



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

# ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΕΥΘΥΜΙΟΥ

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ  
ΣΕ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΓΚΟΕΠΑΓΩΓΙΚΩΝ  
ΜΑΚΡΩΝ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ RNAS**

**STUDY OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS  
IN REGULATORY ELEMENTS OF ONCOGENIC  
LONG NON-CODING RNAS**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Αντώνιος Γιακουντής**, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αντώνιος Γιακουντής**: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος**: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δανιέλα Τσίκου**: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>1</b>
1.1 Καρκίνος.....	1
1.2 Γαστρικός Καρκίνος.....	1
1.2.1 Ανατομία Στομάχου.....	1
1.2.2 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά.....	2
1.2.3 Διάγνωση.....	4
1.2.4 Ιστολογικοί Τύποι.....	4
1.2.5 Παράγοντες Κινδύνου.....	6
1.2.6 Μοριακοί Υπότυποι.....	7
1.3 Σημειακοί Πολυμορφισμοί .....	9
1.3.1 Σημειακοί Πολυμορφισμοί στον Καρκίνο.....	9
1.3.2 Σημειακοί Πολυμορφισμοί στο Γαστρικό Καρκίνο.....	10
1.3.3 Μοριακές Λειτουργίες και Επιπτώσεις των Σημειακών Πολυμορφισμών σε Κωδικές και μη-Κωδικές Περιοχές.....	13
1.3.4 Συσχέτιση των SNPs με Διάγνωση και Θεραπεία στο Γαστρικό Καρκίνο-Η Σημασία τους.....	18
1.4 Μακρά Μη Κωδικοποιητικών RNA στον Καρκίνο.....	20
1.4.1 Ο ρόλος των Μακρά Μη Κωδικοποιητικά στον Καρκίνο.....	20
1.4.2 Ταξινόμηση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs με Βάση τη Γονιδιωματική τους θέση .....	20
1.4.3 Ταξινόμηση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs με Βάση το Μηχανισμό Δράσης τους.....	21
1.4.4 Ταξινόμηση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs με Βάση την Υποκυτταρική τους θέση .....	22
1.4.5 Μοριακές Λειτουργίες και Επιπτώσεις των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs....	24
1.4.6 Μακρά Μη Κωδικοποιητικά RNAs στη Διάγνωση και στη Θεραπεία του Γαστρικού Καρκίνου.....	26
<b>Σκοπός.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>29</b>

<b>2.1 Υλικά.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Πλασμιδιακοί Φορείς.....	29
2.1.2 Κυτταρικές Σειρές.....	30
2.1.3 Βακτηριακά Στελέχη.....	30
<b>2.2 Μέθοδοι.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Μελέτη της Έκφρασης του RECUR1 Υποκινητή.....	30
2.2.1.1 Συσσωματωμένες Ταυτοχρόνιες Ενδιάμεσες Σύντομες Παλινδρομικές Επαναλήψεις/dead Cas9.....	30
2.2.1.2 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	30
2.2.2 Εισαγωγή Σημειακής Ματάλλαξης με τη μέθοδο Κατευθυνόμενης Μεταλλαξογένεσης με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	32
2.2.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	32
2.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης.....	33
2.2.2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με Εκχύλιση από Πηκτή Αγαρόζης.....	34
2.2.2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης μετά από Κατευθυνόμενη Μεταλλαξογένεση.....	35
2.2.2.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης μετά από Κατευθυνόμενη Μεταλλαξογένεση.....	36
2.2.2.6 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με Εκχύλιση από Πηκτή Αγαρόζης Μετά από Ενίσχυση της Αλληλουχίας του Μεταλλαγμένου Υποκινητή.....	36
2.2.2.7 Φωσφορυλίωση DNA Άκρων με Αντίδραση Πολυνουκλεοτιδικής Κινάσης.....	36
2.2.2.8 Καθαρισμός των Προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για το Μεταλλαγμένο RECUR1 Υποκινητή.....	37
2.2.2.9 Αντίδραση Λιγάσης.....	37
2.2.2.10 Μετασηματισμός Κυττάρων DH5α με Θερμικό Σοκ.....	38
2.2.2.11 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (Mini Preparation).....	38
2.2.2.12 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Απομονωμένου Πλασμιδιακού DNA.....	39
2.2.2.13 Διαγνωστική Πέψη των Θετικά Μετασηματισμένων Κλώνων.....	40
2.2.2.14 Διαγνωστική Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης μετά από Αντίδραση Πέψης.....	40
2.2.3 Γονοτύπηση Άγριου Τύπου και Μεταλλαγμένου Τύπου Αλληλουχίας RECUR1 Υποκινητή με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence.....	40

2.2.3.1 Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	41
2.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης.....	42
2.2.3.3 Καθαρισμός των Προϊόντων Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για τον RECUR1 Υποκινητή.....	42
2.2.3.4 Διαγνωστική Πέψη Καθαρισμένων Προϊόντων Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.....	42
2.2.3.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης Μετά την Αντίδραση Πέψης.....	43
<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>44</b>
3.1 Μελέτη Έκφρασης του LncRNA RECUR1.....	44
3.2 Γονοτύπηση Άγριου Τύπου RECUR1 Υποκινητή με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence.....	44
3.3 Κατευθυνόμενη Μεταλλαξογένεση.....	46
3.3.1 Εισαγωγή του SNP Ενδιαφέροντος με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης στο RECUR1 Υποκινητή.....	46
3.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για το Πλήρες Μήκος της Αλληλουχίας του Μεταλλαγμένου RECUR1 Υποκινητή.....	47
3.3.3 Διάγνωση Θετικών Κλώνων RECUR1 Υποκινητών Μετά από Μετασχηματισμό DH5α Κυττάρων .....	48
3.3.4 Προσδιορισμός του Προσανατολισμού των Μεταλλαγμένων RECUR1 Υποκινητών Κλωνοποιημένων σε pGL410 Φορείς.....	49
3.4 Γονοτύπηση Μεταλλαγμένου Τύπου RECUR1 Υποκινητή με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence.....	50
3.5 Αλληλούχηση Μεταλλαγμένου RECUR1 Υποκινητή.....	52
<b>4. Συζήτηση.....</b>	<b>54</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>58</b>

## Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος είναι τρίτος σε ποσοστά θνησιμότητας και πέμπτος σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνος σε παγκόσμια κλίμακα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφανίζονται στην Κεντρική και Ανατολική Ασία. Η μεγαλύτερη πρόκληση του γαστρικού καρκίνου αποτελεί η έγκαιρη διάγνωσή του λόγω έλλειψης εμφανών κλινικών συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια της νόσου. Αυτό το γεγονός αποτελεί και μία από τις κύριες αιτίες των υψηλών ποσοστών θνησιμότητας που εμφανίζει ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ιστολογική και μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου σε υπότυπους, η οποία ανέδειξε υψηλή συσχέτιση μεταξύ σημειακών πολυμορφισμών (single nucleotide polymorphism, SNP) και εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αυτών των SNPs συναντώνται σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος και, συγκεκριμένα, στις μακρά μη κωδικοποιητικές περιοχές (long non-coding RNAs, lncRNAs). Η έκφραση και δράση των lncRNAs εμφανίζει μεγάλη εξειδίκευση σε ιστούς και κύτταρα και αυτό τα καθιστά υποψήφιους μοριακούς βιοδείκτες πρόγνωσης, διάγνωσης και θεραπείας. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το Regulatory Cancer Mutation lncRNA 1 (RECUR1), το οποίο συσχετίζεται με το γαστρικό καρκίνο. Με βάση μη δημοσιευμένα δεδομένα προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου, η ύπαρξη ενός συγκεκριμένου SNP στην αλληλουχία του RECUR1 υποκινητή, το οποίο αποτελεί το SNP ενδιαφέροντος (SNP of interest), φαίνεται να εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με την καρκινοειδή έκφραση του lncRNA RECUR1 στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Το lncRNA RECUR1 αποτελεί το υπό μελέτη γονίδιο της παρούσας πτυχιακής. Συγκεκριμένα, στην παρούσα πτυχιακή (α) μελετάται η υπερέκφραση του lncRNA RECUR1 σε δύο διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, μία του γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS) και μία του εμβρυϊκού νεφρού (HEK), με τεχνολογία CRISPR-activation (β) πραγματοποιείται η μεταλλαξογένεση ακριβείας του SNP ενδιαφέροντος στην αλληλουχία του υποκινητή του lncRNA RECUR1 και (γ) διεξάγεται η γονοτύπηση του άγριου τύπου και του μεταλλαγμένου τύπου του υποκινητή του RECUR1.

**Λέξεις-κλειδιά:** γαστρικός καρκίνος, μακρά μη κωδικοποιητικά RNA, RECUR1, SNP ενδιαφέροντος, κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση

## Abstract

Gastric adenocarcinoma is ranked third as a cause of cancer-related death and exhibits the fifth highest average incidence on a global level. The highest incidence and death rates of gastric cancer are exhibited in Central and East Asia. The major challenge of gastric cancer is the poor prognosis due to the lack of clinical symptoms. It is for this reason why gastric cancer exhibits high death rates. Latest studies have focused on the histological and molecular classification of gastric cancer investigating the resulting subtypes. The investigation revealed significant association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and onset or progression of gastric cancer. The highest number of SNPs occurs in non-coding regions and, specifically, in long non-coding RNAs (lncRNAs). lncRNA expression exhibits high tissue- and cancer cell-specificity. This makes them precious candidate prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers. The Regulatory Cancer Mutation lncRNA 1 (RECUR1) constitutes such a paradigm of lncRNA and seems to be highly associated with gastric cancer. According to unpublished data of our lab, there is a high association between a SNP of interest in the RECUR1 promoter sequence and the carcinogenic expression of the lncRNA RECUR1 in gastric adenocarcinoma. Thus, the lncRNA RECUR1 constitutes the gene of interest of the current study. Specifically, this study refers to three experimental steps: (a) the study of RECUR1 overexpression in two human cancer cell lines, the gastric adenocarcinoma (AGS) and the embryonic kidney (HEK), with the use of CRISPR-activation technology, (b) site-directed mutagenesis of SNP of interest in the sequence of the lncRNA RECUR1 promoter, and (c) the genotyping of the wild- and mutated-type of RECUR1 promoter.

