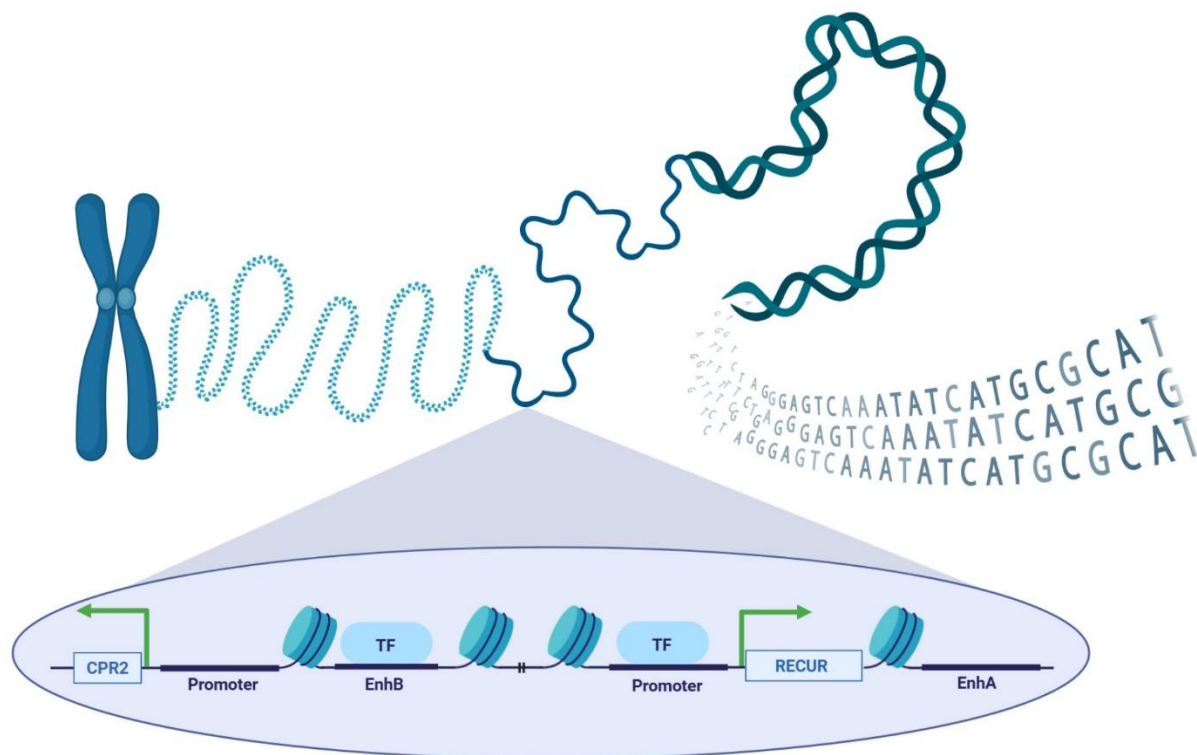


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιοματικής



Created in BioRender.com bio

«Μελέτη ρυθμιστικών στοιχείων lncRNA με CRISPR προσεγγίσεις και δοκιμασίες χημειοφωταύγειας στον γαστρικό καρκίνο»

«Studying the regulatory elements of a lncRNA with CRISPR and chemiluminescence assays in gastric cancer»

Καψή Αθηνά του Γεωργίου

Λάρισα 2025

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής:

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

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

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

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το έτος 2025.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γιακουντή Αντώνιο για τις πολύτιμες συμβουλές, για την καθοδήγηση του σε κάθε βήμα της πορείας μου, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης, είμαι ευγνώμων για την άψογη συνεργασία μας, αλλά και την αμέτρητη γνώση που μου μετέδωσε σε όλα τα χρόνια των προπτυχιακών σπουδών μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Μπελούκα Απόστολο και Ψαρρά Άννα-Μαρία για τη συμβολή και την συμμετοχή τους στην πτυχιακή μου εργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλα τα μέλη του εργαστηρίου και, ιδιαίτερα, τους συμφοιτητές μου Δρόσο Χρίστο και Νικολαΐδου Ανθή για την υπέροχη συνεργασία και για την συμπαράστασή τους.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στην οικογένεια μου, οι οποίοι βρίσκονται στο πλευρό μου και με υποστηρίζουν σε κάθε μου απόφαση.

Περιεχόμενα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	1
Ευχαριστίες	2
Περιεχόμενα	3
Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Γαστρικός Καρκίνος	7
1.1.1 Επιδημιολογία Γαστρικού Καρκίνου	7
1.1.2 Ταξινόμηση Γαστρικού Καρκίνου	9
1.2 Διαγνωστικές Μέθοδοι	10
1.2.1 Παρεμβατικές Μέθοδοι: Ενδοσκόπηση	11
1.2.2 Μη παρεμβατικές μέθοδοι: Μη παρεμβατικές Μέθοδοι: Υγρή Βιοψία, CT/PET scan.....	11
1.3 Μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA	12
1.3.1 Βιογένεση των lncRNA	13
1.3.2 Λειτουργίες των lncRNA	14
1.4 Ρυθμιστικά Στοιχεία και Χρωματίνη	15
1.4.1 Τοπολογικά Συνδεδεμένες Περιοχές	15
1.4.2 Ρύθμιση μεταγραφής των lncRNA	16
1.4.3 Ρόλος των Lineage Survival Μεταγραφικών Παραγόντων GATA στον γαστρικό καρκίνο	17
1.4.4 Ρύθμιση της χρωματίνης από τα lncRNA	17
1.4.5 Καρκινοειδικά εκφραζόμενα lncRNA ως εξειδικευμένοι Μοριακοί Βιοδείκτες	19
2. Σκοπός	22
3. Υλικά και Μέθοδοι	23
3.1 Υλικά	23
3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς	23
3.1.1.1 AIO-puro	23
3.1.1.2 pGL4.10	23
3.1.1.3 pGL4.10/AdML	24

3.1.1.4 pGL4.75	25
3.1.2 Κυτταρικές σειρές	25
3.1.2.1 AGS	25
3.1.2.2 AGTR-G4	26
3.2 Μέθοδοι	26
3.2.1 Κλωνοποίηση του πλήρους μήκους του ενισχυτή B του γονιδίου CPR2 και των τριών επιμέρους τμημάτων της αλληλουχίας του ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML και επιβεβαίωση του προσανατολισμού ένθεσής τους	27
3.2.1.1 Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR για την ενίσχυση και απομόνωση τμημάτων DNA μήκους 200 και 600 ζευγών βάσεων	27
3.2.1.2 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης και απομόνωσης προϊόντος PCR από πήκτωμα αгарόζης	28
3.2.1.3 Πρωτόκολλο αντίδρασης φωσφορυλίωσης των άκρων του προϊόντος PCR που απομονώθηκε από τον πήκτωμα αгарόζης	29
3.2.1.4 Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο	29
3.2.1.5 Πρωτόκολλο αντίδρασης λιγάσης	30
3.2.1.6 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού βακτηρίων	30
3.2.1.7 Διαλογή αποικιών και ανάπτυξη τους σε υγρή καλλιέργεια	31
3.2.1.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με πρωτόκολλο homemade mini-preps	31
3.2.1.9 Επιβεβαιωτικές PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτώματος για επιβεβαίωση του προσανατολισμού του ενθέματος	31
3.2.2 Δοκιμές Λουσιφεράσης (Dual-Luciferase Reporter Assay System) για τον προσδιορισμό ενεργότητας του ενισχυτή B και των τριών επιμέρους τμημάτων του	34
3.2.2.1 Πρωτόκολλο διαμόλυνσης γαστρικών κυττάρων AGS με πλασμιδία που φέρουν αλληλουχίες πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων	34
3.2.2.2 Λύση των καρκινικών κυττάρων και μέτρηση της ενεργότητας των πιθανών ρυθμιστικών αλληλουχιών με δοκιμασία λουσιφεράσης	34
3.2.3 Αποσιώπηση του ενισχυτή B μέσω συστήματος CRISPR/nCas9	35
3.2.3.1 Υβριδοποίηση των sgRNA	35
3.2.3.2 Κλωνοποίηση του sgRNA1 στον φορέα AIO	35
3.2.3.3 Επιβεβαιωτικές PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης για επιβεβαίωση μετασχηματισμού των βακτηρίων για το sgRNA1 και διαλογή θετικού κλώνου	35
3.2.3.4 Κλωνοποίηση του sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro	36

3.2.3.5 Επιβεβαιωτικές PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης για επιβεβαίωση μετασχηματισμού των βακτηρίων για το sgRNA2 και διαλογή θετικού κλώνου	37
3.2.3.6 Γραμμοποίηση του φορέα και διαμόλυνση κυττάρων AGS	38
3.2.3.7 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από γαστρικά καρκινικά κύτταρα έπειτα από διαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro και διαγνωστικές PCR	39
3.2.4 Κλωνοποίηση ενός τμήματος του υποκινητή του γονιδίου CPR2 στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10 και επιβεβαίωση του προσανατολισμού ένθεσης	40
4. Αποτελέσματα	43
4.1 Ενεργότητα του Ενισχυτή B	43
4.1.1 Απομόνωση του Ενισχυτή B και των τριών επιμέρους τμημάτων του από γονιδιωματικό DNA	43
4.1.2 Επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης του Ενισχυτή B και των επιμέρους τμημάτων του	44
4.1.3 Δοκιμασία Λουσιφεράσης για το ολικό τμήμα και τα επιμέρους τμήματα του Ενισχυτή B και με τους δύο προσανατολισμούς	46
4.1.4 Δοκιμασία Λουσιφεράσης για το ολικό τμήμα και τα επιμέρους τμήματα του Ενισχυτή B για την συσχέτιση με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία	49
4.2 Απαλοιφή του Ενισχυτή B μέσω του συστήματος CRISPR/nCas9	52
4.2.1 Κλωνοποίηση των sgRNA1 και sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro	53
4.2.2 Έλεγχος των κλώνων των AGS κυττάρων για γενετική τροποποίηση	55
4.3 Απομόνωση και μελέτη της ενεργότητας μιας υποψήφιας αλληλουχίας υποκινητή του γονιδίου-στόχου του lncRNA RECUR1	56
4.3.1 Δοκιμασία βιοφωταύγειας του υποκινητή του CPR2	57
5. Συζήτηση	59
6. Βιβλιογραφία	63

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί τον 5^ο συχνότερο καρκίνο παγκοσμίως και τον 4^ο καρκίνο σε θνησιμότητα. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη νόσος είναι ασυμπτωματική σε πρώιμα στάδια, διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα και συνοδεύεται από κακή πρόγνωση. Παράλληλα, οι μέχρι σήμερα διαγνωστικές μέθοδοι είναι επεμβατικές, δυσάρεστες για τον ασθενή και ιδιαίτερα δαπανηρές για τα εθνικά συστήματα υγείας. Τα παραπάνω προβλήματα έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των επιστημόνων στα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA), τα οποία εντοπίζονται σε σωματικά υγρά μέσω υγρής βιοψίας. Επιπρόσθετα, τα lncRNA παρουσιάζουν υψηλή ιστοειδικότητα, η οποία μεταφράζεται σε καρκινοειδικότητα, θέτοντας ερωτήματα γύρω από την ρύθμιση της έκφρασης τους. Για τον λόγο αυτό, η μελέτη των ρυθμιστικών τους στοιχείων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, διερευνάται η ενεργότητα δύο ρυθμιστικών στοιχείων που εμπλέκονται στον γονιδιωματικό άξονα ρύθμισης που περιλαμβάνει το lncRNA RECUR1, το οποίο φαίνεται να συμμετέχει στην καρκινογένεση, και τον στόχο του, το κωδικοποιητικό γονίδιο CPR2. Ειδικότερα, εξετάζεται η ενεργότητα μιας υποψήφιας αλληλουχίας, που ονομάσαμε Ενισχυτή B, με δοκιμασίες λουσιφεράσης και διερευνάται το υπομήμα του με την μεγαλύτερη ενεργότητα. Παράλληλα, μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κι άλλων ρυθμιστικών στοιχείων του άξονα, και συγκεκριμένα μιας άλλης αλληλουχίας ενισχυτή που ανακαλύφθηκε σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου και ονομάστηκε Ενισχυτής A, καθώς και του Υποκινητή του lncRNA RECUR1. Για την καλύτερη κατανόηση του ρυθμιστικού άξονα, επιχειρήθηκε η στόχευση του ενεργότερου υπομημάτος του Ενισχυτή B μέσω του συστήματος CRISPR/nCas9. Τέλος, εντοπίστηκε και επαληθεύτηκε πειραματικά και μια νέα αλληλουχία για τον Υποκινητή του CPR2, η οποία συγκρίθηκε πειραματικά με μια προγενέστερη αλληλουχία στην οποία εστίασαν ανεπιτυχώς προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ως πιθανός υποκινητής του γονιδίου CPR2.

Abstract

Gastric cancer is the fifth most common cancer worldwide and the fourth leading cause of cancer-related mortality. Since this disease is asymptomatic at early stages, it is usually diagnosed at advanced stages and is associated with poor prognosis. At the same time, the currently available diagnostic methods are invasive, unpleasant for the patient, and particularly costly for the national healthcare systems. These challenges have shifted scientific interest toward long non-coding RNAs (lncRNAs), which can be detected in body fluids through liquid biopsy. Moreover, lncRNAs exhibit high tissue specificity, raising questions about the regulation of their expression. For this reason, the study of their regulatory elements is of particular interest. The present thesis investigates the activity of two regulatory elements involved in the genomic regulatory axis that includes RECUR1, which appears to participate in carcinogenesis, and its target protein-coding gene CPR2. Specifically, the activity of a candidate sequence, named as Enhancer B, was examined using luciferase assays, and the subfragment with the highest activity was identified. Concurrently, interactions among other regulatory elements of the axis were studied, specifically another enhancer sequence identified in previous experiments of the laboratory, named as Enhancer A, as well as the promoter of lncRNA RECUR1. To achieve a better understanding of the regulatory axis, the most active subfragment of Enhancer B was targeted using the CRISPR/nCas9 system. Finally, a novel sequence corresponding to the promoter of CPR2 was identified and experimentally validated, and it was compared to a previously proposed sequence that earlier laboratory studies had unsuccessfully evaluated as a potential promoter of the CPR2 gene.

1. Εισαγωγή

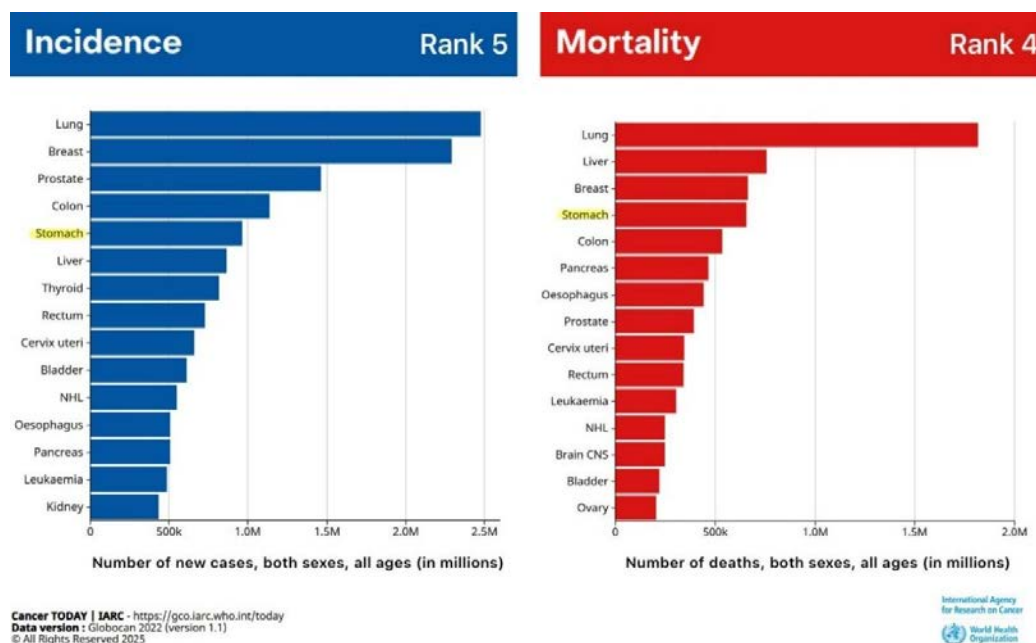
1.1 Γαστρικός Καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος αφορά την εμφάνιση όγκου σε κύτταρα που εντοπίζονται στον στομάχο. Ειδικότερα, αφορά πρωτογενή κακοήθεια που εμφανίζεται στο επιθήλιο του στομάχου [1]. Αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μορφές καρκίνου με την συχνότητα εμφάνισης του τα τελευταία χρόνια να αυξάνεται σημαντικά, με ποσοστό αύξησης 25.4% το 2021 σε σχέση με το 1990 [2], ενώ παράλληλα παρουσιάζει κακή πρόγνωση, καθώς συνήθως διαγιγνώσκεται σε πολύ προχωρημένα στάδια της νόσου και παρουσιάζει ποσοστό ασθενών με πενταετή επιβίωση ~20% [3-6]. Για τους λόγους αυτούς, το ενδιαφέρον γύρω από τη μελέτη του γαστρικού καρκίνου είναι μεγάλο.

Οι μηχανισμοί πίσω από την εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου δεν είναι απολύτως ξεκάθαροι και περιλαμβάνουν μια περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Η απορρύθμιση πολλών γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών παίζει σημαντικό ρόλο κατά την καρκινογένεση. [3]

1.1.1 Επιδημιολογία Γαστρικού Καρκίνου

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί τον 5^ο συχνότερο καρκίνο παγκοσμίως με πάνω από 1.08 εκατομμύρια ασθενείς κάθε χρόνο, αλλά και την 4^η αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως με 770.000 θανάτους κάθε χρόνο (Εικόνα 1.1) [1, 4, 7].

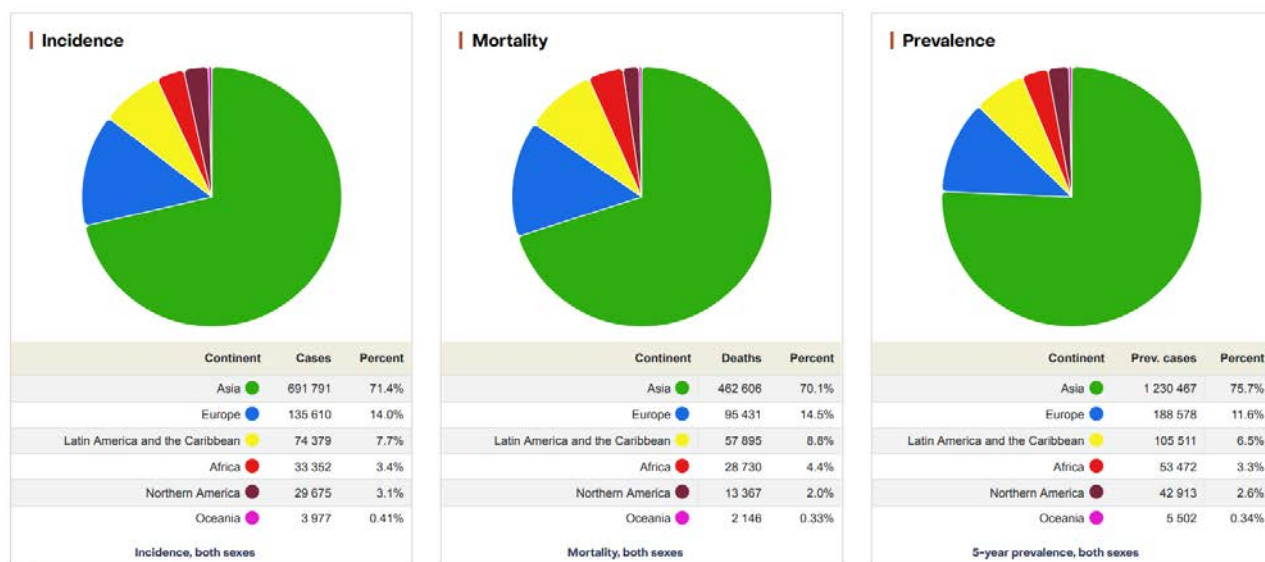


Εικόνα 1.1: Παγκόσμια κατάταξη του γαστρικού καρκίνου βάσει παγκόσμιων Δεδομένων Επιπολασμού και Θνησιμότητας της ασθένειας του καρκίνου, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO)
edited from <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/7-stomach-fact-sheet.pdf>

Η εθνικότητα και η φυλή παρουσιάζουν χαρακτηριστικά μοτίβα ανομοιογένειας στη νόσο, ενώ η ποικιλομορφία και ο επιπολασμός της διαφέρει ανάλογα με τις γεωγραφικές περιοχές. Ειδικότερα,

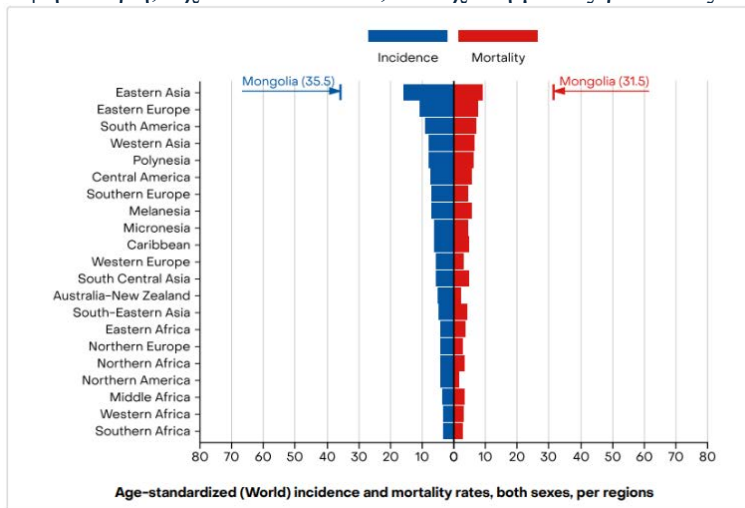
μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται στην Ασία, στην νότια Αμερική και στην κεντροανατολική Ευρώπη, ενώ η βόρεια Αμερική και η Αφρική έχουν χαμηλότερη συχνότητα [4]. Επίσης, ο γαστρικός καρκίνος προσβάλλει σε υψηλότερο ποσοστό τον ασιατικό πληθυσμό σε σύγκριση με τον καυκάσιο πληθυσμό [1, 4].

Όσον αφορά την Ευρώπη, φαίνεται ότι η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου δεν είναι τόσο μεγάλη (Εικόνα 1.2). Αντίστοιχα, η θνησιμότητα εμφανίζει ποσοστό 14,5% σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization-WHO).

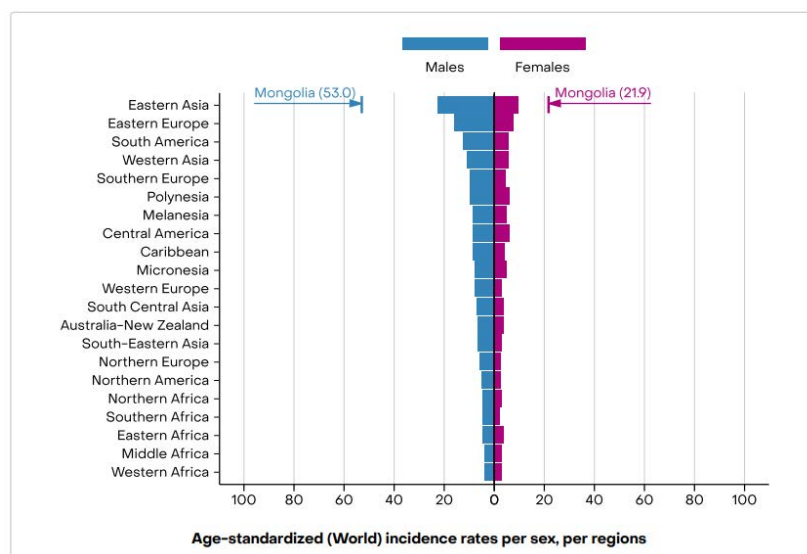


Εικόνα 1.2: Δεδομένα Επιπολασμού, Θνησιμότητας και Πρόληψης της ασθένειας του καρκίνου του στομάχου παγκοσμίως, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/7-stomach-fact-sheet.pdf>

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3, το ποσοστό εμφάνισης νέων περιστατικών σχεδόν ταυτίζεται με το ποσοστό θνησιμότητας, υποδηλώνοντας ανεπαρκή πρόληψη διάγνωση και θεραπεία. Αντίστοιχα, στο διάγραμμα της Εικόνας 1.4 επισημαίνεται πως η συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου στους άνδρες είναι υψηλότερη, σχεδόν διπλάσια, σε σχέση με τις γυναίκες.



Εικόνα 1.3: Συσχέτιση Επιπολασμού και Θνησιμότητας παγκοσμίως, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/7-stomach-fact-sheet.pdf>

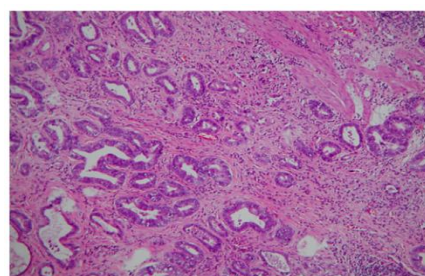


Εικόνα 1.4: Συσχέτιση Επιπολασμού ανάμεσα σε γυναίκες και άνδρες παγκοσμίως, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO)
<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/7-stomach-fact-sheet.pdf>

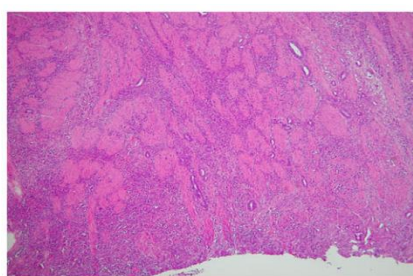
1.1.2 Ταξινόμηση Γαστρικού Καρκίνου

Υπάρχουν πολλά μοντέλα ταξινόμησης του γαστρικού καρκίνου με βάση την ανατομία και την παθολογία. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το μοντέλο κατά Lauren's, το οποίο με βάση την ιστοπαθολογία τον χωρίζει σε 3 κατηγορίες: εντερικό και διάχυτο υπότυπο, καθώς υπάρχει και ο συνδυασμός των δύο, ο μεικτός υπότυπος (Εικόνα 1.5, [8]) [4, 8, 9].

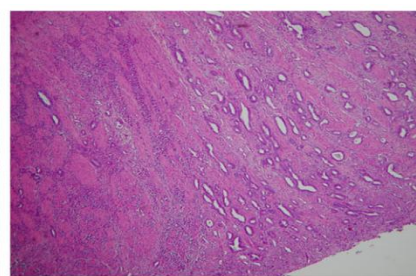
Ο εντερικός υπότυπος αφορά όγκους γαστρικού καρκίνου που μοιάζουν μορφολογικά με αδενοκαρκινώματα εντέρου και διαθέτουν ευδιάκριτους και μεγάλους αδένες [9]. Ακόμη, είναι συνηθέστερος σε μεγαλύτερες ηλικίες, συνδέεται συχνότερα με περιβαλλοντικούς παράγοντες και διαθέτει καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τον διάχυτο υπότυπο [10]. Ο διάχυτος υπότυπος χαρακτηρίζεται από κακώς διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα, τα οποία είτε είναι μεμονωμένα είτε βρίσκονται σε συμπαγείς μάζες στις οποίες είναι πολύ χαλαρά συνδεδεμένα μεταξύ τους, ενώ δεν παρατηρούνται αδένες. Επιπλέον, εμφανίζεται σε μικρότερες ηλικίες, διαθέτει πιθανώς γενετική προδιάθεση, έχει πιο επιθετική συμπεριφορά και χειρότερη διάγνωση [10]. Τέλος, ο μεικτός υπότυπος περιλαμβάνει χαρακτηριστικά τόσο του εντερικού, όσο και του διάχυτου υπότυπου. [9]



Εντερικός υπότυπος



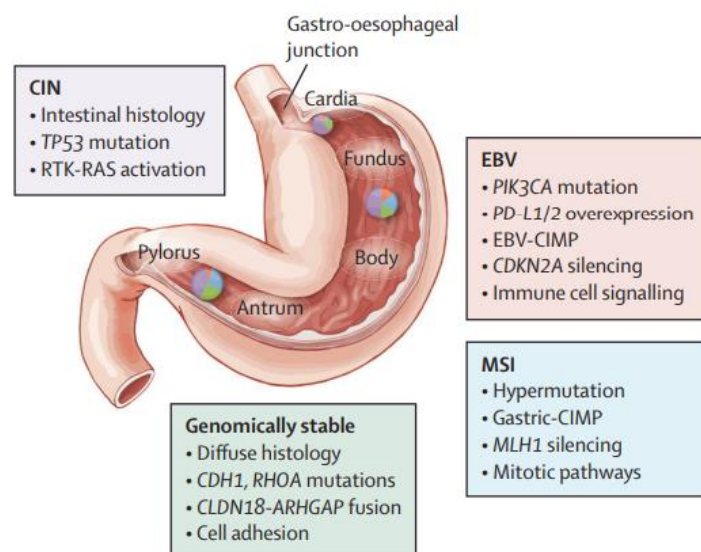
Διάχυτος υπότυπος



Μεικτός υπότυπος

Εικόνα 1.5: Κατάταξη γαστρικού καρκίνου με βάση την ιστολογική μορφολογία του επιθηλίου του στομάχου (Κατάταξη κατά Lauren) [8]

Όσον αφορά τα μοριακά μοντέλα ταξινόμησης, το επικρατέστερο προέρχεται από την κοινοπραξία TCGA (The Cancer Genome Atlas) [3, 11] και αφορά ένα ταξινομικό μοντέλο με 4 υπότυπους (Εικόνα 1.6, [11]). Ο πρώτος εξ αυτών αφορά τους EBV- θετικούς όγκους (Epstein–Barr virus-positive) οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τα υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υποτύπους [3]. Ακόμη, παρατηρείται υπερέκφραση των προσδετών PD-L1/PD-L2 (Programmed Cell Death Ligand), οι οποίοι μέσω της πρόσδεσης τους στον PD-1 (Programmed Cell Death Receptor) υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων, επιτυγχάνουν την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης [3, 12]. Ο δεύτερος αναφέρεται στους MSI-όγκους (Microsatellite Instability), των οποίων το γονιδίωμα φέρει πολλές μεταλλάξεις, υψηλά επίπεδα υπερμεθυλίωσης του DNA και σίγηση της MLH1, μιας πρωτεΐνης του συμπλόκου επιδιόρθωσης λανθασμένα ζευγαρωμένων βάσεων (Mismatch Repair Complex) που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA [3, 13, 14]. Ο τρίτος υπότυπος περιλαμβάνει τους GS-όγκους (Genomically Stable), που παρουσιάζουν χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων, συσχετίζονται με ιστολογία διάχυτου τύπου, εκδηλώνουν πιο επιθετικά χαρακτηριστικά της νόσου και έχουν την χειρότερη πρόγνωση[3]. Τέλος, οι CIN-όγκοι (Chromosomal Instability) εμφανίζουν ιστολογία εντερικού τύπου και ανευπλοειδίες, καθώς και μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια όπως στο TP53, στο VEGF και στο EGFR [3, 11, 13].



