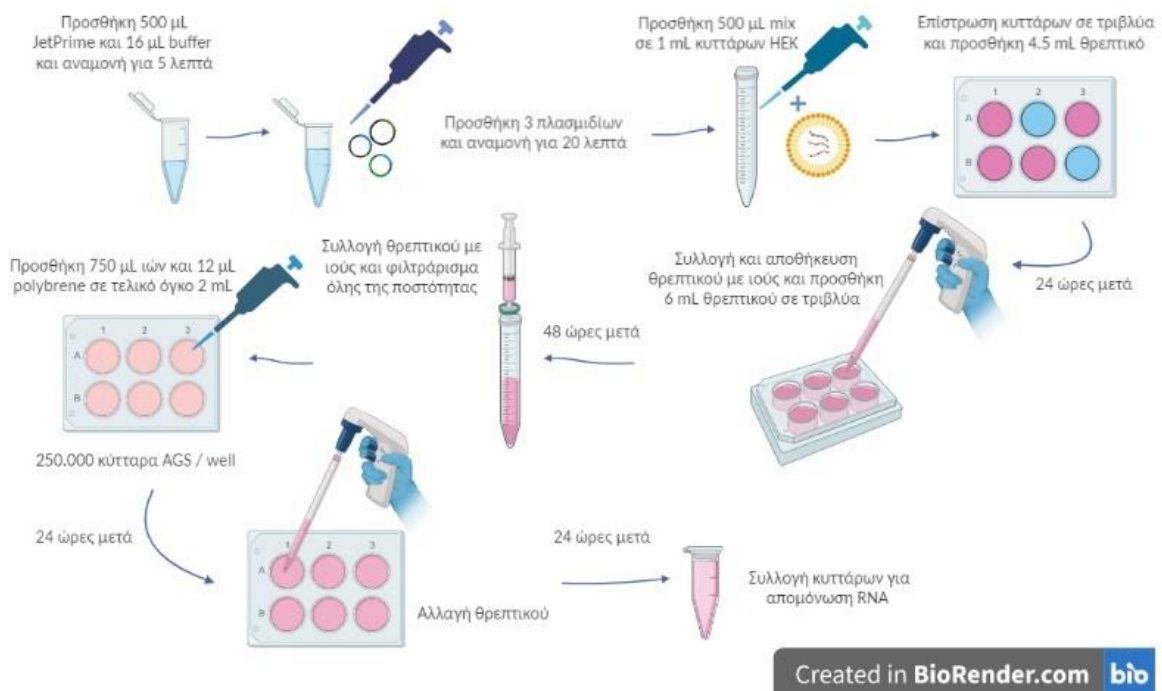
Οι κατασκευές pLVTHM που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιούνται για την διαμόλυνση της καρκινικής κυτταρικής σειράς του στομάχου AGS με το σύστημα με λεντιούς. Για την παραγωγή των λεντιών χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά HEK, η οποία μετασχηματίζεται με τρία πλασμίδια: 1) Τον πλασμιδιακό φορέα που έχει κατασκευαστεί στο εργαστήριο και φέρει την αλληλουχία shRNA, 2) το πλασμίδιο PAX2 το οποίο εκφράζει τις πρωτεΐνες για το πακετάρισμα του λεντιού και 3) το πλασμίδιο PMD2G που εκφράζει πρωτεΐνες απαραίτητες για την συναρμολόγηση φακέλου του λεντιού. Για την επιτυχία της διαμόλυνσης χρησιμοποιείται ο λιποφιλικός παράγοντας JetPrime, ο οποίος αναμειγνύεται με τα τρία πλασμίδια και δημιουργούνται λιπόφιλα σφαιρίδια, τα οποία αλληλεπιδρούν και συντήκονται με την λιποφιλικής φύσης κυτταρική μεμβράνη, διευκολύνοντας την διαδικασία. Οι αναλογίες των συστατικών για παραγωγή των σφαιριδίων φαίνεται στον **πίνακα 12**.

**Πίνακας 12.** Συστατικά για την διαμόλυνση κυττάρων με JetPrime.

<b>Συστατικά</b>	<b>Ποσότητα</b>
JetPrime, Polyplus	16 $\mu$ L
JetPrime buffer	500 $\mu$ L

ρLVTHM πλασμίδιο	4 μg
PAX 2	4 μg
PMD2G	2 μg

Για την γενετική τροποποίηση χρησιμοποιούνται 500 μL από το mix που περιγράφεται στον παραπάνω πίνακα και 1 mL κυττάρων HEK και 4.5 mL θρεπτικό DMEM (Gibco), για τελικό όγκο 6 mL και επίστρωση σε τριβλύα. Η συλλογή του θρεπτικού που περιέχει τους ιούς και το φιλτράρισμα των ιών πραγματοποιείται δύο φορές, η πρώτη 24 ώρες μετά την διαμόλυνση και η δεύτερη 72 ώρες μετά την διαμόλυνση. Ο ιός που συλλέγεται χρησιμοποιείται για την διαμόλυνση των κυττάρων AGS για την μελέτη των αποτελεσμάτων μετά από καταστολή του γονιδίου στόχου (Gracile5 και GR5T). Η επίστρωση των κυττάρων πραγματοποιείται σε τριβλύα 6-well και επιστρώνονται  $2 \cdot 10^5$  κύτταρα/well, τα οποία περιέχονται σε 750 μL θρεπτικό RPMI (Gibco) και, επιπλέον, προστίθεται 750 μL από τον φιλτραρισμένο ιό και 12 μL polybrene. Η συλλογή των κυττάρων για την απομόνωση RNA και τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων με qPCR γίνεται τρεις ημέρες μετά την διαμόλυνση.



**Εικόνα 11.** Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας διαμόλυνσης κυττάρων με το αντιδραστήριο JetPrime.

Παρόμοια διαδικασία ακολουθείται και για την παραγωγή λεντιών με τον πλασμιδιακό φορέα pLVU6 για την παραγωγή ενός sgRNA που στοχεύει αλληλουχίες του πιθανού υποκινητή δύο ισομορφών του Gracile5, της μικρής (short) και μακριάς (Long), και χρησιμοποιείται για το σύστημα CRISPR Activation. Η κατασκευή του pLVU6 υπήρχε έτοιμη στο εργαστήριο και αξιοποιήθηκε για την παρούσα πτυχιακή εργασία. Για το πείραμα αυτό γίνεται χρήση των κυττάρων AGDC16 και LDC10, στα οποία γίνεται διαμόλυνση με λεντιούς, έπειτα από 24 ώρες γίνεται αλλαγή θρεπτικού και αφαίρεση του ιού και η συλλογή κυττάρων για απομόνωση RNA και έλεγχο της έκφρασης γονιδίων στόχων πραγματοποιείται 24 και 72 ώρες από την στιγμή της διαμόλυνσης.

### 3.2.2.2. Διαμόλυνση με την χρήση λιποφεκταμίνης

Ο πλασμιδιακός φορέας pX333 που φέρει τα δύο sgRNAs για στόχευση του γονιδίου GR5T χρησιμοποιείται για την διαμόλυνση κυττάρων AGS. Για την επιλογή κλώνων κυττάρων που έχει λάβει τον φορέα, ο οποίος δεν εκφράζει κάποιο γονίδιο επιλογής (selection marker), χρησιμοποιείται και ένα ακόμα πλασμίδιο, pcDNA6/TR, το οποίο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην βλαστισιδίνη. Η διαμόλυνση επιτυγχάνεται με την χρήση λιποφεκταμίνης (Lipofectamine 2000, Invitrogen), η οποία σχηματίζει λιποσώματα που αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων και διευκολύνει την είσοδο του DNA στα κύτταρα. Οι αναλογίες των συστατικών για παραγωγή των σφαιριδίων φαίνεται στον **πίνακα 13**.

**Πίνακας 13.** Συστατικά για διαμόλυνση κυττάρων με λιποφεκταμίνη.

Συστατικά	Ποσότητα
Lipofectamine 2000, Invitrogen (1 µg/µL)	4 µL
Opti-MEM	250 µL
pX333	1.8 µg
pcDNA6/TR	0.2 µg

Το παραπάνω mix αναμειγνύεται με  $5 \cdot 10^5$  κύτταρα AGS και προστίθεται θρεπτικό RPMI 1640 (Gibco) μέχρι τελικό όγκο 6 mL. Αυτός ο όγκος κυττάρων επιστρώνεται σε τρία τριβλύα ως εξής: 1) 5 mL, 2) 800 µL και 3) 200 µL, και προστίθεται θρεπτικό DMEM (Gibco) μέχρι τελικό όγκο 7 mL. Την επόμενη ημέρα, γίνεται αλλαγή θρεπτικού με θρεπτικό επιλογής RPMI που περιέχει βλαστισιδίνη (10



μg/mL). Έτσι, θα αναπτυχθούν μόνο κύτταρα τα οποία έλαβαν μόνο το πλασμίδιο pcDNA6/TR ή και τα δύο πλασμίδια. Τρεις ημέρες αργότερα γίνεται αλλαγή θρεπτικού με RPMI χωρίς αντιβιοτικό. Έπεται η συλλογή κλώνων που αναπτύσσονται και η μεταφορά τους σε 12-well τριβλύα για μεγαλύτερη ανάπτυξη και, τέλος, η συλλογή κλώνων για απομόνωση DNA και γονοτύπηση.

### 3.2.6.Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA από κύτταρα πραγματοποιείται με την προσθήκη 1 mL τριζόλης (TRI reagent, MRC) σε τριβλύα ανάπτυξης των κυττάρων, αναμονή για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, συλλογή των δειγμάτων σε σωληνάρια (tubes) τύπου erpendorf και μεταφορά σε πάγο. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μL χλωροφόρμιο για την δημιουργία δύο φάσεων, οργανικής και υδατικής, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4 °C και στα 14.000 rpm. Έπειτα γίνεται συλλογή της υδατικής φάσης, η οποία περιέχει το RNA, και ένα βήμα καθαρισμού με ισοπροπανόλη. Συγκεκριμένα, προστίθενται 500 μL ισοπροπανόλη και 5 μL γλυκογόνο (20 mg/mL), αναμονή για 10 λεπτά σε πάγο και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4 °C και στα 14.000 rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500 μL 70 % παγωμένη αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4 °C και στα 14.000 rpm. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος, αφού έχει προηγηθεί η απόρριψη του υπερκείμενου, σε H<sub>2</sub>O, θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά και αποθήκευση στους -80 °C.

### 3.2.7.Κατεργασία με DNAάση

Για την απομάκρυνση τυχόν υπολειπόμενου DNA πραγματοποιείται η κατεργασία των δειγμάτων με DNAάση, η οποία καταστρέφει το DNA αλλά όχι και το RNA. Η σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον **πίνακα 14** και πραγματοποιείται επώαση για 1 ώρα στους 37 °C.

**Πίνακας 14.** Σύσταση αντίδρασης DNAάσης.

Συστατικά	Ποσότητα (μL)
Δείγμα RNA	25
DNAase (1u/ μL), Thermo	1
Buffer 10X, Thermo	3

RNAase out (40 u/ $\mu\text{L}$ ), Invitrogen	0.5
ddH <sub>2</sub> O	0.5
V <sub>Τελικό</sub>	30

Έπεται ένα βήμα καθαρισμού, με προσθήκη 40  $\mu\text{L}$  οξικού νατρίου 3M/pH 5.2, 330  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O και 400  $\mu\text{L}$  Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισομυλική (25:24:1) και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4 °C και στα 14.000 rpm. Έπειτα γίνεται συλλογή της υδατικής φάσης, προσθήκη 1000  $\mu\text{L}$  100 % παγωμένη αιθανόλη και επώαση στους -80 °C για 1 ώρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4 °C και στα 14.000 rpm, απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  70 % παγωμένη αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4 °C και στα 14.000 rpm. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος, αφού έχει προηγηθεί η απόρριψη του υπερκείμενου, σε H<sub>2</sub>O, θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά και αποθήκευση στους -80 °C.

### 3.2.8.Σύνθεση cDNA

Για την σύνθεση του cDNA από δείγματα RNA απαιτούνται 1000 ng δείγματος σε τελικό όγκο 10  $\mu\text{L}$ . Προστίθενται 1  $\mu\text{L}$  Random hexamers (100 mM), Takara και 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM) και τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στους 65 °C. Έπειτα προστίθενται τα υπόλοιπα αντιδραστήρια σύμφωνα με τον **πίνακα 15** και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 2 ώρες. Μετά το τέλος την αντίδρασης, προστίθενται 380  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O και αποθήκευση στους -20 °C.

**Πίνακας 15.** Σύσταση αντίδρασης σύνθεσης cDNA.

Συστατικά	Ποσότητα ( $\mu\text{L}$ )
DTT 0.1 M (500 u/ $\mu\text{L}$ ), Invitrogen	2
Buffer P5 5X, Invitrogen	2
M-MLV (200 u/ $\mu\text{L}$ ), Invitrogen	1
RNAase out (40 u/ $\mu\text{L}$ ), Invitrogen	0.5
ddH <sub>2</sub> O	0.5

### 3.2.9. qPCR

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης γονιδίων αξιοποιείται η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real time quantitative PCR – qPCR), η οποία στηρίζεται στην ικανότητα της χρωστικής SYBR Green να προσδένεται ισχυρά μόνο σε δίκλωνο DNA και να φθορίζει. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων προς εξέταση χρησιμοποιούνται γονίδια ιδιосύστατης έκφρασης GAPDH και RPLP1. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιείται το λογισμικό και το μηχάνημα της εταιρίας BioRad. Η σύσταση της αντίδρασης περιγράφεται στον **πίνακα 16**, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με το πρόγραμμα CFX manager της BioRad και με το λογισμικό υπολογιστικού φύλλου Microsoft Excel.

**Πίνακας 16.** Σύσταση αντίδρασης qPCR.

Συστατικά	Ποσότητα (μL)
Δείγμα	4
Πρόσθιος&Ανάστροφος εκκινητής (10mM)	2
SYBR MIX, KAPA	10
ddH <sub>2</sub> O	4
V <sub>Τελικό</sub>	20

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	5 λεπτά
Αποδιάταξη	95	20 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	58	2 λεπτά
Επιμήκυνση	72	15 δευτερόλεπτα
Κύκλοι	45	

## **Stem Loop qPCR**

Για τον έλεγχο της έκφρασης και παραγωγής του shRNA για το Gracile5, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της qPCR με stem loop εκκινητή. Η διαφορά με την προηγούμενη qPCR είναι πως κατά το στάδιο της σύνθεσης του cDNA προστέθηκαν σε ίση ποσότητα (0.5  $\mu$ L) Random Hexamers και stem loop GR5 εκκινητής (Eurofins), ο οποίος αποτελείται από ένα τμήμα συμπληρωματικό με την αλληλουχία του shRNA και ένα τμήμα με δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια, για την qPCR χρησιμοποιήθηκε ένας εκκινητής (universal) που αναγνωρίζει την αλληλουχία του shRNA και ένας εκκινητής που είναι συμπληρωματικός με την συντηρημένη αλληλουχία φουρκέτας του stem loop. Τα υπόλοιπα στοιχεία της qPCR είναι ίδια με εκείνα που αναφέρθηκαν παραπάνω.

### 3.2.10. Δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών

Η δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού αποικιών (Colony Formation Assay – CFA) είναι μία *in vitro* μέθοδος ελέγχου για την κυτταρική επιβίωση που στηρίζεται στην ιδιότητα ενός μοναδιαίου κυττάρου να αναπτύσσεται σε αποικία. Αξιοποιήθηκε για τον φαινοτυπικό έλεγχο των αποτελεσμάτων έπειτα από καταστολή του γονιδίου GR5T με τη χρήση του φορέα pLVTHM. Για την χρώση χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα AGS τα οποία υποβλήθηκαν σε διαμόλυνση με λεντιούς που φέρουν το shRNA για το γονίδιο στόχο. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI (Gibco) και, έπειτα από την ολοκλήρωση του άλλου πειράματος, έγινε χρώση με την χρωστική Coomassie Blue η οποία προστίθεται για 5 λεπτά και έπειτα απομακρύνεται με διαδοχικές πλύσεις με νερό. Έπειτα, τα τριβλύα 6 well αφήνονται να στεγνώσουν και γίνεται παρατήρηση σε μικροσκόπιο.

### 3.2.11. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από κύτταρα AGS, τα οποία έχουν υποστεί επιμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα pX333 με sgRNA1 και sgRNA2 για το γονίδιο στόχο του Gracile5 (GR5T), για την γονοτύπηση και τον έλεγχο για την επιτυχή εκτομή του τμήματος του γονιδίου πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NucleoSpin Tissue, Mini kit for Genomic DNA from tissue της εταιρίας Macherey-Nagel.

### 3.2.12.Γονοτύπηση

Για τον έλεγχο επιτυχούς εκτομής του τμήματος του γονιδίου στόχου (GR5T) από τα κύτταρα AGS με το σύστημα του πλασμιδιακού φορέα pX333, πραγματοποιείται PCR σε δείγματα γονιδιωματικού DNA με εκκινητές που υβριδίζουν και πλαισιώνουν την περιοχή που στοχεύεται για εκτομή. Η σύσταση και οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον **πίνακα 17**.

**Πίνακας 17.** Πρωτόκολλο PCR για έλεγχο επιτυχίας CRISPR.

Συστατικά	Ποσότητα
DNA	500 ng
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ L
Πρόσθιος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Ανάστροφος εκκινητής (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Taq polymerase (5 u/ $\mu$ L), Kapa Biosystems	0,15 $\mu$ L
Taq buffer (10X), Kapa Biosystems	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τα 50 $\mu$ L
V <sub>Τελικό</sub>	50 $\mu$ L

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	5 λεπτά
Αποδιάταξη	95	1 λεπτό
Υβριδοποίηση	58	20 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72	45 δευτερόλεπτα
Κύκλοι	45	
Τελική επιμήκυνση	72	5 λεπτά

Επιπλέον, πραγματοποιείται μία PCR με εκκινητές που στοχεύουν την ενίσχυση του γονιδίου της ακτίνης για τον ενδογενή έλεγχο της ποιότητας του απομονωμένου γονιδιωματικού DNA. Η σύσταση και οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον **πίνακα 18**.

**Πίνακας 18.** Πρωτόκολλο PCR για ενίσχυση γονιδίου ακτίνης.

Συστατικά		Ποσότητα
DNA		500 ng
dNTPs (10 mM)		1 $\mu$ L
Πρόσθιος εκκινητής (10 $\mu$ M)		1 $\mu$ L
Ανάστροφος εκκινητής (10 $\mu$ M)		1 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM), KAPA		1 $\mu$ L
Taq polymerase (5 u/ $\mu$ L), Kapa Biosystems		0,2 $\mu$ L
Taq buffer (10X), Kapa Biosystems		5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O		Μέχρι τα 50 $\mu$ L
V <sub>Τελικό</sub>		50

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	5 λεπτά
Αποδιάταξη	95	45 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	58	20 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72	30 δευτερόλεπτα
Κύκλοι	40	
Τελική επιμήκυνση	72	5 λεπτά

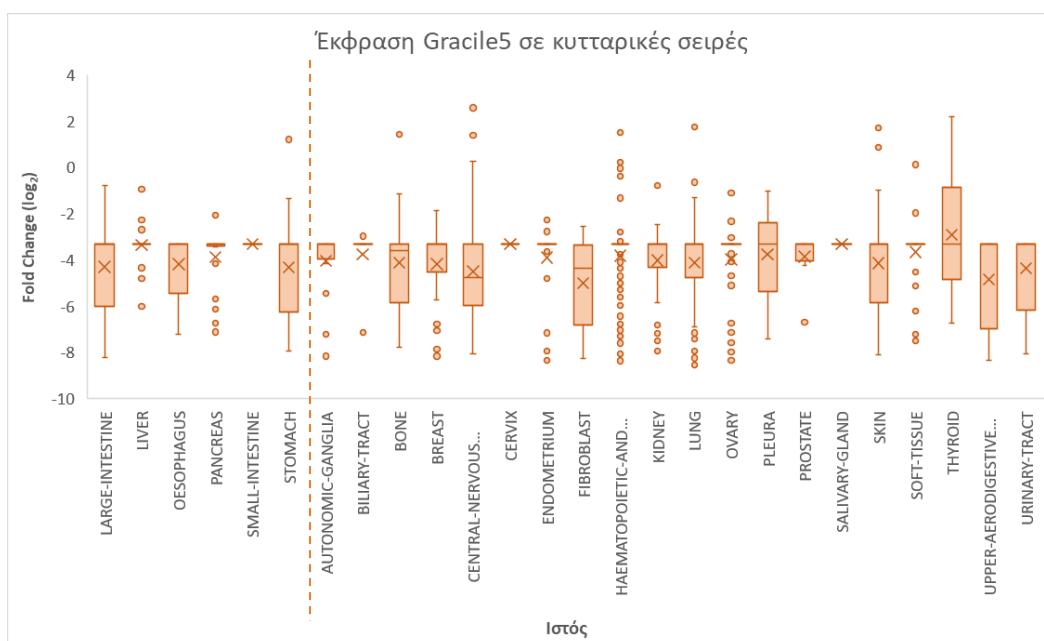
## 4.Αποτελέσματα

### 4.1.Βιοπληροφορική Ανάλυση

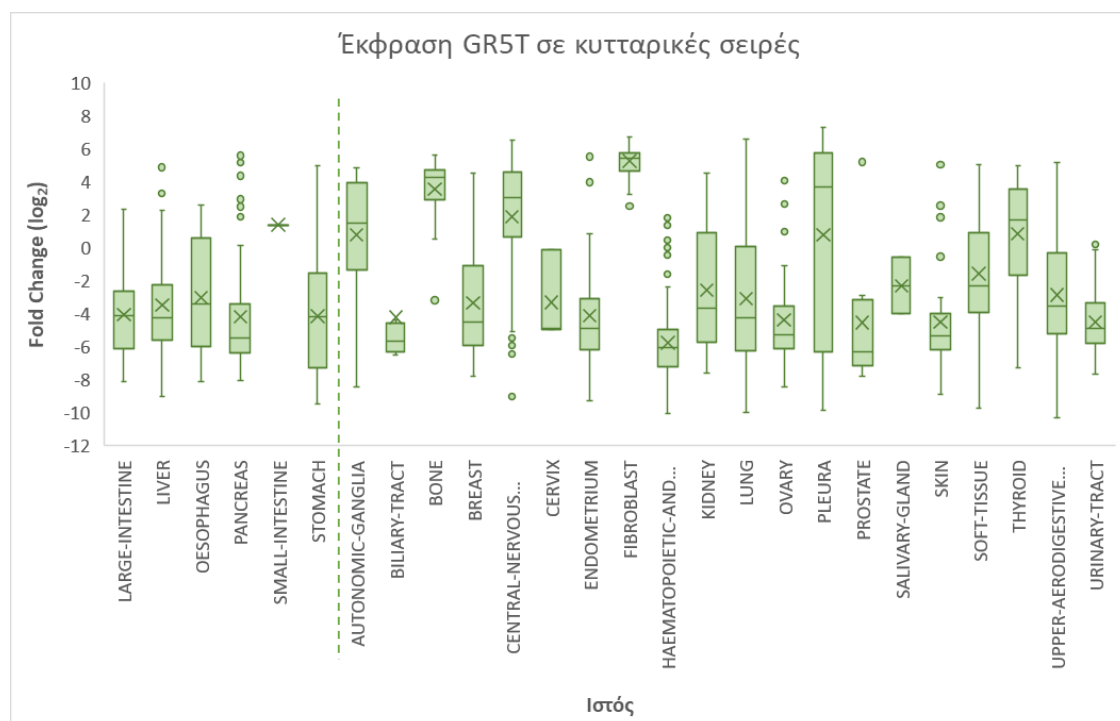
Στα πλαίσια του ερευνητικού έργου του εργαστηρίου για την εύρεση και την μελέτη lncRNA των οποίων η αλλαγή του προφίλ έκφρασης συσχετίζεται με τον γαστρικό καρκίνο, από αναλύσεις δεδομένων αλληλούχησης RNA (RNA seq) από καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου και μετα-ανάλυση της μεταγραφομικής επιλέχθηκε το lncRNA Gracile5 για περαιτέρω μελέτες, καθώς βρέθηκε πως αλλάζει το προφίλ έκφρασής του σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ αυτών και στον γαστρικό.