**Keywords:** gastric cancer, long non-coding RNA, RECUR1, SNP of interest, site-directed mutagenesis



## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ασθένειες του 20<sup>ου</sup> και 21<sup>ου</sup> αιώνα, κυρίαρχος παράγοντας θνησιμότητας των ανθρώπων, με ισχυρή επίδραση στην κλινική και ψυχολογική εικόνα των ασθενών. Κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική διαίρεση, ελέγχονται από μονοπάτια σηματοδότησης τα οποία λειτουργούν ανεξέλεγκτα στα καρκινικά κύτταρα. Βασικό αίτιο όλων των τύπων καρκίνου αποτελεί ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός [1]. Η μελέτη των Hanahan και Weinberg [1] έχει καθορίσει έξι χαρακτηριστικά γνωρίσματα, τα οποία διέπουν τα καρκινικά κύτταρα και αποκτώνται διαδοχικά, καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα εξελίσσονται προοδευτικά σε νεοπλαστικές καταστάσεις. Αυτά τα έξι χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι (α) η αποφυγή της καταστολής ανάπτυξης των κυττάρων, (β) η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο (γ) η διατήρηση της ανεξέλεγκτης σηματοδότησης, (δ) η αναπαραγωγική αθανασία, (ε) η πρόκληση αγγειογένεσης και (στ) η ενεργοποίηση της κυτταρική διήθησης και μετάστασης. Αυτά τα έξι χαρακτηριστικά γνωρίσματα αποκτώνται διαδοχικά από τα καρκινικά κύτταρα, καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα εξελίσσονται προοδευτικά σε νεοπλαστικά κύτταρα. Έπειτα από δέκα χρόνια η ίδια ομάδα ερευνητών [1] πρόσθεσε στη βιβλιογραφία άλλα δύο χαρακτηριστικά γνωρίσματα που διέπουν τα καρκινικά κύτταρα, ήτοι τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού και την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης.

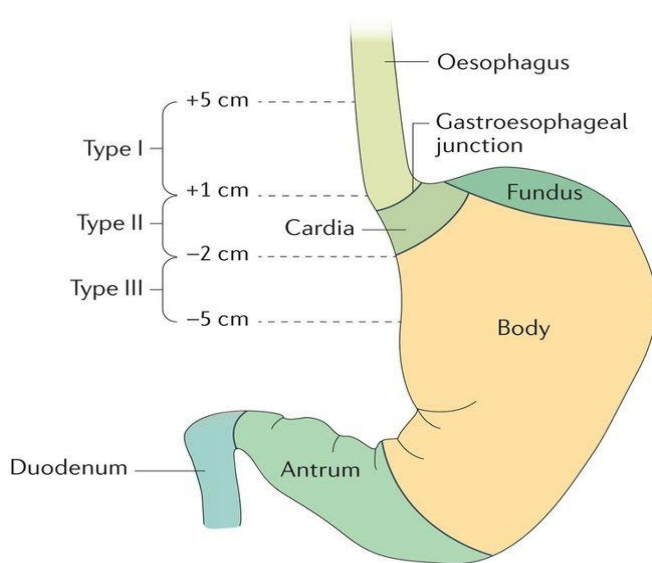
### 1.2 Γαστρικός Καρκίνος

#### 1.2.1 Ανατομία Στομάχου

Ο στόμαχος βρίσκεται μεταξύ του οισοφάγου και του λεπτού εντέρου. Αποτελεί μέρος του γαστρεντερικού συστήματος και αποτελεί το βασικό όργανο που συμμετέχει στη διαδικασία της πέψης. Ο στόμαχος αποτελείται από πέντε μέρη (βλ. Εικ. 1.1): την καρδία (cardia), το θόλο ή πυθμένα (fundus), το σώμα (body), το άντρο (antrum) και τον πυλωρό (ο πυλωρός αποτελεί μέρος του άντρου). Τα μέρη της καρδίας, του θόλου και του σώματος αποτελούν το εγγύς τμήμα του στομάχου, το οποίο συμβάλλει κατά κύριο λόγο στη διαδικασία της πέψης, ενώ τα υπόλοιπα δύο μέρη, άντρο και πυλωρός, αποτελούν το περιφερικό τμήμα του στομάχου [2]. Η γαστροοισοφαγική ή καρδιοοισοφαγική συμβολή (gastroesophageal junction) αποτελεί το σημείο επικοινωνίας του στομάχου με τον οισοφάγο. Το τοίχωμα του στομάχου αποτελείται από τέσσερις χιτώνες (από μέσα προς τα έξω): το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, το μυϊκό και τον ορογόνο. Στο τοίχωμα του στομάχου υπάρχουν οι γαστρικοί αδένες, οι οποίοι εκκρίνουν το γαστρικό υγρό, το οποίο αποτελείται από ένζυμα υπεύθυνα για τη διαδικασία της πέψης. Συνήθως, ο καρκίνος ξεκινά από τα κύτταρα αυτών των γαστρικών αδένων. Όταν ο καρκίνος ξεκινά από τα εσωτερικά στρώματα, τότε η πρόγνωσή του γίνεται πιο δύσκολη [3].

Η συχνότητα εμφάνισης των αδενοκαρκινωμάτων στο περιφερικό τμήμα του στομάχου, η οποία έχει συνδεθεί με γαστρικές λοιμώξεις προκαλούμενες από το βακτήριο *Helicobacter*

*pylori*, έχει μειωθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια στις αναπτυγμένες χώρες. Αντιθέτως, η συχνότητα εμφάνισης αδενοκαρκινωμάτων στο εγγύς τμήμα του στομάχου έχει αυξηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια [4]. Η μελέτη των Siewert και Stein [5] επιτρέπει την κατηγοριοποίηση των οισοφαγικών αδενοκαρκινωμάτων με βάση τα ανατομικά τους χαρακτηριστικά. Η κατηγοριοποίηση αυτή βοηθά στη μελέτη και στη θεραπεία των ετερογενών όγκων που βρίσκονται στην ίδια περιοχή. Οι όγκοι της γαστροοισοφαγικής συμβολής αποτελούν ένα υποσύνολο των οισοφαγικών όγκων και γι' αυτό, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη μέθοδο των Siewert και Stein [5]. Με βάση αυτή την κατηγοριοποίηση [5] τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα του εγγύς τμήματος του στομάχου διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τύπο I, II και III. Ο τύπος I περιλαμβάνει αδενοκαρκινώματα του κατώτερου οισοφάγου (βλ. Εικ. 1.1), δηλαδή της περιοχής που εκτείνεται από 1 cm έως 5 cm πάνω από τη γαστροοισοφαγική συμβολή, ενώ ο τύπος II (βλ. Εικ. 1.1) περιλαμβάνει αδενοκαρκινώματα της γαστροοισοφαγικής συμβολής, δηλαδή της περιοχής που εκτείνεται από 1 cm πάνω από τη γαστροοισοφαγική συμβολή μέχρι και 2 cm κάτω από αυτή. Τέλος, ο τύπος III (βλ. Εικ.1.1) περιλαμβάνει αδενοκαρκινώματα που βρίσκονται σε περιοχή που επεκτείνεται από 2 cm έως 5 cm κάτω από τη γαστροοισοφαγική συμβολή. Σύμφωνα με την όγδοη έκδοση της Μικτής Αμερικάνικης Επιτροπής για τον Καρκίνο (AJCC) τα αδενοκαρκινώματα τύπου I και II χαρακτηρίζονται ως καρκίνοι του οισοφάγου, ενώ το αδενοκαρκίνωμα τύπου III χαρακτηρίζεται ως γαστρικός καρκίνος και η πρόγνυσή του είναι η δυσκολότερη [6, 7].



Nature Reviews | Disease Primers

Εικόνα 1.1 Η Siewert-Stein κατηγοριοποίηση καρκίνων της γαστροοισοφαγικής περιοχής [8].

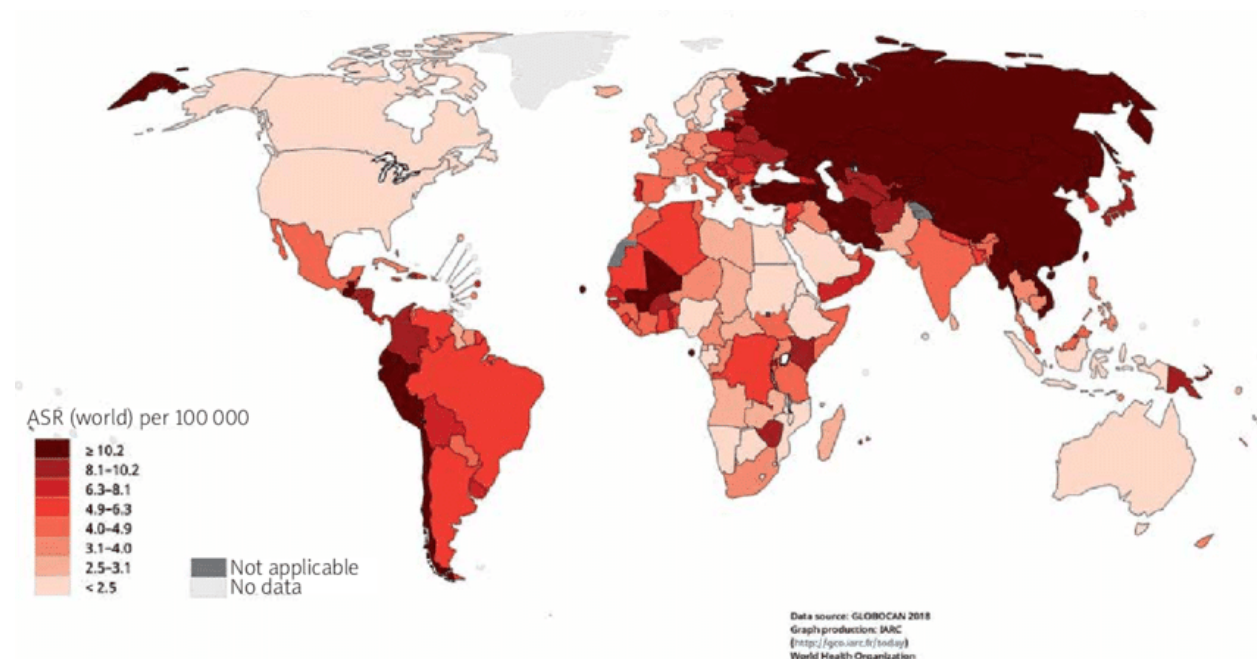
### 1.2.2 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά

Με βάση τα στοιχεία του 2018 του Παγκόσμιου Παρατηρητηρίου Καρκίνου (GLOBOCAN 2018) ο γαστρικός καρκίνος εμφανίζει υψηλή συχνότητα εμφάνισης κινδύνου και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Το έτος 2018 οι θάνατοι ανήλθαν στους 783,000 και αναφέρονται

σε μεγάλο ποσοστό σε ηλικιωμένους άντρες. Η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρδιακού καρκίνου, σε αντίθεση με αυτή του περιφερικού στόμαχου (κυρίως στο άντρο), έχει αυξηθεί επτά φορές τις τελευταίες δεκαετίες [9, 10].