Εικόνα 1.6: Μοριακό μοντέλο ταξινόμησης καρκίνου σύμφωνα με το TCGA [11]

1.2 Διαγνωστικές Μέθοδοι

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών σε αρχικά στάδια ανάπτυξης της νόσου είναι ασυμπτωματικό και για τον λόγο αυτό η διάγνωση γίνεται σε μεταγενέστερα στάδια. Τα πιο κοινά συμπτώματα που εμφανίζουν οι ασθενείς είναι ανορεξία, δυσπεψία, απώλεια βάρους και πόνος στην κοιλιά [11]. Οι διαγνωστικές μέθοδοι της νόσου χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Παρεμβατικές Μέθοδοι και Μη Παρεμβατικές Μέθοδοι.

1.2.1 Παρεμβατικές Μέθοδοι: Ενδοσκόπηση

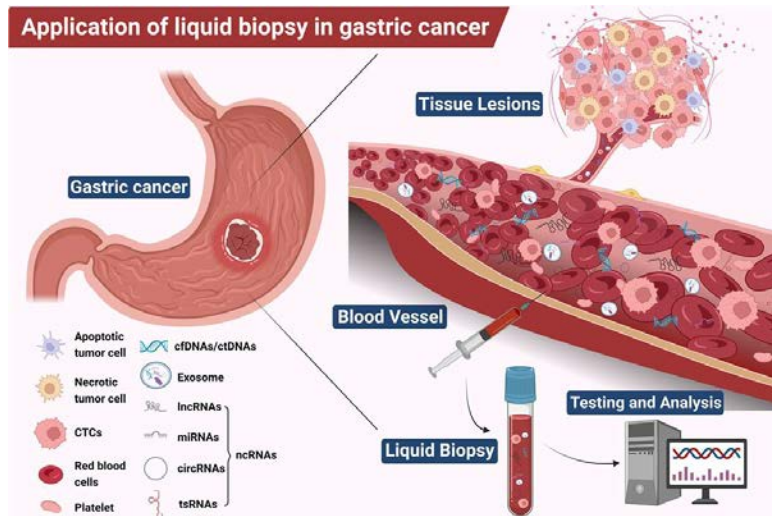
Η ενδοσκοπική υπερηχοτομογραφία (Endoscopic Ultrasonography, EUS) είναι μια πολύ αποδοτική παρεμβατική διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την διάκριση των αρχικών και προχωρημένων σταδίων των γαστρικών όγκων. Μέσω αυτής της μεθόδου είναι δυνατός ο εντοπισμός του όγκου στο στομάχι, αλλά και ο καθορισμός του μακροσκοπικού τύπου του όγκου. Μαζί με την ενδοσκόπηση γίνεται λήψη και δείγματος του ιστού (βιοψία) για να γίνει και ιστολογική επιβεβαίωση των ευρημάτων. Ακολουθεί η ταξινόμηση του όγκου σε αντίστοιχο κλινικό στάδιο, ώστε να αποφασιστεί αν η αντιμετώπιση του θα είναι θεραπευτική ή ανακουφιστική. [7, 15]

Η ενδοσκόπηση, όντας παρεμβατική μέθοδος και αρκετά δυσάρεστη προς τον ασθενή, δρα ως αρωγός στην αργοπορημένη διάγνωση της ασθένειας. Για τον λόγο αυτό, τα μη παρεμβατικά εργαλεία είναι απαραίτητο να μπορούν να έχουν υψηλή ευαισθησία, δίνοντας παράλληλα αξιόπιστο αποτέλεσμα.

1.2.2 Μη παρεμβατικές Μέθοδοι: Υγρή Βιοψία, CT/PET scan

Πέρα από τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση του όγκου είναι σημαντική και η ανίχνευση μεταστάσεων. Για τον σκοπό αυτό γίνονται εξετάσεις απεικόνισης με αξονική τομογραφία (CT) και Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων (PET scan), τα οποία συνήθως συνδυάζονται (PET/CT). Στην αξονική τομογραφία γίνεται χρήση ακτινών X για την λεπτομερή απεικόνιση του εσωτερικού του σώματος, ενώ στο PET scan γίνεται χορήγηση ραδιενεργού ιχνηθέτη, ο οποίος συσσωρεύεται σε περιοχές αυξημένου μεταβολισμού (μεταστατικές εστίες) εκπέμποντας ακτινοβολία γ η οποία καταγράφεται [16-18].

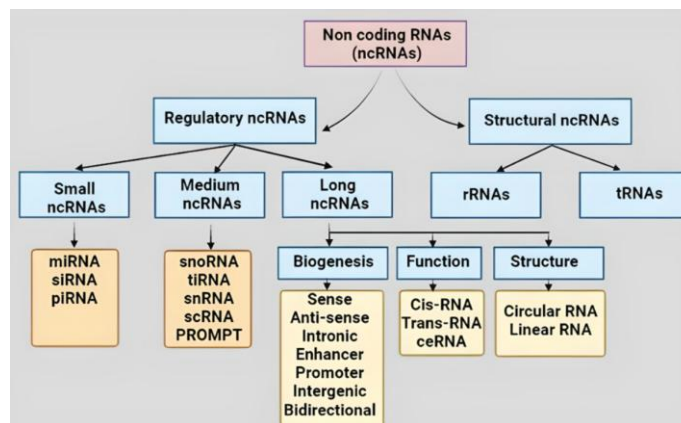
Στις μη παρεμβατικές μεθόδους, κυριαρχεί η Υγρή Βιοψία. Αυτή αφορά τη λήψη υγρών του σώματος (όπως αίμα, σίελο, ούρα, πλευριτικό υγρό) και περεταίρω ανάλυση τους για ανίχνευση κυκλοφορούντος ελεύθερου καρκινικού DNA (ctDNA), κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), εξωσωμάτων, πρωτεϊνών, αιμοπεταλίων που έχουν εκκριθεί από τον όγκο και μη κωδικοποιητικών RNA, όπως τα lncRNA ([Εικόνα 1.7](#))[7, 19]. Η υγρή βιοψία διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της ιστολογικής βιοψίας. Συγκεκριμένα, χρειάζεται λιγότερη ποσότητα δείγματος και μπορεί να επαναληφθεί εύκολα [20]. Επιπλέον, λόγω της ευκολίας της διαδικασίας και του χαμηλού κόστους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόωπη διάγνωση και προληπτικό έλεγχο, αλλά μπορεί να αποτελέσει εύκολη μέθοδο παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου [19]. Ωστόσο, η υγρή βιοψία δεν είναι το ίδιο αξιόπιστη με την ιστολογική βιοψία και για τον λόγο αυτό χρίζεται απαραίτητη η ανακάλυψη νέων εξειδικευμένων βιοδεικτών υγρής βιοψίας, όπως τα lncRNA.



Εικόνα 1.7: Υγρή Βιοψία στον γαστρικό καρκίνο [19]

1.3 Μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (lncRNA, long non-coding RNA)

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχησης του RNA (RNA-seq) και την χαρτογράφηση του συνόλου των μεταγράφων, αποκαλύφθηκε ότι μόλις το 2% του RNA μεταφράζεται τελικά σε πρωτεΐνες, ενώ το υπόλοιπο αντιπροσωπεύει μη κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNA, ncRNA) που διαθέτουν ποικίλους ρυθμιστικούς ρόλους σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες [21]. Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, φαίνεται ότι τα μη-κωδικοποιητικά μετάγραφα συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη διάφορων ασθενειών [22-24]. Τα μετάγραφα αυτά χαρακτηρίζονται από ελάχιστο ή μηδενικό δυναμικό μετάφρασης σε πρωτεΐνη και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: ρυθμιστικά και δομικά (Εικόνα 1.8, [25]). Τα ρυθμιστικά χωρίζονται περαιτέρω βάσει μεγέθους σε μικρά, μεσαία και μακρά ncRNA [25, 26].



Εικόνα 1.8: Ταξινόμηση των μη κωδικοποιητικών RNA [25]

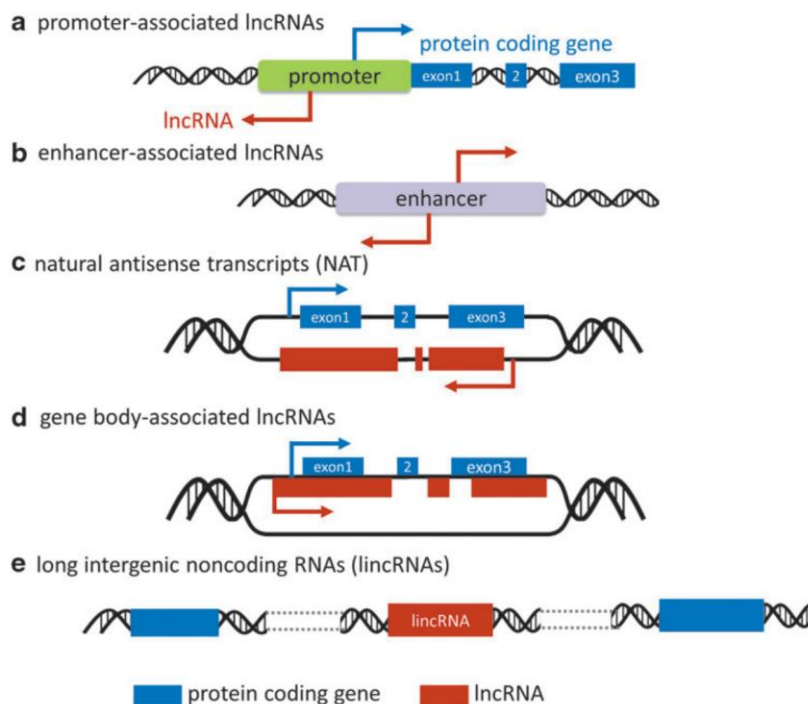
Τα μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (lncRNA, long non-coding RNA) είναι μετάγραφα μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδίων [27, 28]. Ο αριθμός των lncRNAs φτάνει τα 9640, που αντιστοιχεί περίπου στο 50% των κωδικοποιητικών γονιδίων [19, 20]. Τα lncRNA μπορούν να επηρεάσουν ζωτικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες στην νόσο μέσω αλληλεπίδρασης τους με

πρωτεΐνες, με την χρωματίνη αλλά και με RNA [16]. Παρόλου που τα lncRNA εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα mRNA, εμφανίζουν μεγαλύτερη ιστοειδικότητα που συχνά μεταφράζεται και σε καρκινοειδική έκφραση [29, 30]. Ακόμη, χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό συντήρησης εξελικτικά μεταξύ των ειδών, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ταυτοποίηση και κατανόηση των λειτουργιών τους σε κάθε οργανισμό ξεχωριστά [29, 31]. Ωστόσο, παρουσιάζουν υψηλή συντήρηση στην δευτεροταγή τους δομή, ενώ οι υποκινητές των lncRNA και τα ιδιόσυστατα ενεργά lncRNA εμφανίζουν υψηλό ποσοστό συντήρησης [32-34].

1.3.1 Βιογένεση των lncRNA

Παρά την χαμηλή ικανότητα τους να μεταφράζονται, τα lncRNA παρουσιάζουν κοινά στοιχεία με τα mRNA, αφού μεταγράφονται κυρίως από την πολυμεράση II του RNA και επομένως διαθέτουν 5'-καλύπτρα και πολυαδενυλιωμένο 3'-άκρο [31]. Η σταθερότητα των lncRNA στηρίζεται στην πολυαδενυλίωση τους, ενώ τα μη-πολυαδενυλιωμένα lncRNA αποκτούν σταθερότητα μέσω των δευτεροταγών δομών τους.

Τα lncRNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα ([Εικόνα 1.9](#)) [35, 36]. Μια κατηγορία αφορά τα lncRNA σχετιζόμενα με υποκινητές, τα οποία προέρχονται από περιοχές που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες υποκινητών. Αντίστοιχα, τα lncRNA που σχετίζονται με ενισχυτές (e-lncRNA), αφορούν μετάγραφα τα οποία εντοπίζονται και μεταγράφονται από περιοχές που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ενισχυτών. Τα αντινοσηματικά lncRNA βρίσκονται στον αντινοσηματικό κλώνο κωδικοποιητικών γονιδίων, ενώ τα lncRNA σχετιζόμενα με κωδικοποιητικά γονίδια προέρχονται συνήθως από τον νοηματικό κλώνο ενός κωδικοποιητικού γονιδίου και μπορεί να επικαλύπτονται με ιντρόνια ή εξόνια. Τέλος, τα μεσογονιδιακά lncRNA (lincRNA) εντοπίζονται σε περιοχές ανάμεσα σε δύο κωδικοποιητικά γονίδια.

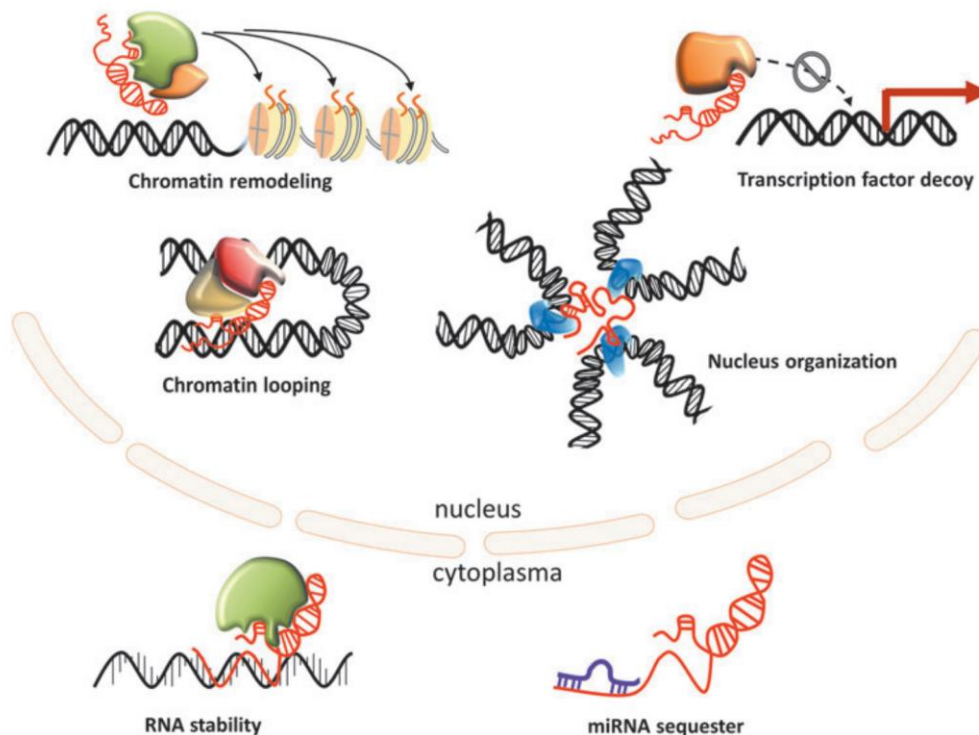


Εικόνα 1.9: Ταξινόμηση των lncRNA βάσει της θέσης τους στο γονιδίωμα [35]

1.3.2 Λειτουργίες των lncRNA

Τα lncRNAs έχουν πολλές λειτουργίες τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.10) [35, 37]. Κάποιοι από τους επαγόμενους από lncRNA μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης καθοδικών γονιδίων-στόχων αφορούν την άμεση αλληλεπίδραση των lncRNA με μεταγραφικούς παράγοντες, δρώντας ως δόλωμα και δεσμεύοντας τους τελευταίους, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση τους με την χρωματίνη. Παράλληλα, τα lncRNA μπορούν να επιστρεφούν σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης σε γειτονικές αλληλουχίες DNA-στόχους είτε βρίσκονται σε κοντινή απόσταση (*in cis*), ρυθμίζοντας τοπικά την μεταγραφή, είτε σε μακρινή απόσταση (*in trans*) *in cis*. Σε άλλες περιπτώσεις, τα e-lncRNA μπορούν να καθοδηγήσουν την δημιουργία βρόχου χρωματίνης, φέρνοντας σε επαφή τον ενισχυτή με τον υποκινητή, ενισχύοντας την μεταγραφή. Ένας ακόμη μηχανισμός ρύθμισης από τα lncRNA είναι η αναδιοργάνωση του πυρήνα μέσω της αναδιάταξης της τρισδιάστατης δομής της χρωματίνης [38].

Στο κυτταρόπλασμα, τα lncRNA μπορούν να προωθήσουν την μετάφραση, λειτουργώντας ως δόλωμα για τα miRNA, δεσμεύοντάς τα και αποτρέποντας την διάσπαση των mRNA στόχων τους [35, 37]. Επιπρόσθετα, μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα των μεταγράφων εκτός πυρήνα, μέσω άμεσης υβριδοποίησης με συμπληρωματικά τους mRNA, σχηματίζοντας δίκλωνες δομές RNA, με αποτέλεσμα την αποδόμησή τους [35, 37]. Τέλος, μπορούν να πακεταριστούν σε κυστίδια (εξωσώματα) και, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, να καταλήξουν και να δράσουν σε απομακρυσμένους ιστούς [39].



Εικόνα 1.10: Λειτουργίες των lncRNA [35]

Οι παραπάνω μηχανισμοί δράσης των lncRNA αξιοποιούνται σε βιολογικές διεργασίες για τη ρύθμιση της λειτουργίας των υγιών κυττάρων. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται τους μηχανισμούς αυτούς, μέσω της απορρύθμισης των lncRNA, για την ενίσχυση της ανάπτυξης τους και την προαγωγή της νόσου, ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση [40].

1.4 Ρυθμιστικά Στοιχεία και Χρωματίνη

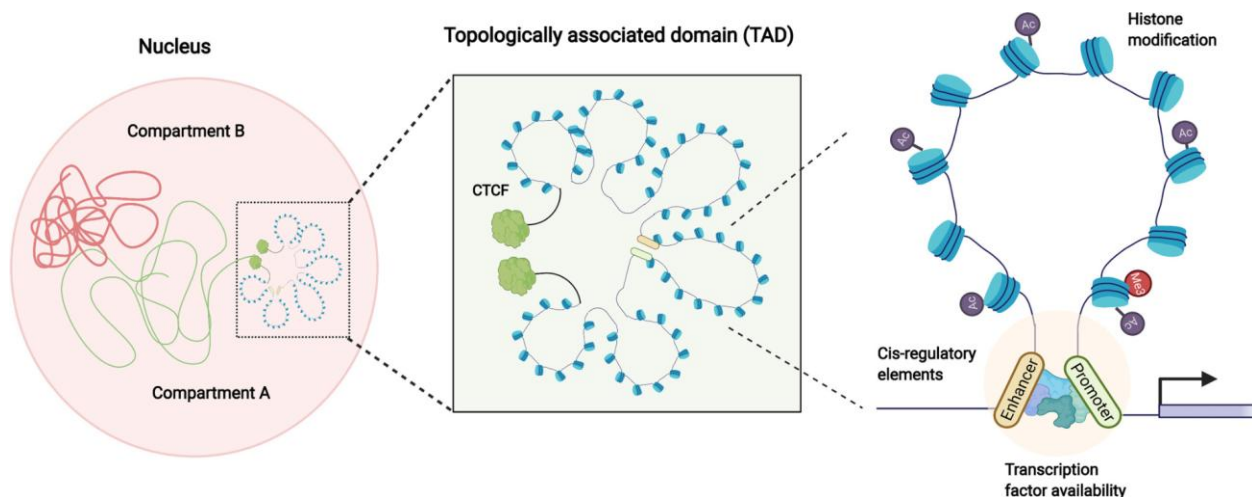
Κάθε ιστός διαθέτει τη δική του ταυτότητα γονιδίων, η οποία καθορίζεται από την ρύθμιση της χρωματίνης που πραγματοποιείται από κοντινά *cis* ρυθμιστικά στοιχεία και απομακρυσμένα *trans* ρυθμιστικά στοιχεία [41, 42]. Στα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, οι ενισχυτές και οι υποκινητές. Οι υποκινητές εντοπίζονται συνήθως ανοδικά του γονιδίου στόχου και αλληλεπιδρούν με τους ενισχυτές, οι οποίοι μπορεί να βρίσκονται σε μακρινή απόσταση ανοδικά ή καθοδικά του γονιδίου στόχου ή και σε μεσιγονιδιακές περιοχές [43-45]. Η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού βρόχου χρωματίνης ([Εικόνα 1.11](#)), διευκολύνοντας της ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης [45]. Στην διαδικασία αυτή συμμετέχουν μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετικούς συνδυασμούς έκφρασης και πρόσδεσης ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο [44, 46]. Επιπλέον, επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών και μεθυλίώσεις σε ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA επηρεάζουν την προσβασιμότητα της χρωματίνης στους μεταγραφικούς παράγοντες [47-49].

Σχετικές μελέτες φανερώνουν ότι χαρακτηριστικοί γενετικοί πολυμορφισμοί (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) ή μεταβολές του πρότυπου μεθυλίωσης στα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία μπορούν να μεταβάλλουν την λειτουργικότητά τους [42, 50]. Συγκεκριμένα, τέτοιες αλλαγές μπορούν να τροποποιήσουν την συγγένεια των μεταγραφικών παραγόντων για τα μοτίβα πρόσδεσης τους, οδηγώντας σε απενεργοποίηση ή υπερενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων και, τελικά, σε καρκινογένεση. Για τον λόγο αυτό, η μελέτη των ρυθμιστικών στοιχείων ενός γονιδίου είναι ουσιώδης, καθώς παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον τρόπο ρύθμισης του.

1.4.1 Τοπολογικά Συνδεδεμένες Περιοχές (Topologically Associated Domains, TADs)

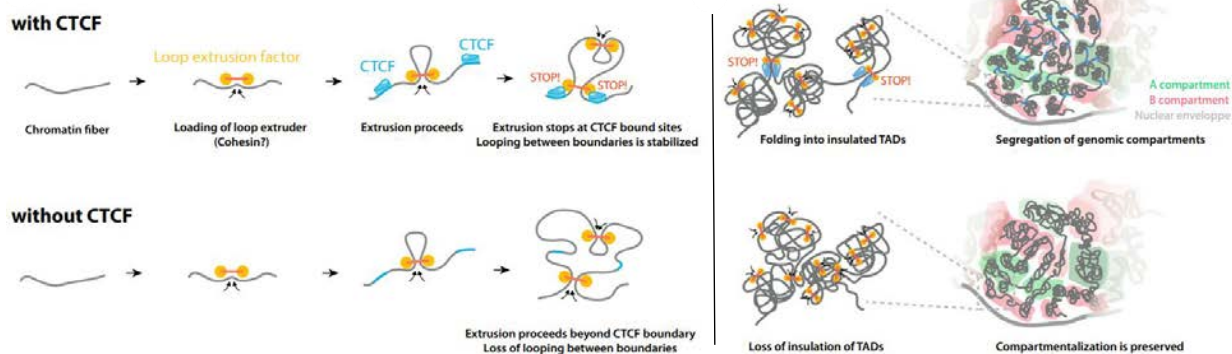
Οι ενισχυτές βρίσκονται συχνά σε μεγάλη απόσταση από τον υποκινητή του γονιδίου-στόχου με τον οποίο τελικά θα αλληλεπιδράσουν. Η καθοδήγηση τους εξασφαλίζεται από την τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος σε Τοπολογικά Συνδεδεμένες Περιοχές (Topologically Associated Domains, TADs, βεβαιώνοντας ότι κάθε ενισχυτής θα αλληλεπιδράσει με τον υποκινητή του κατάλληλου γονιδίου-στόχου, προάγοντας έτσι την ακριβή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [51, 52].

Οι TADs αφορούν σταθερές δομικές μονάδες οργάνωσης των χρωμοσωμάτων. Το μέγεθος τους ποικίλλει από δεκάδες χιλιάδες έως και εκατομμύρια ζεύγη βάσεων [53]. Η περιοχή σφραγίζεται μέσω των πρωτεϊνών-μονωτών CTCFs (CCCTC-binding factors), όπως φαίνεται στην [Εικόνα 1.11](#). Οι γονιδιωματικές περιοχές που συμπεριλαμβάνονται σε μια TAD είναι πιο πιθανό να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους παρά με άλλες γονιδιωματικές περιοχές, και επομένως αποτελούν μια περιοχή αυτόνομης αλληλεπίδρασης. Μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση των γονιδίων στην ίδια TAD συνήθως συσχετίζεται [54, 55], ενώ η δομή των TADs παραμένει σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη τόσο μεταξύ διαφορετικών ειδών, όσο και μεταξύ κυτταρικών τύπων [56].



Εικόνα 1.11: Σχηματική Απεικόνιση των Τοπολογικά Συνδεδεμένων Περιοχών (TADs) και του Βρόχου Χρωματίνης. *Compartment A: Ένεργη-Προσβάσιμη Χρωματίνη, Compartment B: Ανενεργή-Μη Προσβάσιμη Χρωματίνη* [34]

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, είναι σαφές ότι τόσο η διαμόρφωση των βρόχων της χρωματίνης όσο και των TADs ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Η ανακατανομή ή η απώλεια των CTCF, που πραγματοποιείται μέσω μεταλλάξεων ή επιγενετικής απενεργοποίησης στα άκρα των TADs, οδηγεί σε αλλαγές στη δομή της χρωματίνης, στην προσβασιμότητα της και κατά συνέπεια, στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 1.12) [57]. Οι αναδιαμορφώσεις αυτές είναι ικανές να επιτρέψουν την ανεπιθύμητη ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και τελικά να εκκινήσουν την καρκινογένεση [51, 52].



Εικόνα 1.12: Σχηματική Απεικόνιση της αναδιάταξης των TAD παρουσία και απουσία της πρωτεΐνης-μονωτή CTCF. *Compartment A: Ένεργη-Προσβάσιμη Χρωματίνη, Compartment B: Ανενεργή-Μη Προσβάσιμη Χρωματίνη*[57]

1.4.2 Ρύθμιση μεταγραφής των lncRNA

Τόσο τα κωδικοποιητικά γονίδια, όσο και τα lncRNA χρειάζονται μεταγραφικούς παράγοντες, όπου τις περισσότερες φορές είναι κοινοί, για να εκκινήσει η μεταγραφή τους [42]. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί πως η έκφραση των lncRNA επηρεάζεται από επιγενετικές τροποποιήσεις ιστονών και μεθυλίωση ρυθμιστικών αλληλουχιών DNA, η οποία είναι ενδεικτική της ιστοειδικότητας τους [58]. Ωστόσο, η απορρύθμιση των παραπάνω μηχανισμών οδηγεί σε καρκινογένεση.

Όμοια με τα κωδικοποιητικά γονίδια, οι υποκινητές των lncRNA εμφανίζουν μη φυσιολογικά πρότυπα μεθυλίωσης κατά την καρκινογένεση [42]. Ειδικότερα, οι υποκινητές κάποιων lncRNA όπως τα MEG3 και LOC554202 που χαρακτηρίζονται ως ογκοκατασταλτικά, εμφανίζουν υπερμεθυλίωση σε CpG σε όγκους [24, 59, 60]. Αντίστοιχα, οι υποκινητές των ογκοεπαγωγικών lncRNA παρουσιάζουν υπομεθυλίωση σε CpG, ενισχύοντας την καρκινογένεση [24].

1.4.3 Ρόλος των Lineage Survival Μεταγραφικών Παραγόντων GATA στον γαστρικό καρκίνο

Πέρα από τις επιγενετικές τροποποιήσεις, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι lineage survival μεταγραφικοί παράγοντες, η απορρύθμιση των οποίων συσχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη της νόσου, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες [61]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο MITF ο οποίος είναι υπεύθυνος για την διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων και εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε σποραδικό μελάνωμα [62]. Ειδικότερα, κατά την απορρύθμισή του, ο MITF δρα ως ογκογονίδιο, ρυθμίζοντας καθοδικά γονίδια όπως το BCL2 και το CDK2, απορρυθμίζοντας τους μηχανισμούς απόπτωσης και τον κυτταρικό κύκλο αντίστοιχα.