#### 4.1.1.Ανάλυση δεδομένων RNA seq για το Gracile και το γονίδιο στόχο του

Για την ανάλυση δεδομένων από αλληλούχηση RNA χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καρκινικές σειρές διαφόρων τύπων καρκίνου, από διαφορετικούς υποτύπους γαστρικού καρκίνου από βιοψίες ασθενών και μη ασθενών και από πειραματικές μελέτες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης του Gracile5 και του γονιδίου στόχου του, Gracile5 Target (GR5T) σε καρκινικές σειρές από διάφορους ιστούς που αντιστοιχούν στο σύνολο του ανθρώπινου οργανισμού. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 12**, στους περισσότερους ιστούς δεν εκφράζεται το Gracile5 και ακόμα και στο στομάχι η έκφρασή του είναι χαμηλή, ωστόσο παρατηρείται μία παραλλακτικότητα σε όλους τους καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος. Παρόμοιο προφίλ έκφρασης παρουσιάζει και το γονίδιο GR5T, με μεγάλη παραλλακτικότητα έκφρασης σε καρκινικές σειρές του στομάχου (**Εικόνα 13**).



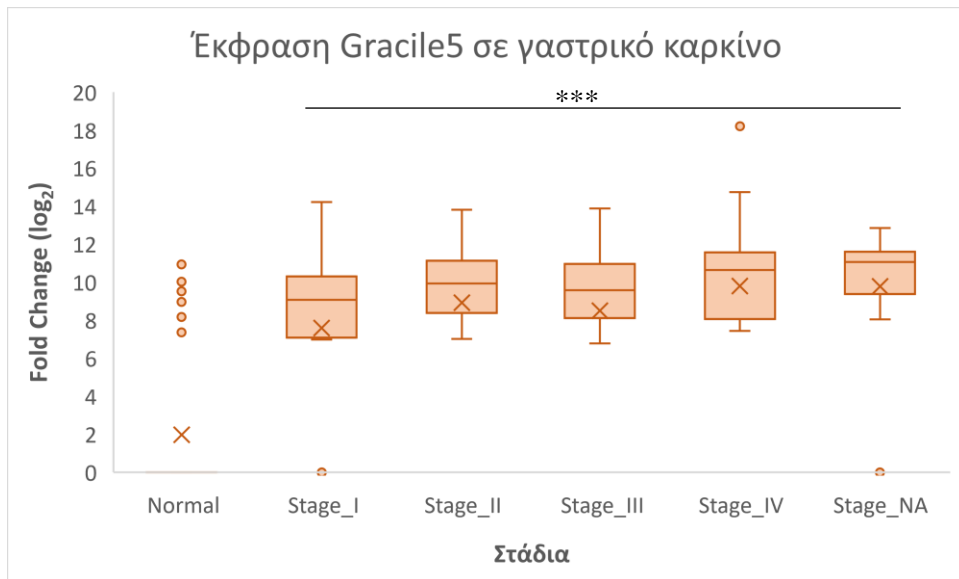
**Εικόνα 12.** Θηκόγραμμα (Box plot) επιπέδων έκφρασης Gracile5 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές ιστών.



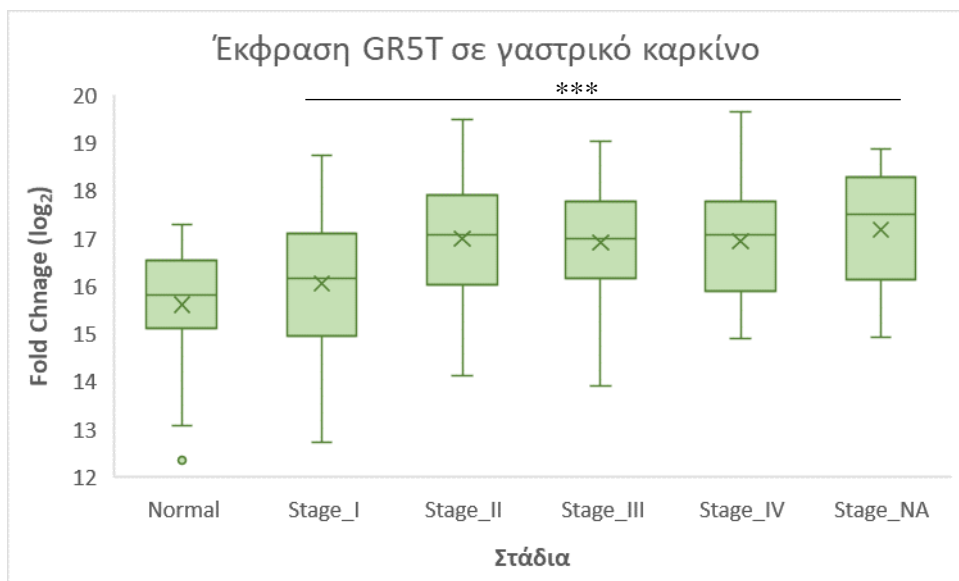
**Εικόνα 13.** Box plot επιπέδων έκφρασης GR5T σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές ιστών.

Έπειτα, έγινε ανάλυση για τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου σε δείγματα υγιών ατόμων και ασθενών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται πως το Gracile5 υπερεκφράζεται στον γαστρικό καρκίνο, αφού τα επίπεδα αυξάνονται απότομα από το φυσιολογικό στο πρώτο στάδιο του καρκίνου. Επιπλέον, σε όλα τα στάδια γαστρικού καρκίνου εκφράζεται περίπου στα ίδια επίπεδα και σταθερά, με μικρές διαφοροποιήσεις από στάδιο σε στάδιο (**Εικόνα 14**). Όσον αφορά το γονίδιο GR5T, η έκφρασή του αυξάνεται από την φυσιολογική κατάσταση στο πρώτο στάδιο, αλλά και από το πρώτο στα επόμενα στάδια, ενώ στην συνέχεια η έκφραση είναι σταθερή σε παρόμοια επίπεδα (**Εικόνα 15**). Επιπλέον, δημιουργήθηκε ένα διάγραμμα (**Εικόνα 16**) για την συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του Gracile5 και GR5T από τα δεδομένα βιοψιών ασθενών με γαστρικό καρκίνο. Σύμφωνα με αυτό, φαίνεται πως υπάρχει μία μικρή θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των δύο γονιδίων στον γαστρικό καρκίνο.

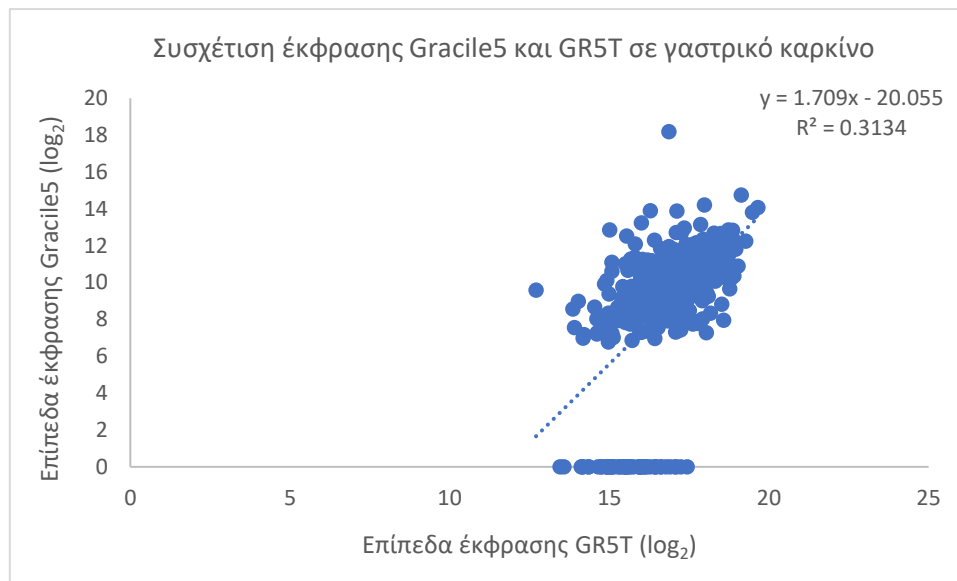




**Εικόνα 14.** Box plot του προφίλ έκφρασης του Gracile5 σε φυσιολογικό ιστό και σε καρκινικό ιστό από ασθενείς με γαστρικό καρκίνο στα διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου. Τα στάδια διακρίνονται από I μέχρι IV, ενώ το στάδιο NA περιλαμβάνονται όλοι οι όγκοι που δεν μπορούν να καταχωρηθούν σε ένα από τα υπόλοιπα στάδια. \*\*\*P<0.001.

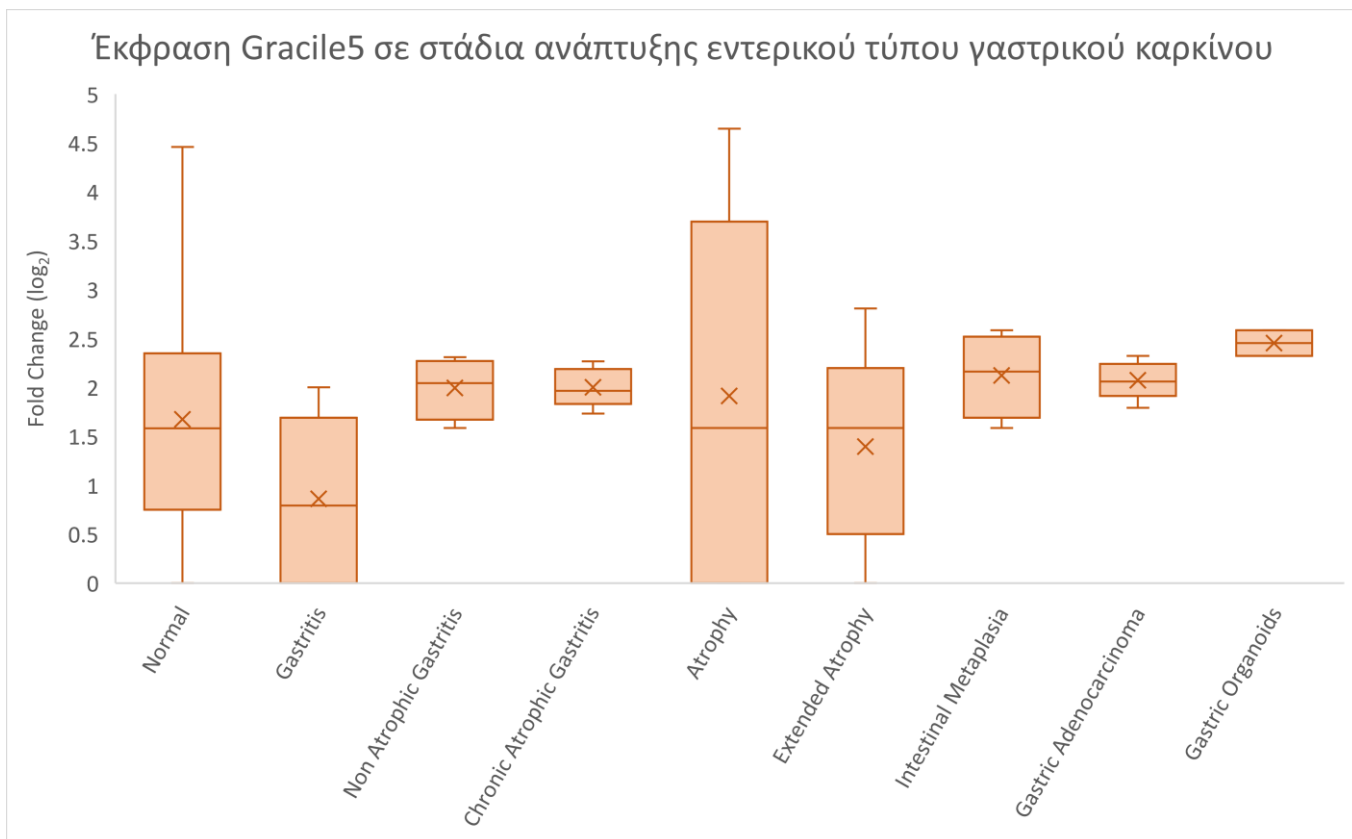


**Εικόνα 15.** Box plot του προφίλ έκφρασης του γονιδίου GR5T σε φυσιολογικό ιστό και σε καρκινικό ιστό από ασθενείς με γαστρικό καρκίνο στα διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου. Τα στάδια διακρίνονται από I μέχρι IV, ενώ το στάδιο NA περιλαμβάνονται όλοι οι όγκοι που δεν μπορούν να καταχωρηθούν σε ένα από τα υπόλοιπα στάδια. \*\*\*P<0.001.



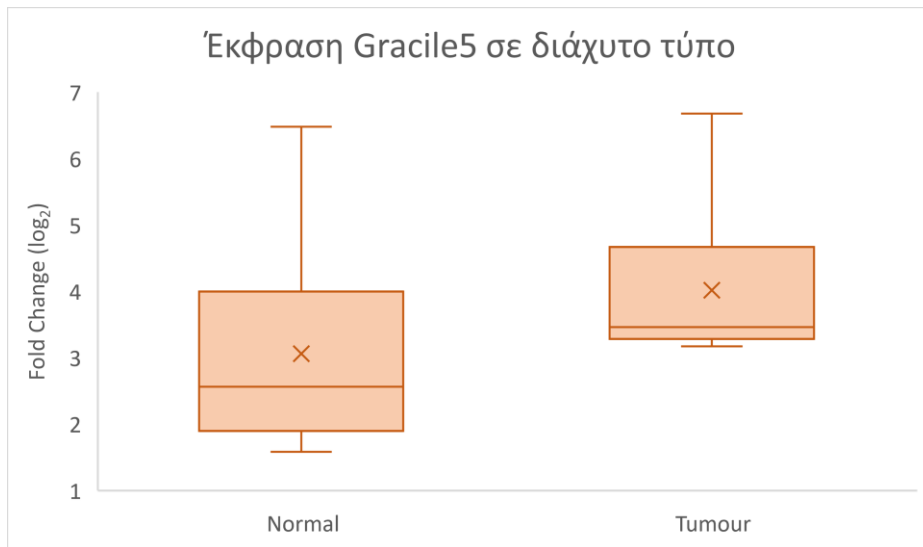
**Εικόνα 16.** Διάγραμμα συσχέτισης (Correlation plot) του προφίλ έκφρασης των γονιδίων Gracile5 και GR5T σε βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο στα διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου.

Επιπλέον, έγινε ανάλυση δεδομένων από βιοψίες ασθενών από καρκινικό και παρακαρκινικό ιστό στομάχου για τους δύο διακριτούς ιστολογικά υποτύπους γαστρικού καρκίνου, τον εντερικό και τον διάχυτο. Όσον αφορά τον εντερικό τύπο γαστρικού καρκίνου, τα δεδομένα βιοψιών προέρχονταν από ασθενείς της Κίνας και της Νικαράγουα (Κεντρική Αμερική), σε διάφορα διακριτά προκαρκινικά και καρκινικά στάδια (**Εικόνα 17**). Ξεκινώντας από την φυσιολογική κατάσταση, έπειτα την γαστρίτιδα, μη ατροφική και χρόνια ατροφική, συνεχίζοντας με την ατροφία και εκτεταμένη ατροφία και, τελικά, την εντερική μεταπλασία που είναι όλες εκείνες οι προκαρκινικές καταστάσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε εντερικού τύπου γαστρικό καρκίνο. Στο διάγραμμα περιλαμβάνονται και τα οργανοειδή του στομάχου, τα οποία προέρχονται από βλαστοκύτταρα και οργανώνονται σε τρισδιάστατες επιθηλιακές δομές και χρησιμοποιούνται ως μοντέλο για τη μελέτη του γαστρικού καρκίνου εργαστηριακά προσομοιάζοντας τις πραγματικές συνθήκες στον οργανισμό. Παρατηρείται μία μικρή αύξηση της έκφρασης του Gracile5 από το στάδιο της εκτεταμένης ατροφίας στην εντερική μεταπλασία και τα επίπεδα διατηρούνται σε αυτά τα επίπεδα και στην ύπαρξη γαστρικού αδενοκαρκινώματος, ωστόσο παρατηρούνται και διακυμάνσεις της έκφρασης στα προκαρκινικά στάδια.

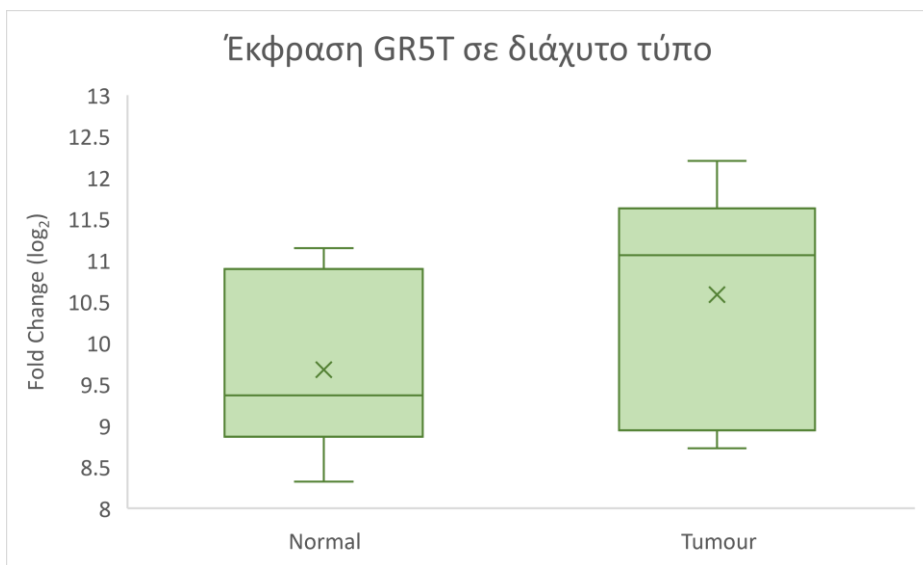


**Εικόνα 17.** Box plot έκφρασης Gracile5 σε φυσιολογικό ιστό, προκαρκινικά στάδια ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου και σε εντερικού τύπου γαστρικό καρκίνο.

Από την ανάλυση της έκφρασης Gracile5 σε βιοψίες από ασθενείς με διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου έναντι παρακαρκινικών ιστών, παρατηρείται μία αύξηση των επιπέδων έκφρασης του Gracile5 από το φυσιολογικό στο καρκινικό επίπεδο (**Εικόνα 18**). Επιπλέον, η έκφραση του GR5T βρέθηκε και αυτή αυξημένη στον καρκίνο συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό (**Εικόνα 19**). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκε ήταν μικρός και χρειάζονται περισσότερα δείγματα ασθενών με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου για να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

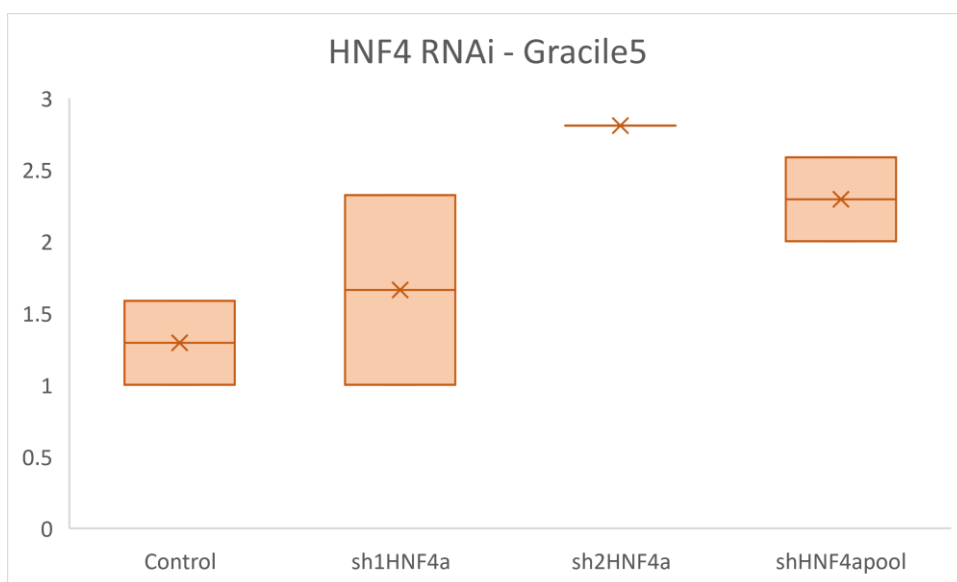


**Εικόνα 18.** Box plot των επιπέδων έκφρασης του Gracile5 σε φυσιολογικό (normal) και καρκινικό (tumour) ιστό, που προέρχονται από βιοψίες ασθενών με διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου. Normal = 6, Tumour = 6



**Εικόνα 19.** Box plot των επιπέδων έκφρασης του GR5T σε φυσιολογικό (normal) και καρκινικό (tumour) ιστό, που προέρχονται από βιοψίες ασθενών με διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου. Normal = 6, Tumour = 6

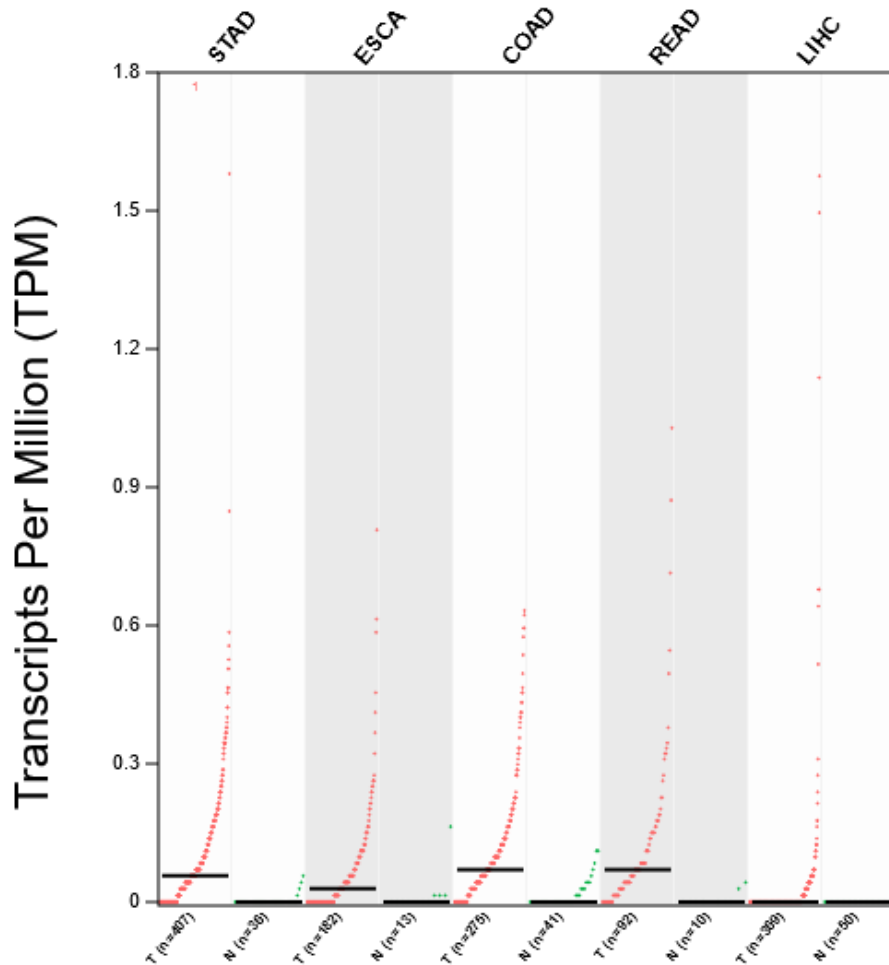
Τέλος, έγινε ανάλυση της έκφρασης του Gracile5 σε δημοσιευμένα δεδομένα RNA-seq της γαστρικής καρκινικής κυτταρικής σειράς YCC3 όπου επιτεύχθηκε καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a με RNAi. Υπό συνθήκες καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα παρατηρείται μία αύξηση του Gracile5 έως και περίπου δύο φορές (**Εικόνα 20**). Αυτό το αποτέλεσμα καταδεικνύει μία ενδεχόμενη σχέση μεταξύ των δύο και γι' αυτό τον λόγο εξετάζεται περαιτέρω η αλληλεπίδρασή τους.