Ο γαστρικός καρκίνος εμφανίζει μεγάλη γεωγραφική διακύμανση (βλ. Εικ. 1.4). Συγκεκριμένα η Ανατολική Ασία εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά συχνότητας εμφάνισης και θνησιμότητας για το γαστρικό καρκίνο και στα δύο φύλα σε παγκόσμια κλίμακα. Ακολουθεί η Δυτική Ασία, η Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη, η Νότια Αμερική, η Μελανησία και η Πολυνησία. Η Δυτική Ευρώπη εμφανίζει ενδιάμεσα ποσοστά συχνότητας εμφάνισης και θνησιμότητας γαστρικού καρκίνου, ενώ η Αφρική εμφανίζει τα χαμηλότερα ποσοστά. Ενδιαφέρον είναι ότι τα στοιχεία δείχνουν ότι τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας για του άντρες στην Ανατολική Ασία είναι μεγαλύτερα από αυτά για τις γυναίκες. Επίσης, η συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου είναι υψηλή για τους άντρες στη Δυτική Ευρώπη και χαμηλή για τις γυναίκες [10, 11].

Η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου αυξάνεται με την ηλικία. Ο γαστρικός καρκίνος εμφανίζεται στην ηλικιακή ομάδα 50-70 έτη [12]. Έχει παρατηρηθεί ότι για ανθρώπους άνω των 80 ετών, οι όγκοι είναι μεγαλύτεροι, η εμπλοκή των λεμφαδένων πιθανότερη και τα ποσοστά μετεγχειρητικών επιπλοκών και θνησιμότητας μεγαλύτερα [13].



**Εικόνα 1.4** Εκτιμώμενα ηλικιακά τυποποιημένα ποσοστά θνησιμότητας για το γαστρικό καρκίνο το 2018 (για τα δύο φύλα και για όλες τις ηλικιακές ομάδες) [9].

### 1.2.3 Διάγνωση

Η παθολογική συμπτωματολογία του γαστρικού καρκίνου είναι συνήθως ήπια ή περιορίζεται σε συνήθη καθημερινά γαστρικά ενοχλήματα. Αυτό συνήθως δεν προκαλεί υποψίες στον ασθενή με αποτέλεσμα τη μη έγκυρη διάγνωσή του [12]. Οι διαγνωστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στο γαστρικό καρκίνο περιλαμβάνουν την ενδοσκόπηση του ανώτερου πεπτικού με λήψη βιοψιών, οι οποίες προσφέρουν, εκτός από την ιστολογική απόδειξη της νόσου, εκτίμηση του μεγέθους και της μορφολογίας της νόσου [14]. Επίσης, περιλαμβάνουν την ενδοσκοπική υπερηχοτομογραφία για την εκτίμηση του βάθους διηθήσης του οργάνου, την αξονική τομογραφία για την αναζήτηση μεταστάσεων, τη μαγνητική τομογραφία και τη διαγνωστική λαπαροσκόπηση, η οποία προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες σε σύγκριση με την αξονική τομογραφία που αφορούν τη διάγνωση περιτοναϊκών μεταστάσεων και την ανίχνευση ηπατικών και λεμφαδενικών μεταστάσεων [15].

Ο γαστρικός καρκίνος εξελίσσεται ταχέως και μέσω των λεμφαδένων υπόκειται σε μετάσταση στο ήπαρ και σε γειτονικά όργανα. Ο τρόπος θεραπείας του καρκίνου εξαρτάται από το στάδιο του καρκίνου τη στιγμή της διάγνωσής του. Ασθενείς με πρώιμο στάδιο καρκίνου, το οποίο διαγιγνώσκεται στο βλεννογόνο ή τον υποβλεννογόνο του τοιχώματος του στομάχου, μπορεί να εμφανίσουν πενταετή επιβίωση σε ποσοστό 95%. Βέβαια, λόγω έλλειψης συμπτωμάτων η έγκαιρη διάγνωση δεν είναι πάντα εφικτή. Αντιθέτως, το ποσοστό των ασθενών με προχωρημένο στάδιο που εμφανίζουν πενταετή επιβίωση δεν ξεπερνά το 25%. Εξαιρέση αποτελούν οι χώρες της Ιαπωνίας και της Νότιας Κορέας, όπου εφαρμόζονται προληπτικοί έλεγχοι με τη χρήση φωτοφθορογραφίας και ενδοσκόπησης με αποτέλεσμα το ποσοστό των ασθενών με πενταετή επιβίωση να φτάνει έως και 52% [12]. Γι' αυτό η ανάπτυξη μη-επεμβατικού τύπου βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση σε μαζική κλίμακα είναι σημαντική.

### 1.2.4 Ιστολογικοί Τύποι

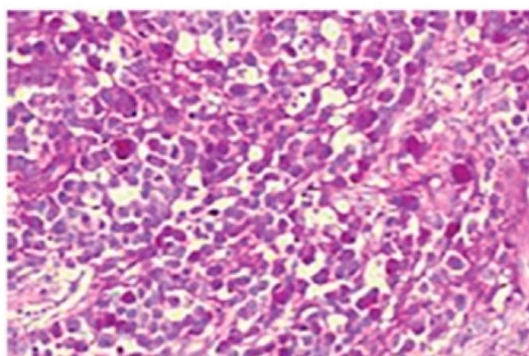
Οι κακοήθεις όγκοι του γαστρικού καρκίνου διακρίνονται σε:

- a. Αδενοκαρκινώματα
- b. Γαστρικά λεμφώματα (Non-Hodgkin λέμφωμα)
- c. Στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού
- d. Νευροενδοκρινείς όγκους

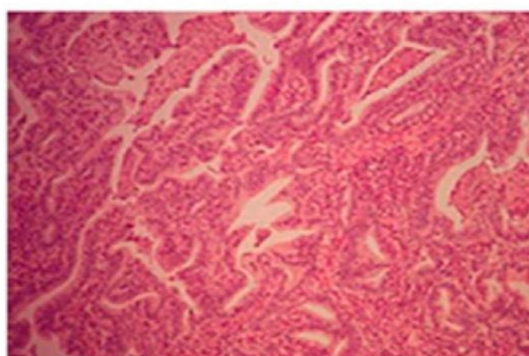
Η παρούσα εργασία εστιάζεται στους ιστολογικούς τύπους των αδενοκαρκινωμάτων, οι οποίοι αποτελούν το ~95% των περιπτώσεων όλων των καρκίνων του στομάχου και προέρχονται από τα κύτταρα της βλενογόνου (εσωτερική στοιβάδα) του στομάχου [16]. Εν

συντομία για τους υπόλοιπους τύπους γαστρικού καρκίνου, τα γαστρικά λεμφώματα (gastrointestinal stromal tumors, GIST), συνήθως μη-Hodgkin, προέρχονται από τα ανοσοποιητικά κύτταρα (B-κύτταρα) των τοιχωμάτων του στομάχου, οι στρωματικοί όγκοι γαστρεντερικού σωλήνα προέρχονται από τα διάμεσα κύτταρα των τοιχωμάτων του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ οι νευροενδοκρινείς όγκοι προέρχονται από το νευρικό ή ενδοκρινικό σύστημα του στομάχου. Οι τρεις παραπάνω τύποι γαστρικού καρκίνου αποτελούν το ~5% των περιπτώσεων όλων των καρκίνων του στομάχου [16].

#### Diffuse type carcinoma



#### Intestinal type carcinoma



**Εικόνα 1.2** Μορφολογικά χαρακτηριστικά γαστρικού αδενοκαρκινώματος διάχυτου και εντερικού τύπου [17].

Με βάση τα ιστολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, έχουν αναπτυχθεί τρία διαφορετικά συστήματα ιστοπαθολογικής ταξινόμησης των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων, τα οποία είναι τα συστήματα ταξινόμησης (α) Borrmann [18], (β) Ming [18, 19] και (γ) Lauren [18, 20]. Το ευρύτερα διαδεδομένο σύστημα ιστοπαθολογικής ταξινόμησης των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων είναι αυτό του Lauren, καθώς περιγράφει το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα για πληθυσμούς με διαφορετικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά. Το σύστημα κατά Lauren [20] χωρίζει το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα σε τρεις κατηγορίες: (α) το εντερικού τύπου αδενοκαρκίνωμα, (β) το διάχυτου τύπου αδενοκαρκίνωμα και (γ) το μικτού τύπου αδενοκαρκίνωμα. Οι διαφορετικοί αυτοί τύποι γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων δεν διαφέρουν μόνο μορφολογικά (βλ. Εικ. 1.2), αλλά

παρουσιάζουν, επίσης, γενετικές διαφορές και διαφορές στην εξέλιξη και στην κλινική εικόνα του καρκίνου.

Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα εντερικού τύπου [21] αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τύπο αδενοκαρκινώματος και αποτελεί ~54% όλων των περιπτώσεων του γαστρεντερικού αδενοκαρκινώματος. Ιστοπαθολογικά, αυτός ο τύπος αδενοκαρκινώματος παρουσιάζει κακοήγη επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν συνοχή και διαφοροποίηση και διεισδύουν σε γειτονικούς ιστούς. Η μελέτη του Correa et al. [22] περιέγραψε την αλληλουχία των προκαρκινικών αλλοιώσεων που οδηγούν στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (Εικ. 1.3). Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη [22], η κύρια αιτία για την ανάπτυξη εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματος είναι η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori*, η οποία προκαλεί φλεγμονή της βλεννογόνου του στομάχου, γνωστή ως γαστρίτιδα, και μετατρέπεται σε χρόνια μη-ατροφική γαστρίτιδα, καθώς εμφανίζει απώλεια κάποιων αδενικών στοιχείων. Τη χρόνια μη-ατροφική γαστρίτιδα ακολουθεί η εντερική μεταπλασία χαρακτηριστικό της οποίας είναι η απώλεια γαστρικών αδενών και η εμφάνιση των μεταπλαστικών αδενών. Το επόμενο στάδιο προκαρκινικής αλλοίωσης, μετά την εντερική μεταπλασία, είναι η δυσπλασία, η οποία χαρακτηρίζεται από νεοπλαστικό φαινότυπο (ακανόνιστο σχήμα και αρχιτεκτονική αδένων). Η υψηλή βαθμού δυσπλασία οδηγεί σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα [22].