Αντίστοιχο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι lineage survival μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας GATA [61]. Συγκεκριμένα, οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και GATA6 υπερεκφράζονται σε όγκους γαστρικού καρκίνου σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου στερεών όγκων. Έπειτα από αναλύσεις ChIP-Seq γαστρικών καρκινικών κυττάρων, παρατηρείται πως οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες συνυπάρχουν σε χρωματινικές περιοχές υποκινητών και ενισχυτών και συνδέονται σε θέσεις ανοδικά κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών γονιδίων-στόχων. Επιπλέον, σε κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου AGS με επαγόμενη σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 παρατηρήθηκε αλλαγή του μεταγραφόματος κατά 12%, μειωμένος ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μειωμένη κινητικότητα που συνεπάγεται και μειωμένη μεταστατική ικανότητα σε δοκιμασίες επούλωσης πληγών (Wound Healing Assays). Τέλος, και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση lncRNA, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την υπερέκφραση των LINC01003 και MALAT1, καθώς και την υποέκφραση των DANCR και TOM3P9 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα.

Επομένως, για την κατανόηση των μηχανισμών απορρύθμισης της έκφρασης που τελικά οδηγούν στην επαγωγή του γαστρικού καρκίνου, κρίνεται απαραίτητη η συσχέτιση της αλληλεπίδρασης των ρυθμιστικών στοιχείων ενός γονιδίου και των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας GATA.

1.4.4 Ρύθμιση της χρωματίνης από τα lncRNA

Ανάμεσα στις ποικίλες λειτουργίες των lncRNA ([Ενότητα 1.3.2](#)), ιδιαίτερη σημασία έχει η ικανότητα ρύθμισης της χρωματίνης, καθώς επηρεάζει έμμεσα το πρότυπο μεταγραφής [27]. Τα lncRNA μπορούν να οδηγήσουν είτε σε ενεργοποίηση είτε σε καταστολή της μεταγραφής μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων των ιστονών. Ειδικότερα, κάποια lncRNA επιστρατεύουν την μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών η οποία μπορεί να προβεί στην μεθυλίωση H₃K_{4me3}. Έτσι, προάγεται η μετάβαση της χρωματίνης από την μεταγραφικά ανενεργή της κατάσταση (ετεροχρωματίνη) στην μεταγραφικά ενεργή της μορφή (ευχρωματίνη), επάγοντας την μεταγραφή

των γονιδίων στόχων ([Εικόνα 1.13A](#)). Αντίστοιχα, κάποια lncRNA μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον επιγενετικό μηχανισμό μέσω της ρύθμισης της σταθερότητας των πρωτεϊνών που περιλαμβάνει, είτε προωθώντας είτε αναστέλλοντας την αποικοδόμησή τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το lncRNA ANCR, το οποίο αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό καταστολέα EZH2, επάγοντας φωσφορυλίωση από την κινάση CDK1 και ενισχύοντας το σήμα H₃K_{27me3} που οδηγεί σε μετάβαση της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη [63]. Στον καρκίνο του μαστού, όπου το ANCR παραμένει ανενεργό, ο EZH2 υπερδραστηριοποιείται, προάγοντας την καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ([Εικόνα 1.13C](#)).

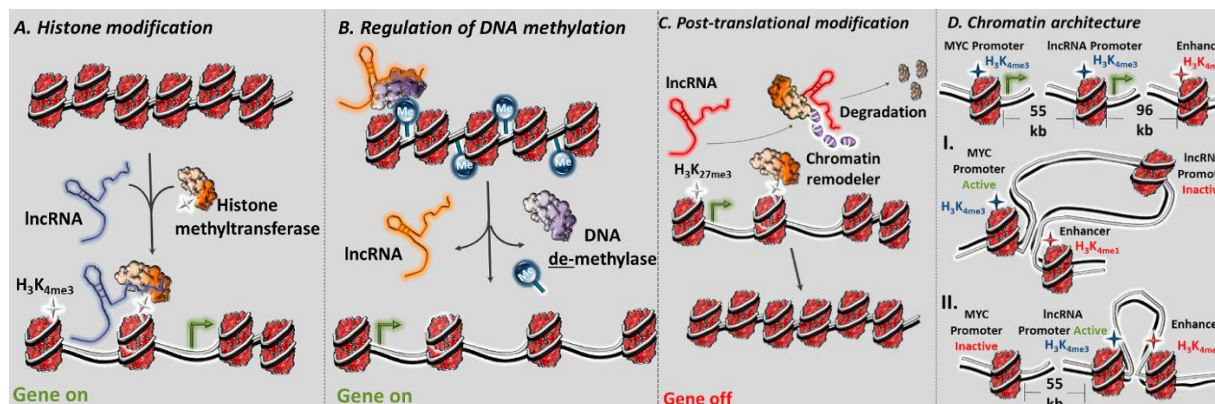
Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα lncRNA συμμετέχουν στην ρύθμιση της μεταγραφής είναι η ρύθμιση της μεθυλίωσης ([Εικόνα 1.13B](#)) [27, 64]. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα lncRNA μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την απομεθυλάση του DNA, επάγοντας την αφαίρεση μεθυλομάδων από αλληλουχίες DNA και προωθώντας έτσι την έκτοπη έκφραση ογκογονιδίων στον καρκίνο.

Τέλος, τα lncRNA μπορούν να τροποποιήσουν την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική της χρωματίνης [27, 38]. Οι μηχανισμοί που αξιοποιούν αφορούν την υποβοήθηση της αλληλεπίδρασης του ενισχυτή με τον υποκινητή προς τον σχηματισμό του βρόχου χρωματίνης και την αναδιαμόρφωση περιοχών TAD, οι οποίες είναι πλούσιες σε αλληλουχίες ενισχυτών [65]. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες που βρίσκονται στον πυρήνα και συνδέονται στο RNA (RNA-Binding Proteins, RBPs), ορισμένες από τις οποίες μπορούν να δράσουν αλλάζοντας το πρότυπο μεθυλίωσης των ρυθμιστικών στοιχείων. Η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των αλληλεπιδράσεων των ρυθμιστικών στοιχείων και της τρισδιάστατης διαμόρφωσης της χρωματίνης στον χώρο [66].

Για παράδειγμα, η μεταγραφή του lncRNA ThymoD σχετίζεται με την απομεθυλίωση περιοχών πλούσιων σε CpG, οι οποίες περιλαμβάνουν αλληλουχίες πρόσδεσης παραγόντων CTCF, καθώς και με την στρατολόγηση της κοεζίνης με σκοπό την αναδιάταξη της τρισδιάστατης δομής της χρωματίνης [67]. Το αποτέλεσμα είναι η μετακίνηση του υποκινητή του γονιδίου Bcl11b από την πυρηνική μεμβράνη προς έναν απομακρυσμένο ενισχυτή, γεγονός που επιτρέπει την ενεργοποίηση του γονιδίου και τη διαφοροποίηση σε T-κύτταρα.

Ακόμη, τα e-lncRNA μπορούν να προσδεθούν στο σύμπλοκο του Διαμεσολαβητή της Μεταγραφής και να σταθεροποιήσουν την κοεζίνη που σφραγίζει τον βρόχο χρωματίνης, φέρνοντας κοντά τα ρυθμιστικά στοιχεία [68]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το e-lncRNA SCAR-6, το οποίο σταθεροποιεί τη δημιουργία βρόχου χρωματίνης για την αλληλεπίδραση των στοιχείων prozb/scar-6 ρυθμίζοντας την έκφραση του prozb. Η απώλεια του οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του prozb και ενεργοποίηση του υποδοχέα PAR2 προκαλώντας τελικά αγγειακή δυσλειτουργία [69].

Πέρα από την συμβολή των lncRNA στην τροποποίηση του πρότυπου έκφρασης, τα ίδια τα ρυθμιστικά τους στοιχεία μπορούν επίσης να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο ([Εικόνα 1.13D](#)) [27]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο υποκινητής του lncRNA PVT1, ο οποίος περιορίζει την έκφραση του γονιδίου MYC στον καρκίνο του μαστού, δρώντας ως ογκοκατασταλτικό στοιχείο [70]. Ειδικότερα, οι υποκινητές των δύο γονιδίων ανταγωνίζονται για την αλληλεπίδραση με ένα σύνολο ενισχυτών. Η στοχευμένη καταστολή του υποκινητή του PVT1 μέσω του συστήματος CRISPRi οδήγησε σε ενίσχυση της έκφρασης του MYC. Συνεπώς, ανάλογα με το ποιος υποκινητής παραμένει ενεργός και ικανός να αλληλεπιδράσει με τον αντίστοιχο ενισχυτή, καθορίζει την αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης [27].

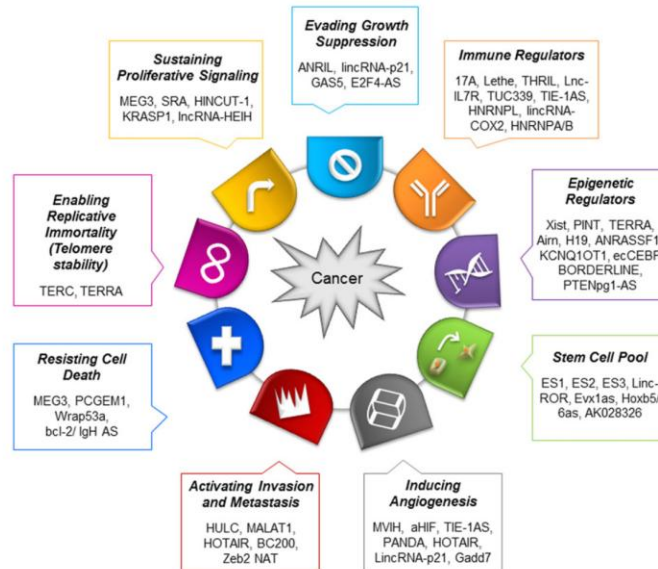


Εικόνα 1.13: Τροποποίηση της μεταγραφής από τα lncRNA μέσω ρύθμισης της χρωματίνης [27]

1.4.5 Καρκινοειδικά εκφραζόμενα lncRNA ως εξειδικευμένοι Μοριακοί Βιοδείκτες

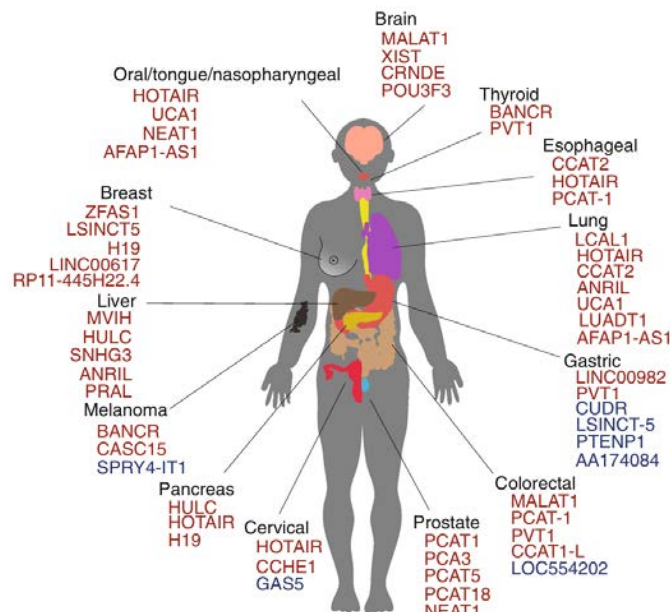
Δεδομένης της καρκινοειδικής έκφρασης των lncRNA, συνεπικουρούμενης και από την αυξημένη παρουσία τους σε σωματικά υγρά ασθενών, τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την αξιοποίησή τους ως μοριακούς διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες [71]. Έπειτα από εκτενή ανάλυση χιλιάδων δειγμάτων καρκινικών βιοψιών, δημιουργήθηκε ο Άτλαντας του Καρκινικού Γονιδιώματος (TCGA), μια ερευνητική κοινοπραξία που συσχετίζει κλινικά, γενετικά, επιγενετικά και μεταγραφομικά φαινόμενα κατά την εξέλιξη της νόσου [27, 72, 73]. Η ανάλυση αυτή φανέρωσε την συμμετοχή διαφορετικών lncRNA στα στάδια της νόσου. Συμπληρωματικά, η σταθερότητα των lncRNA, η εξειδίκευση εμφάνισης σε επίπεδο κυττάρου και ιστού, αλλά και η εύκολη ανίχνευση τους στα σωματικά υγρά τα καθιστά ιδανικά ως μοριακούς καρκινικούς βιοδείκτες [74]. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα μετάγραφα είναι καρκινοειδικά;

Τα lncRNA εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε συγκεκριμένους όγκους, αλλά και σε διαφορετικά στάδια της νόσου [40, 75]. Ειδικότερα, τα lncRNA εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης: από την αυτοκρινή σηματοδότηση, την αποφυγή απόπτωσης, και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, έως την αγγειογένεση και την μετάσταση (Εικόνα 1.14) [40, 76, 77]. Έπειτα από εκτενείς αναλύσεις βιβλιοθηκών, φαίνεται πως συγκεκριμένα lncRNA συμμετέχουν σε όλες αυτές τις διαδικασίες είτε μέσω αυξημένης παρουσίας τους είτε μέσω καταστολής τους [40]. Αντίστοιχες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους παρατηρούνται και ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου, όπου η απορρυθμισμένη έκφραση συγκεκριμένων lncRNA σχετίζεται είτε με αυξημένα επίπεδα όταν προάγουν την νόσο είτε με μειωμένα επίπεδα όταν λειτουργούν ανασταλτικά ως προς την εξέλιξη του όγκου (Εικόνα 1.15) [78]. Επίσης, έπειτα από αναλύσεις του μεταγραφώματος, διαπιστώθηκε πως τα lncRNA εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ιστοειδικότητα συγκριτικά με τα κωδικά μετάγραφα, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά τόσο για διάγνωση της νόσου όσο και για την ακριβή ταυτοποίηση του ιστού προέλευσης του όγκου [29].



Εικόνα 1.14: Συσχέτιση των lncRNA με τα ορόσημα της καρκινογένεσης[77]

Για παράδειγμα, το HOTAIR, το MALAT1 και το PVT1 εμφανίζονται σε υψηλά επίπεδα σε περισσότερους από έναν τύπους καρκίνου[78-81]. Το γεγονός αυτό τα καθιστά ως πιθανούς βιοδείκτες για ένδειξη καρκίνου, χωρίς όμως να εστιάζουν σε έναν συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Αντίστοιχα, το lncRNA LINC00982 εμφανίζει ιστοειδικότητα, καθώς παρατηρείται αυξημένη έκφρασή του σε γαστρικά υγρά που απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του στομάχου σε σχέση με υγιείς ασθενείς [82]. Συνεπώς, η χρήση τέτοιων βιοδεικτών θα μπορούσε να αντιμετωπίσει το κύριο αίτιο της κακής πρόγνωσης του γαστρικού καρκίνου, επιτρέποντας την έγκαιρη και μη παρεμβατική διάγνωση και πρόληψή του.



Εικόνα 1.15: Συσχέτιση των lncRNA με διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η μείωση της έκφρασης ενώ με κόκκινο η αύξηση της έκφρασης σε σχέση με υγιείς ιστούς[78]

Παρόλο που τα lncRNA εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα ως μοριακοί βιοδείκτες, η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη παραμένει περιορισμένη. Μέχρι σήμερα, μόνο ένα lncRNA, το PCA3, έχει εγκριθεί ως διαγνωστικός βιοδείκτης στον καρκίνο του προστάτη μέσω ανίχνευσης στα ούρα. Ειδικότερα, εμφανίζει υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη σε σύγκριση με υγιή άτομα [83-85]. Ωστόσο, η πλειονότητα των υπόλοιπων lncRNA (όπως το MALAT1 και το HOTAIR) βρίσκεται στο στάδιο ερευνητικής αξιολόγησης, γεγονός που αναδεικνύει το αυξανόμενο ενδιαφέρον γύρω από την έρευνα των lncRNA με εφαρμογές στη διάγνωση και την πρόγνωση διάφορων τύπων καρκίνου [85]. Δεδομένης της καρκινοειδικής τους έκφρασης, υπάρχει αυξημένη ανάγκη κατανόησης των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν και εξασφαλίζουν την εξειδικευμένη έκφραση των lncRNA στην νόσο έναντι φυσιολογικών ιστών. Η μελέτη των ρυθμιστικών τους αλληλουχιών DNA, όπως για παράδειγμα των ενισχυτών τους, καθώς και η μελέτη των υποκινητών άλλων γονιδίων με τα οποία αλληλεπιδρούν και τελικά ρυθμίζουν μεταγραφικά, αποτελούν θεμελιώδη ερευνητικά ερωτήματα στο πεδίο, προκειμένου να αναπτυχθούν νέοι, λειτουργικά χαρακτηρισμένοι και εξειδικευμένοι μοριακοί βιοδείκτες.

2. Σκοπός

Η παρούσα πτυχιακή έχει ως σκοπό τη μελέτη δύο πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων, τα οποία βρίσκονται στον άξονα ρύθμισης του lncRNA RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του, CPR2. Ειδικότερα, διερευνάται η ενεργότητα του ενισχυτή B, καθώς και του γονιδίου-στόχου του lncRNA RECUR1 που ονομάζεται CPR2. Σε προηγούμενες πτυχιακές εργασίες του εργαστηρίου επισημάνθηκε πως η απορρύθμιση του συγκεκριμένου lncRNA μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την καρκινοειδικότητα που χαρακτηρίζει τα lncRNA γενικά αλλά και το RECUR1 ειδικότερα, κρίνουν απαραίτητη την μελέτη των ρυθμιστικών τους στοιχείων. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λουσιφεράσης για την εκτίμηση της δραστηριότητας της πλήρους αλληλουχίας του ενισχυτή B σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Παράλληλα, μελετήθηκε συγκριτικά η δραστηριότητα των τριών επιμέρους τμημάτων που απαρτίζουν την πλήρη αλληλουχία του Ενισχυτή B, ώστε να εντοπιστεί το τμήμα με τη μεγαλύτερη ενεργότητα. Αφού βρέθηκε το πιο ενεργό τμήμα, επιχειρήθηκε στοχευμένη απαλοιφή του, μέσω του συστήματος CRISPR/nCas9. Συμπληρωματικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λουσιφεράσης για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του Ενισχυτή B με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία του άξονα, δηλαδή με τον Ενισχυτή A και τον Υποκινητή του RECUR1, τα οποία μελετήθηκαν συγκριτικά με συνδυασμό CRISPR/nCas9 και δοκιμασίες λουσιφεράσης. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λουσιφεράσης για τη διερεύνηση της ενεργότητας της αλληλουχίας του υποκινητή του CPR2, συγκρίνοντάς τον με μια πρότερη αλληλουχία που είχε προταθεί ανεπιτυχώς ως υποψήφιος υποκινητής της CPR2 σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία του εργαστηρίου.

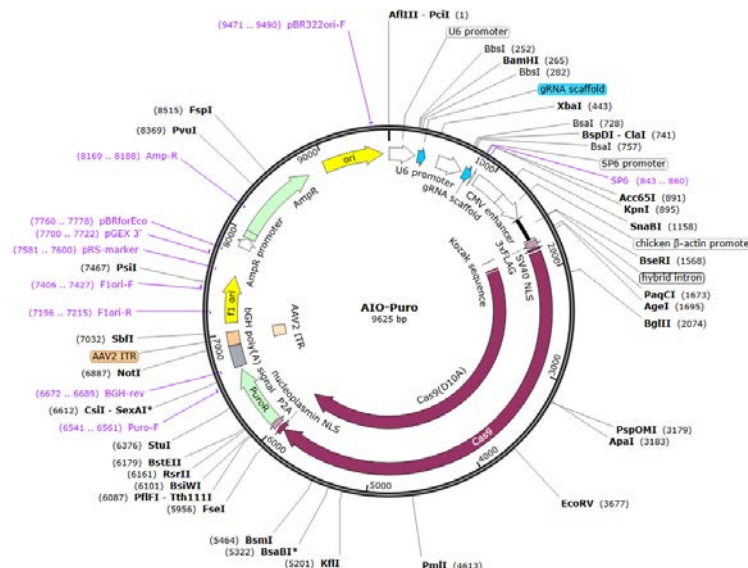
3.Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς

3.1.1.1 AIO-puro (All-In-One Nickase-D10A)

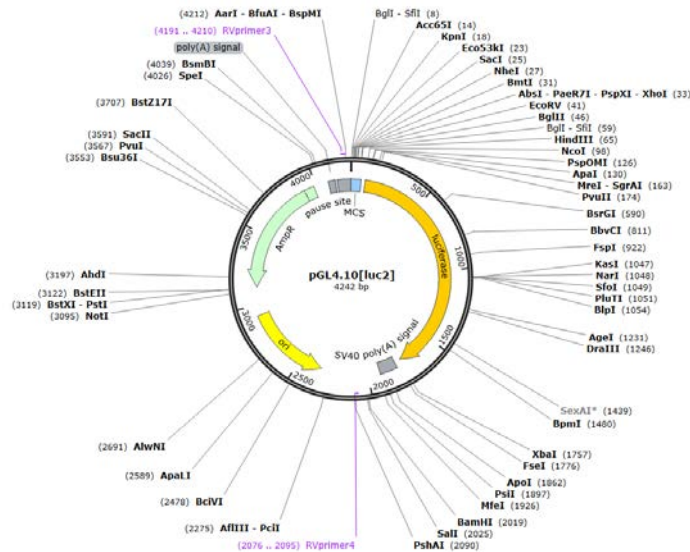
Ο πλασμιδιακός φορέας AIO-puro (All-In-One Nickase-D10A) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των sgRNA σε βακτήρια και τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με στόχο την έκφραση των δύο sgRNA και της nCas9 (D10A). Ο φορέας έχει μήκος 9626 ζεύγη βάσεων. Επιπλέον, διαθέτει γονίδιο που κωδικοποιεί για την nCas9 (νικάση Cas9), υπό τον έλεγχο του υποκινητή Cbh. Ακόμη, έχει δύο υποκινητές U6 δίπλα στους οποίους υπάρχουν θέσεις κοπής από τα περιοριστικά ένζυμα BbsI και BsaI για την ένθεση των δύο sgRNA. Επίσης, το πλασμίδιο φέρει δύο αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια επιλογής. Η πρώτη (AmpR) αφορά το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη για την επιλογή των βακτηριακών κυττάρων, ενώ η δεύτερη το γονίδιο PuroR που προσδίδει ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη για την επιλογή των ευκαρυωτικών κυττάρων.



Εικόνα 3.1: Χάρτης πλασμιδίου AIO-puro (All-In-One Nickase-D10A)

3.1.1.2 pGL4.10

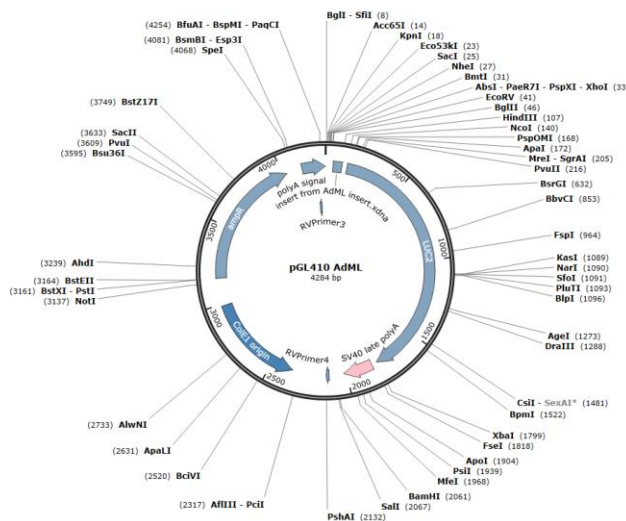
Ο πλασμιδιακός φορέας pGL4.10 χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση τμήματος του υπό εξέταση υποκινητή και τελικά έγινε διαμόλυνση κυττάρων με σκοπό να εξεταστεί η ενεργότητα του υποκινητή με δοκιμές λουσιφεράσης. Ο φορέας έχει μήκος 4242 bp. Διαθέτει ως γονίδιο αναφοράς την λουσιφεράση (Firefly Luciferase), ανοδικά του οποίου βρίσκεται μια θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS, Multi-Cloning Site) όπου θα γίνει η ένθεση του υποκινητή και ένα γονίδιο επιλογής (AmpR) που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη στα βακτήρια. Έτσι μπορεί να γίνει εκτίμηση της ενεργότητας του υποκινητή μέσω της δράσης της λουσιφεράσης.



Εικόνα 3.2: Χάρτης πλασμιδίου pGL4.10 [luc2]

3.1.1.3 pGL4.10/AdML

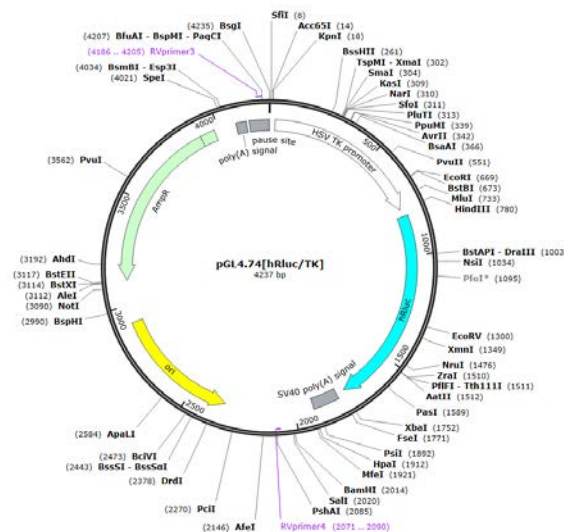
Ο πλασμιδιακός φορέας pGL4.10/AdML χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη ενεργότητας του υπό εξέταση ενισχυτή. Το μήκος του είναι 4284 ζεύγη βάσεων. Ο φορέας αυτός διαθέτει τα ίδια χαρακτηριστικά με τον pGL4.10, με τη διαφορά ότι διαθέτει επιπλέον και μια αλληλουχία με τα απολύτως απαραίτητα ρυθμιστικά στοιχεία εντός κεντρικού υποκινητή (minimal promoter). Επιπλέον, φέρει ένα γονίδιο αναφοράς που κωδικοποιεί για λουσιφεράση (Firefly Luciferase), ώστε να είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός του ενισχυτή και ένα γονίδιο επιλογής (AmpR) που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη στα βακτήρια.



Εικόνα 3.3: Χάρτης πλασμιδίου pGL4.10/AdML

3.1.1.4 pGL4.75

Ο πλασμιδιακός φορέας pGL4.75 χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των πειραμάτων με χρήση του πλασμιδίου που εκφράζει την λουσιφεράση. Ειδικότερα, το πλασμίδιο αυτό φέρει γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο Firefly Renilla (hRluc) υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή και έχει μήκος 4.281 ζεύγη βάσεων. Ακόμη, διαθέτει γονίδιο επιλογής (AmpR) που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη στα βακτήρια.

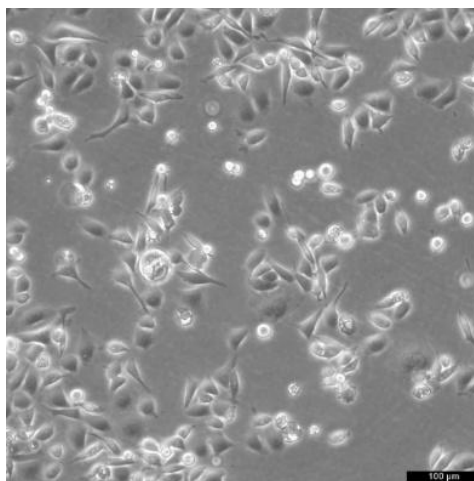


Εικόνα 3.4: Χάρτης πλασμιδίου pGL4.74 [hRluc/TK]

3.1.2 Κυτταρικές σειρές

3.1.2.1 AGS

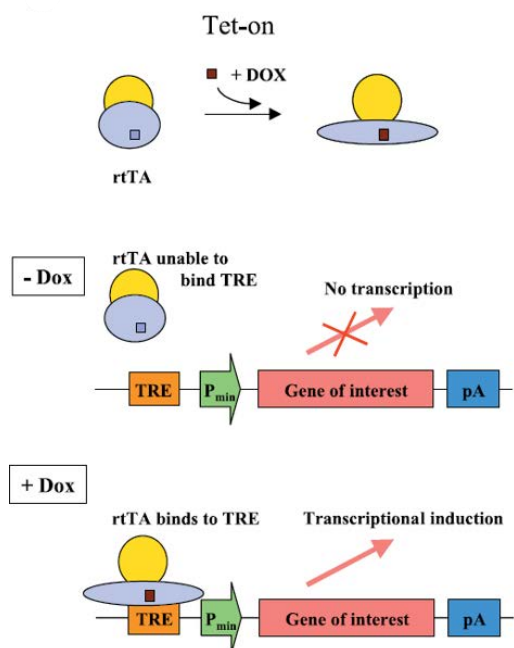
Τα κύτταρα AGS είναι κυτταρική σειρά απομονωμένη από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα με μορφολογία επιθηλίου και προσκολλητικό χαρακτήρα. Απομονώθηκαν από γυναίκα 54 χρονών καυκάσιας εθνικότητας.



Εικόνα 3.5: Κύτταρα AGS cells κάτω από το μικροσκόπιο, <https://www.cytion.com/AGS-Cells/300408>

3.1.2.2 AGTR-G4

Η κυτταρική σειρά AGTR-G4 αφορά AGS κύτταρα τα οποία διαθέτουν το επαγωγίμο σύστημα καταστολής TET. Συγκεκριμένα, το σύστημα αυτό ενεργοποιείται παρουσία δοξυκυκλίνης (DOX), η οποία αναστέλλει τον καταστολέα TET επιτρέποντας την μεταγραφή ενός shRNA που θα καταστείλει την έκφραση ενός μεταγράφου και επομένως της πρωτεΐνης που επρόκειτο να παραχθεί (Εικόνα 3.6, [86]). Στη συγκεκριμένη σειρά το μετάγραφο που θα κατασταλεί είναι του μεταγραφικού παράγοντα GATA4. Κάθε φορά που γίνεται χρήση κυττάρων που διαθέτουν το σύστημα TET, δημιουργούνται δύο συνθήκες, η συνθήκη CON (αρνητικός μάρτυρας που εκφράζει το γονίδιο-στόχο) και η συνθήκη DOX (που καταστέλλει το γονίδιο-στόχο μέσω επαγωγίμης RNAi σίγησης), οι οποίες αφορούν την απουσία και παρουσία δοξυκυκλίνης αντίστοιχα.