**Εικόνα 20.** Box plot έκφρασης του Gracile5 σε κύτταρα YCC3 έπειτα από σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a.

#### 4.1.2.Ανάλυση στη βάση δεδομένων GEPIA

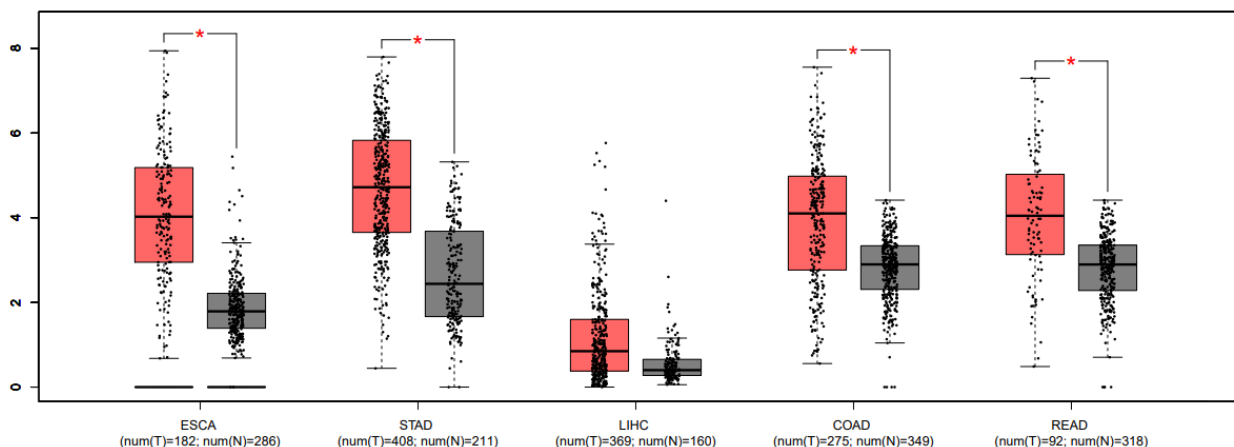
Μετά τα αποτελέσματα των αναλύσεων RNA seq, για την περαιτέρω μελέτη της έκφρασης του Gracile5 και της συσχέτισής του με το γονίδιο GR5T, αξιοποιήθηκε η βάση δεδομένων GEPIA. Από την αναζήτηση των αποτελεσμάτων, επιβεβαιώνεται η αύξηση της έκφρασης του Gracile5 σε διάφορους τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, μεταξύ αυτών και στον γαστρικό καρκίνο.



**Εικόνα 21.** Έκφραση του Gracile5 σε τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος. Με κόκκινο απεικονίζεται η έκφραση σε καρκινικούς ιστούς και με γκρι η έκφραση σε φυσιολογικούς, παρακαρκινικούς ιστούς (TCGA normal and GTEx data). ESCA=Esophageal carcinoma, STAD=Stomach adenocarcinoma, LIHC=Liver hepatocellular carcinoma, COAD=Colon adenocarcinoma, READ=Rectum adenocarcinoma.

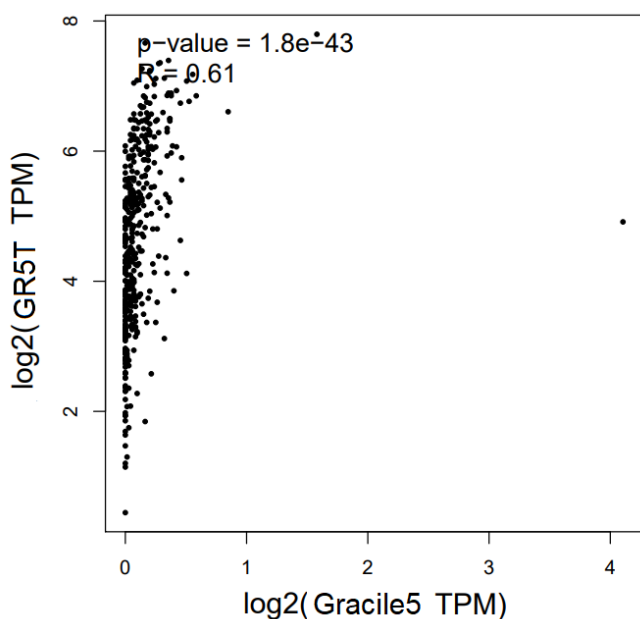
Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα για το γονίδιο στόχο, GR5T, για το οποίο παρατηρείται μία σημαντικώς στατιστική αύξηση της έκφρασης σε καρκίνους του γαστρεντερικού συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού καρκίνου (**Εικόνα 22**).

## GR5T



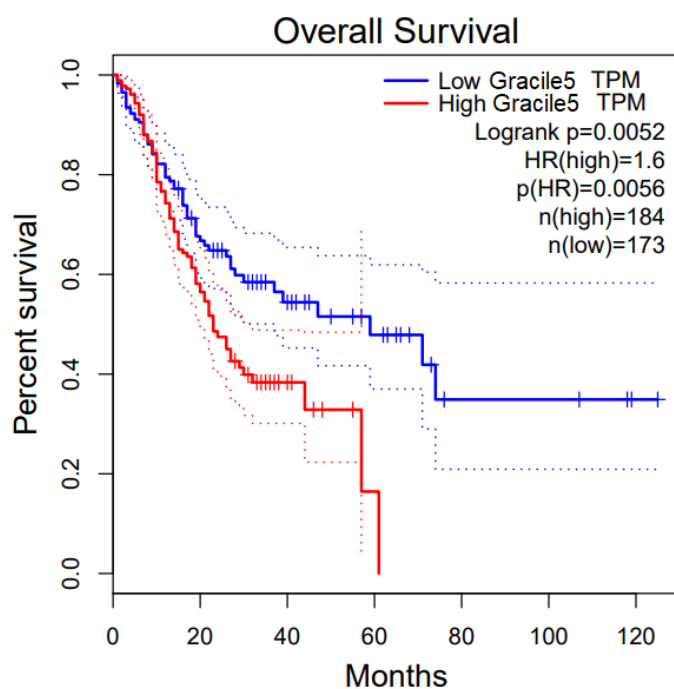
**Εικόνα 22.** Έκφραση του Gracile5 σε τύπους καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος. Με κόκκινο απεικονίζεται η έκφραση σε καρκινικούς ιστούς και με γκρι η έκφραση σε φυσιολογικούς, παρακαρκινικούς ιστούς (TCGA normal and GTEx data). ESCA=Esophageal carcinoma, STAD=Stomach adenocarcinoma, LIHC=Liver hepatocellular carcinoma, COAD=Colon adenocarcinoma, READ=Rectum adenocarcinoma.

Επιπλέον, έγινε ανάλυση συσχέτισης των δύο γονιδίων για τον γαστρικό καρκίνο, με δεδομένα από καρκινικούς ιστούς του στομάχου (TCGA) και από φυσιολογικούς παρακαρκινικούς ιστούς (TCGA και GTEx) με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson. Όπως δείχνει και το διάγραμμα στην **εικόνα 23**, υπάρχει μία θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο γονιδίων για τον γαστρικό καρκίνο ( $R = 0.61$ ), που είναι στατιστικά σημαντική ( $p\text{-value} < 0.05$ ).



**Εικόνα 23.** Διάγραμμα ανάλυσης συσχέτισης των δύο γονιδίων, Gracile5 στον οριζόντιο άξονα, και G R5T στον κάθετο άξονα, στον γαστρικό καρκίνο.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα προκύπτει από την ανάλυση της επιβίωσης των ασθενών με γαστρικό καρκίνο σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης lncRNA Gracile5. Από την ανάλυση προέκυψε πως για ασθενείς με γαστρικό καρκίνο, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του Gracile5 συσχετίζονται με μικρότερο χρόνο επιβίωσης (**Εικόνα 24**).

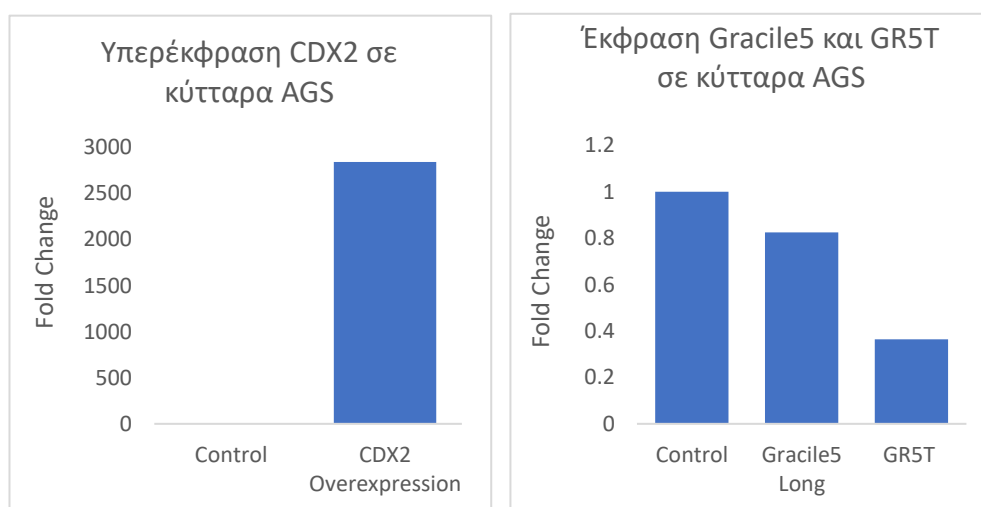


**Εικόνα 24.** Ανάλυση της επιβίωσης των ασθενών με γαστρικό καρκίνο, ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του Gracile5.

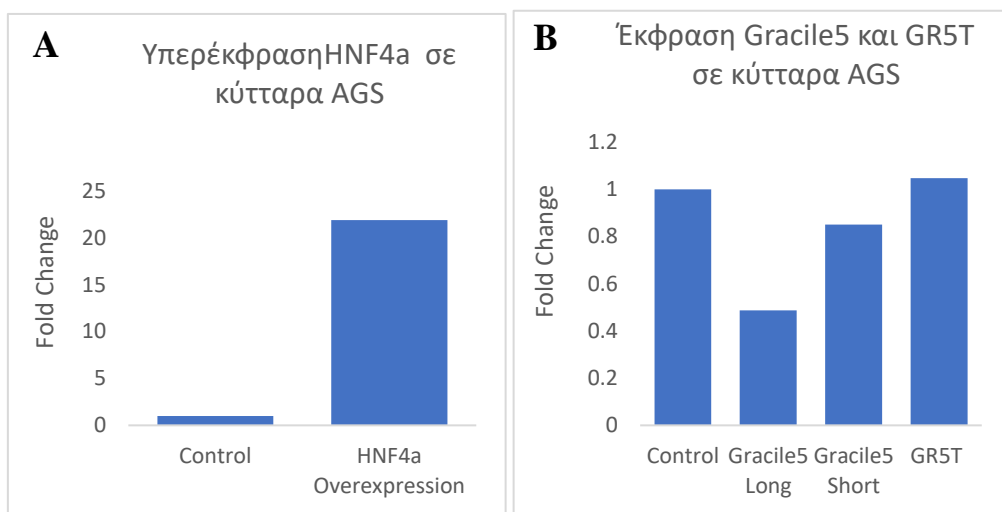


## 6.1. Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των Gracile5 και GR5T σε συνθήκες υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2

Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 20** έστρεψαν το ενδιαφέρον στην σχέση του Gracile5 και του HNF4a και, δεδομένου ότι είναι γνωστό πως στον καρκίνο του στομάχου αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας υπερεκφράζεται και συνεργάζεται με τον παράγοντα CDX2 για προώθηση του γαστρικού καρκίνου. Για τον λόγο αυτό, ελέγχθηκε η έκφραση των Gracile5 και GR5T σε δύο κυτταρικές σειρές του στομάχου, AGS και HFE, στις οποίες είχε προηγουμένως επιτευχθεί υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2. Επιλέχθηκαν αυτές οι δύο, διότι είναι γνωστό πως στην AGS οι δύο μεταγραφικοί εκφράζονται σε υψηλό ποσοστό, ενώ στην HFE φυσιολογικά δεν εκφράζονται. Συγκεκριμένα, στα AGS ελέγχθηκε η έκφραση δύο ισομορφών του Gracile5 που υπάρχουν και πιθανώς εκφράζονται, αλλά δεν είναι γνωστό ποια είναι η λειτουργική. Όσον αφορά την μεγάλη ισομορφή του Gracile5, βρέθηκε η έκφρασή της να μειώνεται κατά 20% σε υπερέκφραση του CDX2 (**Εικόνα 25 b**) και κατά 50% σε υπερέκφραση του HNF4a, (**Εικόνα 26 b**). Στην περίπτωση της μικρής ισομορφής του Gracile5, σε συνθήκη υπερέκφρασης του HNF4a σημειώθηκε μείωση της έκφρασης κατά 15% (**Εικόνα 26 b**), ενώ για την περίπτωση υπερέκφρασης του CDX2, αν και υπήρξε μείωση της έκφρασης σε επίπεδο 65%, τα αποτελέσματα δεν ήταν αξιόπιστα (με κριτήριο την καμπύλη τήξης του προϊόντος) και δεν παρουσιάζονται εδώ. Τέλος, η έκφραση του GR5T μειώθηκε κατά 65% σε υπερέκφραση του CDX2 (**Εικόνα 25 b**) και δεν επηρεάστηκε σε κατάσταση υπερέκφρασης του HNF4a (**Εικόνα 26 b**).

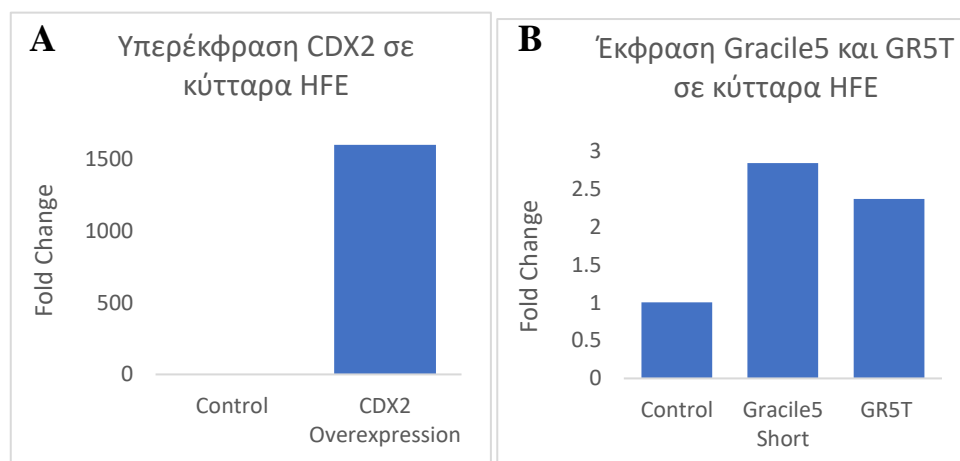


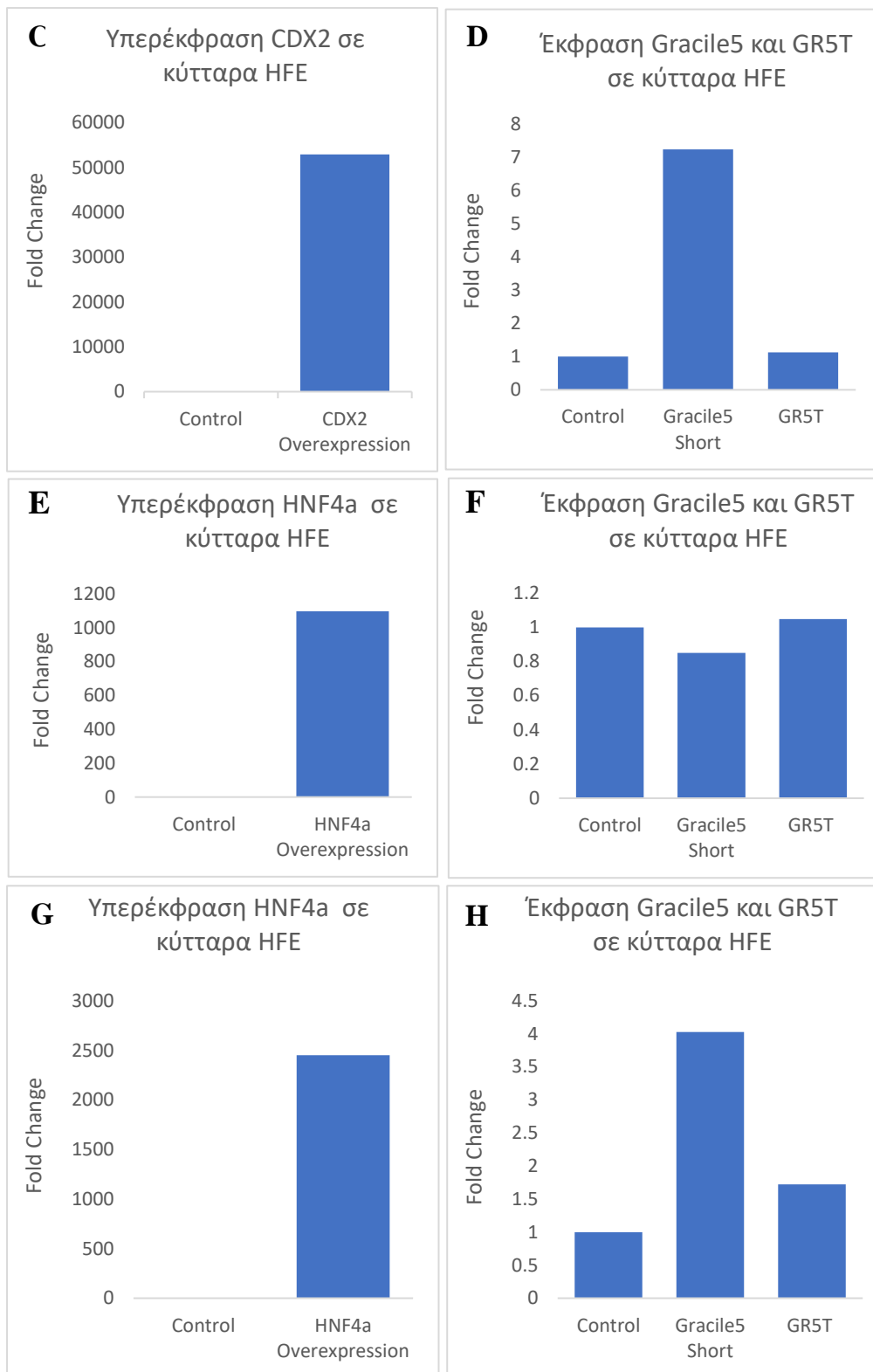
**Εικόνα 25.** Έκφραση Gracile5 και GR5T σε συνθήκη υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 σε κύτταρα AGS. (A) Υπερέκφραση CDX2, (B) Επίπεδα έκφρασης δύο ισομορφών Gracile5 και GR5T.



**Εικόνα 26.** Έκφραση Gracile5 και GR5T σε συνθήκη υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a σε κύτταρα AGS. (A) Υπερέκφραση HNF4a, (B) Επίπεδα έκφρασης δύο ισομορφών Gracile5 και GR5T.

Στα κύτταρα HFE πραγματοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις του πειράματος υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων και ελέγχθηκε η έκφραση της μικρής ισομορφής του Gracile5 και του GR5T. Για το Gracile5, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης και στις δύο περιπτώσεις υπερέκφρασης του CDX2 (**Εικόνα 27 A/C**), ενώ υπό υπερέκφραση του HNF4a στην μία μόνο επανάληψη παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης κατά 4 φορές (**Εικόνα 27H**). Αντίστοιχα, η έκφραση του GR5T αυξήθηκε κατά 2.5 περίπου φορές στην υπερέκφραση του CDX2, στην μία επανάληψη (**Εικόνα 27B**), ενώ σε υπερέκφραση του HNF4a παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης κατά 2 φορές, στην ίδια επανάληψη που αυξήθηκε και η έκφραση του Gracile5 9 (**Εικόνα 27H**).





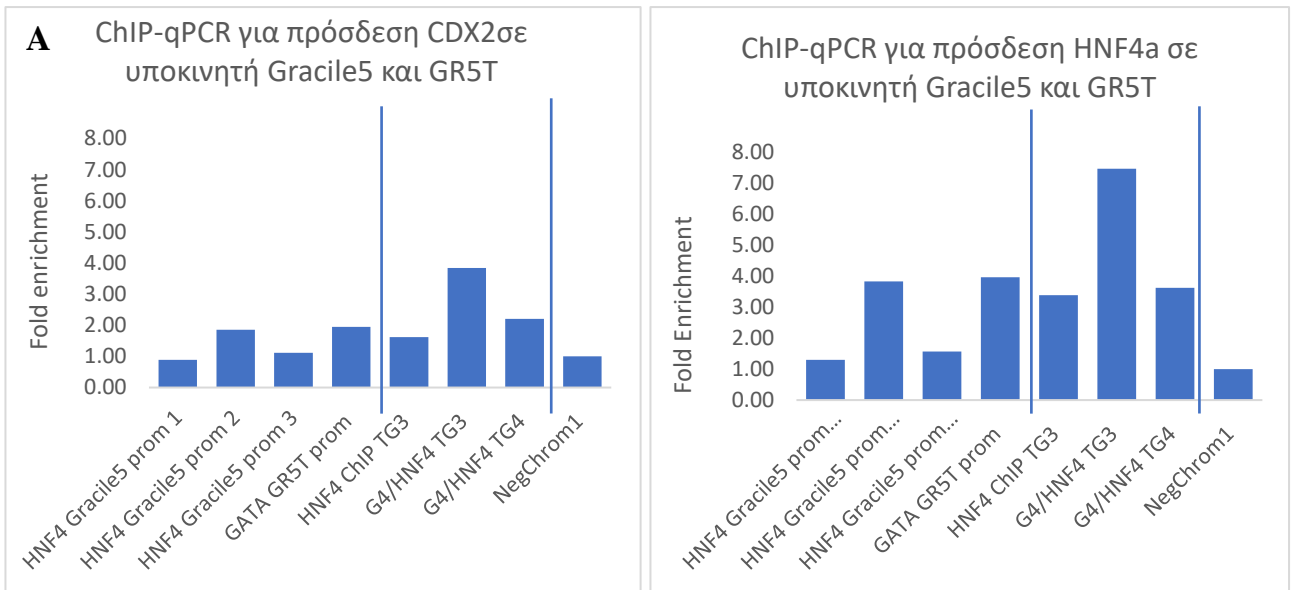
**Εικόνα 27.** Έκφραση Gracile5 και GR5T σε συνθήκη υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 και HNF4a σε κύτταρα HFE. (A) Υπερέκφραση CDX2 (1<sup>η</sup> επανάληψη), (B) Επίπεδα έκφρασης Gracile5 και GR5T, (C) Υπερέκφραση CDX2 (2<sup>η</sup> επανάληψη), (D) Επίπεδα έκφρασης Gracile5 και GR5T, (E) Υπερέκφραση

HNF4a, (F) Επίπεδα έκφρασης δύο ισομορφών Gracile5 και GR5T, (G) Υπερέκφραση HNF4a, (H) Επίπεδα έκφρασης δύο ισομορφών Gracile5 και GR5T.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η έκφραση του GR5T υφίσταται τις ίδιες αλλαγές στην έκφρασή του, όπως και το Gracile5 υποδηλώντας σαφώς πως η έκφραση του GR5T ελέγχεται από το Gracile5.