**Εικόνα 1.3** Στάδια ανάπτυξης εντερικού τύπου γαστρικού αδενοκαρκινώματος.

Τέλος, το διάχυτου τύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα [21] αποτελεί το ~32% των περιπτώσεων όλων των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων και παρουσιάζει έλλειψη συνοχής και μειωμένα επίπεδα διαφοροποίησης. Οι δύο αυτοί τύποι γαστρικού αδενοκαρκινώματος, παρόλο που παρουσιάζουν διαφορετικά παθολογικά χαρακτηριστικά, αντιμετωπίζονται με τον ίδιο τρόπο σε κλινικό επίπεδο. Το μικτού τύπου γαστρικό αδενοκαρκίνωμα παρουσιάζει χαρακτηριστικά και από τους δύο τύπους γαστρικού αδενοκαρκινώματος, το εντερικό και το διάχυτο [21].

### 1.2.5 Παράγοντες Κινδύνου

Η ακριβής αιτία ανάπτυξης του γαστρικού καρκίνου δεν είναι γνωστή. Παρόλα αυτά υπάρχουν γνωστοί παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν την ανάπτυξή του. Η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* και από τον ιό Epstein-Barr (EBV) αποτελεί έως τώρα τους δύο πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου [8].

Η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* μπορεί να προκαλέσει γαστρίτιδα, η οποία πιθανότατα να οδηγήσει σε ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου. Ο ιός Epstein-Barr ή αλλιώς ανθρώπινος ερπητοϊός 4 συναντάται στα μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου, στη γλώσσα, στους σιελογόνους αδένες και στον εξωτράχηλο. Ο EBV ιός μολύνει τα Β λεμφοκύτταρα και προκαλεί τη νόσο της λοιμώδους μονοπυρήνωσης επιπλοκές της οποίας μπορεί να αποτελέσει η δημιουργία λεμφωμάτων στο στόμαχο [8].

Εκτός από τους δύο προαναφερθέντες βασικούς παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξή του, όπως για παράδειγμα διάφορες σοβαρές παθήσεις (π.χ. κακοήθης αναιμία), η ηλικία (>50), η κληρονομικότητα, οι γονιδιακές μεταλλάξεις, το κάπνισμα, η μεγάλη κατανάλωση καπνιστών και επεξεργασμένων τροφίμων, η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ κτλ. [8].

### 1.2.6 Μοριακοί Υπότυποι

Γενικά, η ασθένεια του καρκίνου χαρακτηρίζεται από υψηλή γενετική ετερογένεια. Η ετερογένεια του καρκίνου αναφέρεται στην ύπαρξη μοναδικών μοριακών μεταλλάξεων στις διαφορετικές ομάδες καρκινικών κυττάρων από τις οποίες αποτελείται ένας όγκος. Γι' αυτό η ετερογένεια του καρκίνου συμβάλλει στη δημιουργία διάφορων υπότυπων του καρκίνου. Η ετερογένεια του καρκίνου μπορεί να εμφανίζεται μεταξύ των καρκινικών κυττάρων στον ίδιο όγκο ή ακόμα και μεταξύ ασθενών που φέρουν όγκους ίδιου ιστολογικού τύπου. Η ετερογένεια του καρκίνου οφείλεται σε κληρονομικούς παράγοντες, σωματικές/επίκτητες μεταλλάξεις και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ετερογένεια του καρκίνου μπορεί να προκύψει από γενετικές, μεταγραφικές και επιγενετικές μεταλλάξεις και να επιφέρει ανάλογες μεταβολές σε μεταμεταγραφικό επίπεδο [23].

Η ερευνητική κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA) [23] πρότεινε το 2014 τη μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου σε τέσσερις υπότυπους. Η χρησιμότητα της αναγνώρισης αυτών των υποτύπων έγκειται στη μελλοντική ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών και προγνωστικών βιοδεικτών. Οι μοριακοί υπότυποι σύμφωνα με την κοινοπραξία TCGA [23] παρουσιάζονται παρακάτω:

- **Θετικός όγκος που σχετίζεται με τον ιό Epstein-Barr (EBV):** Αυτός ο μοριακός υπότυπος περιλαμβάνει τους θετικούς όγκους που σχετίζονται με τον ιό Epstein-Barr (EBV), ο οποίος προσβάλλει τα Β-λεμφοκύτταρα και συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου στο περιφερικό τμήμα του στομάχου. Αυτοί οι μοριακοί υπότυποι αποτελούν το 9% όλων των περιπτώσεων του γαστρικού καρκίνου. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο γαστρικός καρκίνος που σχετίζεται με τον ιό EBV χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταγραφή του δεξιόστροφου μεταγράφου

της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamH1-A (BamHI-A rightward transcripts, BART), χαμηλό επίπεδο πυρηνικού αντιγόνου Epstein-Barr1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1, EBNA-1) και έλλειψη της λανθάνουσας πρωτεϊνικής μεμβράνης του EBV (the latent membrane protein 1, LMP1) [23-25]. Η υψηλή μεταγραφική ιδιότητα του BamH1-A συνεισφέρει στην έκφραση των BART miRNAs, τα οποία επάγουν μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων και ογκογένεση. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό αυτού του μοριακού υποτύπου γαστρικού καρκίνου ο οποίος σχετίζεται με τον EBV είναι το υψηλό ποσοστό υπερμεθυλίωσης της νησίδας CpG στον υποκινητή του γονιδίου CDKN2A, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αναστολέα p16<sup>INK4a</sup> των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases, CDKs), η οποία δρα ως αναστολέας όγκου. Αντιθέτως, χαρακτηριστική είναι η έλλειψη της πρωτεΐνης επισκευής αναντιστοιχίας (MLH1) στα πλαίσια του μοριακού χαρακτηρισμού του φαινοτύπου μεθυλίωσης των νησίδων CpG (CpG island hypermethylation, CIMP). Επίσης, αυτός ο μοριακός υπότυπος καρκίνου εμφανίζει υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων στα γονίδια PIK3CA, ARID1A και BCOR και υψηλό ποσοστό ενίσχυσης σε αντίγραφα του γενετικού τόπου 9p24.1, ο οποίος περιέχει γονίδια για την κωδικοποίηση των πρωτεϊνών κινασών Janus 2 (Janus kinase 2, JAK2) που ενεργοποιούν ογκογόνα σηματοδότηση, καθώς και του προσδέτη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) και του προσδέτη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-2 (PD-L2) που επιτρέπουν την ανοχή του όγκου από το ανοσοποιητικό. Τα μεγάλα ποσοστά υπερμεθυλίωσης και οι γενετικές μεταλλάξεις επάγουν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αποφυγή κυτταρικού θανάτου, ανοσοδιαφυγή και αυξημένη επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση [23-25].

- **Ασταθής μικροδορυφορικός όγκος (microsatellitestability, MSI):** Αυτός ο μοριακός υπότυπος γαστρικού καρκίνου αποτελεί >10% των περιπτώσεων του γαστρικού καρκίνου και εμφανίζεται στο σώμα ή στον πυλωρό του στομάχου. Οι μικροδορυφόροι είναι βραχείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Αστάθεια προκύπτει, όταν μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επισκευή του DNA προκαλούν αλλαγή στο μήκος τους, όπως για παράδειγμα εισαγωγή ή διαγραφή ενός νουκλεοτιδίου στη μικροδορυφορική περιοχή κατά την αντιγραφή του DNA. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μικροδορυφορική αστάθεια και η διαδικασία την οποία ακολουθούν τα γονίδια για την επισκευή του DNA ονομάζεται σύστημα επισκευής νουκλεοτιδικής αναντιστοιχίας (mismatch repair system, MMR) [23, 26]. Οι ασταθείς μικροδορυφορικοί όγκοι εμφανίζουν υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων (υπερμετάλλαξη) γονιδίων ή υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη σωστή αντιγραφή του DNA. Τέτοια γονίδια είναι τα hMLH1, hMSH2, hMSH6, και hPMS2. Η υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων έχει ήδη γίνει αντικείμενο μελέτης για τη χρησιμότητά της στην ανάπτυξη βιοδεικτών στο γαστρικό καρκίνο [23, 26].



- **Γονιδιωματικά σταθερός όγκος (genomically stable, GS):** Αυτός ο μοριακός υπότυπος γαστρικού καρκίνου είναι μικροδορυφορικά σταθερός, αποτελεί το 20% των περιπτώσεων του καρκίνου και συνδέεται με το διάχυτο ιστολογικό τύπο του γαστρικού καρκίνου. Χαρακτηριστικό του GS καρκίνου αποτελούν οι μεταλλάξεις CDH1, RHOA και CDLN18-ARHGAP. Τα γονίδια CDH1 και RHOA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες διεργασίες του κυτταρικού κύκλου, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική ανάπτυξη και πολικότητα, η μετανάστευση, κτλ., ενώ τα γονίδια CDLN18-ARHGAP διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα και προσκόλληση [23, 27].
- **Όγκος με χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability, CIN):** Αποτελεί τον πιο συχνό μοριακό υπότυπο γαστρικού καρκίνου σε ποσοστό 50% των γαστρικών όγκων και συνδέεται με τον εντερικό ιστολογικό γαστρικό υπότυπο. Η χρωμοσωμική αστάθεια στον καρκίνο CIN αποτελεί μία γονιδιωματική αστάθεια, η οποία συνεπάγεται τη συχνή αλλαγή στον αριθμό των αντιγράφων των χρωμοσωμάτων [23, 28]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του CIN υπότυπου είναι η καταστολή ή αδρανοποίηση του TP53 και η ενίσχυση του σηματοδοτικού μονοπατιού των RTK/RAS. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 εξασφαλίζει την γονιδιωματική σταθερότητα, αποτρέποντας την συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων, ενώ οι πρωτεΐνες των RTKs συμβάλλουν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης. Συνεπώς, οποιαδήποτε μετάλλαξη στο γονίδιο TP53 ή στην πρωτεΐνη RTK μπορεί να επιτρέψει στα καρκινικά κύτταρα τη συσσώρευση περαιτέρω ογκοεπαγωγικών μεταλλάξεων με αποτέλεσμα την αύξηση της επιθετικότητας του καρκίνου [23, 28, 29].