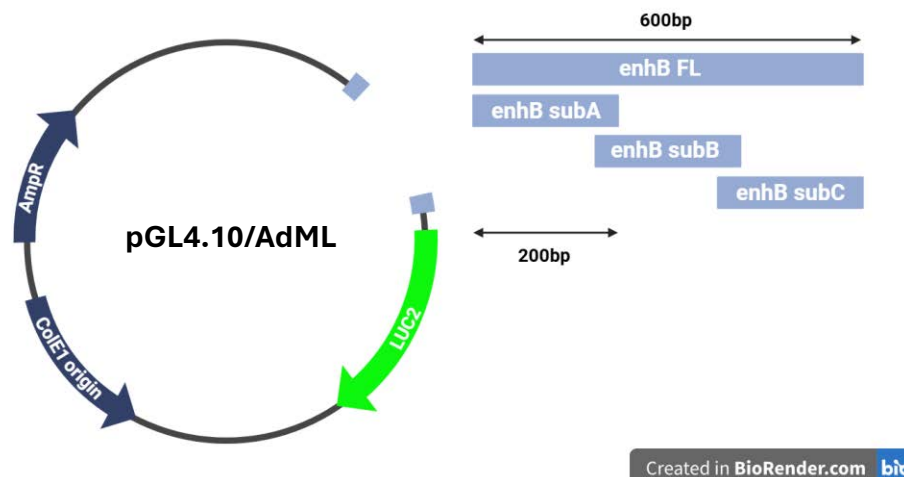


Εικόνα 3.6 : Το σύστημα Tet-on. TA: ενεργοποιητής επαγόμενος από τετρακυκλίνη, DOX: δοξυκυκλίνη, TRE: αλληλουχία/στοιχείο αποκρινόμενο στην τετρακυκλίνη [86]

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κλωνοποίηση του πλήρους μήκους του ενισχυτή B (EnhB) του γονιδίου CPR2 και των τριών επιμέρους τμημάτων της αλληλουχίας του ενισχυτή B (EnhB) στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML και επιβεβαίωση του προσανατολισμού ένθεσής τους

Για τη μελέτη του ενισχυτή B του γονιδίου CPR2 χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGL4.10/AdML. Ο ενισχυτής B (enhB) έχει μήκος 600 ζεύγη βάσεων και για να μπορέσει να γίνει ο χαρακτηρισμός του, πέρα από την προσθήκη του ακέραιου τμήματος του σε πλασμίδιο, έγιναν παράλληλα πειράματα με 3 επιμέρους τμήματα του μήκους 200 ζευγών βάσεων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.7.



Εικόνα 3.7: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων κλωνοποίησης του ενισχυτή B του γονιδίου CPR2 στον πλασμιδιακό φορέα Pgl4.10/AdML

3.2.1.1 Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR για την ενίσχυση και απομόνωση τμημάτων DNA μήκους 200 και 600 ζευγών βάσεων

Αρχικά, έγινε η απομόνωση των 3 τμημάτων μήκους 200 ζευγών βάσεων από γονιδιωματικό DNA καρκινικών γαστρικών κυττάρων θηλαστικού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές για την ενίσχυση του κάθε τμήματος με PCR. Το πρωτόκολλο για την προετοιμασία της αντίδρασης της PCR και τις συνθήκες τις αντίδρασης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1: Σύσταση αντίδρασης και συνθήκες PCR με HiFi pol για ενίσχυση τμήματος 200 βάσεων από γονιδιωματικό DNA

Αντιδραστήρια	Ix	Πρόγραμμα PCR	
Buffer 5x	10 ul	95 °C	2 min
dNTPs	1 ul	95 °C	40 sec
Primers	5 ul	58 °C	20 sec
gDNA	2 ul	72 °C	25 sec
HiFi pol (Q5 pol, NEB)	0,25 ul	72 °C	2 min
WFI	31,75 ul	30 κύκλοι	
ΥΠΕΛΙΚΟΣ	50 ul		

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αгарόζης 1%, με ελάχιστη έκθεση (>10 sec) του DNA στο UV. Έπειτα, έγινε απομόνωση της αντίστοιχης μπάντας, με βοήθεια ladder, στα 200bp για τα 3 τμήματα.

Οι συνθήκες τις αντίδρασης για την ενίσχυση του ολικού τμήματος του ενισχυτή (600 ζεύγη βάσεων) περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2: Σύσταση αντίδρασης και συνθήκες PCR με HiFi pol για ενίσχυση τμήματος 600 βάσεων από γονιδιωματικό DNA

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ix</i>	<i>Πρόγραμμα PCR</i>	
Buffer 5x	10 ul	95 °C	2 min
dNTPs	0,5 ul	98 °C	40 sec
Primers	2 ul	59 °C	25 sec
gDNA	2 ul	72 °C	35 sec
HiFi pol (Q5 pol, NEB)	0,25 ul	72 °C	2 min
WFI	35,75 ul	30 κύκλοι	
V_{ΤΕΛΙΚΟΣ}	50 ul		

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της RCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, με ελάχιστη έκθεση (>10 sec) του DNA στο UV. Έπειτα, έγινε απομόνωση της αντίστοιχης μπάνας, με βοήθεια ladder, στα 600bp.

3.2.1.2 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης και απομόνωσης προϊόντος PCR από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ενίσχυση των τμημάτων DNA με πιθανό ρόλο ρυθμιστικών στοιχείων, έγινε ηλεκτροφόρηση των τμημάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η σύσταση του πηκτώματος και του προϊόντος PCR που φορτώθηκε παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3: Σύσταση πηκτώματος αγαρόζης 1%

<i>Συστατικά</i>	<i>Ποσότητα</i>	<i>Συστατικά</i>	<i>Ποσότητα</i>
TBE	300 ml	Προϊόν PCR	45 ul
Αγαρόζη	3gr	Loading Dye 6x	9 ul
Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr)	10 ul	V_{ΤΕΛΙΚΟΣ}	54 ul

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για 50 λεπτά σε 130V. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ελάχιστη έκθεση (>10 sec) του DNA στο UV για την απομόνωση της αντίστοιχης μπάνας, στα 200bp και στα 600bp, από το πήκτωμα με νυστέρι. Στην συνέχεια, εκτελέστηκε καθαρισμός του DNA που απομονώθηκε με βοήθεια kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel).

Το πρωτόκολλο του kit για την απομόνωση του κάθε τμήματος DNA από το πήκτωμα:

1. Τοποθέτηση τμήματος που απομονώθηκε από το πήκτωμα σε 1,5ml Eppendorf tube.
2. Για κάθε 0,1 gr agarose gel → 200 ul NT buffer
3. Τοποθέτηση του tube στο drybath στους **55-60 °C** για 15 min και vortex κάθε 5 min.
4. Μεταφέρω το υγρό σε στήλη silica που περιέχεται στο kit.
5. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11000g (RCF) και απόρριψη flow through.
6. Προσθήκη 700ul Wash Buffer NT3 στη στήλη.
7. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11000g (RCF) και απόρριψη flow through.
8. Προσθήκη 700ul Wash Buffer NT3 στη στήλη.
9. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11000g (RCF) και απόρριψη flow through
10. Αλλαγή του collecting tube.
11. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 11000g (RCF), ώστε να στεγνώσει η στήλη.

12. Απόρριψη collecting tube, και στη θέση του προσθήκη 1,5 ml Eppendorf για συλλογή του DNA.
13. Προσθήκη 25ul Διάλυμα Έκλουσης στο κέντρο της στήλης.
14. Τοποθέτηση σε stand για 1 λεπτό.
15. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 11000g (RCF).
16. Μέτρηση συγκέντρωσης (nanodrop - ως blank χρησιμοποιώ elution buffer) και αποθήκευση στους -20 °C για μελλοντική χρήση .

3.2.1.3 Πρωτόκολλο αντίδρασης φωσφορυλίωσης των άκρων του προϊόντος PCR που απομονώθηκε από τον πήκτωμα αγαρόζης (ένθεμα)

Το προϊόν PCR που απομονώθηκε από τον πήκτωμα αγαρόζης, αποτελεί το ένθεμα που θα κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα για την αξιολόγηση της ενεργότητας των πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων. Ο φορέας που χρησιμοποιείται είναι κομμένος στο σημείο που θα πραγματοποιηθεί η ένθεση και διαθέτει αποφωσφοριλιωμένα άκρα για να αποτραπεί η επανακυκλοποίηση του. Επομένως, για να είναι δυνατή η ένθεση του επιθυμητού τμήματος, πρέπει να γίνει φωσφορυλίωση των άκρων του ενθέματος.

Στο tube υπάρχουν 23 ul μετά τον καθαρισμό από το πήκτωμα αγαρόζης (25ul Διάλυμα Έκλουσης-2ul Nanodrop). Το πρωτόκολλο φωσφορυλίωσης των άκρων του ενθέματος παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.4: Σύσταση αντίδρασης φωσφορυλίωσης των άκρων του ενθέματος.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ix</i>
PNK Buffer 10x	3,5 ul
T4 PNK	1 ul
ATP	1 ul
PCR product	23 ul
WFI	6,5 ul
V _{FIN}	35 ul

Ακολουθεί επώαση για 30min στους 37 °C.

3.2.1.4 Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Το προϊόν φωσφορυλίωσης πρέπει να καθαριστεί για να γίνει ένθεση του στον πλασμιδιακό φορέα. Ακολουθεί το πρωτόκολλο καθαρισμού DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο:

1. Κάθε δείγμα πρέπει να έχει τελικό όγκο στα 400ul. Προσθήκη της ποσότητας του δείγματος προς καθαρισμό, 1/10 του τελικού όγκου Οξικού Νατρίου 3M, δηλαδή 40 ul, και νερό μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 400ul.
2. Προσθήκη ίσου όγκου δηλ. 400ul Φαινόλης-Χλωροφορμίου-Ισοαμυλικής αλκοόλης και vortex για 10 sec.
3. Φυγοκέντρηση 5min max rpm 4 °C.
4. Απομόνωση υδατικής φάσης (πάνω φάση) σε νέο tube και απόρριψη της οργανικής φάσης.
5. Προσθήκη 1ml EtOH 100% και 2ul glycogen.
6. Αποθήκευση στους -80 °C overnight

7. Φυγοκέντρηση 30 min max rpm 4 °C και απόρριψη υπερκείμενου (προσοχή στο ίζημα).
8. Προσθήκη 500ul 70% EtOH.
9. Φυγοκέντρηση 5 min max rpm 4 °C και αφαίρεση υπερκείμενου χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
10. Airdrying 15 min στον πάγκο.
11. Προσθήκη 22ul WFI.
12. Θέρμανση σε drybath 65 °C για 5min και vortex ανά 2,5min.
13. Μέτρηση συγκέντρωσης του δείγματος στο Nanodrop και αποθήκευση στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

3.2.1.5 Πρωτόκολλο αντίδρασης λιγάσης

Για την επιτυχή ένθεση του επιθυμητού τμήματος, είναι απαραίτητη η παρουσία του ενζύμου λιγάσης. Η λιγάση θα καταλύσει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ενώνοντας τα άκρα του ενθέματος και του πλασμιδιακού φορέα. Το πρωτόκολλο αντίδρασης λιγάσης περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.5: Σύσταση αντίδρασης λιγάσης

Αντιδραστήρια	Ix
Buffer T4 ligase 10x (NEB)	1ul
Vector	50ng
Insert	50ng
WFI	Up to 10ul
Ligase T4 DNA MINO(EnzyQuest)	0,5 ul
V _{FIN}	10ul

Ακολούθησε ολονύκτια επώαση για 16h στους 16 °C.

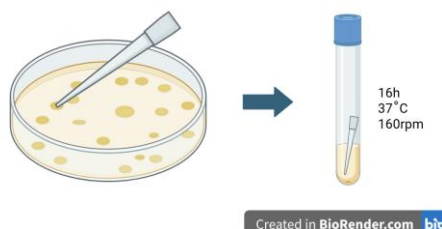
3.2.1.6 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού βακτηρίων

Μετά την αντίδραση λιγάσης, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό χημειοδεκτικών βακτηρίων *E.coli* DH5a. Η αναλογία των βακτηρίων προς το προϊόν λιγάσης είναι 10:1. Συγκεκριμένα, γίνεται προσθήκη 5 ul προϊόντος λιγάσης σε 40 ul βακτήρια. Ο μετασχηματισμός γίνεται μέσω θερμικού σοκ και στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 800ul θρεπτικού μέσου LB απουσία αντιβιοτικού σε δοκιμαστικό σωλήνα καλλιέργειας (15ml) για 50min στους 37°C/160rpm, για να γίνει ανάκαμψη από το σοκ και να δοθεί χρόνος στα βακτήρια που δέχθηκαν το πλασμίδιο να εκφράσουν τα γονίδια αντιβιοαντοχής.

Μετά από 50 λεπτά, ακολουθεί επίστρωση 400 ul υγρής καλλιέργειας σε προθερμασμένο τριβλίο που περιέχει αμικικιλίνη 100ug/ml, με τη βοήθεια γυάλινων Pasteur. Έπειτα, γίνεται τοποθέτηση των τρυβλίων στον επωαστήρα στους 37 °C για 16h.

3.2.1.7 Διαλογή αποικιών και ανάπτυξη τους σε υγρή καλλιέργεια

Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων σε τρυβλία, έγινε διαλογή αποικιών με κίτρινα ακροφύσια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες καλλιέργειας (15ml) που περιείχαν 2ml θρεπτικό. Έπειτα, ακολούθησε επώαση στους 37 °C/160rpm για 16h περίπου.



Εικόνα 3.8: Διαλογή αποικιών και μεταφορά σε επωαστικό κύλινδρο για ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας

3.2.1.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με πρωτόκολλο homemade mini-preps

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

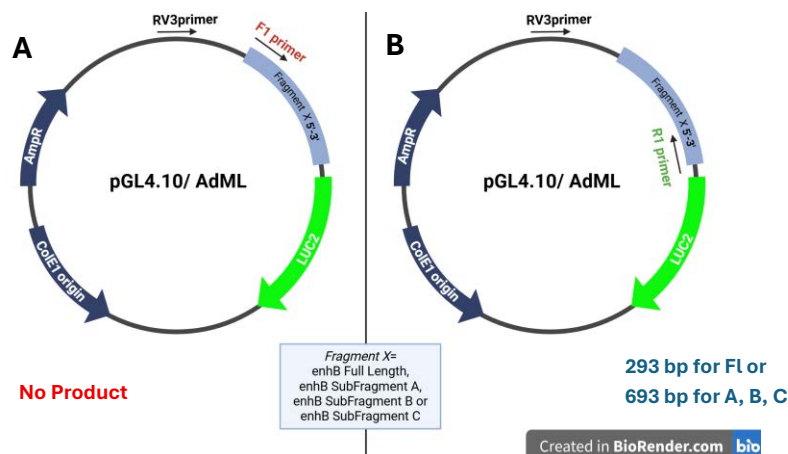
1. Μεταφορά υγρής καλλιέργειας σε 1,5ml Eppendorf tube
2. Φυγοκέντρηση 3000rpm για 5min και απόρριψη υπερκείμενου (διατήρηση βακτηριακού ιζήματος)
3. Προσθήκη 100ul Buffer I και Vortex
4. 200 ul Buffer II (FRESH!!) και ήπια ανακίνηση του tube (5x)
5. Θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
6. Προσθήκη 150 ul Buffer III και ήπια ανακίνηση του tube (5x)
7. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο (4 °C) για 5 λεπτά
8. Φυγοκέντρηση max rpm, 4 °C για 15 min
9. Απομόνωση υπερκείμενου σε νέο tube
10. Προσθήκη 1ml EtOH 100% και ήπια ανακίνηση του tube (5x)
11. Τοποθέτηση δειγμάτων στους -80 °C για 20 λεπτά
12. Φυγοκέντρηση max rpm, 4 °C για 30 min και απόρριψη υπερκείμενου
13. Προσθήκη 500 ul 70% EtOH
14. Φυγοκέντρηση max rpm, 4 °C για 5 min και αφαίρεση υπερκείμενου προσεκτικά
15. Airdrying της πελλέτας για 10-15min σε θερμοκρασία δωματίου
16. Επαναδιάλυση σε 100 ul WFI
17. Drybath στους 65 °C για 5 min και κάθε 2,5min vortex
18. Αποθήκευση στους -20 °C για μελλοντική χρήση

3.2.1.9 Επιβεβαιωτικές PCR και ηλεκτροφόρηση ηλεκτροφόρηση ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση του προσανατολισμού του ενθέματος

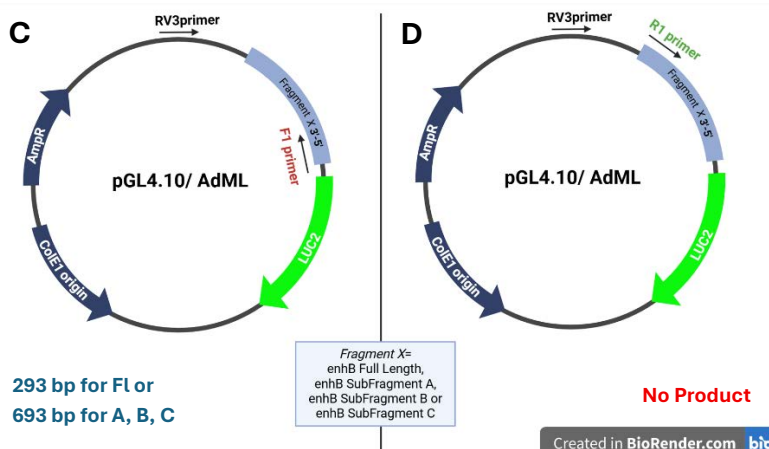
Για την επιβεβαίωση του προσανατολισμού του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών. Το πρώτο ζεύγος αποτελείται από τους εκκινητές F1 και

RV3, ενώ το δεύτερο από τους εκκινητές R1 και RV3. Ο RV3 εκκινητής υβριδοποιείται στον σκελετό (backbone) του πλασμιδίου και χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση ένθεσης.

Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο ανεξάρτητες αντιδράσεις PCR, μία με το κάθε ζεύγος. Στις [Εικόνες 3.9](#) και [3.10](#) απεικονίζονται σχηματικά οι θέσεις υβριδοποίησης του κάθε εκκινητή στο πλασμίδιο. Όπως φαίνεται, στην περίπτωση που το ένθεμα μπει με προσανατολισμό 5'-3' θα λειτουργήσει το ζεύγος RV3/R1 ([Εικόνα 3.9](#), B), ενώ αν εισαχθεί με προσανατολισμό 3'-5' θα λειτουργήσει το ζεύγος F1/RV3 ([Εικόνα 3.10](#), C).



Εικόνα 3.9: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα PGL4.10/ADML μετά την ένθεση της αλληλουχίας του ενισχυτή και οπτικοποίηση των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών για τις επιβεβαιωτικές PCR για τον προσανατολισμό. Α) Ενισχυτής με προσανατολισμό 5'-3', Χρήση του εκκινητή RV3 και του εμπρόσθιου εκκινητή F1, Δεν παράγεται προϊόν. Β) Ενισχυτής με προσανατολισμό 5'-3', Χρήση του εκκινητή RV3 και του οπίσθιου εκκινητή R1, Παράγεται προϊόν.



Εικόνα 1.10: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα PGL4.10/ADML μετά την ένθεση της αλληλουχίας του ενισχυτή και οπτικοποίηση των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών για τις επιβεβαιωτικές PCR για τον προσανατολισμό. Α) Ενισχυτής με προσανατολισμό 3'-5', Χρήση του εκκινητή RV3 και του εμπρόσθιου εκκινητή F1, Παράγεται προϊόν. Β) Ενισχυτής με προσανατολισμό 3'-5', Χρήση του εκκινητή RV3 και του οπίσθιου εκκινητή R1, Δεν παράγεται προϊόν.

Το πρωτόκολλο της PCR που εκτελέστηκε για την παραπάνω επιβεβαίωση παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 3.6: Σύσταση αντίδρασης PCR για επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης του ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα PGL4.10/ADML

Προσανατολισμός 3'-5'		Προσανατολισμός 5'-3'	
<i>mastermix</i>	<i>1x</i>	<i>mastermix</i>	<i>1x</i>
Taq Buffer A 10x	5 ul	Taq Buffer A 10x	5 ul
dNTPs	0,5 ul	dNTPs	0,5 ul
F primer	1 ul	R primer	1 ul
RV3 primer	1 ul	RV3 primer	1 ul
TaqPol (5U/ul)	0,15 ul	TaqPol (5U/ul)	0,15 ul
WFI	41,35 ul	WFI	41,35 ul
Template (10ng/ul)	1 ul	Template (10ng/ul)	1 ul
V_{FIN}	50 ul	V_{FIN}	50 ul

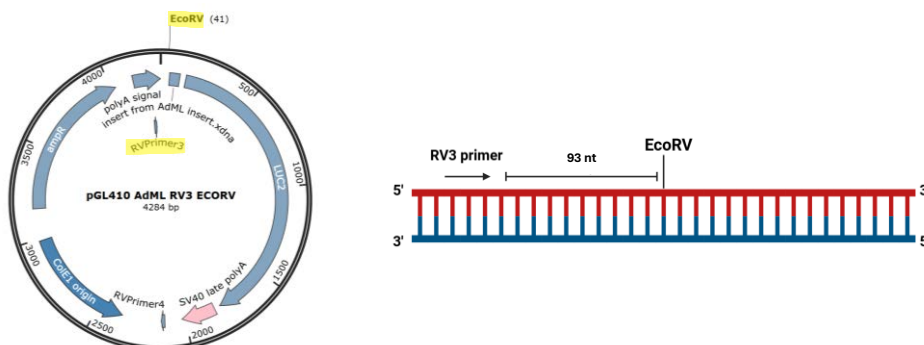
Οι συνθήκες αντίδρασης για τις παραπάνω PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8, χωριστά για την ενίσχυση των τμημάτων μήκους 200bp και 600bp.

Πίνακας 3.7: Συνθήκες αντίδρασης PCR για επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης του ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα PGL4.10/ADML για το μήκος 200 βάσεων και των 600 βάσεων

200bp		600bp	
Πρόγραμμα PCR		Πρόγραμμα PCR	
95 °C	3 min	95 °C	3 min
98 °C	45 sec	98 °C	45 sec
60 °C	10 sec	60 °C	10 sec
72 °C	15 sec	72 °C	20 sec
72 °C	5 min	72 °C	5 min
25 κύκλοι		25 κύκλοι	

Αφού ολοκληρώθηκε η PCR, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αгарόζης 1% σε 150V για 45 λεπτά για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος.

Οι ζώνες που αναμένεται να παρατηρηθούν αντιστοιχούν στις 293 βάσεις κατά την ενίσχυση τμήματος 200 βάσεων και στις 693 βάσεις, κατά την ενίσχυση τμήματος 600 βάσεων. Η προσθήκη των 93 βάσεων οφείλεται στην απόσταση της θέσης υβριδοποίησης του εκκινητή RV3 από την θέση κλωνοποίησης του τμήματος (EcoRV) (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11: Σχηματική απεικόνιση της θέσης υβριδοποίησης του εκκινητή RV3 και της απόστασης της θέσης αυτής από τη θέση πέψης από το περιοριστικό ένζυμο EcoRV

Μετά την επιβεβαίωση του προσανατολισμού ακολούθησε ανακαλλιέργεια των επιθυμητών minis σε 3 ml θρεπτικό LB, για να γίνει αποθήκευση βακτηριακού αποθέματος σε γλυκερόλη και παράλληλα απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση εμπορικών μεθόδων (πιο καθαρό προϊόν). Τα 3 ml καλλιέργειας επώαστηκαν στους 37 °C/160rpm για 16h περίπου.

3.2.2 Δοκιμές Λουσιφεράσης (Dual-Luciferase Reporter Assay System) για τον προσδιορισμό ενεργότητας του ενισχυτή B και των τριών επιμέρους τμημάτων του

Μετά την απομόνωση των πλασμιδίων με εμπορικές μεθόδους (Macherau Nagel plasmid per kit), ακολουθεί η διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS με τα πλασμίδια ώστε να γίνει ο προσδιορισμός ενεργότητας των πιθανών ρυθμιστικών αλληλουχιών.

3.2.2.1 Πρωτόκολλο διαμόλυνσης γαστρικών κυττάρων AGS με πλασμίδια που φέρουν αλληλουχίες πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων

Κάθε πηγάδι περιείχε 200ng πλασμιδίου με την υπό διερεύνηση ρυθμιστική αλληλουχία και το γονίδιο της λουσιφεράσης Firefly και 20 ng πλασμιδίου με το γονίδιο της λουσιφεράσης Renilla.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάμειξη των δύο πλασμιδίων και προσθήκη 57 ul RPMI για κάθε πηγάδι στο μείγμα των πλασμιδίων. Παράλληλα, σε ένα άλλο 1,5 ml Eppendorf Tube γίνεται ανάμειξη 63 ul RPMI για κάθε πηγάδι με 0,85 ul (850 ng) λιποφιλικού παράγοντα P-PEI. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός των πλασμιδίων σε λιποσωμάτια και στη συνέχεια επώαση για τουλάχιστον 20 ώρες στους 37 °C/ 5% CO₂.

3.2.2.2 Λύση των καρκινικών κυττάρων και μέτρηση της ενεργότητας των πιθανών ρυθμιστικών αλληλουχιών με δοκιμασία λουσιφεράσης

Την τρίτη ημέρα πραγματοποιείται η λύση των καρκινικών κυττάρων για να είναι δυνατή η εκτίμηση της ενεργότητας των πιθανών ρυθμιστικών αλληλουχιών. Οι μετρήσεις έγιναν με χρήση του λουμινομέτρου Lumat3 (LB 9508) της Berthold Technologies και του λογισμικού Instrument Control and Evaluation (ICE).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Excel και μέσω του λογισμικού της R (R Studio, έκδοση R 3.4.4 for Windows). Η τιμή της λουσιφεράσης Firefly κάθε δείγματος διαιρέθηκε με την αντίστοιχη τιμή της λουσιφεράσης Renilla. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών τιμών και η τυπική απόκλιση (Standard Deviation). Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με ιστογράμματα και έγινε εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας τους με t-test.

3.2.3 Αποσιώπηση του ενισχυτή B μέσω συστήματος CRISPR/nCas9

3.2.3.1 Υβριδοποίηση των sgRNA

Ο νοηματικός (sense) και ο αντινοηματικός (antisense) κλώνος των δύο sgRNA (μήκους 21nt) διατίθενται σε μονόκλωνη μορφή σε ξεχωριστά vials. Επομένως, είναι απαραίτητη η υβριδοποίηση των 2 κλώνων. Συγκεκριμένα, σε 1,5 ml Eppendorf tube προστέθηκε:

Πίνακας 3.8: Σύσταση αντίδρασης υβριδοποίησης του sense και antisense κλώνου των sgRNA

Αντιδραστήρια	1x
sgRNA sense	2 ul
sgRNA antisense	2 ul
Annealing Buffer	96 ul
V _{ΤΕΛΙΚΟΣ}	100 ul

Έπειτα, το παραπάνω tube προστίθεται σε floater και μέσα σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο περιέχει νερό που βράζει, για 5 λεπτά. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, απομακρύνεται το ποτήρι ζέσεως από την εστία και παραμένει στον πάγκο μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία 40 °C. Στην συνέχεια είναι έτοιμο για χρήση ή αποθήκευση στους -20 °C.

Μετά την υβριδοποίηση, τα sgRNA διαθέτουν μονόκλωνα άκρα τα οποία είναι συμβατά για κλωνοποίηση σε φορέα AIO στον οποίο έχει γίνει πέψη με το ένζυμο περιορισμού BsaI.

3.2.3.2 Κλωνοποίηση του sgRNA1 στον φορέα AIO

Το sgRNA1 εισήχθη στον φορέα AIO σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση λιγάσης:

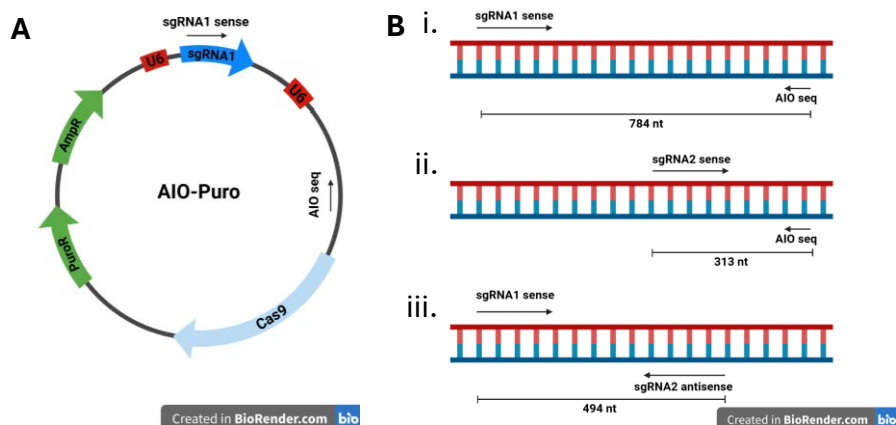
Πίνακας 3.9: Σύσταση αντίδρασης λιγάσης για ένθεση sgRNA στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro

Αντιδραστήρια	1x	1x
Buffer T4 ligase 10x (NEB)	1ul	1 ul
Vector (AIO-puro BsaI digested)	50ng	1 ul
Insert (sgRNA1)	50ng	4 ul
WFI	Up to 10ul	3,5 ul
Ligase T4 DNA MINO(EnzyQuest)	0,5 ul	0,5 ul
V _{ΤΕΛΙΚΟΣ}	10ul	10ul

Στη συνέχεια, ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli στελέχους DH5a, με το ίδιο πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην [υποενότητα 3.2.1.6](#). Ακολούθησε διαλογή αποικιών ([υποενότητα 3.2.1.7](#)) και απομόνωση πλασμιδίου ([υποενότητα 3.2.1.8](#)).