#### 4.3. Έλεγχος πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2 στους υποκινητές των γονιδίων Gracile5 και GR5T σε πείραμα ChIP

Έπειτα από τα αποτελέσματα των qPCR για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων Gracile5 και GRT μετά από υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation/ChIP), η οποία δεν περιγράφεται στην παρούσα πτυχιακή εργασία, για την ενίσχυση των γονιδωματικών περιοχών στις οποίες προσδένονται οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες σε κύτταρα AGS. Για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης, πραγματοποιήθηκε ChIP-qPCR σε δείγματα μη κατακερματισμένης χρωματίνης, που χρησιμεύει ως αρνητικός μάρτυρας, και ανοσοκατακρημισμένης (immunoprecipitated/IP) για κάθε μεταγραφικό παράγοντα με ζεύγη εκκινητών που αναγνωρίζουν την αλληλουχία υποκινητή των δύο γονιδίων, Gracile5 και GR5T. Για τον υποκινητή του γονιδίου Gracile5 χρησιμοποιήθηκαν τρία ζεύγη εκκινητών που προσδένονται σε διαφορετικά σημεία πάνω σε αυτόν, ενώ για τον υποκινητή του GR5T χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών. Η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε ως προς τον αρνητικό μάρτυρα και, επιπλέον, συμπεριλήφθηκαν στις αναλύσεις θετικοί μάρτυρες (HNF4a TG3, GATA4-HNF4a TG3/TG4) και αρνητικός μάρτυρας (Neg Chrom 1). Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της **Εικόνας 27**, για τον υποκινητή του Gracile5 που ενισχύεται με το δεύτερο ζεύγος εκκινητών παρατηρείται μία αύξηση των επιπέδων, 2 φορές για πρόσδεση του CDX2 και 4 φορές για πρόσδεση του HNF4a, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αντίστοιχα, παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και για τον υποκινητή του γονιδίου GR5T, δηλαδή 2 φορές ενίσχυση πρόσδεσης του CDX2 και 4 φορές ενίσχυση πρόσδεσης του HNF4a, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

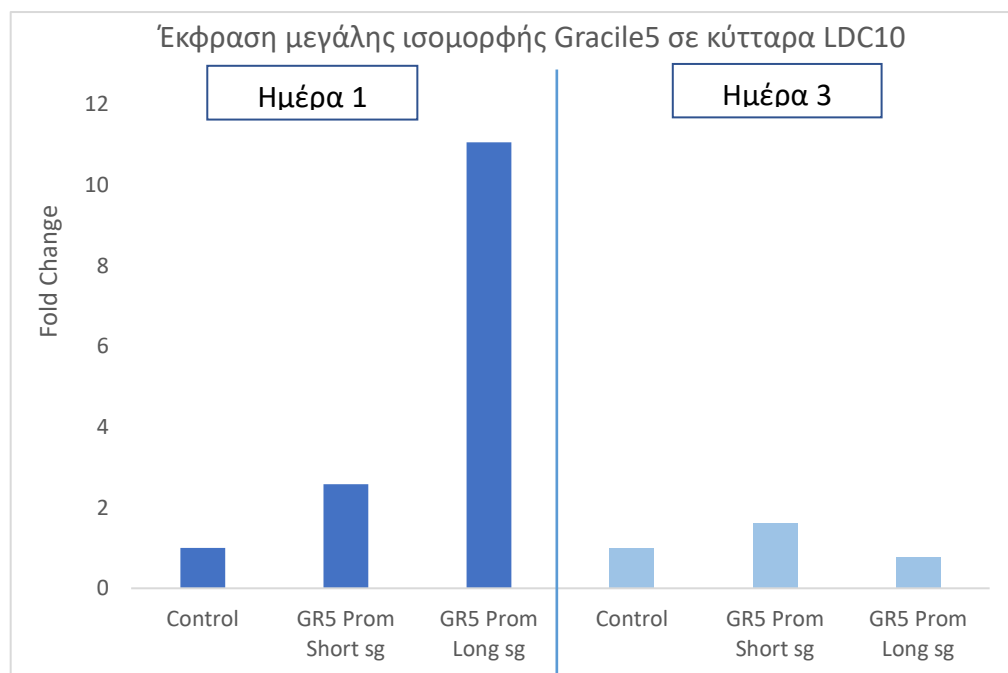


**Εικόνα 28.** Ανάλυση ChIP qPCR για πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων CDX2 (A) και HNF4a (B) στους υποκινητές των γονιδίων Gracile5 και GR5T. Η ενίσχυση της πρόσδεσης υπολογίστηκε σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα Neg Chrom 1, που πρόκειται για μεσογονιδιακή περιοχή όπου δεν προσδέονται μεταγραφικοί παράγοντες. Επιπλέον, στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν και θετικοί μάρτυρες (HNF4a TG3, G4-HNF4a TG3/TG4), όπου είναι γνωστό ότι προσδέονται οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες.

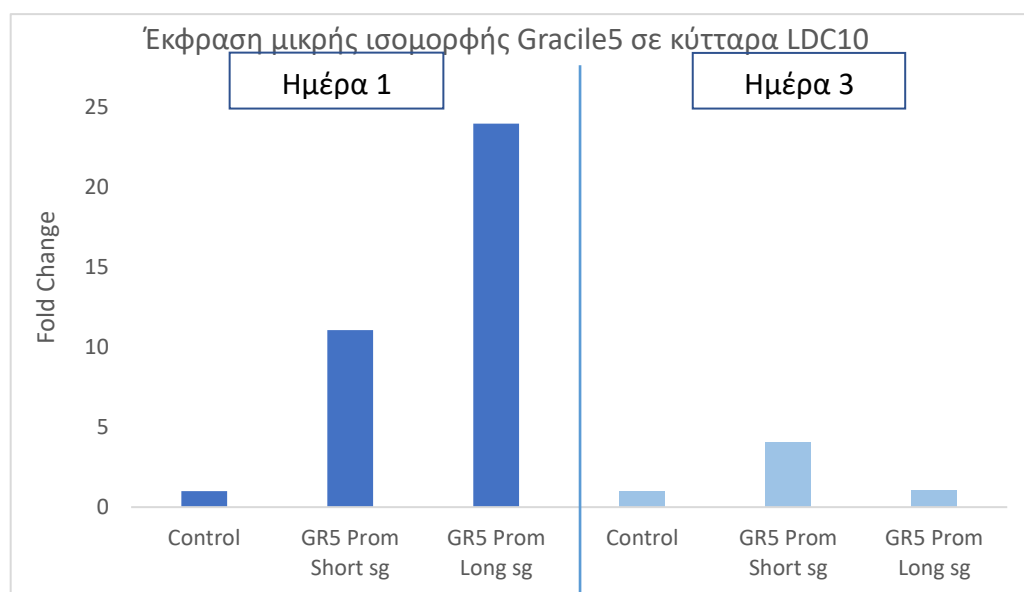
#### 4.4. Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του Gracile5 και του GR5T σε πείραμα υπερέκφρασης με το σύστημα CRISPRa

Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων λόγω της έκφρασης του Gracile5, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CRISPRa για στόχευση του υποκινητή του γονιδίου Gracile5 για την υπερέκφραση του γονιδίου. Τα guide RNA που είχαν σχεδιαστεί και κλωνοποιηθεί προηγουμένως στον φορέα pLVU6 ήταν δύο και στόχευαν σε διαφορετικές αλληλουχίες του υποκινητή για υπερέκφραση των δύο ισομορφών του Gracile5 που έχουν βρεθεί, της μικρής (Short) και της μεγάλης (Long). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο σειρές κυττάρων, AGDC16 και LDC10 σε δύο συνθήκες, μία και τρεις ημέρες μετά από διαμόλυνση με λεντιούς. Ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των δύο ισομορφών του Gracile5 καθώς και του γονιδίου στόχου, GR5T, έγινε με qPCR.

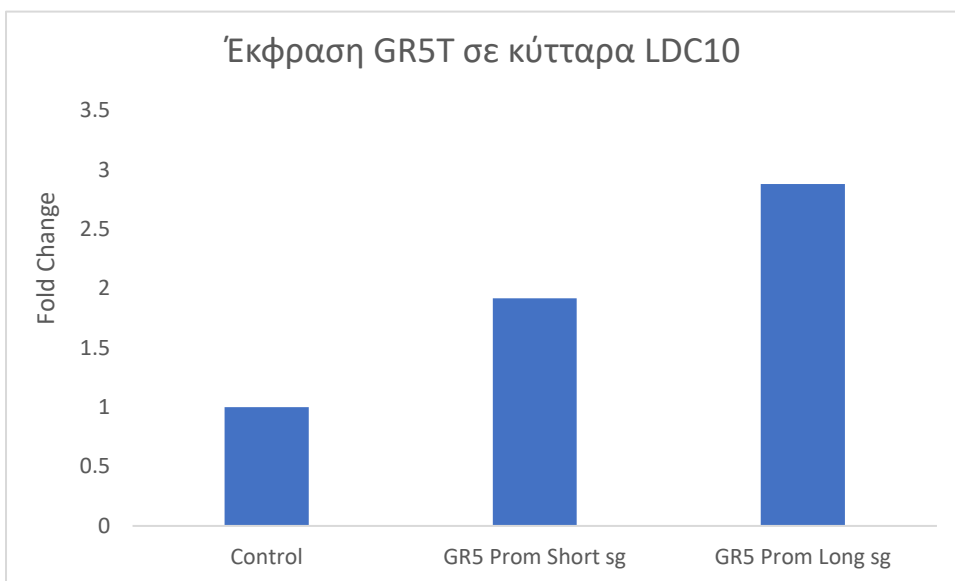
Στα κύτταρα LDC10 επιτεύχθηκε σημαντική υπερέκφραση και των δύο ισομορφών του Gracile5, η οποία παρατηρήθηκε και στις δύο συνθήκες (1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα) και, συγκεκριμένα 2.5 φορές αύξηση για την μικρή και 11 φορές για την μεγάλη ισομορφή. Την τρίτη ημέρα το φαινόμενο της υπερέκφρασης δεν παρατηρείται πλέον (**Εικόνα 29, 30**). Επίσης, παρατηρήθηκε δύο με τρεις φορές αύξηση του GR5T και στις δύο περιπτώσεις στόχευσης του υποκινητή την πρώτη ημέρα ελέγχου, ωστόσο την τρίτη ημέρα δεν ελέγχθηκε η έκφρασή του (**Εικόνα 31**).



**Εικόνα 29.** Έλεγχος έκφρασης μεγάλης ισομορφής Gracile5 σε κύτταρα LDC10 μία και τρεις ημέρες μετά την διαμόλυνση.

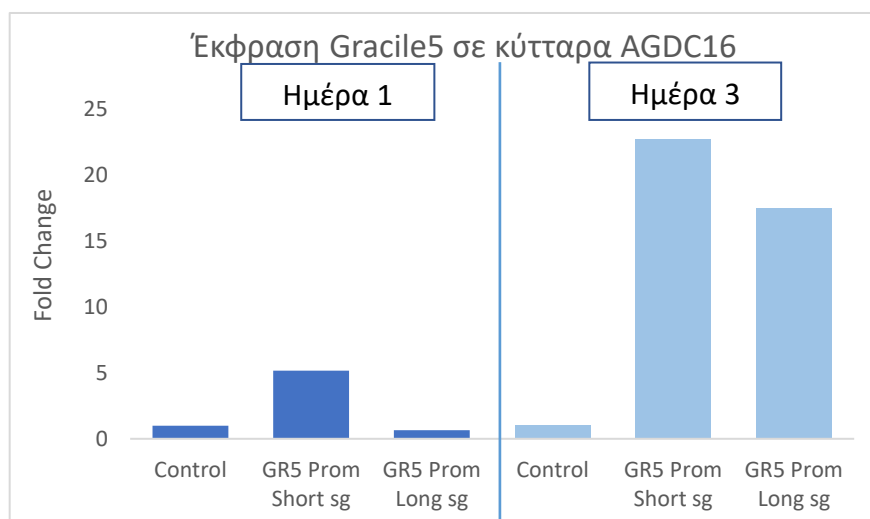


**Εικόνα 30.** Έλεγχος έκφρασης μικρής ισομορφής Gracile5 σε κύτταρα LDC10 μία και τρεις ημέρες μετά την διαμόλυνση.

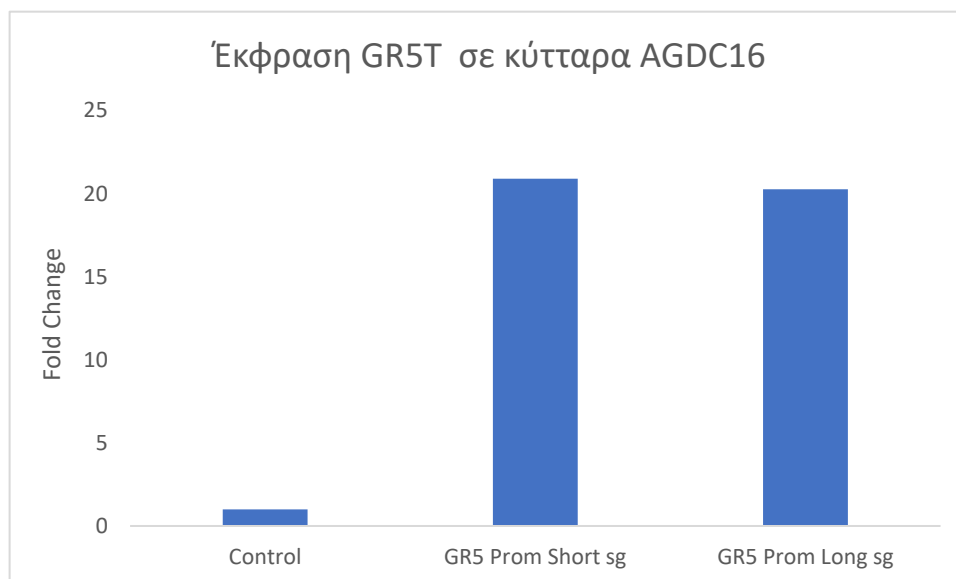


**Εικόνα 31.** Έλεγχος έκφρασης του στόχου του Gracile5, GR5T, σε κύτταρα LDC10 μία ημέρα μετά την διαμόλυνση.

Στα κύτταρα AGDC16 πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις του πειράματος. Στην πρώτη επανάληψη ελέγχθηκε η έκφραση του Gracile5 και του GR5T στις δύο συνθήκες ελέγχου. Το Gracile5 βρέθηκε πως υπερεκφράζεται και τις δύο ημέρες ελέγχου και για τις δύο περιπτώσεις στόχευσης του υποκινητή με guideRNA. Μάλιστα, η υπερέκφραση ήταν πιο έντονη την τρίτη ημέρα ελέγχου και για τις δύο περιπτώσεις στόχευσης, με περίπου 20 φορές αύξηση της έκφρασης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (**Εικόνα 32**). Ακόμα, η έκφραση του GR5T την τρίτη ημέρα ελέγχου ήταν και αυτή αυξημένη και στις δύο περιπτώσεις στόχευσης, υποδεικνύοντας πως υπάρχει μία θετική συσχέτιση της έκφρασης του Gracile5 και του GR5T (**Εικόνα 33**).

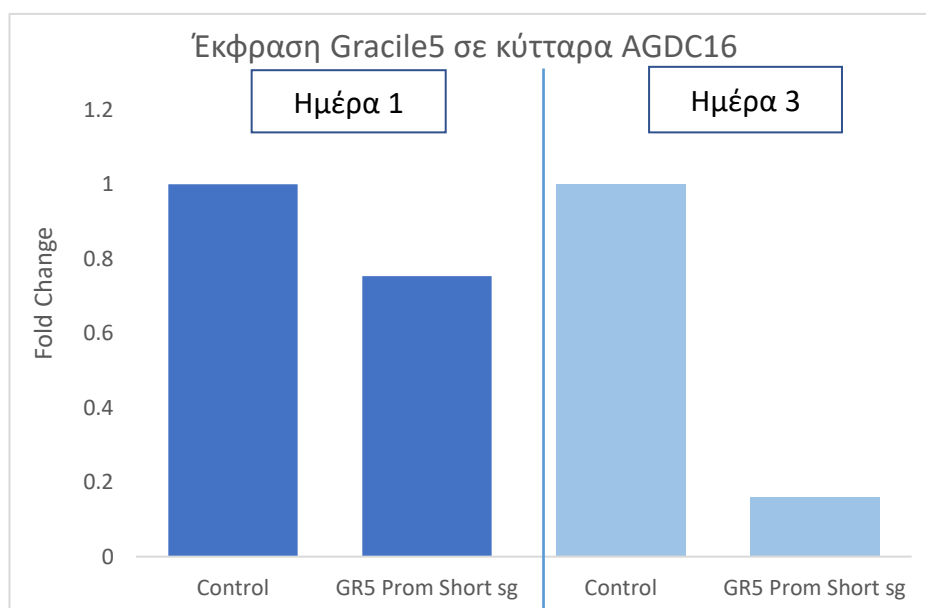


**Εικόνα 32.** Έλεγχος έκφρασης Gracile5 σε κύτταρα AGDC16 μία και τρεις ημέρες μετά την διαμόλυνση.



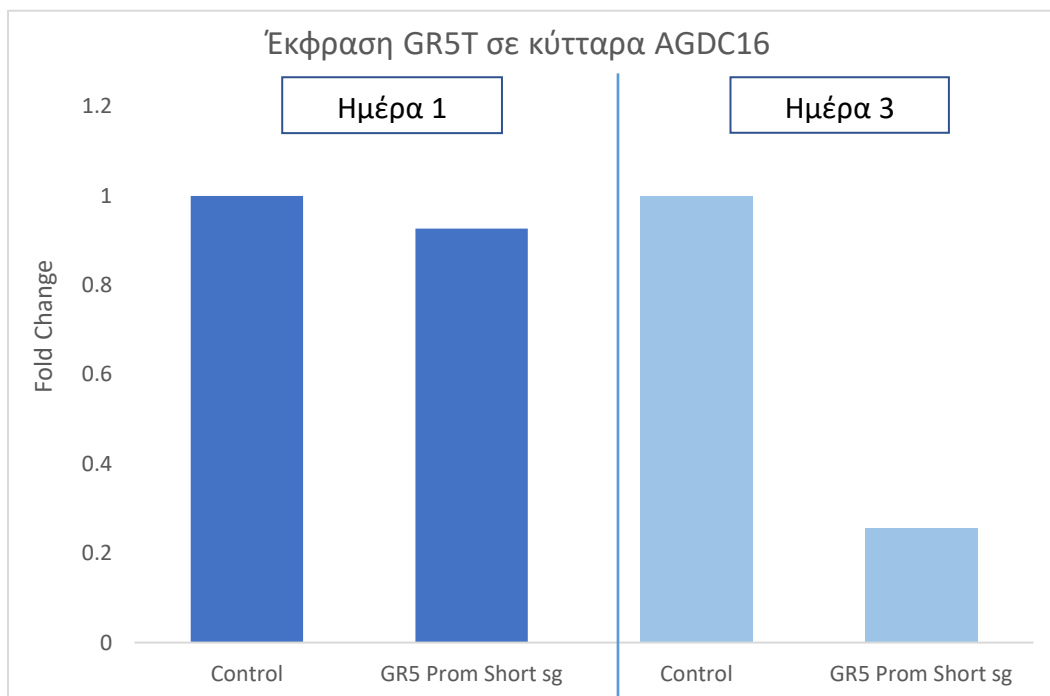
**Εικόνα 33.** Έλεγχος έκφρασης του στόχου του Gracile5, GR5T, σε κύτταρα AGDC16 τρεις ημέρες μετά την διαμόλυνση.

Στη δεύτερη επανάληψη τα αποτελέσματα έδειξαν πως το σύστημα αυτό είχε το αντίθετο αποτέλεσμα από αυτό για το οποίο σχεδιάστηκε, αντί δηλαδή για υπερέκφραση του γονιδίου προκλήθηκε καταστολή, όπως δείχνουν και το διάγραμμα στην **εικόνα 34**. Επιπλέον, παρατηρείται και μείωση της έκφρασης του GR5T σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αυτά τα αποτελέσματα ισχύουν τόσο για την πρώτη όσο και για την τρίτη ημέρα ελέγχου της έκφρασης (**Εικόνα 35**).





**Εικόνα 34.** Έλεγχος έκφρασης Gracile5 σε κύτταρα AGDC16 μία και τρεις ημέρες μετά την διαμόλυνση.



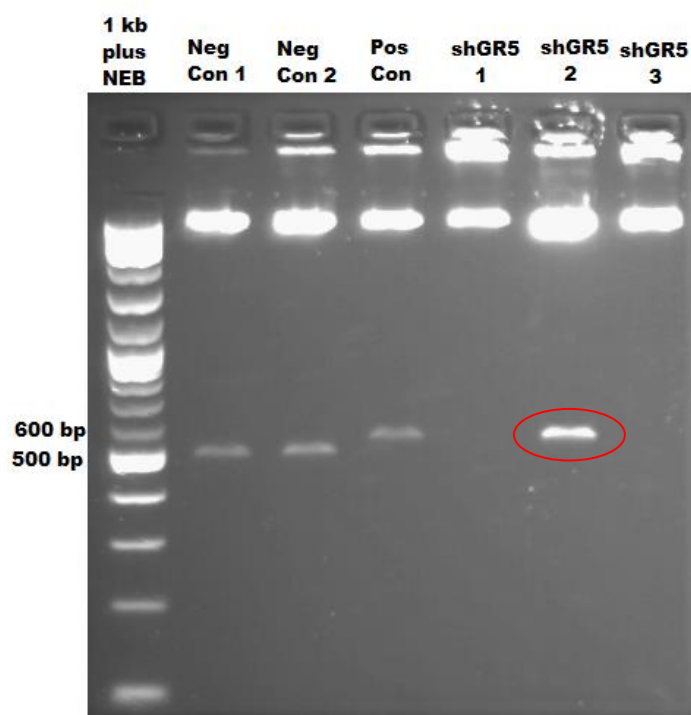
**Εικόνα 35.** Έλεγχος έκφρασης του στόχου του Gracile5, GR5T, σε κύτταρα AGDC16 τρεις ημέρες μετά την διαμόλυνση.

#### 4.5.Κλωνοποίηση pLVTHM

Για την μελέτη του lncRNA Gracile5 και του γονιδίου στόχου του GR5T, κατασκευάστηκε ένα εργαλείο για την παροδική καταστολή της έκφρασής τους. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση ενός μορίου shRNA που στοχεύει το εκάστοτε γονίδιο – στόχο στον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM και έγινε μετασχηματισμός του στελέχους E.coli Stbl3.

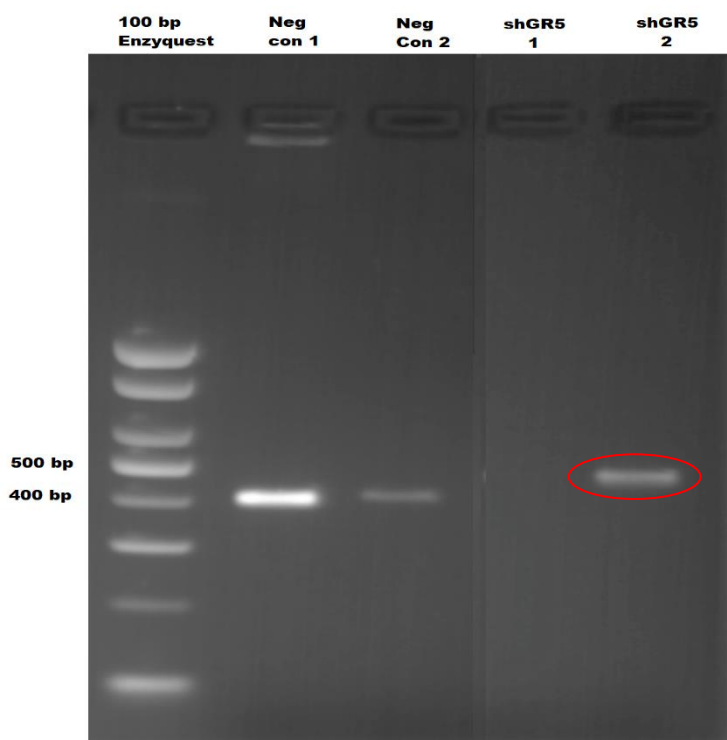
Για τον έλεγχο της ένθεσης του shRNA για στόχευση του Gracile5, έγινε διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XbaI και EcoRI και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Σε περίπτωση ανεπιτυχούς ένθεσης, αναμένεται ένα προϊόν στα 490 ζεύγη βάσεων περίπου, ενώ αν το ένθεμα κλωνοποιήθηκε, παρατηρείται μία ζώνη στα 550 ζεύγη βάσεων περίπου. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση λιγάσης και ένα προϊόν self ligation, ενώ ως θετικός μάρτυρας ο φορέας με

επιβεβαιωμένη την ενσωμάτωση ενός shRNA. Στην **εικόνα 36** φαίνονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της διαγνωστικής πέψης.