### 1.3 Σημειακοί Πολυμορφισμοί

#### 1.3.1 Σημειακοί Πολυμορφισμοί στον Καρκίνο

Κάθε άνθρωπος φέρει το δικό του γονιδίωμα το οποίο μπορεί να διαφέρει από το γονιδίωμα άλλων ανθρώπων εξαιτίας των μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις μπορεί να αναφέρονται σε μία μόνο νουκλεοτιδική βάση και σε αυτή την περίπτωση η μετάλλαξη ορίζεται ως σημειακός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP) ή σε περισσότερες μεταβολές στην αλληλουχία ζευγών βάσεων του DNA. Οι άνθρωποι κατέχουν την ίδια γονιδιωματική ταυτότητα σε ποσοστό 99.5%. Το υπολειπόμενο ποσοστό της τάξης του 0.5% προέρχεται από γενετικές τροποποιήσεις και ευθύνεται για τους διαφοροτικούς φαινότυπους μεταξύ των ατόμων [30]. Τα SNPs αποτελούν τον πιο συχνό τρόπο μετάλλαξης στο ανθρώπινο γονιδίωμα, απαντώνται σε συχνότητα που υπερβαίνει το 1% του πληθυσμού και εμφανίζουν μέση πυκνότητα εμφάνισης 1 SNP ανά 100-300 βάσεις. Τα SNPs αναφέρονται σε εισαγωγή, διαγραφή ή αντικατάσταση νουκλεοτιδίων σε μία αλληλουχία DNA [31]. Οι γενετικές αυτές τροποποιήσεις μπορεί να είναι κληρονομικές ή αποτέλεσμα εξωτερικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία,

κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα κ.τ.λ. Αυτές οι γενετικές τροποποιήσεις μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να προκαλέσουν τη προδιάθεση για κάποια νόσο, όπως για παράδειγμα τον καρκίνο. Γι' αυτό το λόγο οι γενετικές τροποποιήσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί βιοδείκτες ή αλλιώς ως μοριακές υπογραφές, προκειμένου να ορίσουν την προδιάθεση ενός ατόμου σε μία ασθένεια, την έγκαιρη πρόγνωση και την βέλτιστη θεραπεία για το άτομο (εξατομικευμένη θεραπεία) [31].

Τα SNPs μπορεί να επηρεάσουν βασικές λειτουργίες ενός οργανισμού, όπως για παράδειγμα τον κυτταρικό κύκλο, το σύστημα αναντιστοιχίας του DNA, το μεταβολισμό και την ανοσολογική απόκριση. Οι αλλαγές που επιφέρουν τα SNP στα σηματοδοτικά μονοπάτια αυτών των λειτουργιών μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο. Τα SNPs βρίσκονται σε διάφορες περιοχές των γονιδίων, όπως για παράδειγμα στις ρυθμιστικές αλληλουχίες των υποκινητών, στα εξόνια, στα ιντρόνια και στις 5'-3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (untranslated regions, UTRs) [32]. Οι μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο, επηρεάζονται από τη θέση των SNPs στο γονίδιο. Συγκεκριμένα, τα SNPs στην περιοχή του υποκινητή (TATA αλληλουχία) επιφέρουν μεταβολές στη δραστηριότητα της μεταγραφικής διαδικασίας, τη δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων, τη μεθυλίωση του DNA και τις τροποποιήσεις των ιστονών [32-34]. Τα SNP στα εξόνια αλλοιώνουν την αμινοξική αλληλουχία και συχνά ενεργότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης, ενώ τα SNP στα ιντρόνια προκαλούν παραλλαγές ματίσματος των αντιγράφων και προάγουν ή διακόπτουν τη λειτουργία των μακρών μη κωδικοποιητικών RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) [32, 35]. Τα SNPs στο 5' της UTR περιοχής επηρεάζουν τη διαδικασία της μετάφρασης, ενώ τα SNP στο 3' της UTR περιοχής επηρεάζουν τη σύνδεση των miRNAs [32, 36].

Βεβαία, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η επίδραση ενός και μόνο SNP δεν είναι επαρκώς μεγάλη για τον ακριβή υπολογισμό του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου ή της πρόγνωσής τους. Τουναντίον, ένα σύνολο από SNPs είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως μοριακή υπογραφή για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Ένας από τους πιο καλά μελετημένους καρκίνους αποτελεί ο καρκίνος του μαστού, ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με 77 SNPs [37].

### **1.3.2 Σημειακοί Πολυμορφισμοί στο Γαστρικό Καρκίνο**

Η μελέτη των σημειακών πολυμορφισμών στο γαστρικό καρκίνο είναι ακόμη εν εξελίξει. Κάποια από τα SNPs, τα οποία σχετίζονται με το γαστρικό καρκίνο, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1. Το πρωτο-ογκογονίδιο FOSL1 (FOS like antigen 1), το οποίο είναι μέλος της οικογένειας παραγόντων μεταγραφής Fos) συσχετίζεται με την καρκινογένεση πολλαπλών καρκίνων. Το πρωτο-ογκογονίδιο FOSL1 και το γονίδιο JUN σχηματίζουν σύμπλοκα ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1, τα οποία επηρεάζουν βιολογικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η ογκογένεση. Η μελέτη των

Liu et al. [38] διερεύνησε τη σχέση μεταξύ επτά SNPs στο πρωτο-ογκογονίδιο FOSL1 και του γαστρικού καρκίνου στον Κινέζικο πληθυσμό. Η μελέτη εκπονήθηκε χρησιμοποιώντας 1,140 δείγματα βιοψιών και 1,547 δείγματα ελέγχου. Επανάληψη πραγματοποιήθηκε σε 1,006 δείγματα και 2,273 δείγματα ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη των δειγμάτων βιοψίας έγινε σε υποομάδες χωρισμένες με βάση την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ. Τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν ότι το SNP rs1892901 (με θέση στο 5' άκρο του γονιδίου) συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Συγκεκριμένα, το SNP rs1892901 διαταράσσει την πρόσδεση πρωτεϊνών και την έκφραση του FOSL1 και άλλων γονιδίων σχετιζόμενων με το γαστρικό καρκίνο, όπως τα γονίδια EGR1, CHD, EP300, FOS και JUN [38].

**Πίνακας 1.1** Σημειακοί πολυμορφισμοί που συνδέονται με την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου.

Σημειακοί Πολυμορφισμοί (SNP)	Γειτονικά Γονίδια	Γενετικοί Τόποι	Αλληλόμορφα	Βιβλιογραφία
rs1892901	FOSL1	11q21	G/A	[38]
rs13361707	PRKAA1	5p13.1	T/C	[39]
rs2294008	PSCA	8q24.3	C/T	[40, 41]
Rs4072037	MUC1	1q22.9	T/C	[40]
rs13361707	PRKAA1	5p13.1	T/C	[39, 40]

Ένα επιπλέον SNP που συνδέεται με το γαστρικό καρκίνο είναι το rs13361707 στο γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας άλφα-1 της πρωτεϊνικής κινάσης (protein kinase catalytic subunit alpha-1 gene, PRKAA1). Το SNP rs13361707 βρίσκεται στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου PRKAA1 στο γενετικό τόπο 5p13.1. Το γονίδιο PRKAA1 επηρεάζει τη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού. Η μελέτη Jiang et al. [39] εφάρμοσε μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης χρησιμοποιώντας στοιχεία από δεκαπέντε μελέτες, τα οποία είναι διαθέσιμα στις πηγές δεδομένων των Embase, Pubmed, Wangfang και China National Knowledge Infrastructure. Έντεκα από τις δεκαπέντε μελέτες αναφέρονται στον Κινεζικό πληθυσμό, τρεις στον Κορεατικό πληθυσμό και μία στους Ισπανόφωνους της Αμερικής. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης, η οποία εφαρμόστηκε για κάθε χώρα, έδειξαν ότι το SNP rs13361707 συμβάλλει στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου, εκτός του πληθυσμού των Ισπανόφωνων Αμερικανών [39].

Επιπλέον, μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide association study, GWAS) έχουν διεξαχθεί σε πληθυσμούς της Ανατολικής Ασίας αποδεικνύοντας ότι υπάρχουν SNPs στους γενετικούς τόπους 8q24.3 και 1q22.9 που δείχνουν υψηλή συσχέτιση

μεταξύ SNP και γαστρικού καρκίνου. Τα SNPs αυτά είναι το rs2976392 και το rs2294008 στο γενετικό τόπο 8q24.3 για το γονίδιο αντιγόνου βλαστικών κυττάρων προστάτη (Prostate Stem Cell Antigen gene, PSCA) και τα SNPs rs2075570 και rs2070803 στο γενετικό τόπο 1q22.9 για το γονίδιο βλεννίνη 1 (mucin 1 gene, MUC1) [40]. Μία επιπλέον μελέτη έδειξε ότι η αντικατάσταση της βάσης C με T στο SNP rs2294008 στο γονίδιο PSCA καταστέλλει τη μεταγραφική ιδιότητα του PSCA, καθώς συνδέεται στον υποκινητή η πρωτεΐνη καταστολέας YY1 (Yin Yang 1) [41]. Ορισμένα SNPs σχετίζονται με γαστρικά αδενοκαρκινώματα στην περιοχή της καρδιάς του στομάχου και κάποια με γαστρικά αδενοκαρκινώματα εκτός της περιοχής της καρδιάς. Για παράδειγμα, SNPs όπως το μη-συνώνυμο rs4072037 στο γενετικό τόπο 1q22, το rs9841504 στο γενετικό τόπο 3q13.31, τα rs13361707 και rs10074991 στο γενετικό τόπο 5p13.1 και το rs2294693 στο γενετικό τόπο 6p2.11 έδειξαν συσχέτιση με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα σε περιοχές του στομάχου πλην της καρδιάς. Αντιθέτως, το SNP rs2274223 στη γενετική περιοχή 10q23 για το γονίδιο PLCE1 έδειξε συσχέτιση με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα στο τμήμα του καρδίου του στομάχου. Γενικά, περαιτέρω μελέτες που έχουν διεξαχθεί στις προαναφερθείσες χρωμοσωμικές περιοχές έδειξαν ότι οι χρωμοσωμικές περιοχές 1q22, 3q13.31, 5p13.1, 6p21.1 και 8q24.3 εμφανίζουν ισχυρότερη συσχέτιση με γαστρικά αδενοκαρκινώματα που βρίσκονται εκτός του τμήματος της καρδιάς παρά εντός του τμήματος [40].