3.2.3.3 Επιβεβαιωτικές PCR και ηλεκτροφόρηση ηλεκτροφόρηση ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση μετασχηματισμού των βακτηρίων για το sgRNA1 και διαλογή θετικού κλώνου

Η επιβεβαίωση ένθεσης του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε με την χρήση του sense sgRNA1 ως εμπρόσθιο εκκινητή και της αλληλουχίας AIO seq, που υβριδοποιείται πάνω στο AIO πλασμίδιο και λειτουργεί ως οπίσθιος εκκινητής. Οι θέσεις που υβριδοποιούνται οι εκκινητές στο πλασμίδιο και το αναμενόμενο μήκος παρουσιάζονται στην [Εικόνα 3.17A](#) και [Εικόνα 3.17B](#) αντίστοιχα.



Εικόνα 3.17: Α) Σχηματική απεικόνιση του φορέα AIO-puro μετά την ένθεση του sgRNA1. Στο πλασμίδιο φαίνονται οι θέσεις υβριδοποίησης του ζεύγους εκκινητών AIO seq και sgRNA1 sense. Β) Αναμενόμενα μήκη από το προϊόν κάθε ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Μαζί με τα δείγματα, στην αντίδραση της PCR φορτώθηκαν και δύο μάρτυρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο AIO στο οποίο είχε γίνει ένθεση ενός sgRNA1 από προηγούμενα πειράματα και ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο AIO χωρίς ένθεμα. Το πρωτόκολλο της PCR που εκτελέστηκε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.10: Σύσταση αντίδρασης και συνθήκες PCR για εξακρίβωση ένθεσης του sgRNA1

Αντιδραστήρια	Ix	Πρόγραμμα PCR	
Taq Buffer A 10x	3 ul	95 °C	3 min
dNTPs	0,5 ul	98 °C	45 sec
sgRNA1 sense	1 ul	60 °C	10 sec
AIO_seq primer	1 ul	72 °C	30 sec
TaqPol (5U/ul)	0,15 ul	72 °C	5 min
WFI	22,35 ul	25 κύκλοι	
Template (10ng)	2 ul		
ΥΠΕΛΙΚΟΣ	30 ul		

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε 120V για 1 ώρα. Η ζώνη που αναμένεται να φανεί στο πήκτωμα αντιστοιχεί στα 784 nt, σύμφωνα με την Εικόνα 3.17i.

Μετά την επιβεβαίωση ένθεσης ακολούθησε ανακαλλιέργεια του θετικού κλώνου σε 3 ml θρεπτικό LB, για να γίνει αποθήκευση βακτηριακού αποθέματος σε γλυκερόλη και παράλληλα απομόνωση του πλασμιδίου με εμπορικές μεθόδους. Τα 3 ml καλλιέργειας επωάστηκαν στους 37°C/160rpm για 16h περίπου.

3.2.3.4 Κλωνοποίηση του sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro

Μετά την απομόνωση πλασμιδίου που φέρει το sgRNA1, ακολούθησε πέψη για να είναι δυνατή η ένθεση του sgRNA2. Η αντίδραση πέψης συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.11: Αντίδραση Πέψης του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro που φέρει το sgRNA1 με το ένζυμο BsaI

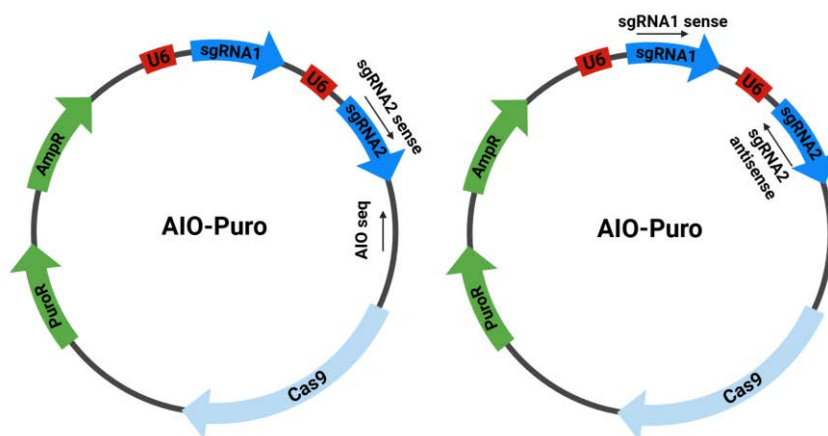
Αντιδραστήρια	Ix	Ix
3.1 Buffer 10x(NEB)	5 ul	5 ul
BsaI enzyme	6 ul	6 ul
Plasmid	1500 ng	3 ul
WFI	Up to 50 ul	37 ul
ΥΤΕΛΙΚΟΣ	50 ul	50 ul

Στην αντίδραση πέψης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού BsaI και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 4 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια, το προϊόν της αντίδρασης φορτώθηκε σε 1% πήκτωμα αгарόζης, το οποίο ηλεκτροφορήθηκε σε 130V για 40 λεπτά και ακολούθησε απομόνωση της επιθυμητής μπάνας από το πήκτωμα αгарόζης με εμπορικές μεθόδους, σύμφωνα με το πρωτόκολλο ([Υποενότητα 3.2.1.1-3.2.1.8](#)).

Μετά την απομόνωση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου, ακολούθησε αντίδραση λιγάσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο που εκτελέστηκε για την ένθεση του sgRNA1 στην [υποενότητα 3.2.3.2](#). Κατόπιν, έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli του στελέχους DH5a με το προϊόν λιγάσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της [υποενότητας 3.2.1.6](#). Ακολούθησε διαλογή αποικιών ([υποενότητα 3.2.1.7](#)) και μη εμπορική απομόνωση πλασμιδίου ([υποενότητα 3.2.1.8](#)).

3.2.3.5 Επιβεβαιωτικές PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης για επιβεβαίωση μετασχηματισμού των βακτηρίων για το sgRNA2 και διαλογή θετικού κλώνου

Η επιβεβαίωση ένθεσης του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε με την χρήση του πρόσθιου sgRNA2 ως εμπρόσθιο εκκινητή και του AIO seq, που υβριδοποιείται πάνω στο AIO πλασμίδιο, ως οπίσθιο εκκινητή. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μια ακόμη PCR επιβεβαίωσης με την πρόσθια sgRNA1 αλληλουχίας ως εμπρόσθιο εκκινητή και την ανάστροφη sgRNA2 αλληλουχία ως οπίσθιο εκκινητή. Οι θέσεις που υβριδοποιούνται οι εκκινητές στο πλασμίδιο και τα αναμενόμενα μήκη παρουσιάζονται στην [Εικόνα 18](#) και στην [Εικόνα 3.17Bii,iii](#) αντίστοιχα.



Created in BioRender.com bio

Εικόνα 3.18: Σχηματική απεικόνιση του φορέα AIO-puro μετά την ένθεση του sgRNA1 και του sgRNA2. Στο πλασμίδιο φαίνονται οι θέσεις υβριδοποίησης των δύο ζευγών εκκινητών: AIO seq και sgRNA2 sense (αριστερά) και sgRNA1 sense και sgRNA2 antisense (δεξιά)

Μαζί με τα δείγματα, στην αντίδραση της PCR φορτώθηκαν και τρεις μάρτυρες. Ως πρώτος θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο AIO στο οποίο είχε γίνει ένθεση του sgRNA1 και του sgRNA2 από προηγούμενα πειράματα, ως δεύτερος θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο το οποίο έφερε μόνο το sgRNA1 (επιβεβαίωση ένθεσης sgRNA1) και ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο AIO χωρίς ένθεμα. Το πρωτόκολλο της PCR που εκτελέστηκε είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τις επιβεβαιωτικές PCR του sgRNA1 και παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.12: Σύσταση αντίδρασης και συνθήκες PCR για εξακρίβωση ένθεσης του sgRNA2 και για εξακρίβωση ένθεσης και των 2 sgRNA ταυτόχρονα

Αντιδραστήρια	Ix	Αντιδραστήρια	Ix	Πρόγραμμα PCR	
Taq Buffer A 10x	3 ul	Taq Buffer A 10x	3 ul		
dNTPs	0,5 ul	dNTPs	0,5 ul	95 °C	3 min
sgRNA2 sense	1 ul	sgRNA1 sense	1 ul	98 °C	45 sec
AIO_seq primer	1 ul	sgRNA2 antisense	1 ul	60 °C	10 sec
TaqPol (5U/ul)	0,15 ul	TaqPol (5U/ul)	0,15 ul	72 °C	30 sec
WFI	22,35 ul	WFI	22,35 ul	72 °C	5 min
Template (10ng)	2 ul	Template (10ng)	2 ul	25 κύκλοι	
ΥΤΕΛΙΚΟΣ	30 ul	ΥΤΕΛΙΚΟΣ	30 ul		

Αφού τελείωσε η παραπάνω αντίδραση, τα προϊόντα της ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% σε 130V για 45 λεπτά. Οι ζώνες που αναμένεται να φανούν στο πήκτωμα αντιστοιχούν στα 314 nt, και στα 494 nt, σύμφωνα με την [Εικόνα 3.17Bii](#) και την [Εικόνα 3.17Biii](#) αντίστοιχα.

Μετά την επιβεβαίωση ένθεσης ακολούθησε ανακαλλιέργεια του θετικού κλώνου σε 3 ml θρεπτικό LB, για να γίνει αποθήκευση βακτηριακού αποθέματος σε γλυκερόλη και παράλληλα εμπορική απομόνωση του πλασμιδίου. Τα 3 ml καλλιέργειας επώαστηκαν στους 37 °C/160rpm για 16h περίπου.

Το πλασμίδιο που απομονώθηκε με χρήση εμπορικών μεθόδων θα χρησιμοποιηθεί για διαμόλυνση κυττάρων AGS, με στόχο την επαγωγή του συστήματος CRISPR-nCas9 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα.

3.2.3.6 Γραμμοποίηση του φορέα και διαμόλυνση κυττάρων AGS

Για να είναι δυνατή η ένθεση της πλασμιδιακής κατασκευής AIO-puro που φέρει τα δύο sgRNA στο γονιδίωμα των κυττάρων που θα διαμολυνθούν, πρέπει να προηγηθεί η γραμμοποίηση της. Η πέψη πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο PvuI που κόβει μέσα στη θέση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων και δεν είναι πλέον απαραίτητο. Η πέψη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.13: Σύσταση αντίδρασης πέψης πλασμιδιακού φορέα AIO-puro που φέρει τα 2 sgRNA

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ix</i>
AIO puro με sgRNA1 και sgRNA2	6,5 ul
NEB 3.1 Buffer 10x	4 ul
PvuI (NEB)	2 ul
WFI	27,5 ul
ΥΤΕΛΙΚΟΣ	40 ul

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 4 ώρες.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 1% και καθαρίστηκε με το πρωτόκολλο καθαρισμού φαινόλης - χλωροφόρμιου της [υποενότητας 3.2.1.4](#). Μετά τον καθαρισμό του, ο γραμμοποιημένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων.

3.2.3.7 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από γαστρικά καρκινικά κύτταρα έπειτα από διαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro και διαγνωστικές PCR

Μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων, σχηματίστηκαν μεμονωμένες αποικίες, οι οποίες απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε νέα πιάτα 6-θέσεων. Συνολικά, έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από 20 κλώνους.

Η διαδικασία απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA περιγράφεται παρακάτω:

1. Αφαίρεση θρεπτικού από κάθε πηγάδι του πιάτου 6-θέσεων
2. Προσθήκη 400 ul διάλυμα λύσης σε κάθε πηγάδι
3. Προσθήκη 400 ul Φαινόλης-Χλωροφορμίου-Ισοαμυλικής αλκοόλης σε κάθε πηγάδι και άμεση λήψη του συνολικού όγκου του υπερκείμενου από το πηγάδι
4. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο 1,5ml Eppendorf tube και vortex
5. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, σε max rpm, στους 4 °C
6. Λήψη υδατικής φάσης και μεταφορά σε νέο 1,5ml Eppendorf tube
7. Προσθήκη 40 ul Οξικού Νατρίου 3M, 2ul Γλυκογόνου, 1ml 100% Αιθανόλης
8. -80 °C για τουλάχιστον 1 ώρα
9. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, σε max rpm, στους 4 °C και απόρριψη υπερκείμενου
10. Προσθήκη 500ul 70% Αιθανόλης
11. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, σε max rpm, στους 4 °C και αφαίρεση υπερκείμενου χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα
12. Airdrying για 20 λεπτά στον πάγκο
13. Προσθήκη 50 ul WFI
14. Θέρμανση σε drybath 65 °C για 5min και vortex ανά 2,5min.
15. Μέτρηση συγκέντρωσης του δείγματος στο Nanodrop και αποθήκευση στους -20 °C για μελλοντική χρήση

Μετά την απομόνωση του δείγματος, ακολούθησε κατεργασία του DNA με RNAάση:

1. Προσθήκη 1,5 ul RNAάσης A σε κάθε δείγμα
2. Επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά

Έπειτα, στο δείγμα απαλλαγμένο από RNA, έγινε καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της [υποενότητας 3.2.1.4](#).

Για την εξακρίβωση της δράσης του συστήματος CRISPR/nCas9 πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές PCR στο σημείο εκτομής. Για τις διαγνωστικές PCR χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Το πρώτο ζεύγος αποτελείται από τον εμπρόσθιο και τον οπίσθιο εκκινητή του ολικού τμήματος του ενισχυτή B, ενώ το δεύτερο ζεύγος αποτελείται από τον εμπρόσθιο και τον οπίσθιο εκκινητή του υποτμήματος B του ενισχυτή B. Η σύσταση και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 3.14: Σύσταση και συνθήκες αντίδρασης επιβεβαιωτικής PCR του πλήρους μήκους του ενισχυτή B για διερεύνηση εκτομής

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ix</i>	<i>Πρόγραμμα PCR</i>	
Taq Buffer A 10x	3 ul	95 °C	5 min
dNTPs	0,5 ul	98 °C	45 sec
CPR2_enhB_FL_F1	1 ul	60 °C	30 sec
CPR2_enhB_FL_R1	1 ul	72 °C	40 sec
TaqPol (5U/ul)	0,25 ul	72 °C	3 min
WFI	22,25 ul	32 κύκλοι	
Δείγμα gDNA	2 ul		
V _{ΤΕΛΙΚΟΣ}	30 ul		

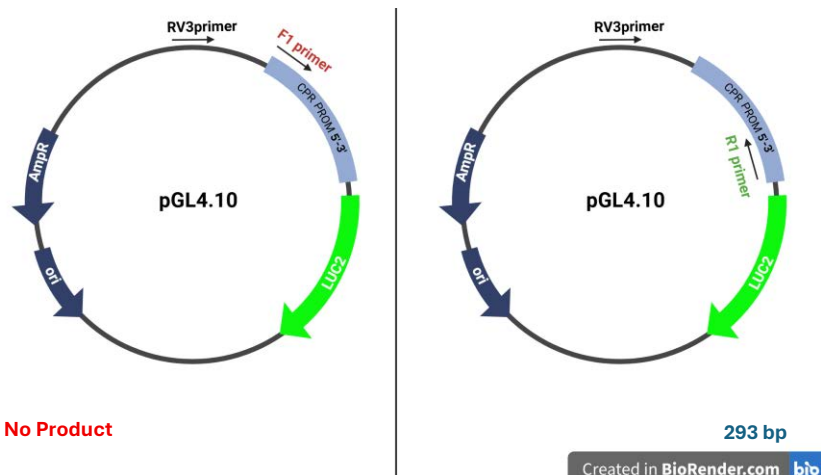
Πίνακας 3.15: Σύσταση και συνθήκες αντίδρασης επιβεβαιωτικής PCR του υποτμήματος B του ενισχυτή B για διερεύνηση εκτομής

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ix</i>	<i>Πρόγραμμα PCR</i>	
Taq Buffer A 10x	3 ul	95 °C	2 min
dNTPs	0,5 ul	98 °C	40 sec
CPR2_enhB_subclonB_F1	1 ul	60 °C	20 sec
CPR2_enhB_subclonB_R1	1 ul	72 °C	25 sec
TaqPol (5U/ul)	0,25 ul	72 °C	3 min
WFI	22,25 ul	38 κύκλοι	
Δείγμα gDNA	2 ul		
V _{ΤΕΛΙΚΟΣ}	30 ul		

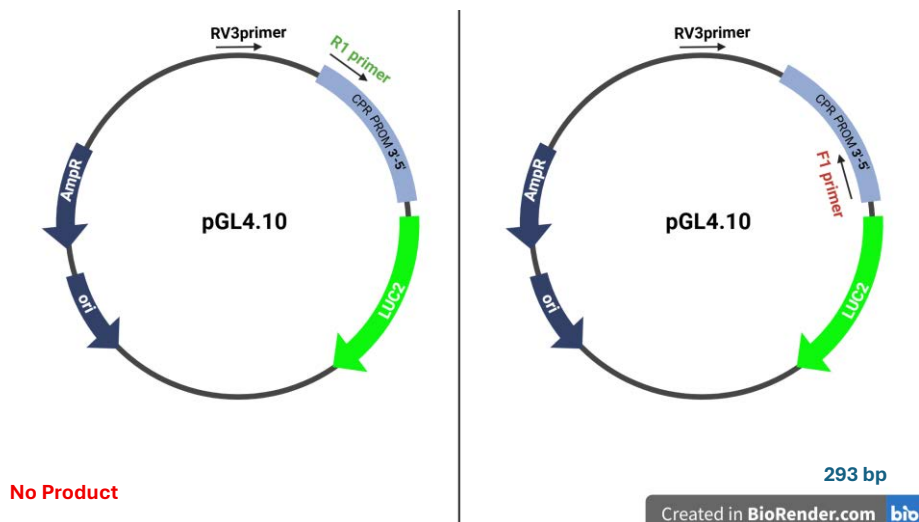
3.2.4 Κλωνοποίηση ενός τμήματος του υποκινητή του γονιδίου CPR2 στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10 και επιβεβαίωση του προσανατολισμού ένθεσης

Για την μελέτη της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου CPR2, η υπό διερεύνηση ρυθμιστική αλληλουχία (200bp) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10. Η διαδικασία περιλάμβανε ενίσχυση και απομόνωση της αλληλουχίας από γονιδιωματικό DNA, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης και εκχύλιση του επιθυμητού τμήματος, φωσφορυλίωση των άκρων του ενθέματος, αντίδραση λιγάσης με τον αποφωσφορυλιωμένο φορέα, μετασχηματισμό βακτηρίων και απομόνωση πλασμιδίου σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρωτόκολλα ([Υποενότητες 3.2.1.1-3.2.1.8](#)).

Η επιτυχής ένθεση και ο προσανατολισμός επαληθεύθηκαν με διαγνωστικές PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών. Ειδικότερα, στις Εικόνες 3.19 και 3.20 παρουσιάζονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση ένθεσης και του προσανατολισμού. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών περιλαμβάνει τον εκκινητή RV3 και τον εμπρόσθιο εκκινητή F1 του υποκινητή του CPR2, το οποίο δεν θα δώσει κάποια ζώνη στον 5'-3' προσανατολισμό, αλλά θα δώσει ζώνη μήκους 293 νουκλεοτιδίων στον 3'-5' προσανατολισμό. Αντίστοιχα, το δεύτερο ζεύγος περιλαμβάνει τον εκκινητή RV3 και τον οπίσθιο εκκινητή R1 του υποκινητή του CPR2, το οποίο δεν θα δώσει κάποια ζώνη στον 3'-5' προσανατολισμό, αλλά θα δώσει ζώνη μήκους 293 νουκλεοτιδίων στον 5'-3' προσανατολισμό.



Εικόνα 3.19: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα PGL4.10 μετά την ένθεση της αλληλουχίας του υποκινητή του CPR2 και οπτικοποίηση των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών για τις επιβεβαιωτικές PCR για τον προσανατολισμό. Α) Υποκινητής με προσανατολισμό 5'-3', Χρήση του εκκινητή RV3 και του εμπρόσθιου εκκινητή F1, Δεν παράγεται προϊόν. Β) Υποκινητής με προσανατολισμό 3'-5', Χρήση του εκκινητή RV3 και του οπίσθιου εκκινητή R1, Παράγεται προϊόν.



Εικόνα 3.20: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα PGL4.10 μετά την ένθεση της αλληλουχίας του υποκινητή του CPR2 και οπτικοποίηση των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών για τις επιβεβαιωτικές PCR για τον προσανατολισμό. Α) Υποκινητής με προσανατολισμό 3'-5', Χρήση του εκκινητή RV3 και του οπίσθιου εκκινητή R1, Δεν παράγεται προϊόν. Β) Υποκινητής με προσανατολισμό 5'-3', Χρήση του εκκινητή RV3 και του εμπρόσθιου εκκινητή F1, Παράγεται προϊόν.

Η σύσταση και οι συνθήκες της PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.16: Σύσταση και συνθήκες αντίδρασης PCR για επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης του υποκινητή του CPR2 στον πλασμιδιακό φορέα PGL4.10

<i>mastermix</i>	<i>Ix</i>	<i>mastermix</i>	<i>Ix</i>	Πρόγραμμα PCR	
Taq Buffer A 10x	3 ul	Taq Buffer A 10x	3 ul	95 °C	3 min
dNTPs	0,5 ul	dNTPs	0,5 ul	95 °C	40 sec
F1 primer	1 ul	R1 primer	1 ul	60 °C	10 sec
RV3 primer	1 ul	RV3 primer	1 ul	72 °C	25 sec
TaqPol (5U/ul)	0,15 ul	TaqPol (5U/ul)	0,15 ul	72 °C	2 min
WFI	23,35 ul	WFI	23,35 ul	33 κύκλοι	
Template	1 ul	Template	1 ul		
V_{FIN}	50 ul	V_{FIN}	50 ul		

Έπειτα, το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης με στόχο την οπτικοποίηση του αποτελέσματος. Ειδικότερα, φορτώθηκε δείγμα 30 ul με 6 ul 6x loading dye σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Μετά την εξακρίβωση προσανατολισμού, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια των θετικών βακτηριακών κλώνων και για τους δύο προσανατολισμούς και στη συνέχεια δημιουργήθηκε βακτηριακό απόθεμα με γλυκερόλη, ενώ πραγματοποιήθηκε ξανά απομόνωση πλασμιδίου με εμπορικές μεθόδους.

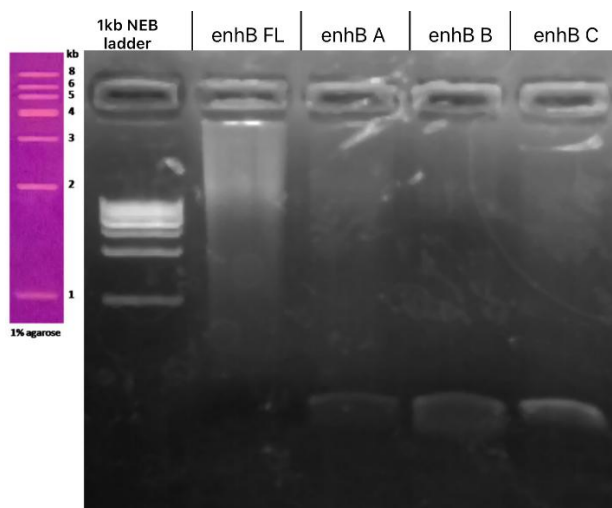
4. Αποτελέσματα

4.1 Ενεργότητα του Ενισχυτή B

Για τη μελέτη της ενεργότητας του Ενισχυτή B στον γαστρικό καρκίνο, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της αλληλουχίας του από γονιδιωματικό DNA και κλωνοποίηση της σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης Firefly. Στη συνέχεια, γαστρικά καρκινικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και αξιολογήθηκε η ενεργότητα του Ενισχυτή B μέσω της μέτρησης της παραγόμενης βιοφωταύγειας (Δοκιμασία Λουσιφεράσης). Παράλληλα, εξετάστηκαν ανεξάρτητα τα τρία επιμέρους τμήματα της αλληλουχίας του ενισχυτή B, προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή καθενός στη συνολική ενεργότητα.

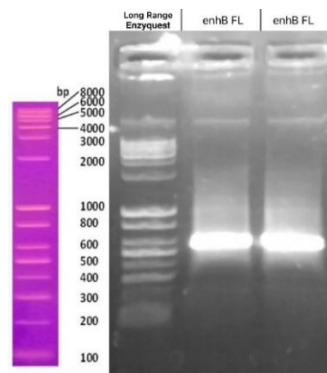
4.1.1 Απομόνωση του Ενισχυτή B και των τριών επιμέρους τμημάτων του από γονιδιωματικό DNA

Η απομόνωση της αλληλουχίας του Ενισχυτή B από γονιδιωματικό DNA πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης PCR με χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Όπως φαίνεται στην [Εικόνα 4.1](#), ενισχύθηκαν αποκλειστικά τα τρία επιμέρους τμήματα του ενισχυτή και όχι η πλήρης αλληλουχία. Συγκεκριμένα, στα τρία επιμέρους τμήματα παρατηρείται ζώνη μεγέθους 200 ζευγών βάσεων.



Εικόνα 4.1: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση ηλεκτώματος αγαρόζης. Απομόνωση του πλήρους τμήματος και των επιμέρους τμημάτων του Ενισχυτή B από γονιδιωματικό DNA. Φορτώθηκαν με σειρά: 1kb NEB ladder, το προϊόν της PCR με ενισχυμένο το πλήρες τμήμα του Ενισχυτή B με αναμενόμενο μήκος 600bp, το προϊόν της PCR με ενισχυμένο το υποτμήμα A του Ενισχυτή B με αναμενόμενο μήκος 200bp, το προϊόν της PCR με ενισχυμένο το υποτμήμα B του Ενισχυτή B με αναμενόμενο μήκος 200bp και το προϊόν της PCR με ενισχυμένο το υποτμήμα C του Ενισχυτή B με αναμενόμενο μήκος 200bp.

Σε δεύτερη προσπάθεια, το πρωτόκολλο της PCR προσαρμόστηκε ώστε να ενισχύονται τμήματα μήκους 600 βάσεων, σε αντίθεση με τις αρχικές συνθήκες των 200 βάσεων. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην [Εικόνα 4.2](#), όπου παρατηρείται σαφής ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος των 600 βάσεων. Για την αύξηση της απόδοσης, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες αντιδράσεις PCR, τα προϊόντα των οποίων στην συνέχεια ενώθηκαν.



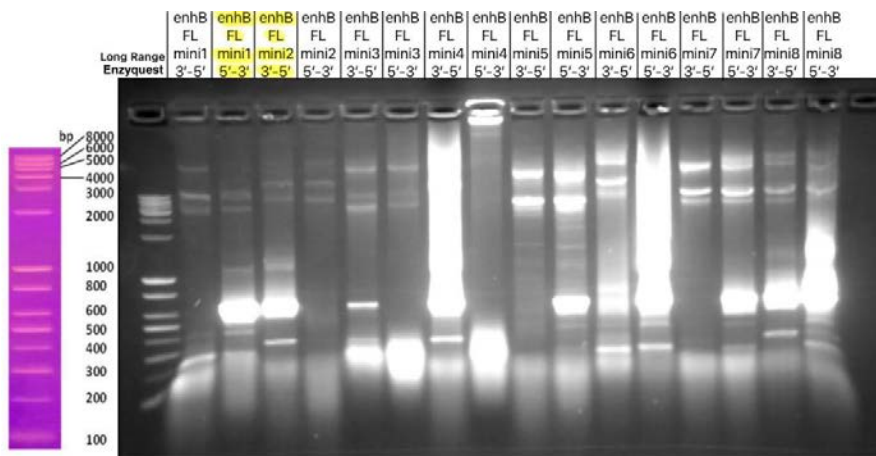
Εικόνα 4.2: : Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Απομόνωση του πλήρους τμήματος του Ενισχυτή B από γονιδιωματικό DNA. Φορτώθηκαν με σειρά: Long Range Enzyquest ladder και από δύο επαναλήψεις του προϊόντος PCR με ενισχυμένο το πλήρες τμήμα του Ενισχυτή B με αναμενόμενο μήκος 600bp.

4.1.2 Επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης του Ενισχυτή B και των επιμέρους τμημάτων του

Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων με πλασμιδιακούς φορείς pGL4.10/AdML που φέρουν το πλήρες τμήμα (FL) και τα υποτμήματα A, B, C του Ενισχυτή B, ακολούθησε επιλογή κλώνων και στη συνέχεια εκτελέστηκαν επιβεβαιωτικές αντιδράσεις PCR για εξακρίβωση του προσανατολισμού ένθεσης των τμημάτων.