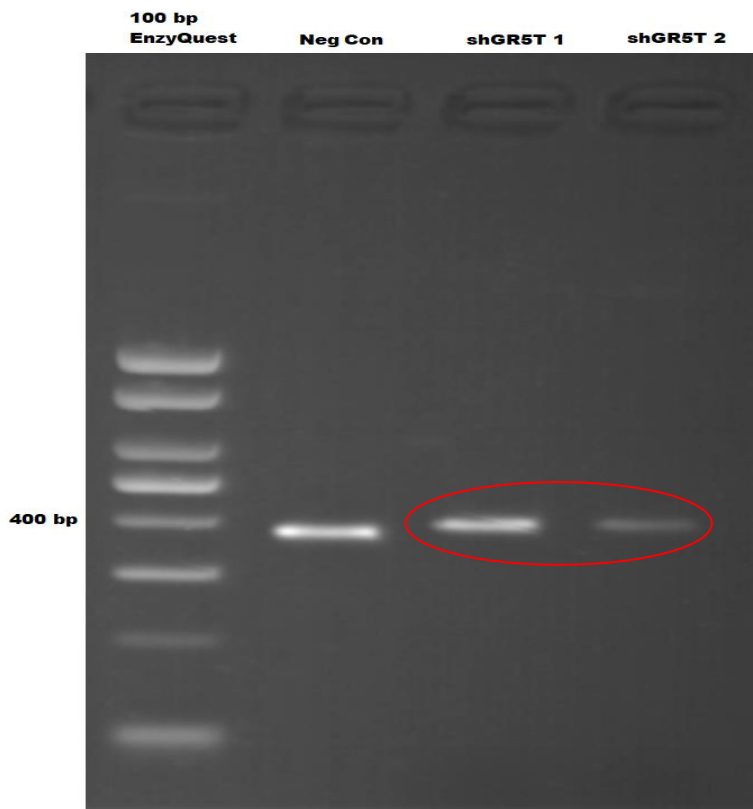
**Εικόνα 36.** Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής πέψης του φορέα pLVTHM για έλεγχο ένθεσης shRNA για Gracile5 (shGR5) σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (1 kb plus, NEB), ο φορέας pLVTHM (Neg Con 1), το προϊόν self ligation (Neg Con 2), ο θετικός μάρτυρας (Pos Con) και τα τρία δείγματα προς έλεγχο. Το θετικό δείγμα αντιστοιχεί στη ζώνη περίπου στα 550 ζεύγη βάσεων και σημειώνεται με κόκκινο πλαίσιο.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και διαγνωστική PCR για τον έλεγχο ένθεσης του shRNA για το Gracile5. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και το αναμενόμενο προϊόν σε περίπτωση επιτυχούς ένθεσης είναι μία ζώνη κοντά στα 450 ζεύγη βάσεων, ενώ σε αντίθετη περίπτωση η ζώνη εντοπίζεται κοντά στα 390 ζεύγη βάσεων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας πλασμιδιακός φορέας χωρίς ένθεμα (self ligation). Το αποτέλεσμα της διαγνωστικής PCR παρατίθεται στην **εικόνα 37**.



**Εικόνα 37.** Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής PCR του φορέα pLVTHM για έλεγχο ένθεσης shRNA για GR5 (shGR5) σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest), ο φορέας pLVTHM (Neg Con 1), το προϊόν self ligation (Neg Con 2) και τα δύο δείγματα προς έλεγχο. Το δείγμα που είναι θετικό, με προϊόν που αντιστοιχεί στη ζώνη περίπου στα 450 ζεύγη βάσεων, σημειώνεται με κόκκινο πλαίσιο.

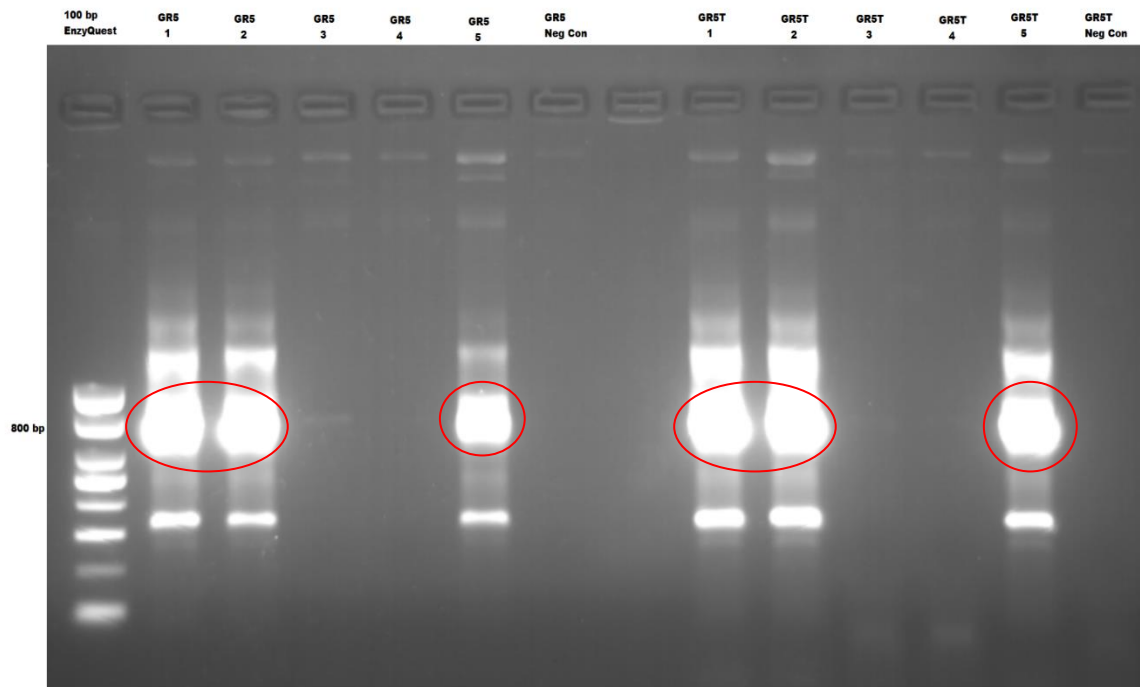
Για την επιβεβαίωση της ένθεσης του shRNA για το GR5T (shGR5T), επίσης, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR και οι ζώνες σε περίπτωση θετικού και αρνητικού αποτελέσματος είναι ίδιες με την περίπτωση για το shGR5. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην **εικόνα 38**.



**Εικόνα 38.** Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής PCR του φορέα pLVTHM για έλεγχο ένθεσης shRNA για GR5T (shGR5T) σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest), το προϊόν self ligation (Neg Con) και τα δύο δείγματα προς έλεγχο. Και τα δύο δείγματα είναι θετικά με προϊόν που αντιστοιχεί στη ζώνη περίπου στα 450 ζεύγη βάσεων και σημειώνεται με κόκκινο πλαίσιο.

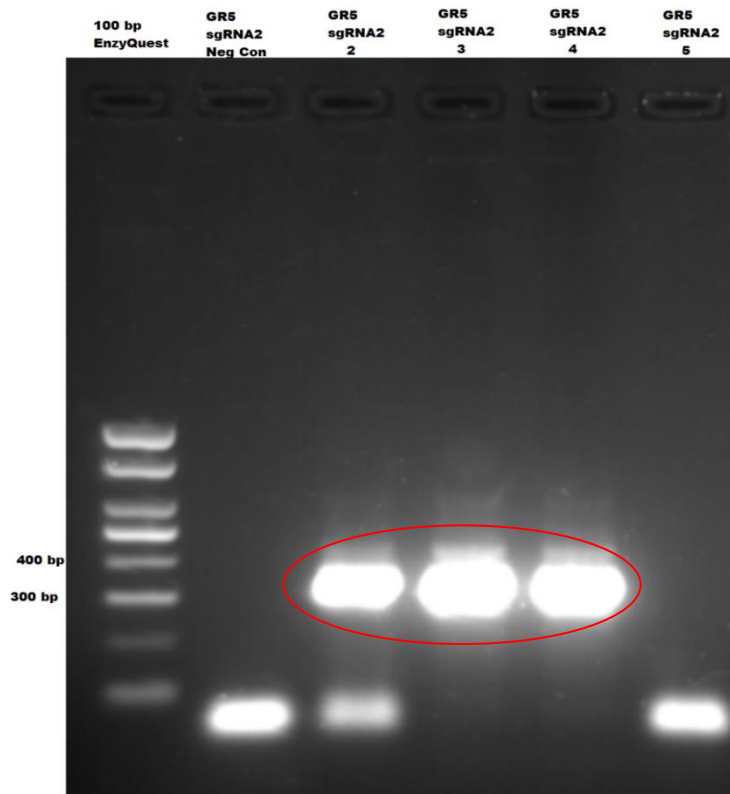
#### 4.6.Κλωνοποίηση pX333

Για την μελέτη των αποτελεσμάτων μετά από απενεργοποίηση (Knockout) του Gracile5 και του γονιδίου GR5T, κατασκευάστηκε ένα εργαλείο για knockout με τη χρήση του πλασμιδιακού φορέα pX333 για την έκφραση δύο sgRNA που αναγνωρίζουν και στοχεύουν τα γονίδια – στόχους. Μετά την κλωνοποίηση του πρώτου sgRNA (sgRNA1) στον φορέα και μετασχηματισμό αυτού στο στέλεχος E.coli DH5a, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% απεικονίζονται στην **εικόνα 39**. Η περίπτωση ενσωμάτωσης του sgRNA1 αντιστοιχεί σε ένα προϊόν στα 800 ζεύγη βάσεων περίπου.



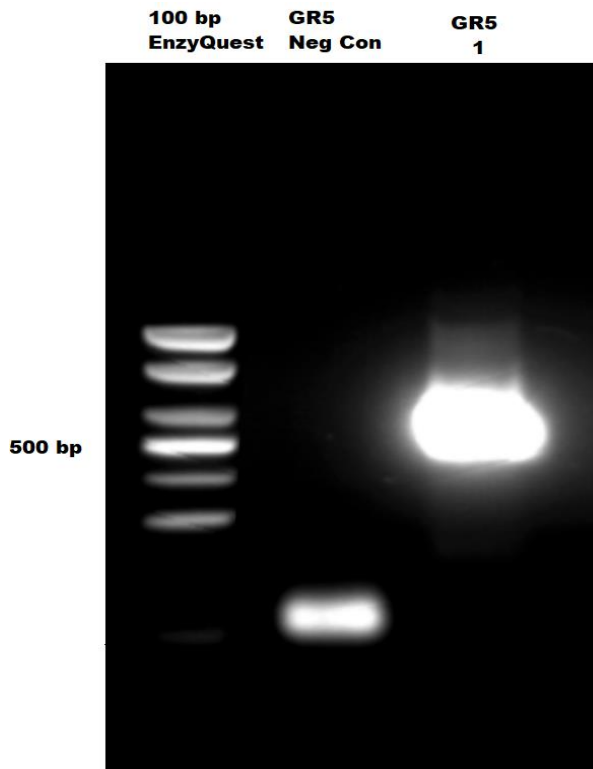
**Εικόνα 39.** Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής PCR του φορέα pX333 για έλεγχο ένθεσης sgRNA1 για Gracile5 και GR5T σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest), το προϊόν self ligation (GR5 / GR5T Neg Con) και τα πέντε, για κάθε γονίδιο, δείγματα προς έλεγχο. Τρία δείγματα είναι θετικά για κάθε περίπτωση, με προϊόν που αντιστοιχεί στη ζώνη περίπου στα 800 ζεύγη βάσεων και σημειώνεται με κόκκινο πλαίσιο.

Στη συνέχεια επιλέχθηκε ένα θετικό δείγμα για κάθε γονίδιο, πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BsaI, κλωνοποίηση ενός δεύτερο μορίου sgRNA (sgRNA2) και μετασχηματισμό στο στέλεχος E.coli DH5a. Για τον έλεγχο ένθεσης του sgRNA2 πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Αν το ένθεμα κλωνοποιήθηκε με επιτυχία, λαμβάνεται ένα προϊόν στα 350 ζεύγη βάσεων περίπου. Ως αρνητικός μάρτυρας αξιοποιήθηκε φορέας στον οποίον έχει κλωνοποιηθεί μόνο το sgRNA1 και στην αντίδραση λιγάσης για το sgRNA2 δεν προστέθηκε ένθεμα (self ligation). Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης φαίνονται στις εικόνες **40** και **42**.

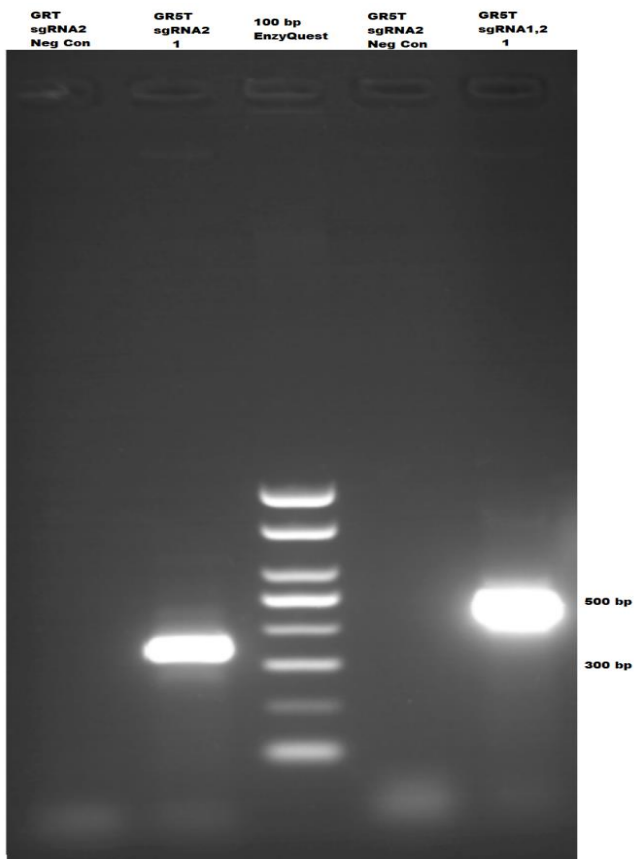


**Εικόνα 40.** Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής PCR του φορέα pX333 για έλεγχο ένθεσης sgRNA2 για Gracile5 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest), το προϊόν self ligation (GR5 / GR5T Neg Con) και τέσσερα δείγματα προς έλεγχο. Τρία δείγματα είναι θετικά, με προϊόν που αντιστοιχεί στη ζώνη περίπου στα 350 ζεύγη βάσεων και σημειώνεται με κόκκινο πλαίσιο.

Για την τελική επιβεβαίωση της ένθεσης και των δύο sgRNA πραγματοποιήθηκε μία ακόμη διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η περίπτωση ύπαρξης και των δύο ενθεμάτων αντιστοιχεί σε ένα προϊόν στα 500 ζεύγη βάσεων περίπου. Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης φαίνονται στις εικόνες **41** και **42**.



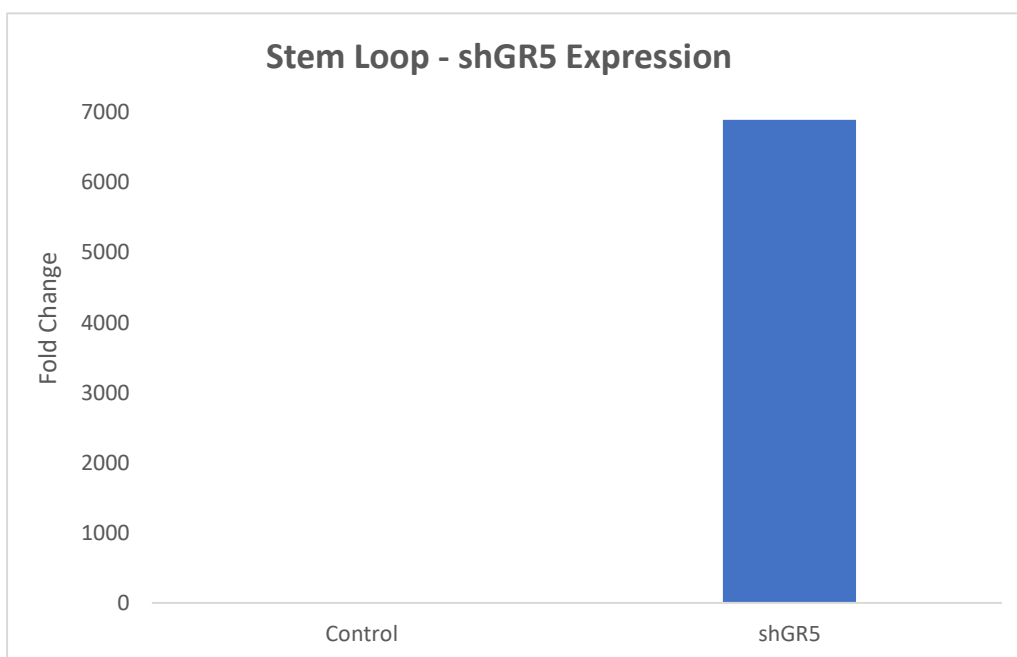
*Εικόνα 41.* Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής PCR του φορέα pX333 για έλεγχο ένθεσης sgRNA1 sgRNA2 για Gracile5 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest), το προϊόν self ligation (GR5T sgRNA2 Neg Con) και ένα δείγμα προς έλεγχο.



**Εικόνα 42.** Ηλεκτροφόρηση διαγνωστικής PCR του φορέα pX333 για έλεγχο ένθεσης sgRNA1 sgRNA2 για GR5T σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest), το προϊόν self ligation (GR5T sgRNA2 Neg Con) και ένα δείγμα προς έλεγχο.

#### 4.7: Έλεγχος αποτελεσματικότητας της παραγωγής shRNA από τον φορέα pLVTHM

Μετά την διαμόλυνση των κυττάρων AGS με τον πλασμιδιακό φορέα pLVTHM μέσω του συστήματος λεντιών, την απομόνωση RNA και την σύνθεση cDNA, διεξήχθη stem loop qPCR για τον έλεγχο της έκφρασης του shRNA για το γονίδιο Gracile5 στα κύτταρα. Αυτό το βήμα επιλέχθηκε τόσο για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του φορέα pLVTHM όσο και για τον έμμεσο έλεγχο καταστολής του μεταγράφου Gracile5, εφόσον το γονίδιο αυτό εκφράζεται εξαρχής σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα AGS κύτταρα και η καταστολή δεν θα ήταν ανιχνεύσιμη. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης επιλέχθηκε το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH και ο υπολογισμός της έκφρασης έγινε σε σύγκριση με έναν αρνητικό μάρτυρα (control), που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι φορέας pLVTHM που δεν περιέχει αλληλουχία shRNA. Συγκριτικά με το control, για το οποίο ορίζεται η τιμή 1, το shRNA του Gracile5 εκφράζεται 7,000 περισσότερο (**Εικόνα 43**).

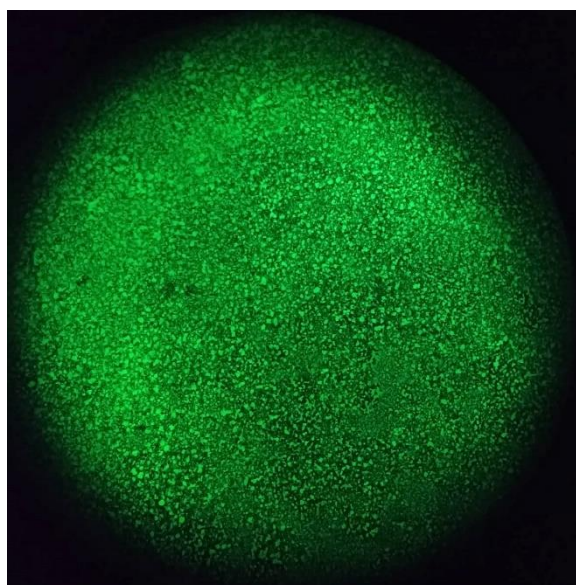


**Εικόνα 43.** Επίπεδα έκφρασης του shRNA για Gracile5 σε κύτταρα AGS που έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα pLVTHM μετά από διεξαγωγή stem loop qPCR.



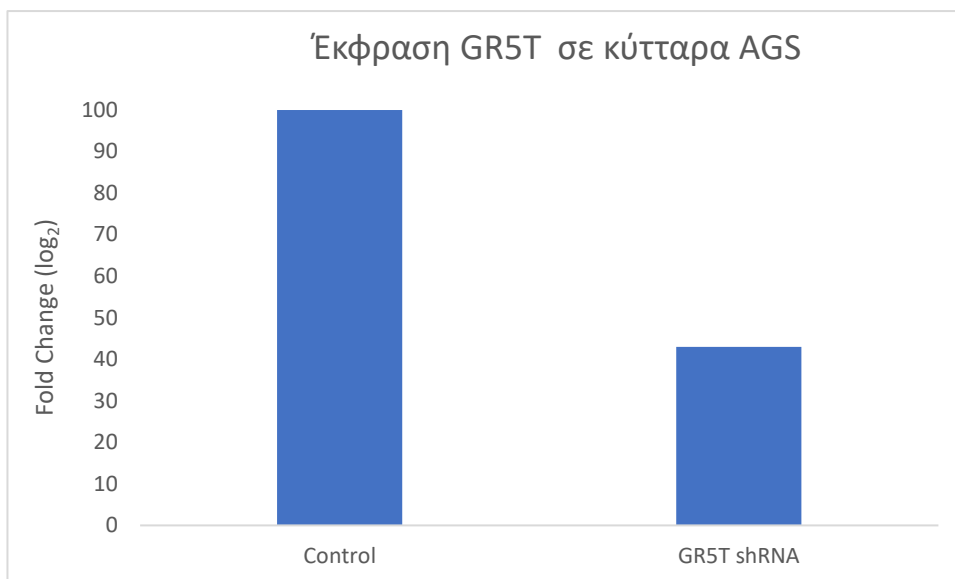
#### 4.8. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίου GR5T έπειτα από παροδική μεταγραφική σίγηση σε κύτταρα AGS

Για τον έλεγχο της σημασίας του γονιδίου στόχου GR5T, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα παροδικής σίγησης του μεταγράφου με το σύστημα που χρησιμοποιεί τον φορέα pLVTHM. Αρχικά, έγινε παρατήρηση στο μικροσκόπιο για να ελεγχθεί η παραγωγή/πολλαπλασιασμός λεντιών από τα κύτταρα AGS. Η επιτυχής γενετική τροποποίηση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με παρατήρηση φθορισμού σε μικροσκόπιο, καθώς το πλασμίδιο pLVTHM, ένα εκ των τριών πλασμιδίων για την συναρμολόγηση λεντιών, φέρει και ένα γονίδιο GFP. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 44**, υπάρχει έντονος φθορισμός, που σημαίνει ότι τα κύτταρα μολύνθηκαν με λεντιούς και εκφράζουν τα γονιδιά τους.