Επίσης, η μελέτη των Jang et al. [40, 42] διεξήχθη στον πληθυσμό της Νότιας Κορέας συσχετίζοντας με GWAS 551,842 SNP σε 803 περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου. Η μελέτη έδειξε ότι 38 από τα 551,842 SNP συσχετίζονται με γαστρικό καρκίνο και συγκεκριμένα το rs13361707 για το γονίδιο PRKAA1, το rs11125033 για το γονίδιο PRKCE gene και το rs1345778 για το γονίδιο PTGER4.

Γενικά, θα πρέπει να αναφερθεί ως γενικό συμπέρασμα ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των υποψηφίων SNPs, τόσο πιο έγκυρος μπορεί να είναι ένας προγνωστικός έλεγχος και τόσο πιο αποτελεσματική μπορεί να είναι μία εξατομικευμένη θεραπεία, όταν χρησιμοποιούνται τα SNPs ως βιοδείκτες στον καρκίνο [41, 42]. Ωστόσο στην πλειοψηφία τους οι παραπάνω μελέτες αφορούν συσχέτιση των SNP με την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου και όχι απόδειξη της άμεσης λειτουργικής εμπλοκής τους σε μοριακές διεργασίες που την διέπουν. Στην πλειοψηφία τους, τέτοιες συσχετίσεις προκύπτουν λόγω της παθητικής συνκληρονόμησης SNPs (passengers) με την υπαίτια μετάλλαξη (driver SNP) στον ίδιο απλότυπο. Συνεπώς η χρήση των SNP ως βιοδεικτών απαιτεί i) τον εντοπισμό και διαχωρισμό των υπαίτιων μεταλλάξεων ii) την πειραματική μελέτη τους σε λειτουργικό επίπεδο και iii) την πειραματική απόδειξη του μοριακού μηχανισμού δράσης τους στα πλαίσια της ογκογένεσης.

### 1.3.3 Μοριακές Λειτουργίες και Επιπτώσεις των Σημειακών Πολυμορφισμών σε Κωδικές και μη-Κωδικές Περιοχές

Τα SNPs εντοπίζονται σε κωδικές και μη-κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων σε όγκους ασθενών. GWAS μελέτες έδειξαν ότι σχεδόν το 90% των SNPs που σχετίζονται με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εντοπίζονται σε μη-κωδικές περιοχές, όπως για παράδειγμα σε miRNAs και μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs [43]. Τα τελευταία χρόνια τα έργα The Human Genome Project και The Cancer Genome Atlas βοήθησαν στη δημιουργία καταλόγων SNPs και μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γονιδίωμα, συνεισέφεραν στην αναγνώριση των παραλλαγών σε αλληλουχίες όγκων και καρκινικών κυττάρων και διέκριναν ποιες μεταλλάξεις έχουν άμεση σχέση με την ογκογένεση, οι οποίες ονομάζονται μεταλλάξεις-οδηγοί (driver mutations). Παρόλο αυτά, ο μηχανιστικός τους ρόλος, δηλαδή ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση, είναι ακόμα υπό διερεύνηση [30].

**Κωδικές περιοχές:** Τα SNPs σ' αυτές τις περιοχές μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία της μετάφρασης του ώριμου mRNA με αποτέλεσμα να επιφέρουν αλλαγές στην αλληλουχία των αμινικών οξέων των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή τα SNP ονομάζονται μη-συνώνυμα SNP. Τα SNP που δεν επιφέρουν αλλαγές στην αλληλουχία των αμινικών οξέων των πρωτεϊνών ονομάζονται συνώνυμα SNP. Μία συνώνυμη μετάλλαξη επηρεάζει το ρυθμό μετάφρασης ή/και το χρόνο ημιζωής του mRNA. Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των SNPs στις κωδικές περιοχές των γονιδίων είναι η επίδρασή τους στη διαδικασία της μετάφρασης [30]. Παραδείγματα τέτοιων SNPs παρουσιάζονται στον πίνακα 1.2.

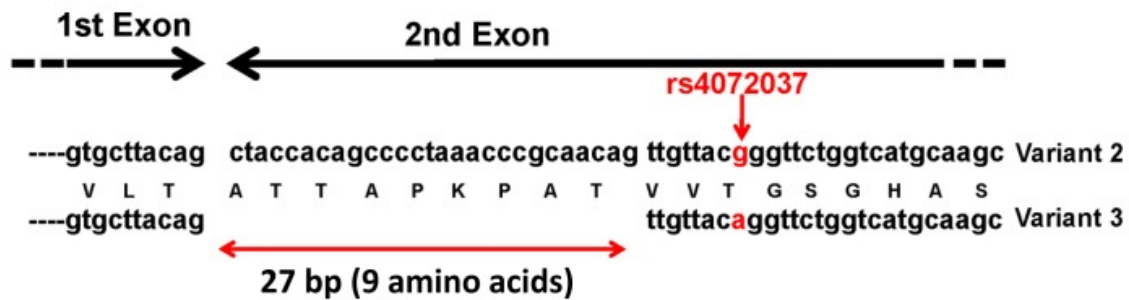
*Πίνακας 1.2 Σημειακοί πολυμορφισμοί σε κωδικές περιοχές που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκίνου.*

Σημειακοί Πολυμορφισμοί (SNP)	Γονίδια	Αλληλόμορφα	Επιρροή σε Λειτουργία	Τύπος Καρκίνου	Βιβλιογραφία
T2562G	CFTR	T/G	Ταχύτητα μετάφρασης CFTR	Εντέρου, πνεύμονα, μαστού	[38, 44]
rs4072037	MUC1	T/C	Μάτισμα	Γαστρικός-διάχυτου τύπου	[45]
rs4072037	TLR4	A/G	Αντικατάσταση αμινοξέος	Γαστρικός	[46]

Τα SNPs που βρίσκονται στο πρόδρομο mRNA (εξόνια, ιντρόνια) και στο ώριμο mRNA (5'-3' UTR) ονομάζονται δομικά SNPs (structural SNP, srRNA). Τα SNPs επηρεάζουν τη μεταφραστική απόδοση μέσω των αλλαγών που επιφέρουν στη δευτεροταγή δομή του mRNA. Τα srRNAs επηρεάζουν τη διαδικασία του ματίσματος και της μετάφρασης, τη

σταθερότητα του mRNA, την αλληλουχία των αμινοξέων και τη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ασθενειών. Η μελέτη των Kirchner et al. [44] προσδιόρισε το συνώνυμο SNP (synonymous SNP, sSNP) T2562G το οποίο τροποποιεί την ταχύτητα της τοπικής μετάφρασης του ρυθμιστή διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) προκαλώντας επιζήμιες αλλαγές στη σταθερότητα και τη λειτουργία των πρωτεϊνών [44]. Το SNP T2562G στο γονίδιο CFTR σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου εντέρου, πνεύμονα και μαστού [47]. Η τροποποίηση της ταχύτητας της μετάφρασης προκαλεί αστάθεια του γονιδίου CFTR και την εισαγωγή του κωδικονίου σύζευξης ACG (αντικατάσταση κωδικονίου Thr854-ACT με Thr854-ACG τριπλέτα) σ' ένα χαμηλής αφθονίας tRNA, το οποίο είναι σπάνιο στα ανθρώπινα βρογχικά επιθήλια, αλλά όχι στους υπόλοιπους ανθρώπινους ιστούς. Αυτό υποδηλώνει την υψηλή ιστοειδικότητα (tissue specificity) του sSNP T2562G. Το συμπέρασμα αυτής της μελέτης αναδεικνύει την επιρροή του συγκεκριμένου sSNP στην ταχύτητα της μετάφρασης του mRNA [44].

Όσον αφορά το γαστρικό καρκίνο εντερικού τύπου, η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* προάγει την έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών, οι οποίες οδηγούν σε χρόνια φλεγμονή που προσδιαθέτει για γαστρικό καρκίνο. Ο γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου προκαλείται από γενετικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στα γαστρικά βλαστικά κύτταρα ή/και επιθηλιακά πρόδρομα κύτταρα. GWAS μελέτες [45] έχουν δείξει ότι το χρωμόσωμα 1q22 σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου στον Κινέζικο, Ιαπωνικό και Νότιο Κορεάτικο πληθυσμό, καθώς περιλαμβάνει το γονίδιο MUC1), το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη βλεννίνη. Η πρωτεΐνη βλεννίνη στα φυσιολογικά κύτταρα είναι υπεύθυνη για να προστατεύει τα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου από επιβλαβείς παράγοντες, π.χ. φλεγμονές. Αντιθέτως, σε καρκινικά κύτταρα το γονίδιο MUC1 δρα ως ογκογόνο, εξαιτίας της παρουσίας των SNPs στο γονίδιο, με αποτέλεσμα να εμφανίζει μία αντι-αποπτωτική λειτουργία. Η μελέτη των Saeki et al. [45] βασίστηκε σε 85,576 SNPs χρησιμοποιώντας 188 περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου διάχυτου τύπου και 752 αναφορές και 2753 SNPs με 749 περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου διάχυτου τύπου και 750 αναφορές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 10 SNPs εμφάνισαν συσχέτιση με το γαστρικό καρκίνο στις χρωμοσωμικές περιοχές 8q24.3 και 1q22. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν SNPs στο γονίδιο αντιγόνου βλαστικών κυττάρων του προστάτη (PSCA) στη χρωμοσωμική περιοχή 8q24.3 και SNPs στο γονίδιο βλεννίνη 1 (MUC1) στη χρωμοσωμική περιοχή 1q22., τα οποία σχετίζονται με γαστρικό καρκίνο διάχυτου τύπου. Η μελέτη αυτή [45], επίσης, έδειξε ότι το SNP rs4072037 (G/A αντικατάσταση, κόκκινο βέλος, βλ. Εικ. 1.5) επάγει δύο μείζοντα μετάγραφα του MUC1 στο γαστρικό επιθήλιο (variants 2 και 3). Το SNP rs4072037 βρίσκεται στην 5' πλευρά του δεύτερου εξονίου και καθορίζει τη θέση δέκτη ματίσματος στο δεύτερο εξόνιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μεταγράφων του rs4072037, του μεταγράφου 2 (G αλληλόμορφο) και του μεταγράφου 3 (A αλληλόμορφο). Η δομική διαφορά μεταξύ των δύο μεταγράφων έγκειται στα 9 επιπλέον αμινοξέα που φέρει η παραλλαγή 2 στο εξόνιο 2 σε σχέση με το μετάγραφο 3. Τα 9 επιπλέον αμινοξέα του μεταγράφου 2 επηρεάζει το N-τερματικό πεπτίδιο σήματος και συνεπώς, και τη λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης [45].