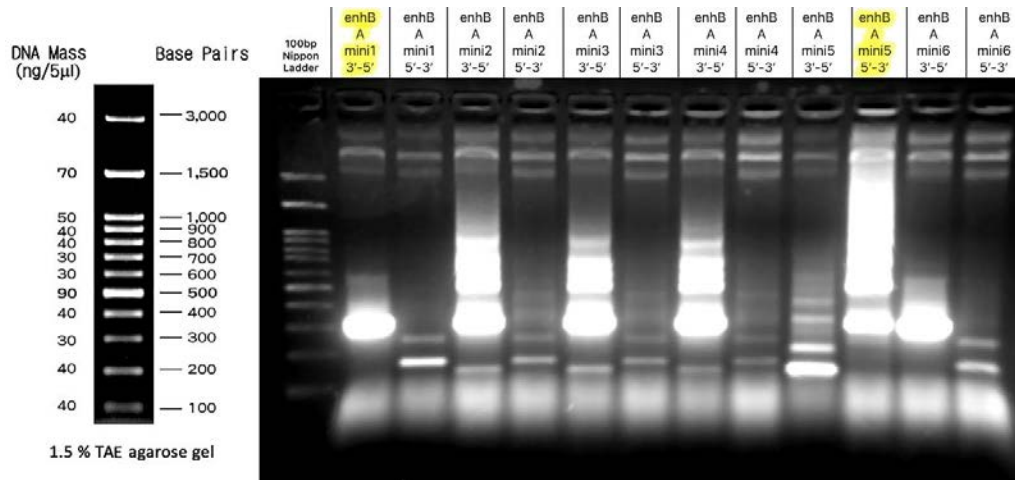
Σε κάθε αντίδραση PCR διερευνάται ο προσανατολισμός του αντίστοιχου ενθέματος. Στις φωτογραφίες των αποτελεσμάτων αναγράφεται το ένθεμα που περιέχει κάθε πλασμίδιο, καθώς και ο εξεταζόμενος προσανατολισμός. Με κίτρινο χρώμα έχουν επισημανθεί οι βακτηριακοί κλώνοι που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανακαλλιέργεια και απομόνωση πλασμιδιακού DNA, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων.

Στην [Εικόνα 4.3](#) παρουσιάζεται φωτογραφία από το πηκτώμα αгарόζης με τα προϊόντα της επιβεβαιωτικής PCR για τα πλήρες τμήμα (FL) του Ενισχυτή B. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι κλώνοι mini1 με προσανατολισμό 5'-3' και mini 2 με προσανατολισμό 3'-5'.

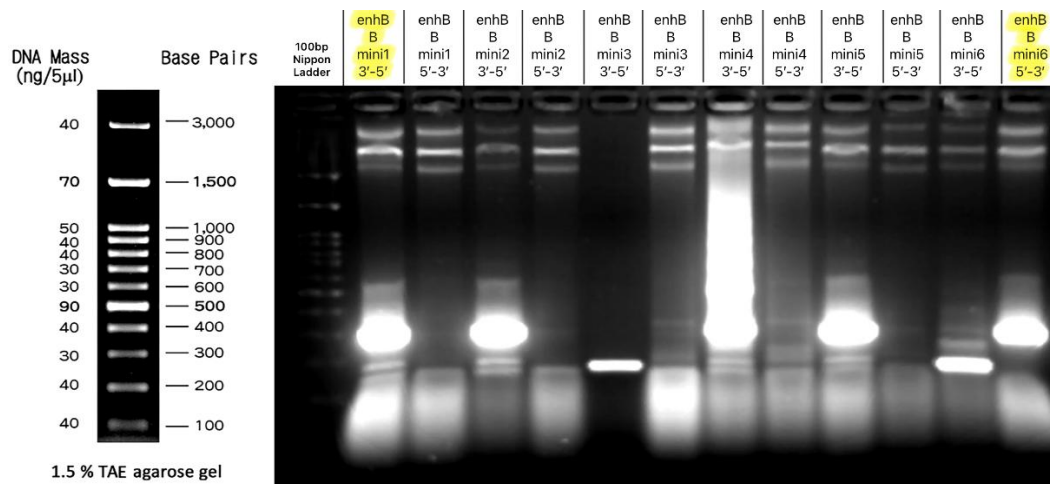


Εικόνα 4.3: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Διερεύνηση προσανατολισμού ενθέματος πλήρους τμήματος του Ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML έπειτα από απομόνωση πλασμιδίου με homemade mini preps. Φορτώθηκαν με σειρά: Long Range Enzyquest ladder και 8 δείγματα υπό εξέταση με αναμενόμενο μήκος 693bp.

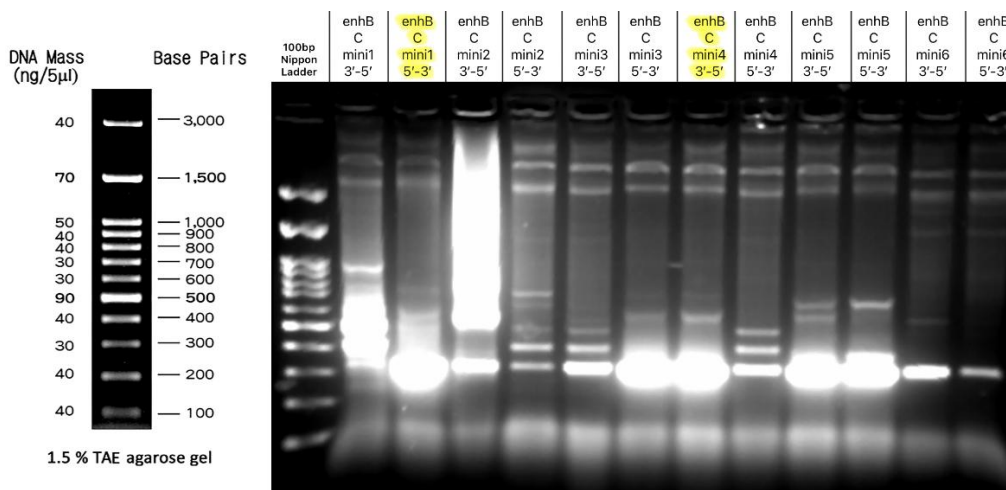
Όσον αφορά τα επιμέρους τμήματα του Ενισχυτή B, τα από την απομόνωση πλασμιδίων, που έφεραν τα υποτμήματα A, B, και C του Ενισχυτή B παρουσιάζονται στις Εικόνες 4.4, 4.5 και 4.6 αντίστοιχα. Με βάση τις αναλύσεις, επιλέχθηκαν οι κλώνοι mini1 (3'-5') και mini 5 (5'-3') για το υποτμήμα A, οι κλώνοι mini1 (3'-5') και mini 6 (5'-3') για το υποτμήμα B και οι κλώνοι mini1 (5'-3') και mini 4 (3'-5') για το υποτμήμα C.



Εικόνα 4.4: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Διερεύνηση προσανατολισμού υποτμήματος A του Ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML έπειτα από απομόνωση πλασμιδίου με homemade mini preps. Φορτώθηκαν με σειρά: Long Range Enzyquest ladder και 6 δείγματα υπό εξέταση με αναμενόμενο μήκος 293bp.

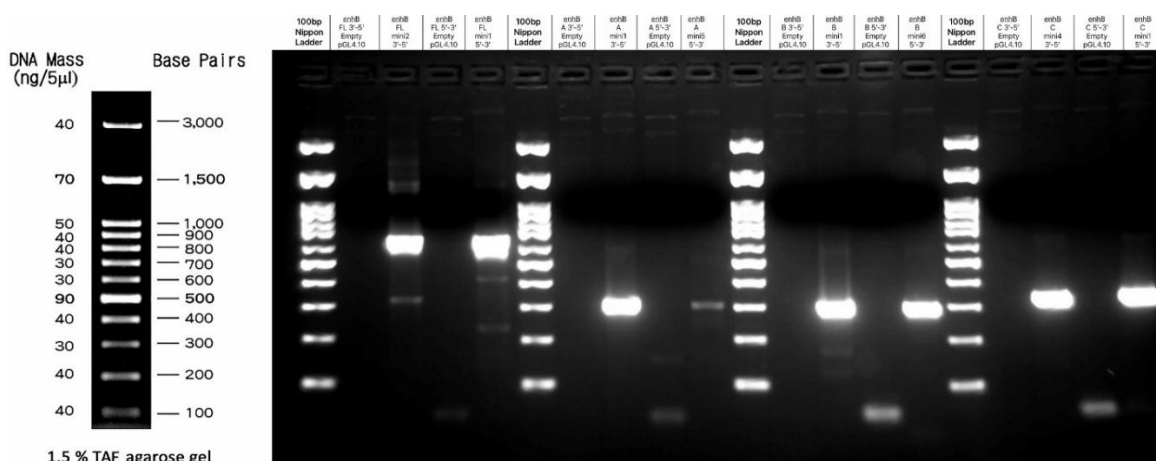


Εικόνα 4.5: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Διερεύνηση προσανατολισμού υποτμήματος B του Ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML έπειτα από απομόνωση πλασμιδίου με homemade mini preps. Φορτώθηκαν με σειρά: Long Range Enzyquest ladder και 6 δείγματα υπό εξέταση με αναμενόμενο μήκος 293bp.



Εικόνα 4.6: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Διερεύνηση προσανατολισμού υποτιμήματος C του Ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML έπειτα από απομόνωση πλασμιδίου με homemade mini preps. Φορτώθηκαν με σειρά: Long Range Enzyquest ladder και 6 δείγματα υπό εξέταση με αναμενόμενο μήκος 293bp.

Ακολούθησε ανακαλλιέργεια των επιλεγμένων κλώνων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε κυκλοποιημένος φορέας pGL4.10 χωρίς ένθεμα. Τα αποτελέσματα της τελικής αντίδρασης PCR παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.7](#).



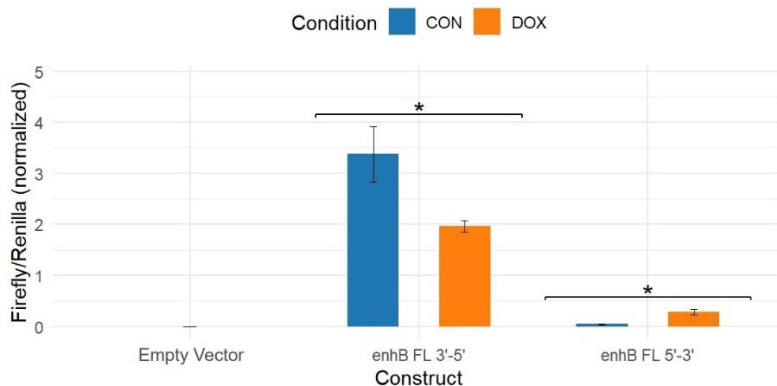
Εικόνα 4.7: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Επιβεβαίωση προσανατολισμού του πλήρους τμήματος (FL) και των υποτιμημάτων A,B,C του Ενισχυτή B στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML έπειτα από απομόνωση πλασμιδίου με commercial kit. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp ladder, αρνητικός μάρτυρας (κενός φορέας pGL4.10), enhB FL mini2 (3'-5'), αρνητικός μάρτυρας, enhB FL mini1 (5'-3'), 100bp ladder, αρνητικός μάρτυρας, enhB A mini1 (3'-5'), αρνητικός μάρτυρας, enhB A mini5 (5'-3'), 100bp ladder, αρνητικός μάρτυρας, enhB B mini1 (3'-5'), αρνητικός μάρτυρας, enhB B mini6 (5'-3'), 100bp ladder, αρνητικός μάρτυρας, enhB B mini4 C (3'-5'), αρνητικός μάρτυρας, enhB C mini1 (5'-3').

4.1.3 Δοκιμασία Λουσιφεράσης για το ολικό τμήμα και τα επιμέρους τμήματα του Ενισχυτή B και με τους δύο προσανατολισμούς

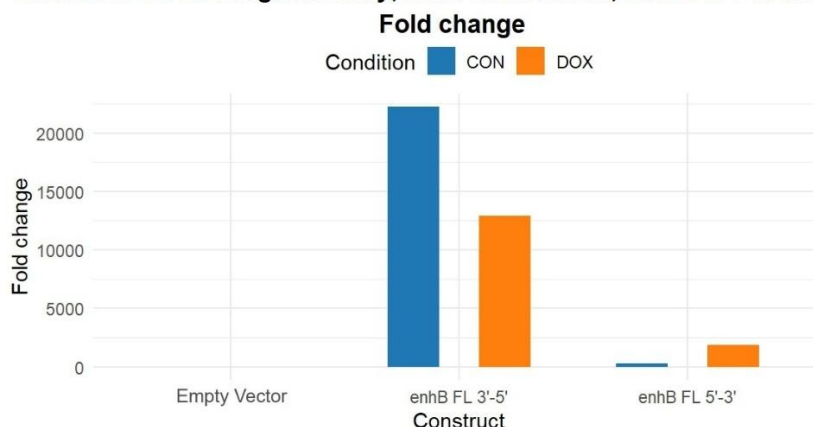
Μετά την κατάλληλη προετοιμασία, οι πλασμιδιακοί φορείς που απομονώθηκαν με το πλήρες τμήμα, καθώς και τα τρία υποτιμήματα του ενισχυτή B χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων.

Στο διάγραμμα της [Εικόνας 4.8A](#), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κανονικοποιημένων μετρήσεων βιοφωταύγειας του πλήρους τμήματος του Ενισχυτή B, ενώ στο διάγραμμα της [Εικόνας 4.8B](#) απεικονίζεται η σχετική αύξηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή τον φορέα pGL4.10/AdML χωρίς ένθεμα (fold change). Επιπρόσθετα, παρουσιάζονται δύο συνθήκες, η συνθήκη CON, όπου το GATA4 μεταγράφο εκφράζεται κανονικά, και η συνθήκη DOX, όπου έχει πραγματοποιηθεί καταστολή του GATA4 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS.

A Enhancer B Full Length Activity, both Orientations, with & w/o GATA4



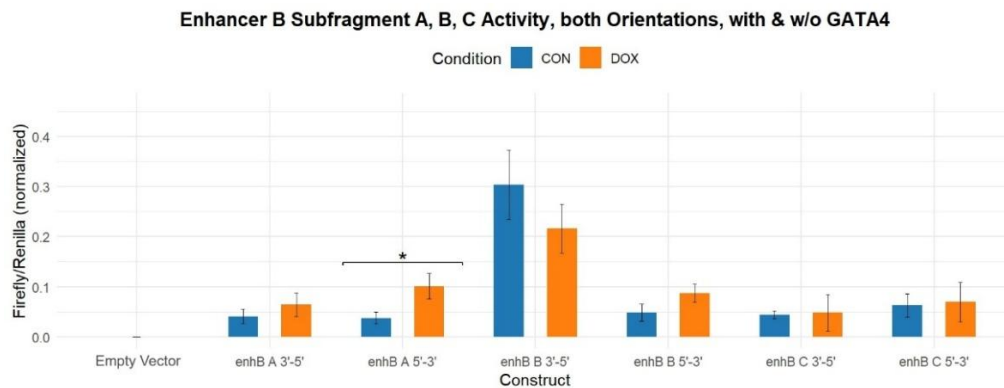
B Enhancer B Full Length Activity, both Orientations, with & w/o GATA4



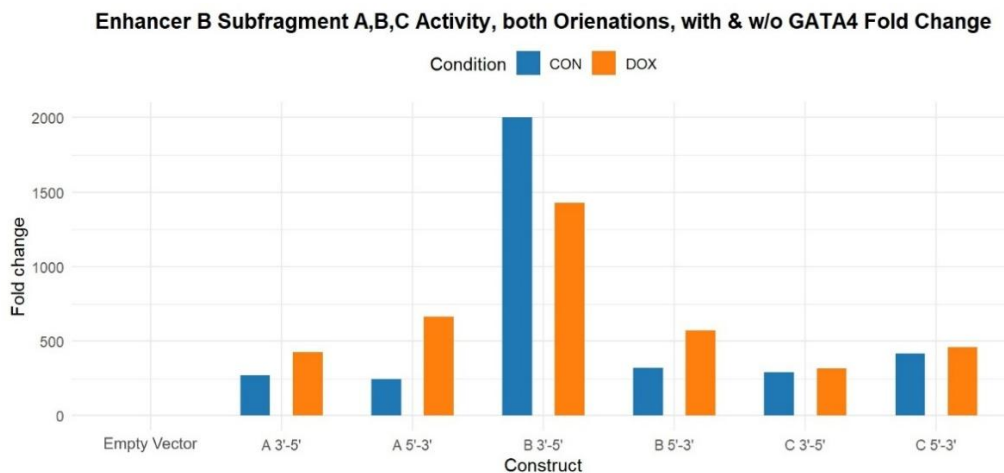
Εικόνα 4.8: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το πλήρες τμήμα του Ενισχυτή B και για τους δύο προσανατολισμούς ένθεσης, παρουσία και απουσία του GATA4. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα AGTR-G4. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα AGTR-G4C (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι i) η υποψήφια αλληλουχία του ενισχυτή B είναι πράγματι ενεργή σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS, ii) ο προσανατολισμός 3'-5' εμφανίζει υψηλότερη ενεργότητα, και συγκεκριμένα 22000 φορές μεγαλύτερη από τον άδειο φορέα (fold change), σε σύγκριση με τον προσανατολισμό 5'-3', ο οποίος εμφανίζει εύρος απόκλισης 300, και iii) η παρουσία του GATA4 ασκεί ενισχυτική επίδραση στη δραστηριότητά του Ενισχυτή B. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της [Εικόνας 4.8](#), παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση κατά 1,7 φορές της ενεργότητας του Ενισχυτή B κατά τη σίγηση του GATA4, αναδεικνύοντας έτσι τον ρόλο του GATA4 ως μεταγραφικού ενεργοποιητή για τον συγκεκριμένο ενισχυτή.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και μέτρηση βιοφωταύγειας των τριών επιμέρους υποτιμημάτων του Ενισχυτή B. Τα αποτελέσματα κανονικοποιημένων τιμών λουσιφεράσης με τιμές σφάλματος απεικονίζονται στο διάγραμμα της [Εικόνας 4.9](#), ενώ οι τιμές σχετικής δραστηρότητας λουσιφεράσης σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα παρουσιάζονται στο διάγραμμα της [Εικόνας 4.10](#).



Εικόνα 4.9: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για τα τρία υποτιμήματα του Ενισχυτή B και για τους δύο προσανατολισμούς ένθεσης, παρουσία και απουσία του GATA4. Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηρότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα AGTR-G4.

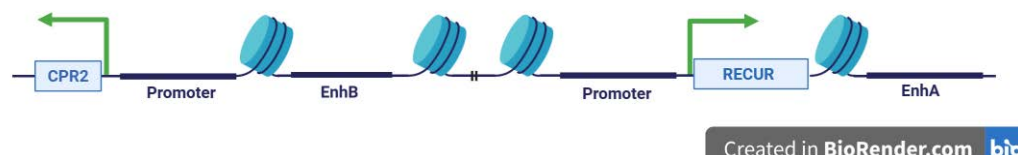


Εικόνα 4.10: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για τα τρία υποτιμήματα του Ενισχυτή B και για τους δύο προσανατολισμούς ένθεσης, παρουσία και απουσία του GATA4. Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηρότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα AGTR-G4 (Σχετική δραστηρότητα, Fold Change).

Όσον αφορά τα τρία επιμέρους υποτιμήματα, το B παρουσιάζει την υψηλότερη ενεργότητα, κατά 2000 φορές σε σχέση με τον άδειο φορέα και σε σύγκριση με τα άλλα υποτιμήματα που εμφανίζουν απόκλιση κάτω από 500, υποδηλώνοντας ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία περιλαμβάνει τα βασικά λειτουργικά στοιχεία της δράσης του ενισχυτή. Παρά την μείωση της ενεργότητας του υποτιμήματος B κατά τη σίγηση του GATA4, η μεταβολή αυτή δεν αναδείχθηκε στατιστικώς σημαντική λόγω παραλλακτικότητας των επαναλήψεων. Αντιθέτως, για το υποτιμήμα A στον προσανατολισμό 5'-3' καταγράφηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά κατά την σίγηση του GATA4.

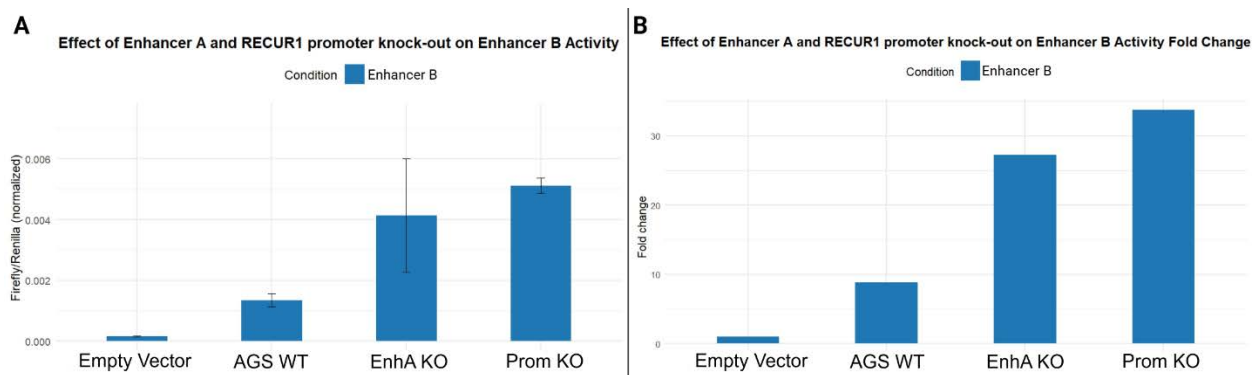
4.1.4 Δοκιμασία Λουσιφεράσης για το ολικό τμήμα και τα επιμέρους τμήματα του Ενισχυτή B για την συσχέτιση με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία

Μετά την επιβεβαίωση του ενεργού προσανατολισμού του Ενισχυτή B, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με στόχο τη διερεύνηση των *in vitro* μεταβολών της ενεργότητάς του σε σχέση τα λοιπά ρυθμιστικά στοιχεία που έχουν προηγουμένως ανακαλυφθεί ότι ρυθμίζουν τον άξονα RECUR1-CPR2. Για την καλύτερη κατανόηση του υπό μελέτη συστήματος, η εξεταζόμενη περιοχή παρουσιάζεται στην [Εικόνα 4.11](#).

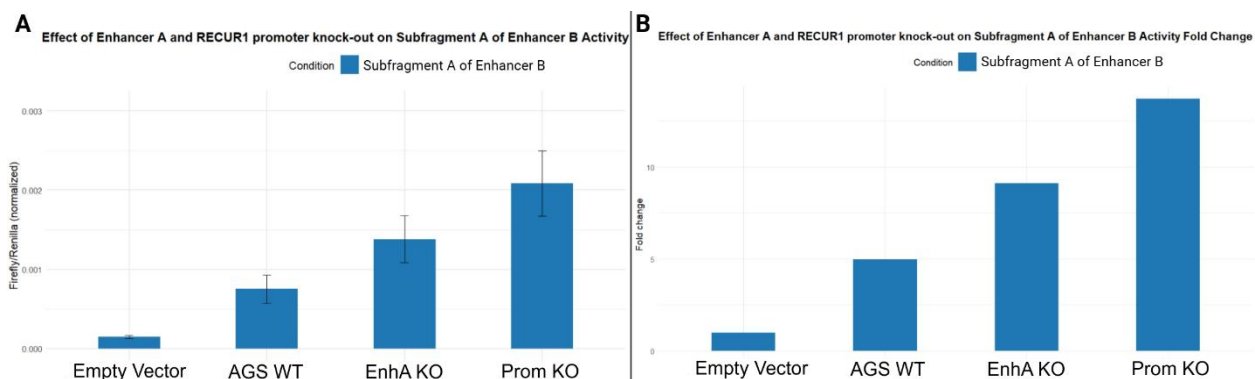


Εικόνα 4.11: Γονιδιωματικός άξονας της υπό μελέτη ρυθμιστικής περιοχής, μήκους περίπου 40kb. Από αριστερά προς δεξιά απεικονίζονται: το κωδικοποιητικό γονίδιο CPR2, ο υποκινητής του CPR2, ο Ενισχυτής B, ο Υποκινητής του RECUR1, το γονίδιο του lncRNA RECUR1 και ο Ενισχυτής A

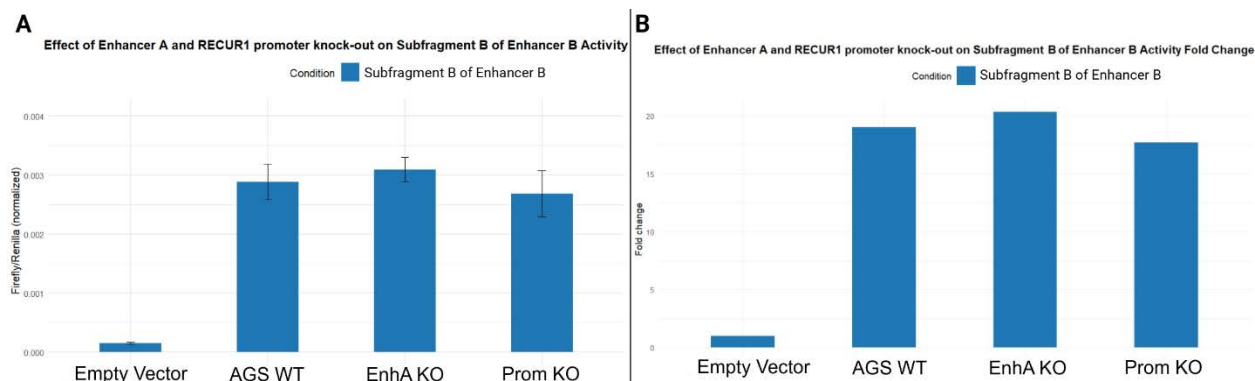
Για τη διασαφήνιση των πιθανών λειτουργικών μεταβολών των παραπάνω ρυθμιστικών αλληλουχιών, αρχικά μελετήθηκε τόσο το πλήρες τμήμα του Ενισχυτή B, όσο και τα τρία υποτμήματα του σε κυτταρικές σειρές γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS στις οποίες έχει κατασταλεί η έκφραση (Knock Out) είτε του Ενισχυτή A, είτε του Υποκινητή του RECUR1 μέσω απαλοιφής με ντο σύστημα CRISPR/nCas9. Τα διαγράμματα με τα αποτελέσματα για το πλήρες τμήμα, για το υποτμήμα A, για το υποτμήμα B και για το υποτμήμα C του Ενισχυτή B παρατίθενται στις Εικόνες [4.12](#), [4.13](#), [4.14](#) και [4.15](#) αντίστοιχα. Στα διαγράμματα A παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη δραστικότητα της λουσιφεράσης, ενώ στα διαγράμματα B απεικονίζονται οι κανονικοποιημένες τιμές δραστικότητας λουσιφεράσης σε σύγκριση με αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή άδειο φορέα pGL4.10/AdML.



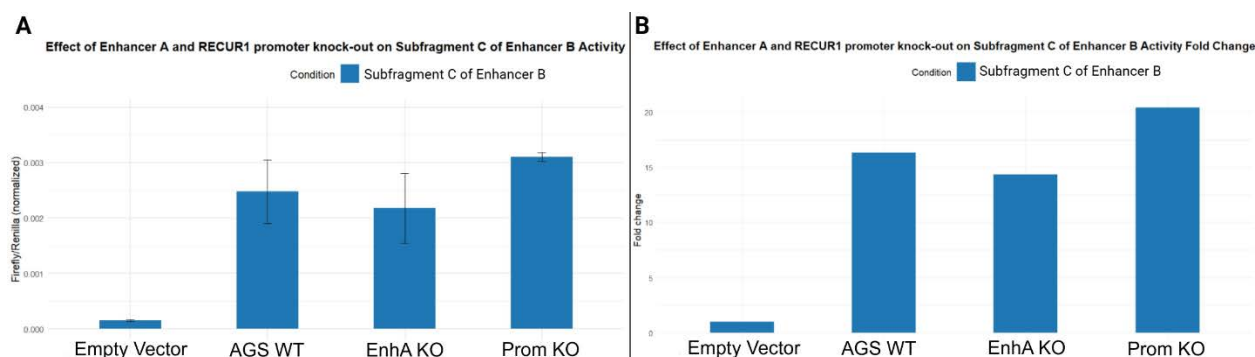
Εικόνα 4.12: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το πλήρες τμήμα του Ενισχυτή B σε κύτταρα AGS, σε κύτταρα AGS με Knock Out του Ενισχυτή A και σε κύτταρα AGS με Knock Out του Υποκινητή του RECUR1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pGL4.10/AdML. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα (Σχετική δραστικότητα, Fold Change).



Εικόνα 4.13: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το υπομήνιο A του Ενισχυτή B σε κύτταρα AGS, σε κύτταρα AGS με Knock Out του Ενισχυτή A και σε κύτταρα AGS με Knock Out του Υποκινητή του RECURI1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pGL4.10/AdML. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).



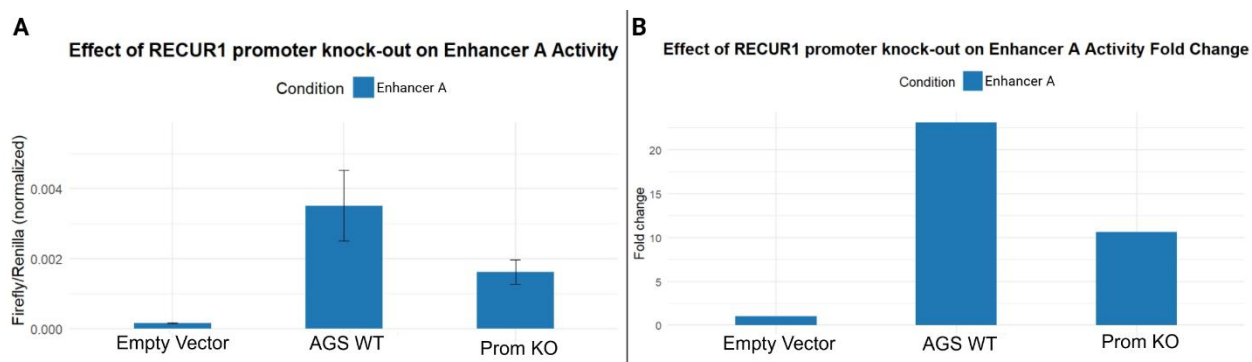
Εικόνα 4.14: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το υπομήνιο B του Ενισχυτή B σε κύτταρα AGS, σε κύτταρα AGS με Knock Out του Ενισχυτή A και σε κύτταρα AGS με Knock Out του Υποκινητή του RECURI1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pGL4.10/AdML. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).