**Εικόνα 44.** Εικόνα από μικροσκοπία φθορισμού για παρατήρηση κυττάρων AGS που έχουν διαμολυνθεί με λεντιούς που φέρουν γονίδιο GFP.

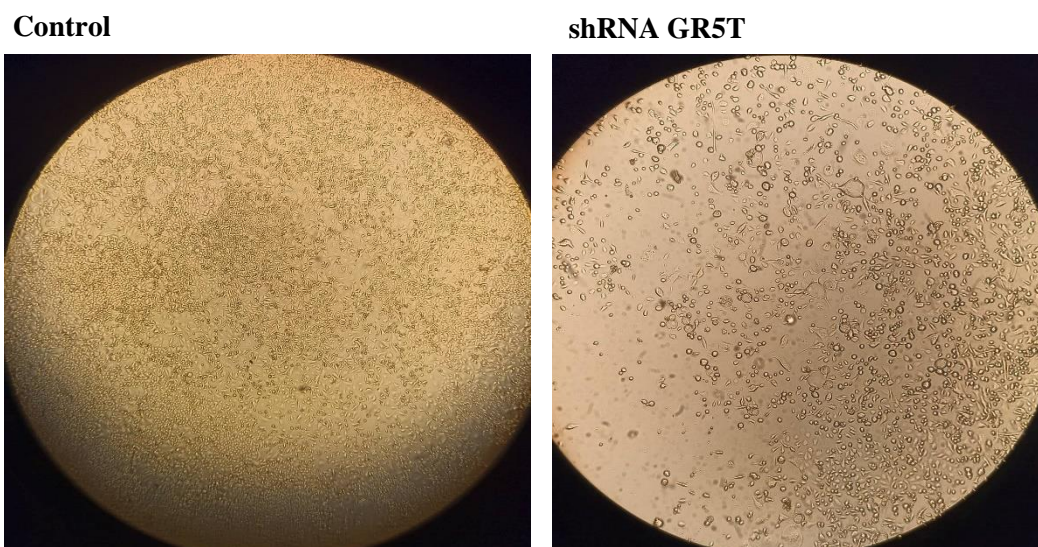
Τα επίπεδα έκφρασης του GR5T ελέγχθηκαν με qPCR σε cDNA που παράχθηκε από την απομόνωση RNA σε κύτταρα AGS που διαμολύνθηκαν με λεντιούς. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε ως προς το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της **εικόνας 45**, επιτεύχθηκε σίγηση της έκφρασης του GR5T σε ποσοστό 60% σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (control), ο οποίος είναι η έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα AGS που είχαν δεχτεί το πλασμίδιο pLVTHM χωρίς κλωνοποιημένα αλληλουχία.



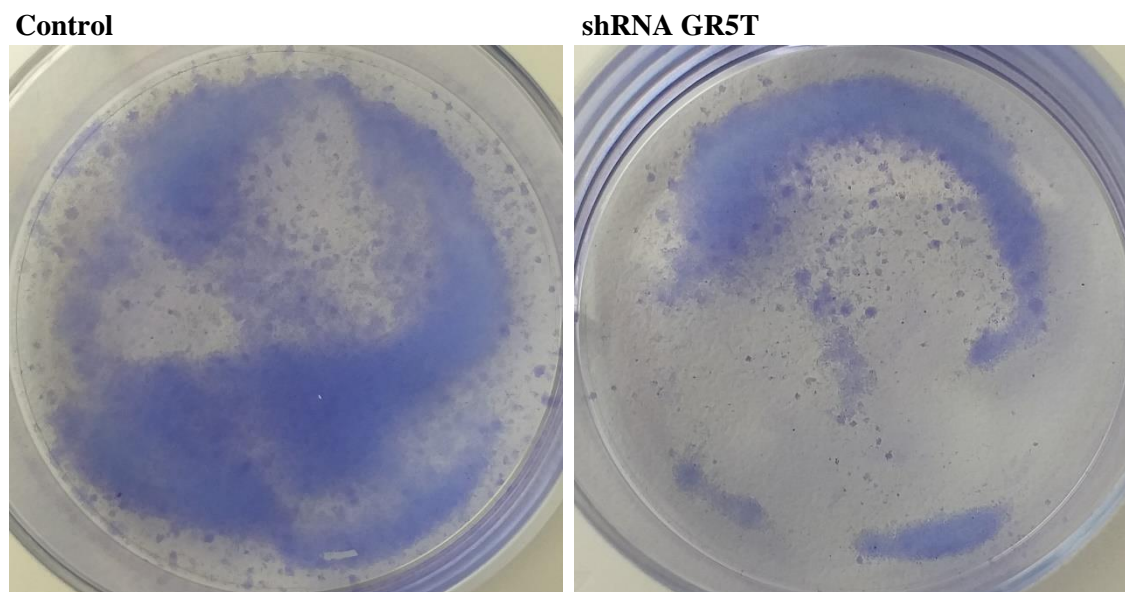
**Εικόνα 45.** Επίπεδα έκφρασης GR5T σε κύτταρα AGS υπό συνθήκες σίγησης μέσω του pLVTHM.

#### 4.9: Έλεγχος φαινοτύπου κυττάρων AGS σε συνθήκες καταστολής του GR5T

Έπειτα από την επιβεβαίωση της επιτυχούς σίγησης του γονιδίου GR5T σε κύτταρα AGS, ακολούθησε ο έλεγχος του φαινοτύπου στο μικροσκόπιο και με CFA για μακροσκοπικό έλεγχο. Η παρατήρηση φαινοτύπου έγινε σε κύτταρα AGS που δέχτηκαν το πλασμίδιο pLVTHM χωρίς ένθεμα, τα οποία αξιοποιούνται ως αρνητικός μάρτυρας, και σε κύτταρα AGS στα οποία πέτυχε η σίγηση του GR5T. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, παρατηρείται μείωση της επιφάνειας που καλύπτουν τα κύτταρα AGS σε συνθήκη καταστολής του γονιδίου GR5T και αλλαγή της μορφολογίας τους (**Εικόνα 46**). Σε μακροσκοπικό επίπεδο, παρατηρείται μία μείωση της επιφάνειας κάλυψης των κυττάρων σε συνθήκες καταστολής του γονιδίου GR5T (**Εικόνα 47**).



**Εικόνα 46.** Μικροσκοπική παρατήρηση φαινοτύπου κυττάρων AGS έπειτα από καταστολή του γονιδίου GR5T.

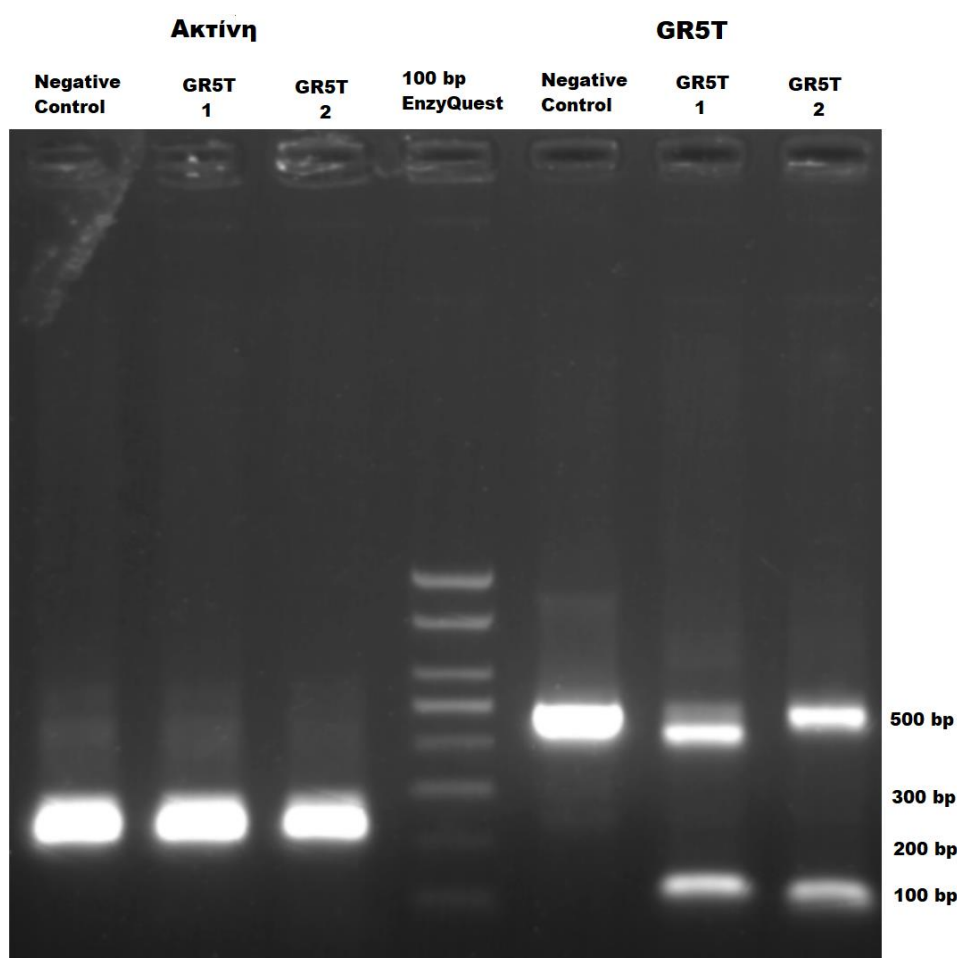


**Εικόνα 47.** Παρατήρηση φαινοτύπου κυττάρων AGS έπειτα από καταστολή του γονιδίου GR5T με την μέθοδο χρώσης κυττάρων CFA.

#### 4.10.Γονοτύπηση

Μετά την διαμόλυνση των κυττάρων AGS με το σύστημα απενεργοποίησης του GR5T γονιδίου με τη χρήση του πλασμιδιακού φορέα pX333, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από τους κλώνους κυττάρων που αναπτύχθηκαν. Το σύστημα γενετικής τροποποίησης αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικό, καθώς σε πρώτο στάδιο παρατηρήθηκε επιβίωση και μεγάλη ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με βλαστισιδίνη, γεγονός που μεταφράζεται ως επιτυχή εισαγωγή τουλάχιστον του πλασμιδίου που προσφέρει αντίσταση στο αντιβιοτικό και μεγάλη αυξημένων των πιθανοτήτων εισαγωγής και του πλασμιδίου pX333. Ωστόσο, η ανάπτυξη των επιλεγμένων κλώνων σε μεγαλύτερη κλίμακα δεν ήταν η επιθυμητή και οι κλώνοι παρουσίασαν αργή ανάπτυξη, όπως διαπιστώθηκε μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Για την απομόνωση και την γονοτύπηση επιλέχθηκαν τελικά μόνο δύο κλώνοι κυττάρων AGS και, έπειτα από την απομόνωση και την μέτρηση της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA με το φασματοφωτόμετρο Quawell, διαπιστώθηκε πως απομονώθηκε επαρκής ποσότητα και πραγματοποιήθηκε PCR. Επιπλέον, έγινε PCR και για την ενίσχυση του ιδιοσυστατου γονιδίου της ακτίνης, που χρησιμοποιείται ως ενδογενής δείκτης της ποιότητας του απομονωμένου

γονιδιωματικού DNA. Τα αποτελέσματα και για τις δύο PCR φαίνονται στην **εικόνα 48**. Όσον αφορά τα αποτελέσματα για το GR5T, αν η εκτομή του τμήματος του γονιδίου ήταν επιτυχής, τότε αναμένεται ένα προϊόν περίπου στα 100 ζεύγη βάσεων, ενώ σε αντίθετη περίπτωση το προϊόν που ενισχύεται αντιστοιχεί σε ζώνη στα 500 περίπου ζεύγη βάσεων. Ενισχύθηκαν δύο προϊόντα, ένα στα 500 ζεύγη βάσεων και ένα ακόμα στα 100 ζεύγη βάσεων, το οποίο σημαίνει πως η εκτομή του τμήματος του γονιδίου GR5T με το σύστημα CRIPSR Cas9 συνέβη στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα, άρα προέκυψε ετεροζυγωτία. Επιπλέον, μεταξύ των δύο δειγμάτων προέκυψαν προϊόντα με ελάχιστα διαφορετικό μήκος στα 100 ζεύγη βάσεων.



**Εικόνα 48.** Ηλεκτροφόρηση PCR για γονοτύπηση του γονιδίου GR5T για έλεγχο επιτυχίας συστήματος CRISPR Cas9 με τον φορέα pX333 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Φαίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp, EnzyQuest) και δύο δείγματα προς έλεγχο. Η επιτυχής εκτομή αντιστοιχεί στην ζώνη των 100 ζευγών βάσεων.



## 5.Συζήτηση

Ο καρκίνος του στομάχου είναι η πέμπτη σε συχνότητα μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο και αποτελεί την τρίτη σε κατάταξη αιτία θανάτου που οφείλεται στην συγκεκριμένη νόσο. Παρά τις αξιόλογες προσπάθειες που γίνονται για την έγκαιρη αντιμετώπιση καρκίνου του στομάχου, ακόμα τα ποσοστά παραμένουν υψηλά, κυρίως λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης της νόσου σε τελικά στάδια [136, 137]. Επιπλέον, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις είναι περιορισμένες και περιλαμβάνουν την χειρουργική αφαίρεση του όγκου, κυρίως για όγκους που ανιχνεύονται σε αρχικό στάδιο, καθώς και χημειοθεραπευτικά σχήματα [138]. Επομένως, είναι προφανής η ανάγκη για εύρεση νέων μη επεμβατικών, μοριακών βιοδεικτών για προγνωστικούς, διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Στην αναζήτηση για εύρεση εύκολων στην εφαρμογή και εξειδικευμένων βιοδεικτών για τον καρκίνο του στομάχου, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε μία νέα ομάδα μη κωδικοποιητικών μορίων που ονομάζονται μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non coding RNA / lncRNA). Τα lncRNA έχουν κυτταρο- και ιστοειδική έκφρασή τους, εμπλέκονται σε πληθώρα βασικών κυτταρικών διεργασιών και η απορρύθμισή τους έχει συσχετιστεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ αυτών και με τον καρκίνο του στομάχου [139]. Υπάρχουν διάφορα lncRNA για τα οποία ερευνάται η αξία τους στην πρόγνωση και διάγνωση του γαστρικού καρκίνου, αλλά και η χρήση τους είτε ως στόχοι είτε ως μέσα σε θεραπευτικές προσεγγίσεις [140].

Στα πλαίσια του εργαστηριακού έργου για την ανακάλυψη και μελέτη lncRNA που εμφανίζουν εξειδικευμένη έκφραση στον καρκίνο του στομάχου και έχουν προοπτικές για χρήση ως βιοδείκτες, εντάσσεται και η παρούσα πτυχιακή εργασία. Σκοπός αυτής είναι η μελέτη του lncRNA Gracile5, το οποίο μέσα από βιοπληροφορικές αναλύσεις βρέθηκε πως υπερεκφράζεται στον γαστρικό καρκίνο, καθώς και ενός υποψήφιου κωδικοποιητικού γονιδίου στόχου, που βρίσκεται γειτονικά του γονιδιακού τόπου του lncRNA και του οποίου η έκφραση φαίνεται πως συσχετίζεται με εκείνη του Gracile5. Πολλά lncRNA ρυθμίζουν την έκφραση κωδικοποιητικών γονιδίων που βρίσκονται σε γειτονικούς χρωμοσωμικά τόπους (*cis* δραστικά lncRNA). Τέτοια παραδείγματα που αφορούν lncRNA που ρυθμίζουν θετικά την μεταγραφή γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων έχουν βρεθεί και σε διάφορες μορφές καρκίνου. Για παράδειγμα, σε κάποιους υποτύπους οξείας λευχαιμίας έχει βρεθεί ότι το lncRNA CASC15 υπερεκφράζεται και έχει ισχυρή θετική συσχέτιση με

το γειτονικό γονίδιο SOX4, που λειτουργεί ως ογκογονίδιο στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Μέσα από πειράματα RNAi και CRISPR/Cas9 για καταστολή του CASC15 αποδείχθηκε πως και η έκφραση του SOX4, σε κάθε περίπτωση, μειορρυθμιζόταν [141]. Το lncRNA RBAT1 έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται στο ρετινοβλάστωμα και λειτουργεί ως ογκογονίδιο, ελέγχοντας την αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Το RBAT1 ελέγχει *in cis* την έκφραση του γονιδίου E2F3, που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα για την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων εξαρτώμενων από τον κυτταρικό κύκλο, πιθανόν στρατολογώντας της ριβονουκλεοπρωτεΐνης HNP1L1 στον υποκινητή του E2F3 ενεργοποιώντας την μεταγραφή του [142]. Ένα άλλο παράδειγμα *cis* δραστικού lncRNA που ελέγχει θετικά την έκφραση γειτονικού γονιδίου αφορά το TRERNA1, το οποίο στον γαστρικό καρκίνο έχει αυξημένη έκφραση και σχετίζεται με μετάσταση. Αυτό το lncRNA βρέθηκε πως ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γονιδίου SNAI1, το οποίο για έναν ρυθμιστή της κυτταρικής μετανάστευσης και της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) στην εξέλιξη του καρκίνου, λειτουργώντας ως ενισχυτής του και αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασής του [143].

Για την βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα αλληλούχησης RNA από βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο από διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες, με εντερικό και διάχυτο τύπο και σε διάφορα στάδια της νόσου καθώς επίσης και η βάση δεδομένων GEPIA. Από την ανάλυση βρέθηκε ότι στον καρκίνο του στομάχου παρατηρείται μία αύξηση της έκφρασης του Gracile5 και, μάλιστα, υπάρχει έντονη παραλλακτικότητα της έκφρασης και εντός των καρκινικών κυτταρικών τύπων του στομάχου (**Εικόνα 12**, **Εικόνα 21**). Από την ανάλυση της έκφρασης των δύο γονιδίων σε διάφορα στάδια εξέλιξης του γαστρικού καρκίνου φαίνεται πως η έκφραση του Gracile5 αυξάνεται γύρω στις 10 φορές από το φυσιολογική κατάσταση στο πρώτο στάδιο της νόσου, ενώ και από το πρώτο στο δεύτερο στάδιο παρατηρείται μία μικρή αύξηση έκφρασης που αργότερα σταθεροποιείται (**Εικόνα 14**). Η έκφραση του GR5T, επίσης, αυξάνεται από το φυσιολογικό στο πρώτο στάδιο εμφάνισης της νόσου και από το πρώτο στο δεύτερο, ενώ στην συνέχεια κινείται στα ίδια επίπεδα (**Εικόνα 15**). Από την δημιουργία διαγράμματος για την συσχέτιση των δύο γονιδίων σε όλα τα στάδια γαστρικού καρκίνου αποδεικνύεται πως υπάρχει μία στατιστικώς σημαντική, θετική συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ των δύο γονιδίων (**Εικόνα 16**, ). Ακόμα, από την ανάλυση της έκφρασης των δύο γονιδίων στους δύο διακριτούς ιστολογικά τύπους γαστρικού καρκίνου, τον εντερικό και τον διάχυτο, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων

έκφρασης από το φυσιολογικό στο καρκινικό στάδιο και στον εντερικό τύπο, όπου ελέγχθηκε η έκφραση σε προκαρκινικά στάδια, φαίνεται πως η έκφραση του Gracile5 αυξάνεται ελαφρώς στο στάδιο της εντερικής μεταπλασίας (**Εικόνα 17, Εικόνα 18**). Η υψηλή έκφραση του Gracile5 συνδέεται και με δυσμενή πρόγνωση και επιβίωση των ασθενών με γαστρικό καρκίνο (**Εικόνα 24**). Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν δύο συμπεράσματα. Πρώτον, τα δύο γονίδια, Gracile5 και GR5T, φαίνεται πως έχουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στον καρκίνο του στομάχου και υπερεκφράζονται σε αυτόν. Δεύτερον, το Gracile5 υπερεκφράζεται από τα αρχικά στάδια εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, γεγονός που υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο lncRNA ίσως μπορεί να αξιοποιηθεί ως διαγνωστικός βιοδείκτης για την έγκαιρη και πρόωρη διάγνωση της νόσου, ενώ είναι ακόμα ασυμπτωματική.

Από προηγούμενες βιοπληροφορικές αναλύσεις ChIP-seq δεδομένων του εργαστηρίου (δεν παρουσιάζονται εδώ) και από τα αποτελέσματα του διαγράμματος στην **Εικόνα 20**, υπάρχουν ενδείξεις πως η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου Gracile5 ελέγχεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF4a και CDX2. Οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα και, μάλιστα, η έκτοπη έκφρασή τους στο στομάχι έχει συσχετιστεί με το στάδιο της εντερικής μεταπλασίας [144-147]. Επιπλέον, και οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται στην ρύθμιση της έκφρασης lncRNA σε πολλούς καρκίνους. Για παράδειγμα, στο υπατοκυτταρικό καρκίνωμα τα lncRNA HOTAIR και MALAT1, τα οποία υπερεκφράζονται σε αυτόν τον τύπο καρκίνου, υπάγονται σε θετική ρύθμιση και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες, HNF4a και CDX2 [148]. Επιπλέον, η έκφραση του lncRNA HNF4a-AS1, που εντοπίζεται σε γειτονικό γενετικό τόπο από το γονίδιο που κωδικοποιεί τον HNF4a, ενεργοποιείται ισχυρά από τον HNF4a που μεταγράφεται από τον υποκινητή P1 στο ενήλικο ήπαρ και πιθανώς το ίδιο ρυθμίζει την μεταγραφή του HNF4a από τους δύο εναλλακτικούς υποκινητές, έχοντας κάποιο ρόλο και στην καρκινογένεση [149, 150]. Αντίθετα, το lncRNA HOTAIR, του οποίου η έκφραση είναι απορυθμισμένη σε καρκίνους του γαστρεντερικού, καταστέλλεται άμεσα από τον HNF4a σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος και του παχέος εντέρου. Η καταστολή επιτυγχάνεται με την παρεμπόδιση σχηματισμού βρόχου χρωματίνης, που φέρνει κοντά έναν ενισχυτή και τον υποκινητή του HOTAIR, από τον HNF4a καταστέλλοντας, έτσι την μεταγραφή και το EMT [70]. Επομένως, για να βρεθεί στην συγκεκριμένη περίπτωση η ρυθμιστική σχέση μεταξύ των μεταγραφικών

παραγόντων και του γονιδίου του Gracile5, πραγματοποιήθηκε qPCR για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των Gracile5 και GR5T σε κύτταρα AGS και HFE που προηγουμένως είχε επιτευχθεί υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF4a και CDX2. Στα κύτταρα HFE η έκφραση του Gracile5 αυξάνεται και, αντίστοιχα, ακολουθεί και αυξάνεται η έκφραση του GR5T (**Εικόνα 27**). Στα κύτταρα AGS, η έκφραση των δύο ισομορφών του Gracile5 μειώνεται μέχρι και, ακόμα, η έκφραση του GR5T και αυτή μειώνεται σε συνθήκες υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 και δεν επηρεάζεται σε υπερέκφραση του HNF4a (**Εικόνα 25**, **Εικόνα 26**). Από τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύεται ο θετικός ρυθμιστικός ρόλος του Gracile στην έκφραση GR5T. Επίσης, οι κυτταρικές αυτές σειρές επιλέχθηκαν για να ελεγχθεί η επίδραση της υπερέκφρασης των δύο μεταγραφικών παραγόντων τόσο σε μία κυτταρική σειρά που φυσιολογικά δεν τους εκφράζει (HFE) όσο και σε μία που εκφράζονται (AGS). Όπως ήταν αναμενόμενο, στα HFE παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του Gracile5, ενισχύοντας τις ενδείξεις για ρύθμιση της έκφρασής του από τους CDX2 και HNF4a. Ωστόσο, στα κύτταρα AGS παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του. Μία ενδεχόμενη εξήγηση για το φαινόμενο αυτό είναι πως σε κύτταρα που φυσιολογικά εκφράζουν έναν μεταγραφικό παράγοντα, η υπερέκφραση αυτού δεν θα επιφέρει αλλαγές στην έκφραση ρυθμιζόμενων γονιδίων. Ενδιαφέρον θα είχε η ταυτόχρονη υπερέκφραση των δύο μεταγραφικών παραγόντων, καθώς είναι γνωστό πως συνεργάζονται και λειτουργούν σε σύμπλοκα και η καταστολή αυτών των μεταγραφικών σε κύτταρα AGS, και στη συνέχεια έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων Gracile5 και GR5T.