**Εικόνα 1.5** SNP rs4072037 (G/A) σε κωδική περιοχή του γονιδίου MUC1 του γαστρικού επιθηλίου και η επίδρασή του σε περιοχή ματίσματος δημιουργώντας δύο μετάγραφα του MUC1. Το μετάγραφο 2 (variant 2) περιέχει 9 αμινοξέα περισσότερα από το μετάγραφο 3 [45].

Επιπλέον, όσον αφορά το γαστρικό καρκίνο, GWAS μελέτες έδειξαν ότι μη-κωδικά SNPs βλαστικής σειράς που εντοπίζονται σε περιοχές κωδικοποιητικών mRNAs σχετίζονται με αυτόν τον τύπο καρκίνου και επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση. Παραδείγματα τέτοιων SNPs είναι σε γονίδια κυτοκινών, τα οποία βρίσκονται συνήθως στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων και επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων και συνεπώς, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA [48]. Στην οικογένεια των κυτοκινών ανήκουν ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α, TNF) και η ιντερλευκίνη-8 και -10 (interleukin, IL-8, IL-10). Το SNP rs1799724 (C/T) στο γονίδιο του TNF-α-857, το SNP rs2227532 (T/C) στο γονίδιο του IL-8-845 και το SNP rs1800872 (C/A) στο γονίδιο του IL-10-592 εμφανίζουν συσχέτιση με κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Γενικά, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α, TNF) ανήκει στην οικογένεια των κυτοκινών και καταστέλλει την έκκριση γαστρικού οξέος στο στόμαχο, ενώ η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) είναι χημειοκίνη, η οποία επηρεάζει τη χημειοταξία, δηλαδή το μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα οδηγούνται προς την φλεγμονή. Η έκκρισή της IL-8 προκαλείται από τους πολυσακχαρίτες, τα βακτήρια και άλλους παράγοντες, όπως ο TNF-α. Η IL-10 είναι μία αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία επηρεάζει την κυτταρική απορρύθμιση, την κυτταροτοξική απόκριση και αναστέλλει το σχηματισμό προφλεγμονοδών κυτοκινών, όπως είναι ο παράγοντας TNF-α. Τα SNPs rs1799724 (C/T), rs2227532 (T/C) και IL-10-592 (C/A) στα γονίδια των TNF-α-857, IL-8-845 και IL-10-592 αντίστοιχα, επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA και την ένταση της φλεγμονώδους απόκρισης αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου [48].

Ένας επιπλέον παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου είναι η ύπαρξη των SNPs στους Toll-like υποδοχείς (TLR), οι οποίοι αποτελούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες. Η μελέτη του de Oliveira et al. [46] διερεύνησε τη γενετική ευαισθησία του γαστρικού στομάχου με τους TLR 2 και 4 και έδειξε ότι SNPs στις περιοχές των γονιδίων TLR2 (-196 έως -174 del) και TLR4 (+896 A/G rs4986790) συσχετίζονται με γαστρικό καρκίνο. Το γονίδιο TLR4 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και αποτελείται από τρία εξόνια. Η ύπαρξη του SNP (+896 A/G rs4986790) στο γονίδιο του TLR4 επιτρέπει την αντικατάσταση του Asp299Gly αμινοξέος. Αυτή η αντικατάσταση διαταράσσει τη δομή της εξωκυτταρικής περιοχής του TLR4 και επάγει μειωμένη αναγνώριση προσδέματος ή αλληλεπίδραση

πρωτεΐνης και μειωμένη ανταπόκριση σε λιποσακχαρίτη εμποδίζοντας τη μεταφορά του TLR4 στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό οδηγεί σε υπερβολική φλεγμονώδη απόκριση, πιθανότατα εξαιτίας της αποτυχίας στη διέγερση κυττάρων και στην παραγωγή της IL-10. Από την άλλη πλευρά, το TLR2 γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 και το SNP -196 έως -174 del προκαλεί τη διαγραφή 22 νουκλεοτιδίων. Αυτή η διαγραφή επιφέρει αλλαγές στην περιοχή του υποκινητή με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου [46].

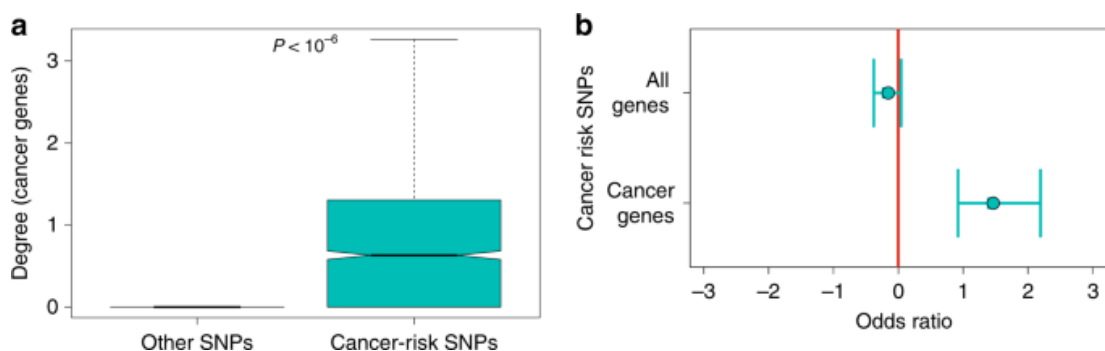
**Μη κωδικές περιοχές:** SNPs που βρίσκονται σ' αυτή την περιοχή επηρεάζουν το μάτισμα των γονιδίων, τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων, την αποικοδόμηση του mRNA ή την αλληλουχία του μη κωδικοποιητικού RNA (non-coding RNA, ncRNA) και βρίσκονται ανοδικά (upstream), εσωτερικά (intronic) καθοδικά (downstream) του γενετικού τόπου του γονιδίου. Ο αριθμός των SNPs είναι μεγαλύτερος στις μη-κωδικές περιοχές σε σχέση με τον αριθμό των SNPs στις κωδικές περιοχές, εάν και ο αριθμός των μεταλλάξεων-οδηγών που έχει ταυτοποιηθεί πειραματικά είναι μεγαλύτερος στις κωδικές περιοχές από ότι στις μη κωδικές περιοχές, λόγω ευκολίας στην μελέτη τους. Επίσης, η μη κωδική γενετική ποικιλομορφία στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την επιγενετική ρύθμιση [49]. Τα SNPs συνήθως βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου και γενικά, το 90% των ανθρώπινων ασθενειών σχετίζονται με SNPs εκτός της κωδικής περιοχής [50]. Παραδείγματα τέτοιων SNPs παρουσιάζονται στον πίνακα 1.3.

**Πίνακας 1.3** Σημειακοί πολυμορφισμοί σε μη κωδικές περιοχές που συνδέονται με την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου.

Σημειακοί Πολυμορφισμοί (SNP)	Γονίδια	Αλληλόμορφα	Τύπος Καρκίνου	Επιρροή σε Λειτουργία	Βιβλιογραφία
rs1799724	TNF-α-857	C/T	Γαστρικός	Καταστολή έκκρισης γαστρικού οξέος	[48]
rs2227532	IL-8-845	T/C	Γαστρικός	Καταστολή έκκρισης γαστρικού οξέος	[48]
rs4073	IL-8	A/T	Γαστρικός-καρδιακή μοίρα	Καταστολή έκκρισης γαστρικού οξέος	[51]
rs1800896	IL-10	A/G	Γαστρικός-καρδιακή μοίρα	Καταστολή έκκρισης γαστρικού οξέος	[51]
rs16260	CDH1	C/A	Γαστρικός-διάχυτου τύπου	Υπερμεθυλίωση DNA	[51]



Το σχήμα στην Εικόνα 1.6a [50] απεικονίζει την κατανομή των SNPs με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, τα οποία στοχεύουν ογκογονίδια και γονίδια-καταστολείς όγκου, και των υπόλοιπων SNPs (other SNPs) σε γενετικούς τόπους που ελέγχουν την έκφραση ποσοτικών χαρακτηριστικών (expression quantitative trait loci, eQTLs). Το κάθε δίκτυο eQTL οργανώθηκε σε κοινότητες, οι οποίες ομαδοποιήθηκαν σε σύνολα των SNPs και σχετικών λειτουργικών γονιδίων. Σ' αυτά τα δίκτυα eQTLs έγινε συσχέτιση των SNPs (cancer-risk SNPs και των υπολοίπων SNPs) με τα γονίδια καρκίνου λαμβάνοντας υπόψη τη σύνδεση ανισορροπίας και το συνολικό αριθμό γονιδίων με τα οποία τα SNPs συσχετίζονται. Η κατανομή στην Εικόνα 1.6a δείχνει ότι τα SNPs με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (cancer-risk SNPs) εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σε eQTL περιοχές ογκοεπαγωγικών ή κατασταλτικών γονιδίων συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια. Συνεπώς, ένας κύριος μηχανισμός δράσης τους μπορεί να είναι η μεταβολή της έκφρασης γονιδίων [50].



**Εικόνα 1.6** (α) Κατανομή των SNPs με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (cancer-risk SNPs), τα οποία στοχεύουν ογκογονίδια και γονίδια-καταστολείς όγκου, και των υπόλοιπων SNPs (other SNPs) σε δίκτυα τόπων έκφρασης ποσοτικών χαρακτηριστικών (expression quantitative trait loci, eQTLs). (β) Λόγος σχετικών πιθανοτήτων (odds ratio) για την εύρεση των SNPs με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στους υποκινητές όλων των γονιδίων [50].