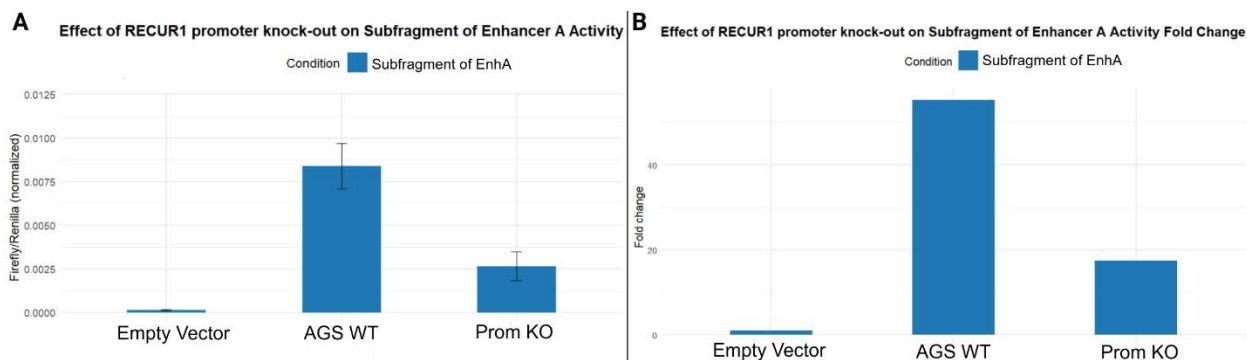
Εικόνα 4.15: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το υπομήνιο C του Ενισχυτή B σε κύτταρα AGS, σε κύτταρα AGS με Knock Out του Ενισχυτή A και σε κύτταρα AGS με Knock Out του Υποκινητή του RECURI1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pGL4.10/AdML. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ενεργότητα του Ενισχυτή B αυξάνεται κατά την απαλοιφή του υποκινητή του lncRNA RECUR1. Ειδικότερα, τετραπλασιάζεται η ενεργότητα του πλήρους τμήματος και τριπλασιάζεται η ενεργότητα του υποτμήματος A. Αντίστοιχα, η καταστολή του Ενισχυτή A επηρεάζει τόσο το πλήρες τμήμα του Ενισχυτή B, αυξάνοντας 3 φορές την ενεργότητά του, όσο και το υποτμήμα A, στο οποίο διπλασιάζεται η ενεργότητα, ενώ στα υποτμήματα B και C δεν παρατηρείται μεταβολή στην ενεργότητα.

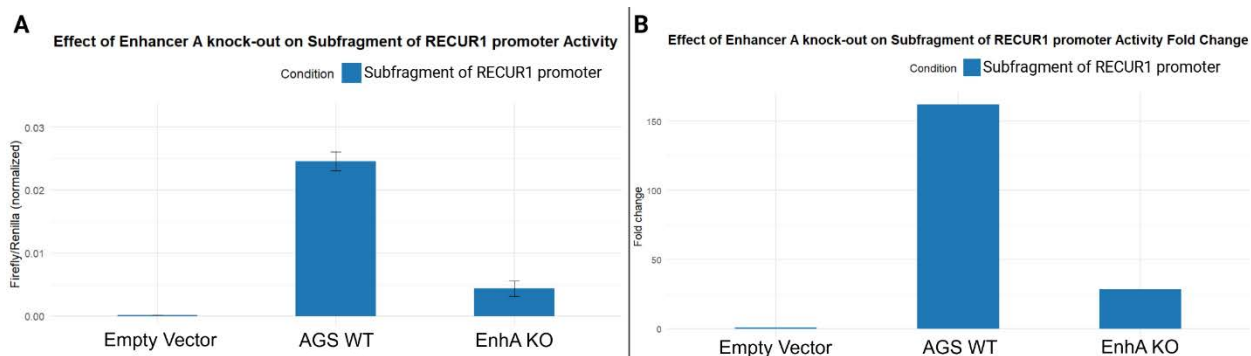
Επιπλέον, σχεδιάστηκαν πειράματα στα οποία εξετάζεται i) η ενεργότητα τόσο της πλήρους αλληλουχίας όσο και του ενεργού υποτμήματος του Ενισχυτή A σε κύτταρα AGS κατά την απαλοιφή του υποκινητή του RECUR1, και ii) η ενεργότητα του ενεργού υποτμήματος του υποκινητή του lncRNA RECUR1 σε κύτταρα με απαλοιφή του Ενισχυτή A. Δηλαδή πειράματα στα οποία ελέγχεται η επίδραση του Ενισχυτή B (παρούσα πτυχιακή) τόσο στον υποκινητή του lncRNA RECUR1, όσο και στον καθοδικό του Ενισχυτή A, που έχουν ανακαλυφθεί και μελετηθεί σε προηγούμενες πτυχιακές του εργαστηρίου. Τα αποτελέσματα για τον Ενισχυτή A και το ενεργό υποτμήμα του υποκινητή του RECUR1 παρατίθενται στις Εικόνες [4.16](#), [4.17](#) και [4.18](#) αντίστοιχα.



Εικόνα 4.16: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το πλήρες τμήμα του Ενισχυτή A σε κύτταρα AGS και σε κύτταρα AGS με Knock Out του Υποκινητή του RECUR1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pGL4.10/AdML. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).



Εικόνα 4.17: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το ενεργό υποτμήμα του Ενισχυτή A σε κύτταρα AGS και σε κύτταρα AGS με Knock Out του Υποκινητή του RECUR1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pGL4.10/AdML. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).



Εικόνα 4.18: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για το ενεργό υπομήμα του Υποκινητή του RECUR1 (core promoter) σε κύτταρα AGS και σε κύτταρα AGS με Knock Out του Ενισχυτή A. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pGL4.10/AdML. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).

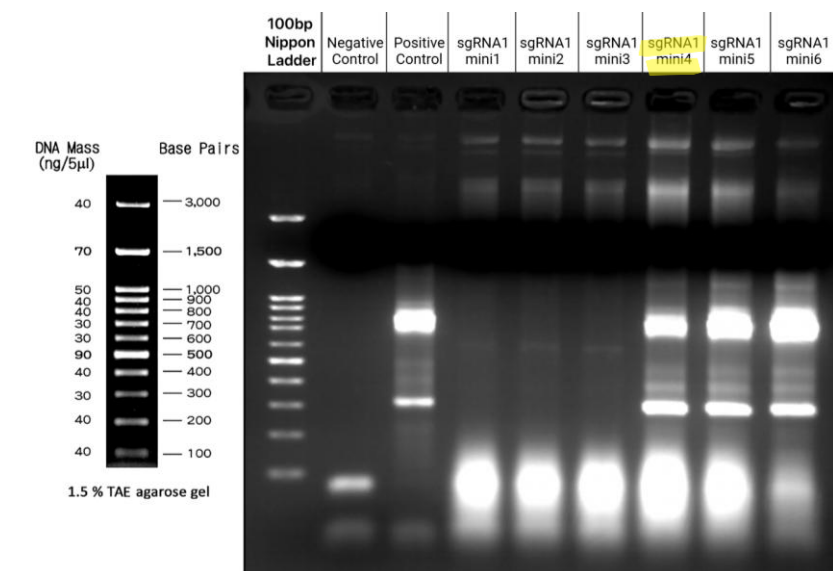
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω ευρήματα, η πλήρης αλληλουχία (600bp) και το ενεργότερο υπομήμα (200bp) του Ενισχυτή A συμφωνούν ως προς την μείωση της ενεργότητας όταν δεν είναι λειτουργικός ο υποκινητής του RECUR1. Αντίστοιχα, το ενεργό τμήμα του Υποκινητή του RECUR1 παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα όταν καταργείται η λειτουργία του Ενισχυτή A. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ρυθμιστικών στοιχείων. Πιο συγκεκριμένα, ο υποκινητής του RECUR1 αποτελεί κύριο στόχο του Ενισχυτή A και είναι απαραίτητος για την πλήρη δραστηριότητα του. Αντίστοιχα, ο Ενισχυτής A και ο υποκινητής του RECUR1 δρουν συνεργατικά, με συνέπεια η κατάργηση του ενός να οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας του άλλου.

4.2 Απαλοιφή του Ενισχυτή B μέσω του συστήματος CRISPR/nCas9

Έπειτα από τις δοκιμές λουσιφεράσης, όπου διαπιστώθηκε η ενεργότητα του Ενισχυτή B σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, αναδείχθηκε ότι η υπό μελέτη αλληλουχία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Το εύρημα αυτό, σε συνδυασμό με τις μεταβολές της ενεργότητας του Ενισχυτή B μετά από την επίδραση των άλλων ρυθμιστικών στοιχείων, που μελετήθηκαν σε προηγούμενες πτυχιές του εργαστηρίου, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η δημιουργία σταθερής καρκινικής κυτταρικής σειράς με γενετική απαλοιφή της αλληλουχίας του Ενισχυτή B μέσω του συστήματος CRISPR/nCas9 ήταν απαραίτητη για την περεταίρω κατανόηση του ρυθμιστικού άξονα.

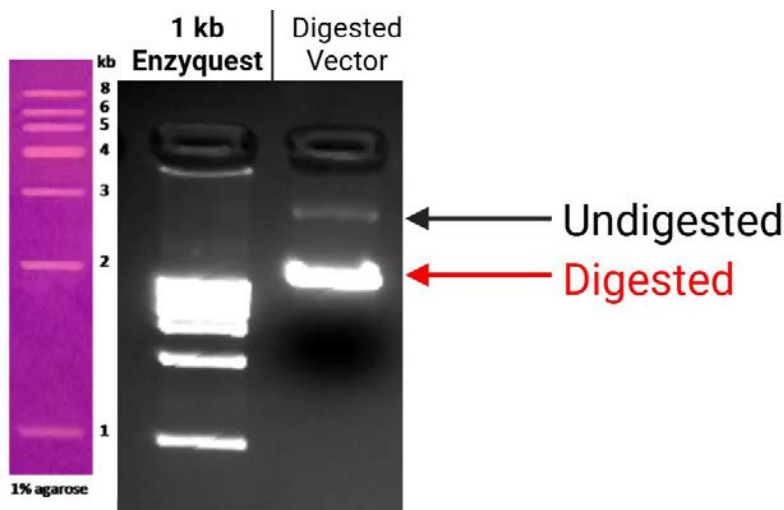
4.2.1 Κλωνοποίηση των sgRNA1 και sgRNA2 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro

Η κλωνοποίηση των δύο sgRNA πραγματοποιήθηκε σε διαδοχικά στάδια. Αρχικά, έγινε κλωνοποίηση του sgRNA1 στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro και ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Έπειτα, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από 6 βακτηριακούς κλώνους και πραγματοποιήθηκε PCR για την επιβεβαίωση της ένθεσης του sgRNA1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.19](#).



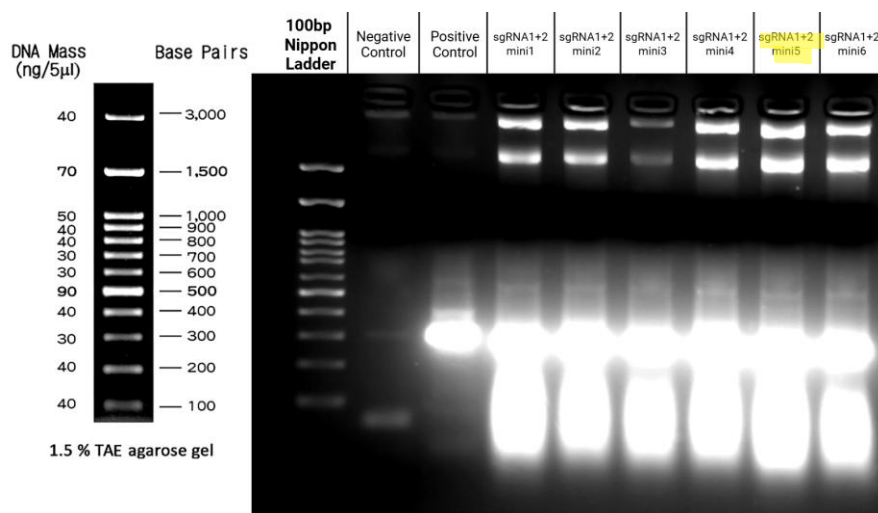
Εικόνα 4.19: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Επιβεβαίωση ένθεσης του sgRNA1 σε πλασμίδιο AIO-puro έπειτα από απομόνωση πλασμιδίου με homemade mini-preps. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Nippon Ladder, Αρνητικός Μάρτυρας (Άδειος Φορέας AIO-puro), Θετικός Μάρτυρας (Φορέας AIO-puro που φέρει sgRNA1 από προηγούμενο επιβεβαιωμένο πείραμα, το προϊόν ενίσχυσης του οποίου είναι 784 bp), 6 δείγματα υπό εξέταση με αναμενόμενο μήκος 784 bp.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου από τον κλώνο 4 με το ένζυμο BsaI και το αποτέλεσμα της πέψης παρουσιάζεται στην [Εικόνα 4.20](#).



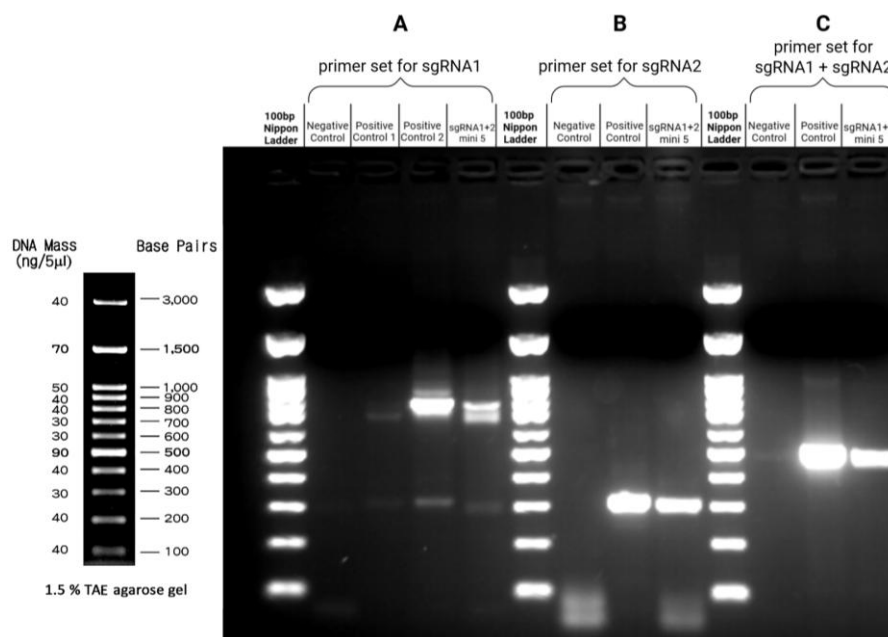
Εικόνα 4.20: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Επιβεβαίωση πέψης του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro, ο οποίος περιέχει το sgRNA1, με το BsaI.

Έπειτα, απομονώθηκε από το πηκτώμα η ζώνη του κομμένου φορέα και πραγματοποιήθηκε ένθεση του sgRNA2 μέσω αντίδρασης λιγάσης. Ακολούθησε επιλογή έξι κλώνων για απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ενώ η ένθεση του sgRNA2 επιβεβαιώθηκε με PCR το αποτέλεσμα της οποίας παρατίθεται στην [Εικόνα 4.21](#).



Εικόνα 4.21: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Επιβεβαίωση ένθεσης του sgRNA2 στον φορέα AIO-puro που ήδη φέρει το sgRNA, έπειτα από απομόνωση του πλασμιδίου με homemade mini-preps. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Nippon Ladder, Αρνητικός Μάρτυρας (Άδειος Φορέας AIO-puro), Θετικός Μάρτυρας (Φορέας AIO-puro που φέρει sgRNA1+sgRNA2 από προηγούμενο επιβεβαιωμένο πείραμα, το προϊόν ενίσχυσης του οποίου είναι στα 313 bp), 6 δείγματα προς εξέταση με αναμενόμενο μήκος 313 bp.

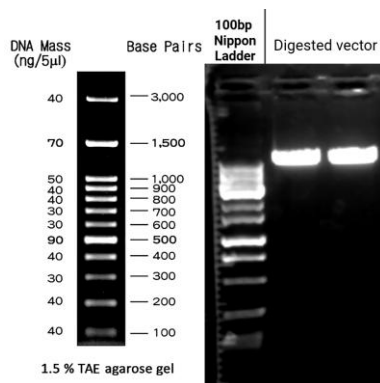
Από τους παραπάνω κλώνους επιλέχθηκε ο κλώνος 5, ο οποίος ανακαλλιεργήθηκε και ακολούθως πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Για την τελική επιβεβαίωση της ένθεσης, εκτελέστηκε PCR με εκκινητές τις κατάλληλα προσανατολισμένες αλληλουχίες των δύο sgRNA (1+2) στα πλασμίδια που απομονώθηκαν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.22](#).



Εικόνα 4.22: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Επιβεβαίωση ένθεσης του sgRNA1 και sgRNA2 σε πλασμίδιο AIO-puro που φέρει και τα δύο sgRNA, έπειτα από απομόνωση του πλασμιδίου με commercial kit. A) Δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ζευγάρι εκκινητών που επιβεβαιώνει την ένθεση του sgRNA1, με αναμενόμενο μήκος 784 bp. B) Δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ζευγάρι εκκινητών που επιβεβαιώνει την ένθεση του sgRNA2, με αναμενόμενο μήκος 313 bp. C) Δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ζευγάρι εκκινητών που επιβεβαιώνει την ένθεση του sgRNA1 & sgRNA2, με αναμενόμενο μήκος 494 bp. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Nippon Ladder, Αρνητικός Μάρτυρας (Άδειος Φορέας AIO-puro), Θετικός Μάρτυρας 1 (Φορέας AIO-puro που φέρει μόνο sgRNA1 από προηγούμενο επιβεβαιωμένο πείραμα), Θετικός Μάρτυρας 2 (Φορέας AIO-puro που φέρει sgRNA1+ sgRNA2 από

προηγούμενο επιβεβαιωμένο πείραμα), δείγμα υπό εξέταση(φέρει *sgRNA1* & *sgRNA2*), 100bp Nippon Ladder, Αρνητικός Μάρτυρας, Θετικός Μάρτυρας 2, δείγμα υπό εξέταση, 100bp Nippon Ladder, Αρνητικός Μάρτυρας, Θετικός Μάρτυρας 2, δείγμα υπό εξέταση.

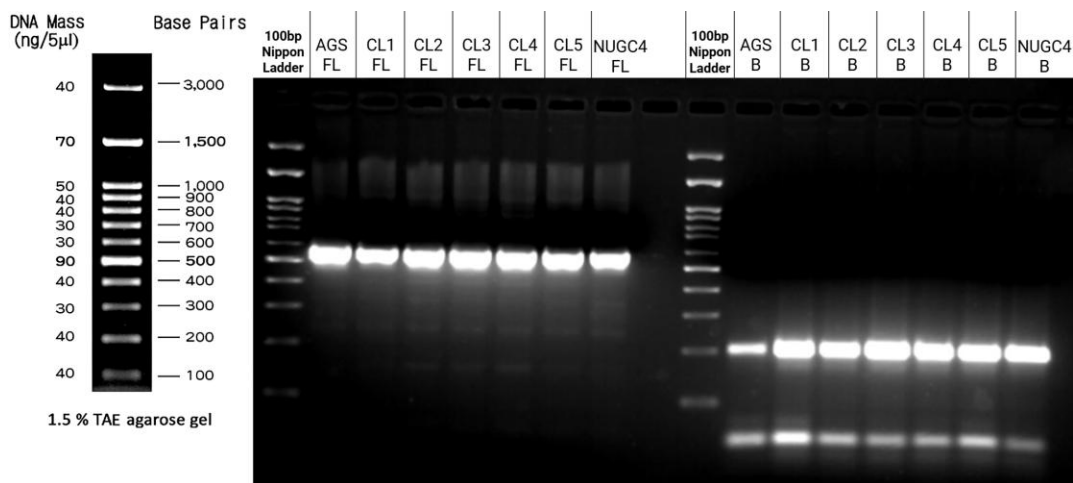
Στη συνέχεια, ο πλασμιδιακός φορέας υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο PvuI ώστε να γραμμοποιηθεί εν όψει του μετασχηματισμού των γαστρικών καρκινικών κυττάρων. Το αποτέλεσμα της γραμμοποίησης παρουσιάζεται στην [Εικόνα 4.23](#), όπου διαπιστώθηκε πλήρης πέψη του πλασμιδίου. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS με το γραμμοποιημένο πλασμίδιο.



Εικόνα 4.23: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης. Επιβεβαίωση πέψης του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro ο οποίος περιέχει το *sgRNA1* και το *sgRNA2*.

4.2.2 Έλεγχος των κλώνων των AGS κυττάρων για γενετική τροποποίηση

Μετά τη διαμόλυνση των AGS γαστρικών καρκινικών κυττάρων, ακολούθησε καλλιέργεια και απομόνωση μεμονωμένων κλώνων, από τους οποίους πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του γονιδιωματικού DNA τους. Έπειτα, εκτελέστηκαν διαγνωστικές PCR στο σημείο εκτομής για την διερεύνηση της δράσης του συστήματος. Συνολικά, καλλιεργήθηκαν και εξετάστηκαν 20 κλώνοι. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ενίσχυσης τόσο για το πλήρες μήκος του Ενισχυτή B (FL, 600bp), όσο και για το υποτμήμα B του Ενισχυτή B (B, 200bp), το οποίο αποτελεί την περιοχή στόχευσης. Τα αποτελέσματα των πέντε πρώτων κλώνων παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.24](#).



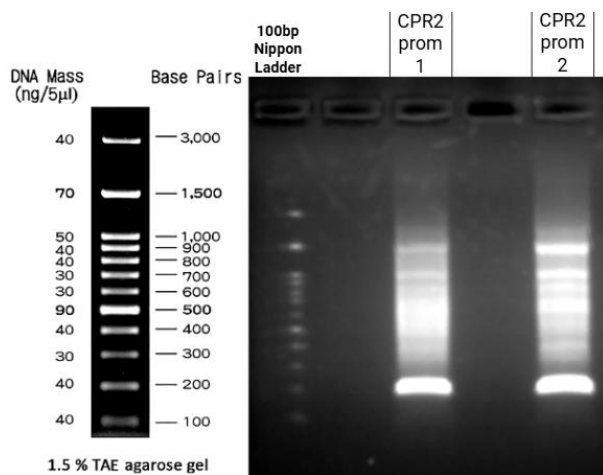
Εικόνα 2.24: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης. Επιβεβαίωση δράσης του συστήματος CRISPR/nCas9 μέσω ενίσχυσης του σημείου εκτομής με αντίδραση PCR. Στα δείγματα με ένδειξη «FL» ενισχύθηκε το πλήρες τμήμα του ενισχυτή B

(600bp), ενώ στα δείγματα με ένδειξη «B» ενισχύθηκε το υποτίμημα B του ενισχυτή B(200bp). Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Nippon Ladder, Θετικός Μάρτυρας 1- κύτταρα AGS, 5 κλώνοι υπό εξέταση, Θετικός Μάρτυρας 2 – κύτταρα NUGC4, 100bp Nippon Ladder, Θετικός Μάρτυρας 1- κύτταρα AGS, 5 κλώνοι υπό εξέταση, Θετικός Μάρτυρας 2 – κύτταρα NUGC4.

Όπως φαίνεται στην [Εικόνα 4.24](#), δεν ανιχνεύθηκε στοχευμένη εκτομή και το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στους υπόλοιπους 15 κλώνους. Η αποτυχία μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Αρχικά, κατά τον σχεδιασμό των sgRNA, η αλληλουχία οδηγός δεν ευθυγραμμίστηκε ακριβώς με την αλληλουχία protospacer, αλλά στόχευε θέση με απόσταση ενός νουκλεοτιδίου από το μοτίβο PAM, γεγονός που ενδέχεται να είχε σημαντικό αντίκτυπο στην συνολική δράση του συστήματος. Εναλλακτικά, μπορεί η στοχευόμενη περιοχή να είναι λειτουργικά κρίσιμη, με αποτέλεσμα ο τροποποιημένος φαινότυπος να μην είναι ανεκτός από τα κύτταρα, οδηγώντας στην αρνητική επιλογή των τροποποιημένων κλώνων.

4.3 Απομόνωση και μελέτη της ενεργότητας μιας υποψήφιας αλληλουχίας υποκινητή του γονιδίου-στόχου του lncRNA RECUR1

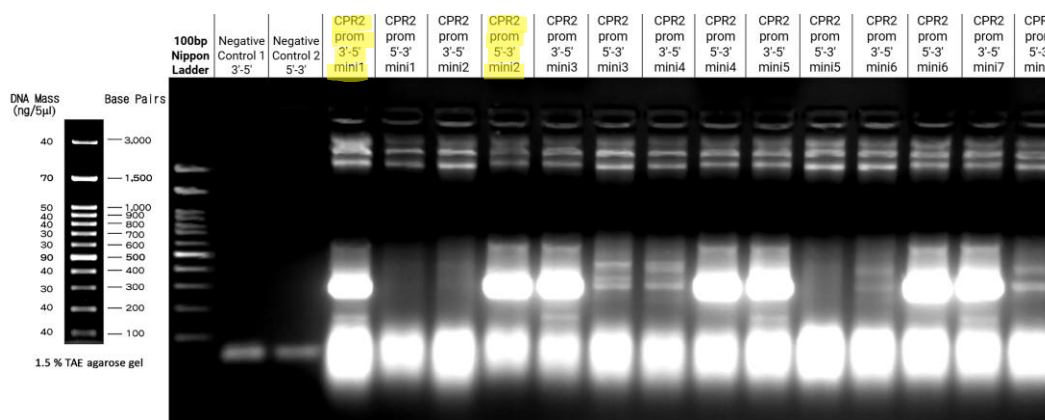
Από τον ρυθμιστικό άξονα της [Εικόνας 4.11](#) μελετήθηκε, στην παρούσα πτυχιακή, και ο υποκινητής του γονιδίου CPR2, που αποτελεί ρυθμιστικό στόχο του lncRNA RECUR1. Πιο συγκεκριμένα, η υποψήφια αλληλουχία του υποκινητή απομονώθηκε από γονιδιωματικό DNA κυττάρων AGS και στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκε και με τους δύο προσανατολισμούς σε πλασμιδιακούς φορείς pGL4.10, οι οποίοι έφεραν το γονίδιο της λουσιφεράσης Firefly. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων AGS και εκτιμήθηκε η δραστηριότητα με μετρήσεις βιοφωτάυγειας. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μια δεύτερη αλληλουχία που είχε προηγούμενων απομονωθεί ως υποψήφιος υποκινητής της CPR2 σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία του εργαστηρίου, αλλά είχε δώσει χαμηλή ενεργότητα σε δοκιμασίες βιοφωτάυγειας. Για την απομόνωση του CPR2 υποκινητή, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες αντιδράσεις, των οποίων τα προϊόντα ενώθηκαν κατά την απομόνωση του DNA από το πήκτωμα. Το αποτέλεσμα ενίσχυσης παρατίθεται στην [Εικόνα 4.25](#).



Εικόνα 4.25: Απομόνωση της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου CPR2 μήκους 200 bp από γονιδιωματικού DNA. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Nippon Ladder και οι δύο ανεξάρτητες αντιδράσεις ενίσχυσης της αλληλουχίας με αναμενόμενο μήκος 200 bp.

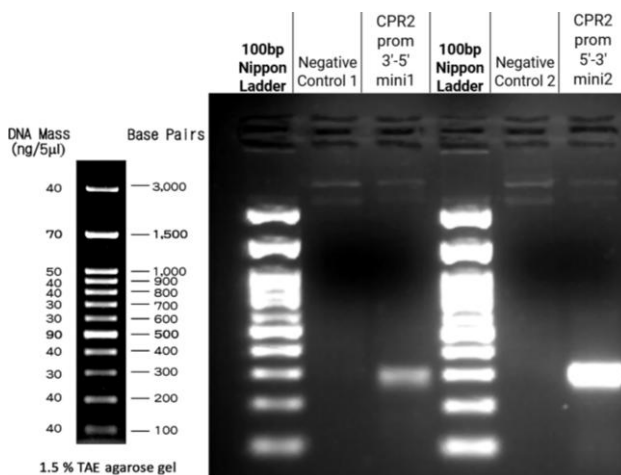
Στη συνέχεια, η απομονωμένη αλληλουχία, κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pGL4.10 και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR για επιβεβαίωση του προσανατολισμού ένθεσης, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.26](#). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε

φορέας pGL4.10 χωρίς ένθεμα. Με κίτρινο χρώμα έχουν επισημανθεί οι βακτηριακοί κλώνοι που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανακαλλιέργεια και χρήση στη διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 4.26: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης του υποκινητή του CPR2 στον φορέα pGL4.10, έπειτα από απομόνωση του πλασμιδίου με homemade mini-preps. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Nippon Ladder, Αρνητικός Μάρτυρας 1 (Άδειος Φορέας pGL4.10) που εξετάζεται για το ένθεμα με προσανατολισμό 3'-5', Αρνητικός Μάρτυρας 2 (Άδειος Φορέας pGL4.10) που εξετάζεται για το ένθεμα με προσανατολισμό 5'-3', 7 δείγματα προς εξέταση με αναμενόμενο μήκος 293 bp.

Τα αποτελέσματα της τελικής επιβεβαιωτικής αντίδρασης PCR παρουσιάζονται στην [Εικόνα 4.27](#).