Επιπλέον, σε δείγματα από προηγούμενο πείραμα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης για τους μεταγραφικούς παράγοντες CDX2 και HNF4a πραγματοποιήθηκε qPCR για έλεγχο της πρόσδεσης τους στους υποκινητές των γονιδίων Gracile5 και GR5T. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει ενίσχυση τμημάτων του υποκινητή του Gracile5 και του υποκινητή του GR5T (**Εικόνα 28**), συνεπώς επιβεβαιώνεται η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές των δύο γονιδίων.

Η μελέτη των lncRNA, που παραμένει μία δύσκολη υπόθεση λόγω της εξειδικευμένης και χαμηλής έκφρασης, είναι εφικτή με τη χρήση του συστήματος CRISPR, με το οποίο μπορεί στοχευμένα και με παραλλαγές του κλασσικού CRISPR να επιτευχθεί ο έλεγχος του γενετικού τύπου και η μεταγραφική του ενεργοποίηση. Μία παραλλαγή που αναπτύχθηκε και ονομάζεται CRISPR activation (CRISPRa),



χρησιμοποιεί την μεταλλαγμένη dCas9, που είναι καταλυτικά ανενεργή, η οποία έχει συντηχθεί με παράγοντες στρατολόγησης και ενεργοποίησης της RNA πολυμεράσης, όπως τους VP64 και p65 [151, 152]. Η μεθοδολογία CRISPRa έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την μελέτη των λειτουργιών πολλών lncRNA, όπως του MALAT-1 και NEAT-1 [153]. Προκειμένου, λοιπόν, να μελετηθεί ο ρόλος του Gracile5 στον καρκίνο του στομάχου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης αυτού του γονιδίου με το σύστημα CRISPRa, σε κύτταρα AGDC16 και LDC10 που εκφράζουν την πρωτεΐνη dCas9. Οι δύο κατασκευές, οι οποίες ήταν διαθέσιμες στο εργαστήριο, αφορούσαν τον ανασυνδυασμένο φορέα pLVU6 με ένθεμα sgRNA που αναγνωρίζει και υβριδοποιεί σε αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου Gracile5 για στόχευση και υπερέκφραση δύο ισομορφών που είναι γνωστό ότι υπάρχουν, της μικρής και μεγάλης. Στα κύτταρα LDC10 η υπερέκφραση ήταν επιτυχής και για τις δύο ισομορφές (**Εικόνα 29, Εικόνα 30**), με αύξηση της έκφρασης από 4 μέχρι 25 φορές περίπου. Αυτή η αύξηση θεωρείται επιτυχής και επαρκής να επιφέρει παρατηρήσιμες αλλαγές, δεδομένου ότι η ενεργοποίηση που επιτυγχάνεται σε κύτταρα θηλαστικών με αυτό το σύστημα κυμαίνεται συνήθως από 2 με 5 φορές [154]. Επιπλέον, φαίνεται πως επηρεάστηκε και η έκφραση του γονιδίου GR5T, καθώς αυξήθηκε κατά δύο με τρεις φορές η έκφρασή του και στις δύο περιπτώσεις στόχευσης (**Εικόνα 31**). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει την θετική συσχέτιση των δύο γονιδίων. Στα κύτταρα AGDC16, στη μία βιολογική επανάληψη παρατηρήθηκε υπερέκφραση τόσο του Gracile5 όσο και του GR5T (**Εικόνα 32, Εικόνα 33**), σε παρόμοια επίπεδα με αυτά στα LDC10, ενώ στη δεύτερη βιολογική επανάληψη του πειράματος σημειώθηκαν αντίθετα αποτελέσματα από τα επιθυμητά, δηλαδή καταστολή της έκφρασης του Gracile5 και, αντίστοιχα, του GR5T (**Εικόνα 34, Εικόνα 35**). Αυτό το φαινόμενο είναι παράδοξο και δεν καταγράφεται στην βιβλιογραφία παρόμοιο αποτέλεσμα. Ωστόσο, μία πιθανή ερμηνεία για το φαινόμενο καταστολής που παρατηρείται είναι πως η πρόσδεση της dCas9, η οποία έχει μεγάλο μοριακό βάρος, στον υποκινητή του Gracile5 εμπόδισε την πρόσδεση του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης για εκκίνηση της μεταγραφής. Σε κάθε περίπτωση, επιτυχημένης υπερέκφρασης ή όχι, επιβεβαιώνεται η θετική ρυθμιστική επίδραση του Gracile5 στο GR5T.

Για την μελέτη της λειτουργίας των Gracile5 και GR5T δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα μοριακά εργαλεία για την παροδική καταστολή (knockdown) της έκφρασης και απενεργοποίηση (knockout) των γονιδίων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Για το

knockdown των γονιδίων, κλωνοποιήθηκαν μόρια shRNA στον φορέα κλωνοποίησης pLVTHM και η επιβεβαίωση της ένθεσης πραγματοποιήθηκε με διαγνωστικές πέψεις και PCR. Ο ανασυνδυασμένος φορέας αξιοποιήθηκε σε πείραμα διαμόλυνσης με λεντιούς σε κύτταρα AGS. Ο έλεγχος της έκφρασης έγινε με qPCR και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για το Gracile5 παράχθηκε ικανός αριθμός μορίων shRNA να προκαλέσει καταστολή (**Εικόνα 43**), ωστόσο δεν ελέγχθηκε η έκφραση του ίδιου του γονιδίου. Τα αποτελέσματα της qPCR για το GR5T έδειξαν καταστολή του μεταγράφου της τάξεως του 60% (**Εικόνα 45**). Μετά την επιτυχημένη καταστολή του GR5T, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία σχηματισμού αποικιών (CFA) για τον έλεγχο φαινοτυπικού αποτελέσματος που προκαλείται από την καταστολή και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Έπειτα από καταστολή του γονιδίου, παρατηρήθηκε μία αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων και μείωση της επιφάνειας που καταλαμβάνουν (**Εικόνα 46, Εικόνα 47**). Για την επιβεβαίωση και την περαιτέρω μελέτη των φαινοτυπικών αποτελεσμάτων χρειάζονται επιπλέον πειράματα για έλεγχο της απόπτωσης και της μείωσης του πληθυσμού.

Για knockout των γονιδίων, κλωνοποιήθηκαν διαδοχικά δύο sgRNA στον πλασμιδιακό φορέα pX333 και η ένθεση επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές PCR. Η κατασκευή για knockout του γονιδίου GR5T αξιοποιήθηκε για διαμόλυνση των κυττάρων AGS με λεντιούς. Για τον έλεγχο επιτυχούς εκτομής τμήματος του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε PCR και διαπιστώθηκε πως ήταν επιτυχής στο ένα εκ των δύο αλληλομόρφων (**Εικόνα 48**). Μάλιστα, μεταξύ των δύο δειγμάτων ελέγχου παρατηρήθηκε μία μικρή διαφορά ως προς τα προϊόντα, δηλαδή το προϊόν εκτομής του γονιδίου μεταξύ των δύο δειγμάτων έχει διαφορετικό μήκος γύρω στα 100 ζεύγη βάσεων. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν ληφθεί υπόψη πως το σύστημα CRISPR Cas9 πραγματοποιεί με κατευθυνόμενο τρόπο τυχαία εκτομή του γονιδίου στόχου.

Στους μελλοντικούς στόχους της έρευνας για το lncRNA Gracile5 εντάσσονται η χρήση της κατασκευής pX333 για knockout του γονιδίου, ο περαιτέρω έλεγχος του μεταγραφικού δικτύου που ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου Gracile5 με επιπλέον συνδυαστικά πειράματα καταστολής και υπερέκφρασης, η ανακάλυψη του ρόλου του Gracile5 στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στόχου και πειράματα για έλεγχο του φαινοτύπου έπειτα από καταστολή ή υπερέκφραση του lncRNA.

## 6. Παράρτημα

### 6.1. Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του στομάχου

Ο γαστρικός καρκίνος παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια από μορφολογικής άποψης και αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός πως υπάρχουν διάφορα συστήματα ταξινόμησης, τα οποία στηρίζονται σε ιστολογικά χαρακτηριστικά [155]. Μέχρι και σήμερα, δεν έχει αποδειχθεί ότι ένα σύστημα ταξινόμησης είναι το πληρέστερο και περιγράφει όλους τους τύπους γαστρικού καρκίνου βάσει ιστοπαθολογικών κριτηρίων και, επιπλέον, παρατηρείται ετερογένεια ακόμα και στον όγκο ενός ασθενούς, γεγονός που εντείνει την δυσκολία στην κατηγοριοποίηση [156]. Ένα σύστημα ιστολογικής ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται κυρίως, και σε κλινικό επίπεδο, είναι το σύστημα ταξινόμησης κατά Laurén, τα οποία αναλύεται παρακάτω.

#### Ταξινόμηση κατά Laurén

Η ταξινόμηση κατά Laurén, αν και δημοσιεύθηκε το 1965, παραμένει ακόμα μία από τις πιο ευρέως αποδεκτές ταξινομήσεις και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με αυτή, διακρίνονται τρεις κατηγορίες γαστρικού καρκίνου: ο εντερικός (intestinal), ο διάχυτος (diffuse) και ο απροσδιόριστος (indeterminate) [157]. Οι κατηγορίες αυτές διαφέρουν τόσο στην κλινική εικόνα όσο και σε μοριακή βάση.

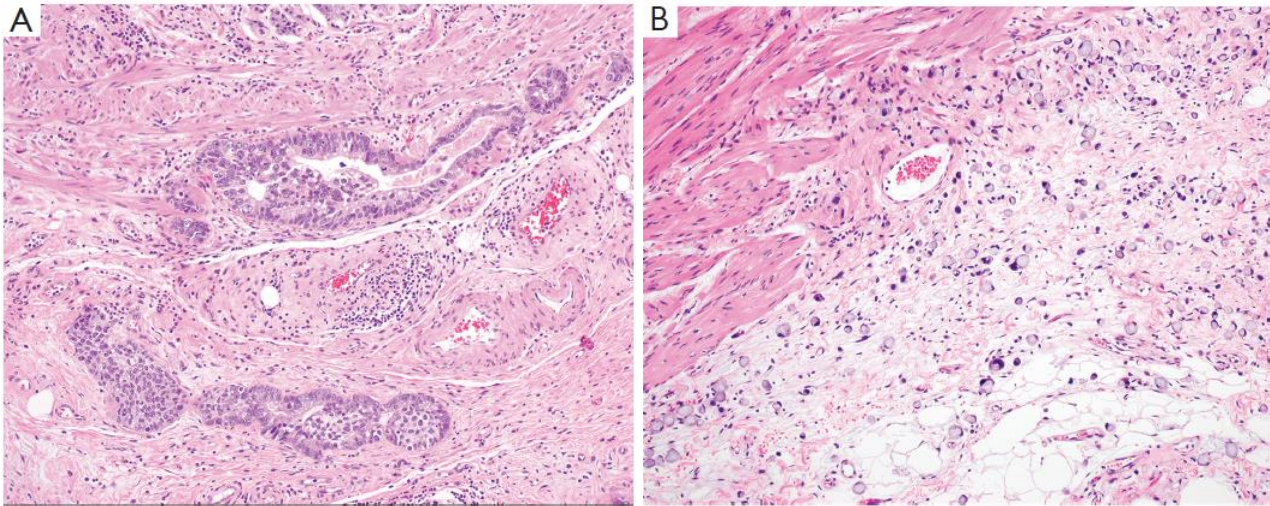
#### **Εντερικός Τύπος**

Αναλυτικότερα, ο εντερικός τύπος γαστρικού καρκίνου είναι ο συχνότερος τύπος, με ποσοστό εμφάνισης 54%, εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις μεγάλες ηλικίες και κυρίως στο ανδρικό φύλο [158]. Διακρίνεται από σωληνοειδείς ή θηλώδεις δομές, από τον σχηματισμό αδένων και τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη συνοχή [159]. Τα στοιχεία που υπάρχουν προτείνουν ότι αυτός ο τύπος γαστρικού καρκίνου περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ του γενετικού προφίλ του ατόμου, του περιβάλλοντος και μόλυνσης από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*H. pylori*) [160, 161]. Πιο συγκεκριμένα, η μόλυνση από το *H. pylori* προκαλεί μία χρόνια φλεγμονή στο σημείο της μόλυνσης, οδηγώντας σε εντερική μεταπλασία του γαστρικού βλεννογόνου, η οποία αποτελεί μία προκαρκινική αλλοίωση του στομάχου. Η μολυσματική δράση οφείλεται σε βακτηριακούς παράγοντες που προκαλούν αλλοιώσεις στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, και συγκεκριμένα, η βακτηριακή

πρωτεΐνη CagA αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και προκαλεί αλλαγές στην μιτωτική δραστηριότητα, την απόπτωση, την συνοχή μεταξύ των κυττάρων και την σηματοδότηση [162]. Επιπλέον, τροποποιεί και τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA των επιθηλιακών και απορρυθμίζει την φυσιολογική έκφραση γονιδίων περαιτέρω στο γαστρικό επιθήλιο [163, 164]. Πέρα από την εμπλοκή περιβαλλοντικών παραγόντων, δηλαδή την μόλυνση από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, σε μοριακό επίπεδο οι όγκοι εντερικού τύπου έχουν συσχετισθεί με το γονίδιο caudal type homeobox-2 (CDX2), το πρωτοογκογονίδιο Her-2/neu (HER2) και το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης [165, 166].

### Διάχυτος Τύπος

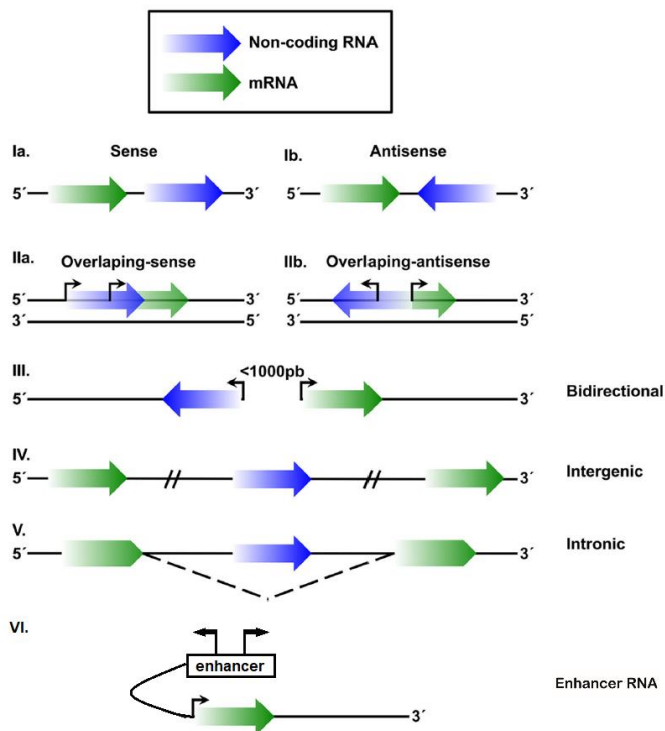
Ο διάχυτος τύπος γαστρικού καρκίνου είναι ο δεύτερος, σε συχνότητα, τύπος (32% περιπτώσεων) και διαγιγνώσκεται συχνότερα σε γυναίκες και σε άτομα νεαρότερης ηλικίας [167]. Περιλαμβάνει σχετικώς αδιαφοροποίητα κύτταρα με μικρή συνοχή μεταξύ τους, τα οποία μπορούν να διεισδύουν διάχυτα στα τοιχώματα του στομάχου χωρίς τον σχηματισμό αδένων, έχουν συνήθως μικρό μέγεθος και στρογγυλό σχήμα και έχουν συχνά την διαμόρφωση σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring). Αυτός ο τύπος συνοδεύεται από ταχεία εξέλιξη της νόσου και χειρότερη πρόγνωση, σε σχέση με τον εντερικό τύπο [168, 169]. Σε μοριακό επίπεδο, η ανάπτυξη διάχυτου τύπου γαστρικού καρκίνου ξεκινά με την απώλεια έκφρασης της E-καδερίνης, πρωτεΐνη της επιφάνειας των κυττάρων, η οποία είναι απαραίτητη για την διατήρηση της συνοχής μεταξύ γειτονικών κυττάρων, καθώς συμμετέχει στον σχηματισμό των κόμβων κυτταρικής προσκόλλησης (adherens junctions) [170]. Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από το γονίδιο CDH1, το οποίο έχει ογκοκατασταλτική δράση και έχουν βρεθεί τόσο σωματικές και γαμετικές μεταλλάξεις όσο και επιγενετικές τροποποιήσεις σε αυτόν τον γονιδιακό τόπο, που οδηγούν σε σίγηση της έκφρασης του γονιδίου, με αποτέλεσμα την καταστολή των λειτουργιών της E-καδερίνης και την ραγδαία εξέλιξη του διάχυτου γαστρικού καρκίνου [166, 171]. Άλλες μεταλλάξεις που έχει βρεθεί ότι είναι χαρακτηριστικές αυτού του τύπου γαστρικού καρκίνου αφορούν το γονίδιο που κωδικοποιεί το μέλος A της οικογένειας RHO GTPασών (RhoA) και συντήξεις μεταξύ γονιδίων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την σύντηξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την κλοδίνη 18 (claudin-18) και την πρωτεΐνη ενεργοποίησης της Rho GTPάσης 6 (CLDN18-ARHGAP6) [172, 173].



**Εικόνα 49.** Ιστολογική απεικόνιση των δύο τύπων γαστρικού αδενοκαρκινώματος, Χρώση τομών με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. (Α) Εντερικός τύπος, διεσταλμένες, διακλαδισμένες σωληνοειδείς δομές, (Β) Διάχυτος τύπος, καρκίνωμα με διαμόρφωση σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring) [167].

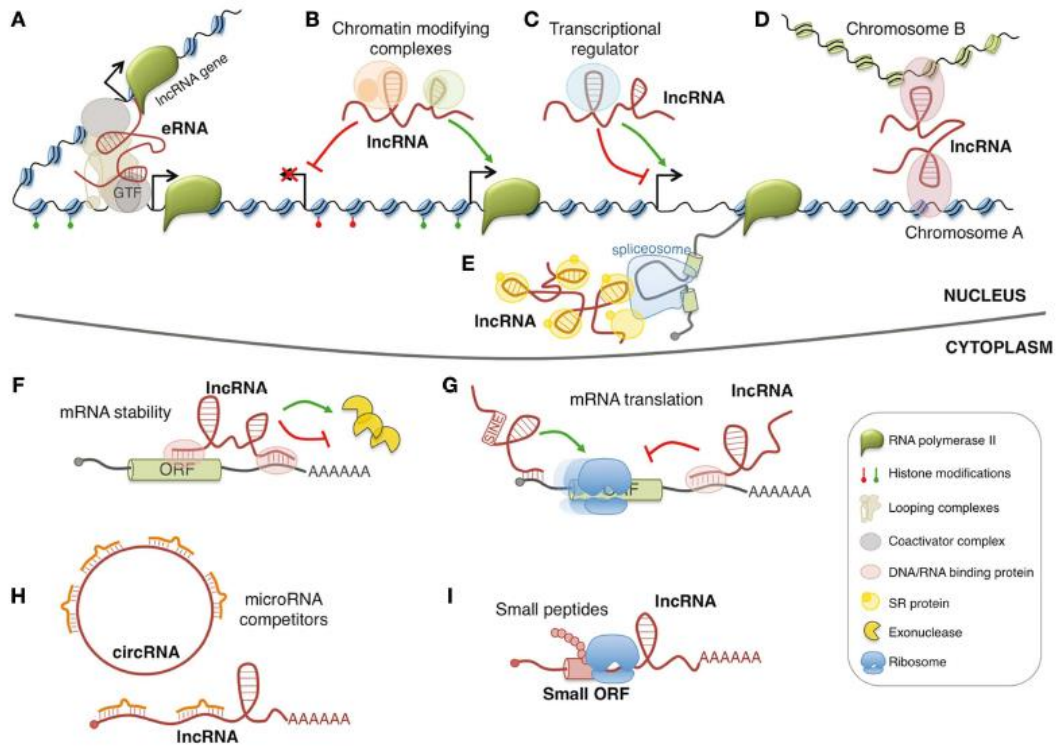
## 6.2.Κατηγορίες lncRNA

Ένας τρόπος ταξινόμησης που χρησιμοποιείται για τα lncRNA είναι η εγγύτητα του γενετικού τόπου αυτών με γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Ανάλογα, λοιπόν, με το σημείο βιογένεσής τους διακρίνονται σε: 1.Νοηματικά ή αντινοηματικά lncRNA, που μεταγράφονται από την ίδια ή την αντίθετη αλυσίδα μεταγραφής του mRNA, αντίστοιχα, 2.νοηματικά ή αντινοηματικά lncRNA, τα οποία αλληλοεπικαλύπτονται με ιντρόνια ή εξόνια άλλων γονιδίων και μεταγράφονται με την ίδια ή την αντίθετη κατεύθυνση, αντίστοιχα (overlapping sense/antisense), 3.αμφίδρομα (bidirectional) lncRNA τα οποία εντοπίζονται σε περιοχές σε απόσταση <1000 ζεύγη βάσεων από το σημείο έναρξης μεταγραφής του mRNA και μεταγράφονται από τον υποκινητή αυτού του κωδικοποιητικού γονιδίου, αλλά από την αντίθετη κατεύθυνση, 4.μεσογονιδιακά (intergenic)/lincRNA που βρίσκονται μεταξύ δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, 5.lncRNA που εντοπίζονται στο ιντρόνιο ενός κωδικοποιητικού γονιδίου (intronic), και 6. lncRNA ενισχυτές /e-lncRNA που μεταγράφονται από αλληλουχίες ενισχυτών [174-177].



**Εικόνα 50.** Ταξινόμηση των lncRNA με κριτήριο την θέση τους στο γονιδίωμα [175].

Ένα ακόμη κριτήριο με το οποίο κατηγοριοποιούνται τα lncRNA είναι το υποκυτταρικό σημείο στο οποίο εντοπίζονται ενδοκυτταρικά, και διακρίνονται σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά lncRNA [178]. **(Εικόνα 51)** Τα πυρηνικά lncRNA εμπλέκονται σε μηχανισμούς αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και στην μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων στόχων, ενώ τα κυτταροπλασματικά lncRNA συμμετέχουν στην μεταφραστική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση των mRNA γονιδίων στόχων, κυρίως προσελκύνοντας miRNA και λειτουργώντας ως εναλλακτικοί στόχοι αυτών (miRNA sponges), με αποτέλεσμα την μείωση του μηχανισμού παρεμβολής RNA (RNA Interference – RNAi), αλλά και συμβάλλοντας στην σταθερότητα των mRNA [179-182].



**Εικόνα 51.** Διάκριση των lncRNA ανάλογα με το υποκυτταρικό σημείο εντοπισμού και δράσης τους, σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά [183].