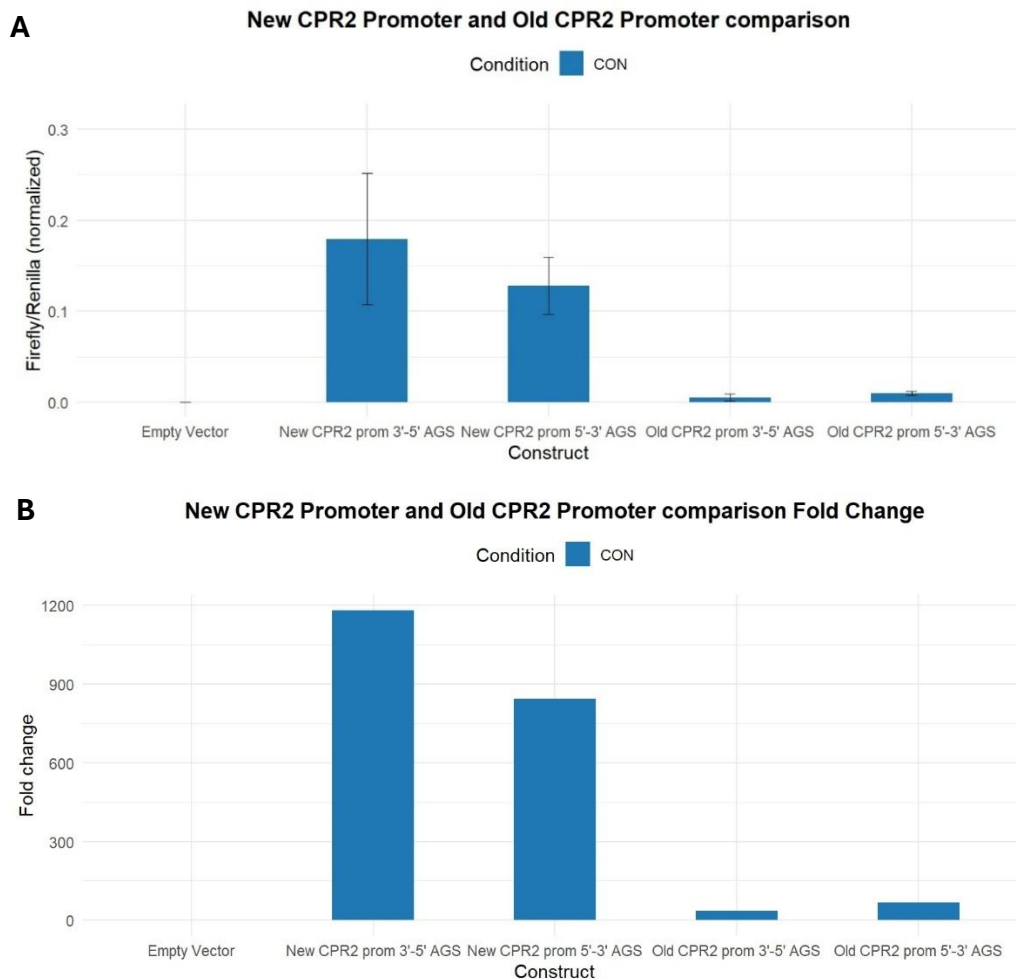


Εικόνα 4.27: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης του υποκινητή του CPR2 στον φορέα pGL4.10, έπειτα από απομόνωση του πλασμιδίου με commercial kit. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Nippon Ladder, Αρνητικός Μάρτυρας 1 (Άδειος Φορέας pGL4.10) που εξετάζεται για το ένθεμα με προσανατολισμό 3'-5', CPR2 prom mini1 3'-5' με αναμενόμενο μήκος 293 bp, Αρνητικός Μάρτυρας 2 (Άδειος Φορέας pGL4.10) που εξετάζεται για το ένθεμα με προσανατολισμό 5'-3', CPR2 prom mini2 5'-3' με αναμενόμενο μήκος 293 bp.

4.3.1 Δοκιμασία βιοφωταύγειας του υποκινητή του CPR2

Μετά την κατάλληλη προετοιμασία, οι πλασμιδιακοί φορείς που απομονώθηκαν και περιέχουν την αλληλουχία του υποκινητή του CPR2 και με τους δύο προσανατολισμούς, χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση γαστρικών καρκινικών κυττάρων.

Στο διάγραμμα της [Εικόνας 4.28A](#), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων βιοφωταύγειας του νέου (New, παρούσα πτυχιακή) και του παλιού (Old) υποκινητή του CPR2, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας στο πείραμα, ενώ στο διάγραμμα της [Εικόνας 4.28B](#) απεικονίζεται η σχετική αύξηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή τον φορέα pGL4.10/AdML χωρίς ένθεμα (fold change).



Εικόνα 4.28: Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης για τον καινούριο και τον παλιό υποκινητή του CPR2 και με τους δύο προσανατολισμούς ένθεσης. A) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα AGS. B) Ιστόγραμμα απεικόνισης κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα AGS (Σχετική δραστηριότητα, Fold Change).

Συμπερασματικά, η συγκριτική ανάλυση της ενεργότητας των δύο αλληλουχιών αποδεικνύει ότι η νέα υποψήφια αλληλουχία του CPR2 υποκινητή εμφανίζει 1200 φορές υψηλότερη ενεργότητα συγκριτικά με τον άδειο φορέα, σε αντίθεση με την παλαιότερη υποψήφια αλληλουχία που εμφάνιζε μόλις 36 φορές υψηλότερη ενεργότητα έναντι του μάρτυρα. Η μεταξύ τους διαφορά των 30-fold υποδηλώνει ότι η νέα αλληλουχία πιθανότατα αντιστοιχεί στον λειτουργικό υποκινητή του CPR2. Επιπρόσθετα, φαίνεται πως ο ενεργός προσανατολισμός του υποκινητή του CPR2 είναι ο 3'-5', αποτέλεσμα συμβατό με την αντιπαράλληλη φορά μεταγραφής του γονιδίου (Crick, 3'-5').

5. Συζήτηση

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί μια νόσο με κακή πρόγνωση λόγω της διάγνωσης του σε προχωρημένα στάδια. Η ανακάλυψη βιοδεικτών υγρής βιοψίας με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση είναι μείζονος σημασίας. Για τον λόγο αυτό, το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί στα lncRNA, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή καρκινοειδικότητα και ιστοειδικότητα. Για την ανάδειξη των συγκεκριμένων μορίων ως κατάλληλους βιοδείκτες σε έναν ορισμένο τύπο καρκίνου, πρέπει να προηγηθεί η μελέτη της καρκινοειδικής ρύθμισης τους που θα επιτευχθεί με τον εντοπισμό και την μελέτη των ρυθμιστικών τους στοιχείων.

Ανάλογες μελέτες από την βιβλιογραφία περιλαμβάνουν την γονιδιωματική περιοχή 8q24 που φιλοξενεί έναν αντίστοιχο άξονα με αυτόν που μελετάται στην παρούσα πτυχιακή, όπου η έκφραση του ογκογονιδίου MYC ρυθμίζεται μέσω του σχηματισμού βρόχων χρωματίνης ανάμεσα σε απομακρυσμένους ενισχυτές και τον υποκινητή του [87]. Το lncRNA CCAT1-L εντοπίζεται σε απόσταση περίπου 500kb ανοδικά του ογκογονιδίου και η σίγηση του φαίνεται να επηρεάζει τον σχηματισμό του βρόχου, αφού αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CTCF ρυθμίζοντας την οριοθέτηση των TAD. Ο σχηματισμός του βρόχου της περιοχής MYC εμφανίζει ιστοειδικότητα σε καρκίνους προστάτη, μαστού και παχέως εντέρου. Στον καρκίνο του παχέως εντέρου παρατηρείται το SNP rs6983267 στην περιοχή της χρωματίνης (MYC-335) που αλληλεπιδρά ο υποκινητής του MYC για τον σχηματισμό βρόχου μεταγραφής. Ο πολυμορφισμός αυτός επιτρέπει την αλληλεπίδραση του ενισχυτή με τον μεταγραφικό παράγοντα TC4 μόνο στον καρκίνο του παχέως εντέρου. Πειράματα αποσίωσης του ενισχυτή MYC-335 σε ποντίκια, είχαν ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στον σχηματισμό όγκων στο έντερο και την μείωση των μεταγράφων του MYC. Μάλιστα, φαίνεται πως ο MYC-335 μπορεί να αλληλεπιδράσει τόσο με τον υποκινητή του MYC όσο και με του CCAT1-L, μέσω σχηματισμού βρόχου χρωματίνης. Αντίστοιχα, άλλες μελέτες φανερώνουν ότι ο υποκινητής του lncRNA PVT1 μπορεί να ανταγωνίζεται τον υποκινητή του MYC για πρόσδεση στον ενισχυτή, δίνοντας στο PVT1 ογκοκατασταλτικό ρόλο [70]. Όλες οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις υποδεικνύουν ένα δυναμικό και ιστοειδικά εξαρτώμενο δίκτυο αλληλεπίδρασης υποκινητή με ενισχυτή το οποίο ελέγχει την έκφραση του MYC.

Η παρούσα πτυχιακή εξετάζει τον ρυθμιστικό άξονα της [Εικόνας 4.11](#), και συγκεκριμένα τον Ενισχυτή B και τον Υποκινητή του γονιδίου CPR2. Το γονίδιο της CPR2, το οποίο αφορά αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου, αποτελεί στόχο του lncRNA RECUR1. Τα τέσσερα ρυθμιστικά στοιχεία που εμπλέκονται εξετάζονται για τις μεταξύ τους σχέσεις.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της υπό εξέταση αλληλουχίας του Ενισχυτή B, επιβεβαίωση της ενεργότητας του και στη συνέχεια, παρατηρήθηκε πως ο 3'-5' προσανατολισμός είναι περισσότερο ενεργός ([Εικόνα 4.8](#)). Αντίστοιχη μελέτη για χαρακτηρισμό αλληλουχίας ενισχυτή πραγματοποιήθηκε και για το lncRNA MALAT1, στην οποία διερευνήθηκε η ενεργότητα τριών υποψήφιων περιοχών (E1, E2, E3) με ανάδειξη μίας μόνο ως ρυθμιστικής αλληλουχίας ενισχυτή (E2) με περίπου 25 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα από τον αρνητικό μάρτυρα[88].

Ακόμη, στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής διερευνήθηκε η συσχέτισή του Ενισχυτή B με τον GATA4 και παρατηρήθηκε πως απουσία του μεταγραφικού παράγοντα, η ενεργότητα του Ενισχυτή B εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση, υποδηλώνοντας την αλληλεπίδραση τους ([Εικόνα 4.8](#)). Παράλληλα, εξετάστηκαν και τα τρία επιμέρους υποτμήματα του Ενισχυτή B και βρέθηκε πως το πιο ενεργό είναι το μεσαίο υποτμήμα ([Εικόνες 4.9, 4.10](#)). Όσον αφορά την

μεμονωμένη συσχέτιση τους με τον GATA4, κανένα από τα τρία υποτιμήματα του κρίσιμου προσανατολισμού, δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή, ωστόσο το ενεργότερο υποτίμημα φαίνεται να έχει μειωμένη ενεργότητα (Εικόνες [4.9](#), [4.10](#)). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση του GATA4 συνδυαστικά σε παραπάνω από ένα υποτίμημα του Ενισχυτή B. Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα σε όγκους γαστρικού καρκίνου σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους καρκίνου [61], γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή καρκινο-ειδικότητα των γονιδίων-στόχων του Ενισχυτή B.

Για τη διερεύνηση των επιδράσεων των γειτονικών ρυθμιστικών στοιχείων στην ενεργότητα του Ενισχυτή B, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα, αν και όχι στατιστικά σημαντικά, έδειξαν πως η ενεργότητα του Ενισχυτή B αυξάνεται απουσία του Ενισχυτή A και του Υποκινητή του RECUR1, τόσο στο πλήρες τμήμα όσο και στο υποτίμημα A, υποδηλώνοντας πως το κρίσιμο τμήμα αλληλεπίδρασης των ρυθμιστικών στοιχείων βρίσκεται στα πρώτα 200 νουκλεοτίδια του Ενισχυτή B (Εικόνες [4.12](#), [4.13](#), [4.14](#), [4.15](#)). Όσον αφορά την πιθανή αλληλεπίδραση των δύο ενισχυτών, θα μπορούσε να προταθεί ως υπόθεση εργασίας, ένα υποθετικό μοντέλο, κατά το οποίο όταν απαλείφεται ο Ενισχυτής A, επιτρέπει στον Ενισχυτή B να εντοπίσει νέους στόχους παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ενεργότητα. Αντίστοιχα, όταν απαλείφεται ο Υποκινητής του RECUR1 αποδεσμεύει το Ενισχυτή B επιτρέποντας του να βρει νέα γονίδια στόχους εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργότητα. Τα επιμέρους ρυθμιστικά στοιχεία, δηλαδή ο Ενισχυτής A και ο Υποκινητής του RECUR1 δρουν συνεργατικά. Όταν απαλείφεται το ένα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα AGS, το άλλο σε όλες τις περιπτώσεις παρουσιάζει μειωμένη ενεργότητα (Εικόνες [4.16](#), [4.17](#), [4.18](#)).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιχειρήθηκε η στόχευση του ενεργού υποτιμήματος του Ενισχυτή B, ώστε να δημιουργηθεί μια σταθερή κυτταρική σειρά με απαλοιφή του συγκεκριμένου ρυθμιστικού στοιχείου. Δυστυχώς, η παραπάνω προσπάθεια απέτυχε. Η αποτυχία μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι, κατά τον σχεδιασμό των sgRNA, η αλληλουχία οδηγός που σχεδιάστηκε στόχευε την αλληλουχία protospacer με απόσταση ενός νουκλεοτιδίου από το μοτίβο PAM.

Σύμφωνα με μελέτες που διερευνούν την ακρίβεια στόχευσης των sgRNA, έχει παρατηρηθεί πως η αλληλουχία protospacer εντοπίζεται ακριβώς δίπλα στο 3' άκρο του μοτίβου PAM και είναι καθοριστική για την λειτουργικότητα του συστήματος [89]. Συγκεκριμένα, επισημαίνεται πως έστω και αν 1 ή 2 από τα πρώτα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας protospacer που γειτνιάζουν με την PAM δεν είναι συμπληρωματικά με το sgRNA, τότε η Cas9 δεν καταφέρνει να αναγνωρίσει την αλληλουχία, ακόμη και αν τα υπόλοιπα 18 νουκλεοτίδια ταιριάζουν πλήρως, καθιστώντας το σύστημα μη λειτουργικό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα συγκεκριμένα νουκλεοτίδια ανήκουν στην κρίσιμη περιοχή seed region, η οποία περιλαμβάνει τα πρώτα 8 με 10 νουκλεοτίδια που βρίσκονται αμέσως δίπλα στο 3' άκρο του μοτίβου PAM. Επομένως, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός νέων sgRNA τα οποία θα στοχεύουν με ακρίβεια την επιθυμητή περιοχή, για την δημιουργία μιας σταθερής κυτταρικής σειράς με ανενεργό τον Ενισχυτή B. Διαθέτοντας το παραπάνω εργαλείο, θα είναι δυνατή η διεξαγωγή πειραμάτων διερεύνησης των αλληλεπιδράσεων του Ενισχυτή B με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία, όπως ο υποκινητής του CPR2, αλλά και η ανακάλυψη των γονιδίων-στόχων του.

Τέλος, μελετήθηκε διεξοδικά και ο υποκινητής του CPR2, ως πιθανός στόχος τόσο του ενισχυτή B όσο και του A. Ειδικότερα, επιλέχθηκε νέα υποψήφια αλληλουχία (New) και συγκρίθηκε με μια αλληλουχία που είχε προταθεί σε προηγούμενη πτυχακή του εργαστηρίου (Old). Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενεργότητα της νέας αλληλουχίας είναι περίπου 30 φορές αυξημένη συγκριτικά με την προηγούμενη, υποδεικνύοντας πως η νέα περιοχή είναι η ενεργή περιοχή υποκινητή (Εικόνα 4.28). Αντίστοιχες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου MAPT, συσχετίζοντας τη δράση του κύριου με τον εναλλακτικό υποκινητή του γονιδίου [90].

Συμπερασματικά, στην παρούσα πτυχιακή χαρακτηρίστηκε η αλληλουχία του Ενισχυτή B, ο ενεργός του προσανατολισμός (3'-5') και το υπομήμα του που εμφανίζει την μεγαλύτερη ενεργότητα (B). Παράλληλα, αποσαφηνίστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ του Ενισχυτή A, του Ενισχυτή B και του Υποκινητή του RECUR1. Τέλος, προτάθηκε και χαρακτηρίστηκε μια νέα αλληλουχία για τον Υποκινητή του CPR2, με υψηλότερη ενεργότητα από την προϋπάρχουσα και με ενεργό προσανατολισμό 3'-5'.

Ωστόσο, για την επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων των υπό μελέτη ρυθμιστικών στοιχείων είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων. Αρχικά, είναι κρίσιμη η διαλεύκανση των αλληλεπιδράσεων του υποκινητή του CPR2 με τα υπόλοιπα ρυθμιστικά στοιχεία με δοκιμασίες λουσιφεράσης. Ακόμη, είναι σημαντική η δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς με απαλοιφή του Ενισχυτή B, ώστε να διερευνηθούν τα γονίδια-στόχοι του. Επιπρόσθετα, στους μελλοντικούς στόχους περιλαμβάνεται η διεξαγωγή πειραμάτων ανοσοκατακρίμνισης της χρωματίνης, για την ανίχνευση πρόσδεσης πρωτεϊνών και παραγόντων στην χρωματίνη που επηρεάζουν τον σχηματισμό των TADs. Δεν πρέπει να παραλειφθούν οι τεχνικές Hi-C ώστε να επιβεβαιωθούν οι αλληλεπιδράσεις των δύο ενισχυτών με τους αντίστοιχους υποκινητές. Τα παραπάνω πειράματα θα δώσουν μια *in cellula* εικόνα για την ρύθμιση του υπό μελέτη γενετικού τόπου και το πως η απορρύθμισή του συμβάλλει στην καρκινογένεση.

6. Βιβλιογραφία

1. Yang, W.J., et al., *Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2023. **29**(16): p. 2452-2468.
2. Zhang, T., Y. Zhang, and X. Leng, *Global, regional, and national trends in gastric cancer burden: 1990-2021 and projections to 2040*. Front Oncol, 2024. **14**: p. 1468488.
3. Baccili Cury Megid, T., et al., *Gastric Cancer: Molecular Mechanisms, Novel Targets, and Immunotherapies: From Bench to Clinical Therapeutics*. Cancers (Basel), 2023. **15**(20).
4. Lopez, M.J., et al., *Characteristics of gastric cancer around the world*. Crit Rev Oncol Hematol, 2023. **181**: p. 103841.
5. Jardim, S.R., L.M.P. de Souza, and H.S.P. de Souza, *The Rise of Gastrointestinal Cancers as a Global Phenomenon: Unhealthy Behavior or Progress?* Int J Environ Res Public Health, 2023. **20**(4).
6. Zhang, Z., et al., *The global, regional, and national burden of stomach cancer among adolescents and young adults in 204 countries and territories, 1990-2019: A population-based study*. Front Public Health, 2023. **11**: p. 1079248.
7. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
8. Chen, Y.C., et al., *Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer*. Pathol Oncol Res, 2016. **22**(1): p. 197-202.
9. 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.
10. Wang, Q. and T. Wang, *Comparison of survival between diffuse type and intestinal type early-onset gastric cancer patients: A large population-based study*. Medicine (Baltimore), 2023. **102**(47): p. e36261.
11. Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
12. Xing, X., et al., *Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients*. Oncoimmunology, 2018. **7**(3): p. e1356144.
13. Rocken, C., *Molecular classification of gastric cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(3): p. 293-301.
14. Ellison, A.R., J. Lofing, and G.A. Bitter, *Human MutL homolog (MLH1) function in DNA mismatch repair: a prospective screen for missense mutations in the ATPase domain*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(18): p. 5321-38.
15. Filip, M., S. Iordache, and A. Sâftoiu, *Gastric Cancer Staging by Endoscopic Ultrasound – Contrast Enhancement and Real-Time Elastography*. Video Journal and Encyclopedia of GI Endoscopy, 2013. **1**(1): p. 164-166.
16. Weber, W.A. and R. Figlin, *Monitoring cancer treatment with PET/CT: does it make a difference?* J Nucl Med, 2007. **48 Suppl 1**: p. 36S-44S.
17. De Wever, W., et al., *Additional value of PET-CT in the staging of lung cancer: comparison with CT alone, PET alone and visual correlation of PET and CT*. Eur Radiol, 2007. **17**(1): p. 23-32.
18. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
19. Ma, S., et al., *Clinical application and detection techniques of liquid biopsy in gastric cancer*. Mol Cancer, 2023. **22**(1): p. 7.

20. Perez-Callejo, D., et al., *Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring*. Transl Lung Cancer Res, 2016. **5**(5): p. 455-465.
21. Consortium, E.P., et al., *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 799-816.
22. Tsai, M.C., R.C. Spitale, and H.Y. Chang, *Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression*. Cancer Res, 2011. **71**(1): p. 3-7.
23. Jiang, M.C., et al., *Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities*. Am J Cancer Res, 2019. **9**(7): p. 1354-1366.
24. Li, J., et al., *Regulation of lncRNA and Its Role in Cancer Metastasis*. Oncol Res, 2016. **23**(5): p. 205-17.
25. Dey, S., et al., *Non-Coding RNAs in Oral Cancer: Emerging Roles and Clinical Applications*. Cancers (Basel), 2023. **15**(15).
26. Dahariya, S., et al., *Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells*. Mol Immunol, 2019. **112**: p. 82-92.
27. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *lncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
28. Cusenza, V.Y., et al., *The lncRNA epigenetics: The significance of m6A and m5C lncRNA modifications in cancer*. Front Oncol, 2023. **13**: p. 1063636.
29. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
30. Cabili, M.N., et al., *Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution*. Genome Biol, 2015. **16**(1): p. 20.
31. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCCation: lncRNA localization and function*. J Cell Biol, 2021. **220**(2).
32. Jiang, C., et al., *Identifying and functionally characterizing tissue-specific and ubiquitously expressed human lncRNAs*. Oncotarget, 2016. **7**(6): p. 7120-33.
33. Ward, M., et al., *Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs*. J Hum Transcr, 2015. **1**(1): p. 2-9.
34. Sherafatian, M. and S.J. Mowla, *The origins and evolutionary history of human non-coding RNA regulatory networks*. J Bioinform Comput Biol, 2017. **15**(2): p. 1750005.
35. Wu, X., et al., *The Many Faces of Long Noncoding RNAs in Cancer*. Antioxid Redox Signal, 2018. **29**(9): p. 922-935.
36. 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.
37. Yang, G., X. Lu, and L. Yuan, *lncRNA: a link between RNA and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(11): p. 1097-109.
38. Yan, F., X. Wang, and Y. Zeng, *3D genomic regulation of lncRNA and Xist in X chromosome*. Semin Cell Dev Biol, 2019. **90**: p. 174-180.
39. Fernandes, J.C.R., et al., *Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease*. Noncoding RNA, 2019. **5**(1).
40. Gutschner, T. and S. Diederichs, *The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view*. RNA Biol, 2012. **9**(6): p. 703-19.
41. Riethoven, J.J., *Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators*. Methods Mol Biol, 2010. **674**: p. 33-42.
42. Lange, M., R. Begolli, and A. Giakountis, *Non-Coding Variants in Cancer: Mechanistic Insights and Clinical Potential for Personalized Medicine*. Noncoding RNA, 2021. **7**(3).

43. Kanhere, A. and M. Bansal, *Structural properties of promoters: similarities and differences between prokaryotes and eukaryotes*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(10): p. 3165-75.
44. Kyrchanova, O. and P. Georgiev, *Mechanisms of Enhancer-Promoter Interactions in Higher Eukaryotes*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
45. Popay, T.M. and J.R. Dixon, *Coming full circle: On the origin and evolution of the looping model for enhancer-promoter communication*. J Biol Chem, 2022. **298**(8): p. 102117.
46. Andersson, R., et al., *An atlas of active enhancers across human cell types and tissues*. Nature, 2014. **507**(7493): p. 455-461.
47. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
48. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
49. Zhao, S., C.D. Allis, and G.G. Wang, *The language of chromatin modification in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2021. **21**(7): p. 413-430.
50. Li, X., et al., *The impact of rare variation on gene expression across tissues*. Nature, 2017. **550**(7675): p. 239-243.
51. Valton, A.L. and J. Dekker, *TAD disruption as oncogenic driver*. Curr Opin Genet Dev, 2016. **36**: p. 34-40.
52. See, Y.X., B.Z. Wang, and M.J. Fullwood, *Chromatin Interactions and Regulatory Elements in Cancer: From Bench to Bedside*. Trends Genet, 2019. **35**(2): p. 145-158.
53. Cardozo Gizzi, A.M., D.I. Cattoni, and M. Nollmann, *TADs or no TADs: Lessons From Single-cell Imaging of Chromosome Architecture*. J Mol Biol, 2020. **432**(3): p. 682-693.
54. Nora, E.P., et al., *Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 381-5.
55. Symmons, O., et al., *Functional and topological characteristics of mammalian regulatory domains*. Genome Res, 2014. **24**(3): p. 390-400.
56. Eres, I.E. and Y. Gilad, *A TAD Skeptic: Is 3D Genome Topology Conserved?* Trends Genet, 2021. **37**(3): p. 216-223.
57. Nora, E.P., et al., *Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization*. Cell, 2017. **169**(5): p. 930-944 e22.
58. Wu, S.C., E.M. Kallin, and Y. Zhang, *Role of H3K27 methylation in the regulation of lncRNA expression*. Cell Res, 2010. **20**(10): p. 1109-16.
59. Augoff, K., et al., *miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer*. Mol Cancer, 2012. **11**: p. 5.
60. Benetatos, L., et al., *CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 2010. **34**(2): p. 148-53.
61. Begolli, R., et al., *Deciphering the Landscape of GATA-Mediated Transcriptional Regulation in Gastric Cancer*. Antioxidants (Basel), 2024. **13**(10).
62. Kawakami, A. and D.E. Fisher, *The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology*. Lab Invest, 2017. **97**(6): p. 649-656.

63. Li, Z., et al., *The degradation of EZH2 mediated by lncRNA ANCR attenuated the invasion and metastasis of breast cancer*. Cell Death Differ, 2017. **24**(1): p. 59-71.
64. Huang, W., et al., *LncRNA-mediated DNA methylation: an emerging mechanism in cancer and beyond*. J Exp Clin Cancer Res, 2022. **41**(1): p. 100.
65. Lupianez, D.G., et al., *Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions*. Cell, 2015. **161**(5): p. 1012-1025.
66. Gerstberger, S., M. Hafner, and T. Tuschl, *A census of human RNA-binding proteins*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(12): p. 829-45.
67. Isoda, T., et al., *Non-coding Transcription Instructs Chromatin Folding and Compartmentalization to Dictate Enhancer-Promoter Communication and T Cell Fate*. Cell, 2017. **171**(1): p. 103-119 e18.
68. Kim, T.K., M. Hemberg, and J.M. Gray, *Enhancer RNAs: a class of long noncoding RNAs synthesized at enhancers*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(1): p. a018622.
69. Ranjan, G., et al., *SCAR-6 elncRNA locus epigenetically regulates PROZ and modulates coagulation and vascular function*. EMBO Rep, 2024. **25**(11): p. 4950-4978.
70. Cho, S.W., et al., *Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element*. Cell, 2018. **173**(6): p. 1398-1412 e22.
71. Pardini, B., et al., *Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies*. Cancers (Basel), 2019. **11**(8).
72. Zhang, J., et al., *International Cancer Genome Consortium Data Portal--a one-stop shop for cancer genomics data*. Database (Oxford), 2011. **2011**: p. bar026.
73. Tomczak, K., P. Czerwinska, and M. Wiznerowicz, *The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge*. Contemp Oncol (Pozn), 2015. **19**(1A): p. A68-77.
74. 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.
75. Li, C.H. and Y. Chen, *Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(8): p. 1895-910.
76. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
77. Parasramka, M.A., et al., *Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma*. Pharmacol Ther, 2016. **161**: p. 67-78.
78. Bartonicek, N., J.L. Maag, and M.E. Dinger, *Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 43.
79. Hajjari, M. and A. Salavaty, *HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers*. Cancer Biol Med, 2015. **12**(1): p. 1-9.
80. Li, Z.X., et al., *MALAT1: a potential biomarker in cancer*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 6757-6768.
81. Cui, M., et al., *Long non-coding RNA PVT1 and cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **471**(1): p. 10-4.
82. Fei, Z.H., et al., *Upregulated expression of long non-coding RNA LINC00982 regulates cell proliferation and its clinical relevance in patients with gastric cancer*. Tumour Biol, 2016. **37**(2): p. 1983-93.
83. Durand, X., et al., *Progenesa PCA3 test for prostate cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2011. **11**(2): p. 137-44.

84. Huang, J., et al., *Clinical evaluation of prostate cancer gene 3 score in diagnosis among Chinese men with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. BMC Urol, 2015. **15**: p. 118.
85. Arriaga-Canon, C., et al., *The Clinical Utility of lncRNAs and Their Application as Molecular Biomarkers in Breast Cancer*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(8).
86. Palais, G., et al., *Targeted transgenesis at the HPRT locus: an efficient strategy to achieve tightly controlled in vivo conditional expression with the tet system*. Physiol Genomics, 2009. **37**(2): p. 140-6.
87. Xiang, J.F., et al., *Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus*. Cell Res, 2014. **24**(5): p. 513-31.
88. Choi, H.I., et al., *The bromodomain inhibitor JQ1 up-regulates the long non-coding RNA MALAT1 in cultured human hepatic carcinoma cells*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 7779.
89. Sternberg, S.H., et al., *DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9*. Nature, 2014. **507**(7490): p. 62-7.
90. Huin, V., et al., *Alternative promoter usage generates novel shorter MAPT mRNA transcripts in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy brains*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 12589.