## Βιβλιογραφία

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. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
3. Katoh, H. and S. Ishikawa, *Lifestyles, genetics, and future perspectives on gastric cancer in east Asian populations*. J Hum Genet, 2021. **66**(9): p. 887-899.
4. Sekiguchi, M., et al., *Epidemiological Trends and Future Perspectives of Gastric Cancer in Eastern Asia*. Digestion, 2022. **103**(1): p. 22-28.
5. Luo, G., et al., *Global patterns and trends in stomach cancer incidence: Age, period and birth cohort analysis*. Int J Cancer, 2017. **141**(7): p. 1333-1344.
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. Ma, Z., et al., *Comparative investigation of early-onset gastric cancer*. Oncol Lett, 2021. **21**(5): p. 374.
8. Mattiuzzi, C. and G. Lippi, *Current Cancer Epidemiology*. J Epidemiol Glob Health, 2019. **9**(4): p. 217-222.
9. Thrift, A.P. and H.B. El-Serag, *Burden of Gastric Cancer*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020. **18**(3): p. 534-542.
10. Leja, M. and A. Line, *Early detection of gastric cancer beyond endoscopy - new methods*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2021. **50-51**: p. 101731.
11. Waldum, H.L. and R. Fossmark, *Types of Gastric Carcinomas*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(12).
12. Pinto, M.P., et al., *A Molecular Stratification of Chilean Gastric Cancer Patients with Potential Clinical Applicability*. Cancers (Basel), 2020. **12**(7).
13. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
14. Lim, B., et al., *Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1190-201.
15. Sun, K., et al., *EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 583463.
16. Padmanabhan, N., et al., *Highly recurrent CBS epimutations in gastric cancer CpG island methylator phenotypes and inflammation*. Genome Biol, 2021. **22**(1): p. 167.
17. Yang, J., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype*. Cancer Lett, 2020. **495**: p. 191-199.
18. Ignatova, E., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: disease that requires special approach*. Gastric Cancer, 2020. **23**(6): p. 951-960.
19. Usui, G., et al., *DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer*. Digestion, 2021. **102**(1): p. 25-32.
20. Wang, Q., G. Liu, and C. Hu, *Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma*. Gastroenterology Res, 2019. **12**(6): p. 275-282.
21. Oue, N., et al., *Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells*. Int J Clin Oncol, 2019. **24**(7): p. 771-778.
22. Sasaki, S., et al., *EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions*. Gastric Cancer, 2019. **22**(3): p. 486-496.
23. Sanjeevaiah, A., et al., *Gastric Cancer: Recent Molecular Classification Advances, Racial Disparity, and Management Implications*. J Oncol Pract, 2018. **14**(4): p. 217-224.



24. Rodriquez, M.G., et al., *MSI and EBV Positive Gastric Cancer's Subgroups and Their Link With Novel Immunotherapy*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
25. Li, K., et al., *Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know*. Cancer Cell Int, 2020. **20**: p. 16.
26. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
27. Eso, Y., et al., *Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers*. J Gastroenterol, 2020. **55**(1): p. 15-26.
28. Pecina-Slaus, N., et al., *Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 122.
29. Martinez-Ciarpaglini, C., et al., *Assessing molecular subtypes of gastric cancer: microsatellite unstable and Epstein-Barr virus subtypes. Methods for detection and clinical and pathological implications*. ESMO Open, 2019. **4**(3): p. e000470.
30. Yang, G., R.Y. Zheng, and Z.S. Jin, *Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours*. J Cancer Res Clin Oncol, 2019. **145**(12): p. 2891-2899.
31. Huo, X., et al., *Characterization and clinical evaluation of microsatellite instability and loss of heterozygosity in tumor-related genes in gastric cancer*. Oncol Lett, 2021. **21**(6): p. 430.
32. Puliga, E., et al., *Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows*. Cancer Treat Rev, 2021. **95**: p. 102175.
33. Katona, B.W. and A.K. Rustgi, *Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(2): p. 211-217.
34. 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.
35. Shenoy, S., *CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 10477-10486.
36. Zhang, H., et al., *Gain-of-Function RHOA Mutations Promote Focal Adhesion Kinase Activation and Dependency in Diffuse Gastric Cancer*. Cancer Discov, 2020. **10**(2): p. 288-305.
37. Zhang, W.H., et al., *The Significance of the CLDN18-ARHGAP Fusion Gene in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1214.
38. Nakayama, I., et al., *Enrichment of CLDN18-ARHGAP fusion gene in gastric cancers in young adults*. Cancer Sci, 2019. **110**(4): p. 1352-1363.
39. Yang, H., et al., *RhoGAP domain-containing fusions and PPAPDC1A fusions are recurrent and prognostic in diffuse gastric cancer*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4439.
40. Bonelli, P., et al., *Precision medicine in gastric cancer*. World J Gastrointest Oncol, 2019. **11**(10): p. 804-829.
41. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology*. Neoplasia, 2017. **19**(5): p. 412-420.
42. Vargas-Rondon, N., V.E. Villegas, and M. Rondon-Lagos, *The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses*. Cancers (Basel), 2017. **10**(1).
43. 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.
44. Kohlruss, M., et al., *Diverse 'just-right' levels of chromosomal instability and their clinical implications in neoadjuvant treated gastric cancer*. Br J Cancer, 2021. **125**(12): p. 1621-1631.
45. Liu, X. and S.J. Meltzer, *Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(3): p. 348-358.

46. Johnston, F.M. and M. Beckman, *Updates on Management of Gastric Cancer*. Curr Oncol Rep, 2019. **21**(8): p. 67.
47. Song, Z., et al., *Progress in the treatment of advanced gastric cancer*. Tumour Biol, 2017. **39**(7): p. 1010428317714626.
48. Joshi, S.S. and B.D. Badgwell, *Current treatment and recent progress in gastric cancer*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 264-279.
49. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
50. Matsuoka, T. and M. Yashiro, *Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(26): p. 2818-2832.
51. Petryszyn, P., N. Chapelle, and T. Matysiak-Budnik, *Gastric Cancer: Where Are We Heading?* Dig Dis, 2020. **38**(4): p. 280-285.
52. Benahmed, F., et al., *Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene*. Gastroenterology, 2008. **135**(4): p. 1238-1247, 1247 e1-3.
53. Grainger, S., J.G. Savory, and D. Lohnes, *Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium*. Dev Biol, 2010. **339**(1): p. 155-65.
54. Coskun, M., J.T. Troelsen, and O.H. Nielsen, *The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(3): p. 283-9.
55. Yasui, W., et al., *Molecular pathology of gastric cancer: research and practice*. Pathol Res Pract, 2011. **207**(10): p. 608-12.
56. Zhu, Y., et al., *Cdx2 Regulates Intestinal EphrinB1 through the Notch Pathway*. Genes (Basel), 2021. **12**(2).
57. Almeida, R., et al., *Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas*. J Pathol, 2003. **199**(1): p. 36-40.
58. Yu, J., et al., *CDX2 inhibits epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer by modulation of Snail expression and beta-catenin stabilisation via transactivation of PTEN expression*. Br J Cancer, 2021. **124**(1): p. 270-280.
59. Masood, M.A., A. Loya, and M.A. Yusuf, *CDX2 as a prognostic marker in gastric cancer*. Acta Gastroenterol Belg, 2016. **79**(2): p. 197-200.
60. Xiao, Z.Y., et al., *Expression of CDX2 and villin in gastric cardiac intestinal metaplasia and the relation with gastric cardiac carcinogenesis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(1): p. 247-50.
61. Akhavan-Niaki, H. and A.A. Samadani, *Molecular insight in gastric cancer induction: an overview of cancer stemness genes*. Cell Biochem Biophys, 2014. **68**(3): p. 463-73.
62. Chawengsaksophak, K., *Cdx2 Animal Models Reveal Developmental Origins of Cancers*. Genes (Basel), 2019. **10**(11).
63. Milne, A.N., et al., *Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer*. Hum Genet, 2009. **126**(5): p. 615-28.
64. Konukiewicz, B., et al., *Loss of CDX2 in colorectal cancer is associated with histopathologic subtypes and microsatellite instability but is prognostically inferior to hematoxylin-eosin-based morphologic parameters from the WHO classification*. Br J Cancer, 2021. **125**(12): p. 1632-1646.
65. Kim, H.S., et al., *CDX-2 homeobox gene expression in human gastric carcinoma and precursor lesions*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(2): p. 438-42.
66. van der Post, R.S., et al., *HNF4A immunohistochemistry facilitates distinction between primary and metastatic breast and gastric carcinoma*. Virchows Arch, 2014. **464**(6): p. 673-9.
67. Dubois, V., et al., *Control of Cell Identity by the Nuclear Receptor HNF4 in Organ Pathophysiology*. Cells, 2020. **9**(10).

68. Yeh, M.M., D.E. Bosch, and S.S. Daoud, *Role of hepatocyte nuclear factor 4-alpha in gastrointestinal and liver diseases*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(30): p. 4074-4091.
69. Walesky, C. and U. Apte, *Role of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) in cell proliferation and cancer*. Gene Expr, 2015. **16**(3): p. 101-8.
70. Battistelli, C., et al., *The lncRNA HOTAIR transcription is controlled by HNF4alpha-induced chromatin topology modulation*. Cell Death Differ, 2019. **26**(5): p. 890-901.
71. Cattin, A.L., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(23): p. 6294-308.
72. Chang, H.R., et al., *HNF4alpha is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer*. Gut, 2016. **65**(1): p. 19-32.
73. Hu, Q., et al., *Berberine Attenuated Proliferation, Invasion and Migration by Targeting the AMPK/HNF4alpha/WNT5A Pathway in Gastric Carcinoma*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1150.
74. Lv, D.D., L.Y. Zhou, and H. Tang, *Hepatocyte nuclear factor 4alpha and cancer-related cell signaling pathways: a promising insight into cancer treatment*. Exp Mol Med, 2021. **53**(1): p. 8-18.
75. Ni, Z., et al., *Analysis of the HNF4A isoform-regulated transcriptome identifies CCL15 as a downstream target in gastric carcinogenesis*. Cancer Biol Med, 2021.
76. Uozaki, H., et al., *Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein-Barr virus status in gastric cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(3): p. 230-40.
77. Xu, C., et al., *HNF4alpha pathway mapping identifies wild-type IDH1 as a targetable metabolic node in gastric cancer*. Gut, 2020. **69**(2): p. 231-242.
78. Larsen, S., et al., *HNF4alpha and CDX2 Regulate Intestinal YAP1 Promoter Activity*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(12).
79. San Roman, A.K., et al., *Transcription factors GATA4 and HNF4A control distinct aspects of intestinal homeostasis in conjunction with transcription factor CDX2*. J Biol Chem, 2015. **290**(3): p. 1850-60.
80. Verzi, M.P., et al., *Intestinal master transcription factor CDX2 controls chromatin access for partner transcription factor binding*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(2): p. 281-92.
81. Chia, N.Y., et al., *Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development*. Gut, 2015. **64**(5): p. 707-19.
82. Ni, Z., et al., *TGR5-HNF4alpha axis contributes to bile acid-induced gastric intestinal metaplasia markers expression*. Cell Death Discov, 2020. **6**: p. 56.
83. Singh, H., et al., *Transcription factor-mediated intestinal metaplasia and the role of a shadow enhancer*. Genes Dev, 2022. **36**(1-2): p. 38-52.
84. Wang, X.T., et al., *Prognostic significance of Cdx2 immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis of published literatures*. J Exp Clin Cancer Res, 2012. **31**: p. 98.
85. Chandra Gupta, S. and Y. Nandan Tripathi, *Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets*. Int J Cancer, 2017. **140**(9): p. 1955-1967.
86. Diamantopoulos, M.A., P. Tsiakanikas, and A. Scorilas, *Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer*. Ann Transl Med, 2018. **6**(12): p. 241.
87. Wei, L., et al., *Noncoding RNAs in gastric cancer: implications for drug resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 62.
88. Wei, L., et al., *The emerging role of microRNAs and long noncoding RNAs in drug resistance of hepatocellular carcinoma*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 147.

89. Liu, Q.P., et al., *LncRNAs in tumor microenvironment: The potential target for cancer treatment with natural compounds and chemical drugs*. *Biochem Pharmacol*, 2021. **193**: p. 114802.
90. Fang, Y. and M.J. Fullwood, *Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016. **14**(1): p. 42-54.
91. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. *Mol Ther Oncolytics*, 2021. **23**: p. 458-476.
92. Gao, F., et al., *Reverse-genetics studies of lncRNAs-what we have learnt and paths forward*. *Genome Biol*, 2020. **21**(1): p. 93.
93. Ransohoff, J.D., Y. Wei, and P.A. Khavari, *The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(3): p. 143-157.
94. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(10).
95. Heery, R., et al., *Long Non-Coding RNAs: Key Regulators of Epithelial-Mesenchymal Transition, Tumour Drug Resistance and Cancer Stem Cells*. *Cancers (Basel)*, 2017. **9**(4).
96. Liu, Y., et al., *Long Non-Coding RNA in Gastric Cancer: Mechanisms and Clinical Implications for Drug Resistance*. *Front Oncol*, 2022. **12**: p. 841411.
97. Zhu, J., et al., *The Emerging Roles of LINC00665 in Human Cancers*. *Front Cell Dev Biol*, 2022. **10**: p. 839177.
98. Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. *Cell*, 2018. **172**(3): p. 393-407.
99. Liu, S.J. and D.A. Lim, *Modulating the expression of long non-coding RNAs for functional studies*. *EMBO Rep*, 2018. **19**(12).
100. Balas, M.M. and A.M. Johnson, *Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer*. *Noncoding RNA Res*, 2018. **3**(3): p. 108-117.
101. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021. **22**(2): p. 96-118.
102. Pisignano, G. and M. Lodomery, *Epigenetic Regulation of Alternative Splicing: How LncRNAs Tailor the Message*. *Noncoding RNA*, 2021. **7**(1).
103. Romero-Barrios, N., et al., *Splicing regulation by long noncoding RNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(5): p. 2169-2184.
104. 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.
105. Nunez-Martinez, H.N. and F. Recillas-Targa, *Emerging Functions of lncRNA Loci beyond the Transcript Itself*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(11).
106. Cheng, T. and S. Huang, *Roles of Non-Coding RNAs in Cervical Cancer Metastasis*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 646192.
107. Gao, N., et al., *Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 598817.
108. Guh, C.Y., Y.H. Hsieh, and H.P. Chu, *Functions and properties of nuclear lncRNAs-from systematically mapping the interactomes of lncRNAs*. *J Biomed Sci*, 2020. **27**(1): p. 44.
109. Grammatikakis, I. and A. Lal, *Significance of lncRNA abundance to function*. *Mamm Genome*, 2022. **33**(2): p. 271-280.
110. Marchese, F.P., I. Raimondi, and M. Huarte, *The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function*. *Genome Biol*, 2017. **18**(1): p. 206.
111. Fernandes, J.C.R., et al., *Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease*. *Noncoding RNA*, 2019. **5**(1).
112. Sebastian-delaCruz, M., et al., *The Role of lncRNAs in Gene Expression Regulation through mRNA Stabilization*. *Noncoding RNA*, 2021. **7**(1).
113. He, J. and X. Ma, *Interaction Between lncRNA and UPF1 in Tumors*. *Front Genet*, 2021. **12**: p. 624905.

114. Chi, Y., et al., *Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers*. Cells, 2019. **8**(9).
115. McCabe, E.M. and T.P. Rasmussen, *lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions*. Semin Cancer Biol, 2021. **75**: p. 38-48.
116. Schmitt, A.M. and H.Y. Chang, *Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways*. Cancer Cell, 2016. **29**(4): p. 452-463.
117. Yan, H. and P. Bu, *Non-coding RNA in cancer*. Essays Biochem, 2021. **65**(4): p. 625-639.
118. Wong, L.S. and C.M. Wong, *Decoding the Roles of Long Noncoding RNAs in Hepatocellular Carcinoma*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).
119. Xiao, L., M. Gorospe, and J.Y. Wang, *Long noncoding RNAs in intestinal epithelium homeostasis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2019. **317**(1): p. C93-C100.
120. Yang, J., et al., *LncRNA H19: A novel oncogene in multiple cancers*. Int J Biol Sci, 2021. **17**(12): p. 3188-3208.
121. Ghafouri-Fard, S., et al., *HOX transcript antisense RNA: An oncogenic lncRNA in diverse malignancies*. Exp Mol Pathol, 2021. **118**: p. 104578.
122. Kong, W., et al., *Long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR: Pathogenic roles and therapeutic opportunities in gastric cancer*. Genes Dis, 2022. **9**(5): p. 1269-1280.
123. 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.
124. Wan, X., et al., *The functional sites of miRNAs and lncRNAs in gastric carcinogenesis*. Tumour Biol, 2015. **36**(2): p. 521-32.
125. Syllaios, A., et al., *Pathways and role of MALAT1 in esophageal and gastric cancer*. Oncol Lett, 2021. **21**(5): p. 343.
126. Xie, S.S., et al., *Emerging roles of non-coding RNAs in gastric cancer: Pathogenesis and clinical implications*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1213-23.
127. Al-Rugeebah, A., M. Alanazi, and N.R. Parine, *MEG3: an Oncogenic Long Non-coding RNA in Different Cancers*. Pathol Oncol Res, 2019. **25**(3): p. 859-874.
128. Li, T., et al., *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(8): p. 8601-12.
129. Sun, W., et al., *Roles of long noncoding RNAs in gastric cancer and their clinical applications*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(11): p. 2231-7.
130. Yang, X., et al., *Long non-coding RNA GAS5 in human cancer*. Oncol Lett, 2020. **20**(3): p. 2587-2594.
131. Kang, F., et al., *Potential Biological Roles of Exosomal Long Non-Coding RNAs in Gastrointestinal Cancer*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 886191.
132. Li, Y., et al., *The Multifaceted Role of Long Non-Coding RNA in Gastric Cancer: Current Status and Future Perspectives*. Int J Biol Sci, 2021. **17**(11): p. 2737-2755.
133. Yang, G., X. Lu, and L. Yuan, *LncRNA: a link between RNA and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(11): p. 1097-109.
134. Bolha, L., M. Ravnik-Glavac, and D. Glavac, *Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer*. Dis Markers, 2017. **2017**: p. 7243968.
135. Tan, H., et al., *Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications*. Theranostics, 2020. **10**(19): p. 8880-8902.
136. Chandra, R., et al., *The changing face of gastric cancer: epidemiologic trends and advances in novel therapies*. Cancer Gene Ther, 2021. **28**(5): p. 390-399.
137. Eusebi, L.H., et al., *Gastric cancer prevention strategies: A global perspective*. J Gastroenterol Hepatol, 2020. **35**(9): p. 1495-1502.
138. Sexton, R.E., et al., *Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies*. Cancer Metastasis Rev, 2020. **39**(4): p. 1179-1203.
139. Chen, D., et al., *Non-Coding RNAs in Gastric Cancer: From Malignant Hallmarks to Clinical Applications*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 732036.

140. Yuan, L., et al., *Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 96.
141. Fernando, T.R., et al., *The lncRNA CASC15 regulates SOX4 expression in RUNX1-rearranged acute leukemia*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 126.
142. He, X., et al., *A novel lncRNA transcript, RBAT1, accelerates tumorigenesis through interacting with HNRNPL and cis-activating E2F3*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 115.
143. Wu, H., et al., *lncRNA TRERNA1 Function as an Enhancer of SNAI1 Promotes Gastric Cancer Metastasis by Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **8**: p. 291-299.
144. Chai, D., et al., *CDX2 and Reg IV expression and correlation in gastric cancer*. BMC Gastroenterol, 2021. **21**(1): p. 92.
145. Pan, J., et al., *Lineage-Specific Epigenomic and Genomic Activation of Oncogene HNF4A Promotes Gastrointestinal Adenocarcinomas*. Cancer Res, 2020. **80**(13): p. 2722-2736.
146. Saberi Anvar, M., et al., *Gastric cancer biomarkers; A systems biology approach*. Biochem Biophys Rep, 2018. **13**: p. 141-146.
147. Zhou, H., et al., *Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP-dependent upregulation of the expression of CDX2*. Oncol Lett, 2018. **15**(5): p. 7617-7624.
148. Cao, M.R., et al., *Bioinformatic analysis and prediction of the function and regulatory network of long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma*. Oncol Lett, 2018. **15**(5): p. 7783-7793.
149. Chen, L., et al., *The Roles of Long Noncoding RNAs HNF1alpha-AS1 and HNF4alpha-AS1 in Drug Metabolism and Human Diseases*. Noncoding RNA, 2020. **6**(2).
150. Guo, S. and H. Lu, *Novel mechanisms of regulation of the expression and transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4alpha*. J Cell Biochem, 2019. **120**(1): p. 519-532.
151. Esposito, R., et al., *Hacking the Cancer Genome: Profiling Therapeutically Actionable Long Non-coding RNAs Using CRISPR-Cas9 Screening*. Cancer Cell, 2019. **35**(4): p. 545-557.
152. Hazan, J. and A.C. Bester, *CRISPR-Based Approaches for the High-Throughput Characterization of Long Non-Coding RNAs*. Noncoding RNA, 2021. **7**(4).
153. M, S.Z., C.C.R. Hartford, and A. Lal, *Interrogating lncRNA functions via CRISPR/Cas systems*. RNA Biol, 2021. **18**(12): p. 2097-2106.
154. La Russa, M.F. and L.S. Qi, *The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(22): p. 3800-9.
155. Seeneevassen, L., et al., *Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
156. Berlth, F., et al., *Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(19): p. 5679-84.
157. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
158. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
159. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications*. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
160. Al Hennawi, H., et al., *Gastric Intestinal Metaplasia and Its Rapid Progression Toward Gastric Adenocarcinoma: A Call for Clear Patient Management and Awareness*. Cureus, 2021. **13**(10): p. e18751.

161. Toh, J.W.T. and R.B. Wilson, *Pathways of Gastric Carcinogenesis, Helicobacter pylori Virulence and Interactions with Antioxidant Systems, Vitamin C and Phytochemicals*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
162. Alipour, M., *Molecular Mechanism of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer*. J Gastrointest Cancer, 2021. **52**(1): p. 23-30.
163. Jencks, D.S., et al., *Overview of Current Concepts in Gastric Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2018. **14**(2): p. 92-101.
164. Koulis, A., A. Buckle, and A. Boussioutas, *Premalignant lesions and gastric cancer: Current understanding*. World J Gastrointest Oncol, 2019. **11**(9): p. 665-678.
165. Chen, Y.C., et al., *Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer*. Pathol Oncol Res, 2016. **22**(1): p. 197-202.
166. Korivi, B.R., et al., *Intestinal and diffuse gastric cancer: a retrospective study comparing primary sites*. Clin Imaging, 2019. **56**: p. 33-40.
167. Iyer, P., et al., *Diffuse gastric cancer: histologic, molecular, and genetic basis of disease*. Transl Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**: p. 52.
168. Figueiredo, C., et al., *Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **400**: p. 277-304.
169. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
170. Mendonsa, A.M., T.Y. Na, and B.M. Gumbiner, *E-cadherin in contact inhibition and cancer*. Oncogene, 2018. **37**(35): p. 4769-4780.
171. Ansari, S., et al., *Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).
172. Jimenez Fonseca, P., et al., *Lauren subtypes of advanced gastric cancer influence survival and response to chemotherapy: real-world data from the AGAMENON National Cancer Registry*. Br J Cancer, 2017. **117**(6): p. 775-782.
173. Tanaka, A., et al., *Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset*. Oncotarget, 2018. **9**(50): p. 29336-29350.
174. Golla, U., et al., *ABHD11-AS1: An Emerging Long Non-Coding RNA (lncRNA) with Clinical Significance in Human Malignancies*. Noncoding RNA, 2022. **8**(2).
175. Herrera-Solorio, A.M., et al., *Histone code and long non-coding RNAs (lncRNAs) aberrations in lung cancer: implications in the therapy response*. Clin Epigenetics, 2017. **9**: p. 98.
176. Parasramka, M.A., et al., *Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma*. Pharmacol Ther, 2016. **161**: p. 67-78.
177. 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.
178. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
179. Alessio, E., et al., *A Single Cell but Many Different Transcripts: A Journey into the World of Long Non-Coding RNAs*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(1).
180. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCcation: lncRNA localization and function*. J Cell Biol, 2021. **220**(2).
181. Heydari, E., et al., *The role of non-coding RNAs in neuroprotection and angiogenesis following ischemic stroke*. Metab Brain Dis, 2020. **35**(1): p. 31-43.
182. Tang, Y., et al., *The role of long non-coding RNAs in rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(11): p. 657-669.
183. Morlando, M., M. Ballarino, and A. Fatica, *Long Non-Coding RNAs: New Players in Hematopoiesis and Leukemia*. Front Med (Lausanne), 2015. **2**: p. 23.