Η Εικόνα 1.6b [50] δείχνει το λόγο σχετικών πιθανοτήτων (odds ratio) για την εύρεση των SNPs με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στους υποκινητές όλων των γονιδίων (καρκινικών και μη καρκινικών γονιδίων, πάνω αριστερά) και στους υποκινητές των ογκογονιδίων και των γονιδίων-καταστολέων καρκίνου (κάτω δεξιά). Τα αποτελέσματα στην Εικόνα 1.6b δείχνουν ότι τα SNPs με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανιστούν στους υποκινητές των ογκογονιδίων και των γονιδίων-καταστολέων καρκίνου παρά στους υποκινητές των υπόλοιπων γονιδίων [50].

Η διαθεσιμότητα χαρτών του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει ωθήσει αρκετές ερευνητικές ομάδες να μελετήσουν το ρόλο των SNPs στα ncRNAs. Τα ncRNAs περιλαμβάνουν τα μικρά (<200 nt) και τα μακρά ncRNAs ( $\geq 200$  nt). Τα ncRNAs περιλαμβάνουν τα miRNAs και τα μικρά πυρηνικά RNA (small nucleolar RNA, snRNAs).

Επίσης, ο καρκίνος του παχέος εντέρου συνδέεται με την εμφάνιση των SNPs σε μη κωδικές περιοχές και συγκεκριμένα στα snRNAs. Η μελέτη των Pao et al. [52] διερεύνησε τη συσχέτιση 31 κοινών SNP στα snRNAs με την επιβίωση 188 ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι δύο από τα 31 SNP, το SNP rs11614913 (CC γονότυπος) στο *Homo sapiens* (has)-miRNA-196a-2 και το SNP rs714775 (TT γονότυπος) για το small Cajal body-specific RNA (scaRNA) U85, σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Αυτά τα SNPs επηρεάζουν τη δέσμευση του miRNA και περιορίζουν την έκφραση των γονιδίων HOXA7 και HOXB8 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της AKT1 κινάσης, η οποία επάγει ογκογένεση.

Υπάρχουν επιπλέον μελέτες, οι οποίες αναφέρονται στην ύπαρξη των SNPs σε μη κωδικές περιοχές που σχετίζονται με γαστρικό καρκίνο. Συγκεκριμένα, η μελέτη των Sandoval-Bórquez et al. [51] αναφέρει ότι το SNP rs1143627 (T/C) στη θέση -31 του γονιδίου IL-1B για τον Καυκάσιο πληθυσμό επάγει αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης-1b (προφλεγμονώδη κυτοκίνη) με αποτέλεσμα την αναστολή απόκρισης γαστρικού οξέος στο στόμαχο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περιοχές του στομάχου πλην της καρδίας και σε καρκίνο του εντέρου. Αντιθέτως, το SNP rs4073 (A/T) στη θέση -251 της TSS περιοχής στο γονίδιο της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) επάγει αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης-8 με αποτέλεσμα την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου στην περιοχή της καρδίας. Κάτι αντίστοιχο ισχύει και για το SNP rs1800896 (A/G) στη θέση -1082 στο γονίδιο της ιντερλευκίνης-10. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα SNPs rs3813867 (C/G) και rs2031920 (C/T) στο γονίδιο CYP2E, το οποίο ανήκει στην υπερ-οικογένεια του κυτοχρώματος P450 και εμπλέκεται στη μεταβολική ενεργοποίηση ενώσεων μοριακού βάρους π.χ. N-νιτροζαμίνας. Επίσης, τα SNPs rs3813867 (C/G) και rs2031920 (C/T) επηρεάζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου και σε συνεργική σχέση με το ένζυμο αποτοξίνωσης (GSTM1) οδηγούν στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου. Τέλος, το SNP rs16260 στη θέση -160 (TSS περιοχή) του γονιδίου του CDH1 προκαλεί υπερμεθυλίωση του DNA και συνδέεται με γαστρικό καρκίνο διάχυτου τύπου [51].

#### **1.3.4 Συσχέτιση των SNPs με Διάγνωση και Θεραπεία στο Γαστρικό Καρκίνο-Η Σημασία τους**

Η δυνατότητα έγκυρης διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου αποτελεί μία πρόκληση, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με γαστρικό καρκίνο διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο εξαιτίας της έλλειψης συμπτωμάτων. Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα κληρονομικών ή/και επίκτητων μεταλλάξεων λόγω εξωτερικών παραγόντων ή απορυθμισμένων κυτταρικών μηχανισμών. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των μεταλλάξεων οφείλεται στα SNPs [53]. Καθορίζοντας ποια είναι τα υπαίτια SNPs για κάθε τύπο καρκίνου και τον τρόπο με τον οποίο δρουν σε μοριακό επίπεδο, αυτά τα SNPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως "μοριακές υπογραφές" ή ως βιοδείκτες όχι μόνο για τη διάγνωση, αλλά και την πρόγνωση του καρκίνου. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα SNPs εμφανίζουν υψηλή ιστοειδικότητα και κυτταροειδικότητα για αρκετούς τύπους καρκίνου λόγω επιλογής τους κατά την μικροεξέλιξη του όγκου και αυτό βοηθά στη χρήση των SNPs

ως βιοδείκτες. Αυτό, με άλλα λόγια, σημαίνει ότι το ίδιο SNP εμφανίζει διαφορετικό γονότυπο σε κάθε τύπο ιστού και κυττάρου, καθώς επηρεάζεται από το μικρο-περιβάλλον του και αυτό το γεγονός μπορεί να καθορίζει την εξέλιξη της νόσου ή την απόκριση ενός ασθενούς στη θεραπεία [54].

Απαραίτητη προϋπόθεση για τον καθορισμό ενός SNP ως υποψήφιο βιοδείκτη είναι η συσχέτισή του με τον τύπο καρκίνου που αποτελεί το στόχο της μελέτης ή με άλλα λόγια τον καθορισμό της ευαισθησίας του καρκίνου-στόχου για το συγκεκριμένο SNP. Η ανάλυση ευαισθησίας του καρκίνου-στόχου για ένα SNP γίνεται με τη μέθοδο μίας μαθηματικής διαδικασίας για ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα και συγκεκριμένα, αυτής της GWAS μετα-ανάλυσης. Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το ποιες γενετικές παραλλαγές συσχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου-στόχου [55].

Για παράδειγμα, όσον αφορά το γαστρικό καρκίνο, είναι ήδη γνωστό ότι το SNP rs1143627 (T/C) στη θέση -31 του γονιδίου IL-1B ανιχνεύεται σε *Helicobacter pylori*-θετικούς ασθενείς επάγοντας υψηλά επίπεδα έκφρασης κυτοκίνης. Αυτό στατιστικά οδηγεί σε μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης κινδύνου γαστρικής ατροφίας και γαστρικού αδενοκαρκινώματος μη-καρδιακού τύπου [51]. Επίσης, το SNP rs7712641 στο γονίδιο POLR3G εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε μη-καρδιακού τύπου γαστρικά καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με υγιή κύτταρα. Συνεπώς, το SNP rs1143627 (T/C) στη θέση -31 του γονιδίου IL-1B και το SNP rs7712641 στο γονίδιο POLR3G μπορούν να αποτελέσουν υποψήφιους βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση του γαστρικού καρκίνου μη-καρδιακού τύπου [40].

Τα γονίδια που υπερεκφράζονται εξαιτίας της ύπαρξης των SNPs μπορεί να αποτελέσουν στόχο για την ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών φαρμάκων από τα ήδη υπάρχοντα για την αντιμετώπιση του γαστρικού καρκίνου. Για παράδειγμα στους όγκους με χρωμοσωμική αστάθεια, οι οποίοι αποτελούν το 50% όλων των περιπτώσεων του γαστρικού καρκίνου και συσχετίζονται με την εντερικού τύπου ιστολογία, τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα δεν έχουν πετύχει να ρυθμίσουν τα υψηλά ποσοστά έκφρασης των γονιδίων ERBB2, EGFR και TP53 που εμφανίζονται στα καρκινικά κύτταρα του στομάχου. Υπό δοκιμή φάρμακα (cetuximab, ranitumumab, nimotuzumab και erlotinib) έχουν ήδη αναπτυχθεί με βάση τους αναστολείς των υποδοχέων για τα προ-αναφερθέντα γονίδια, τα οποία βρίσκονται στις φάσεις III (τα πρώτα δύο) και II (τα δύο τελευταία) [56].

## 1.4 Μακρά Μη Κωδικοποιητικά RNA στον Καρκίνο

### 1.4.1 Ο ρόλος των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNA στον Καρκίνο

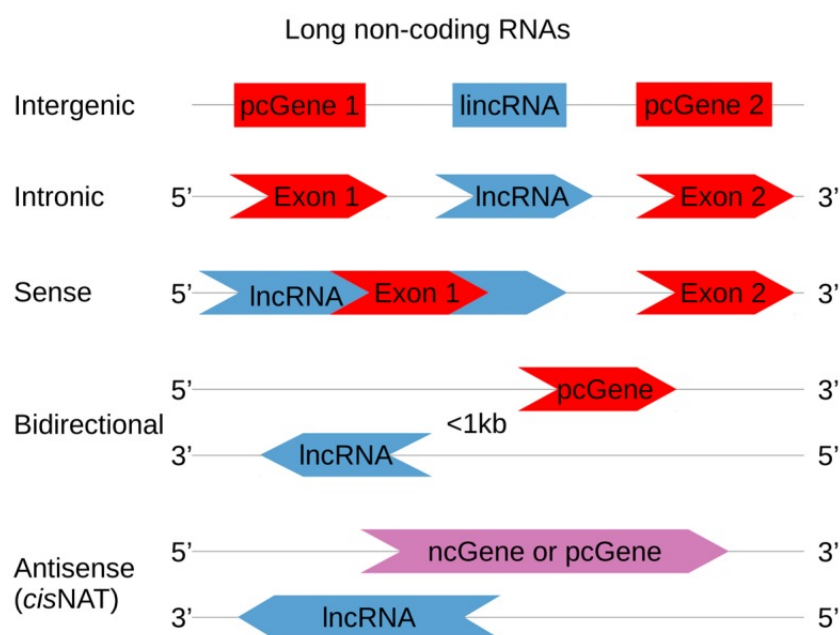
Είναι ήδη γνωστό, μέσω του "Encyclopedia of DNA Elements project (ENCODE)" ότι το 98% του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται, ενώ μόνο το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες με βάση τα κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας. Συνεπώς, το μεγαλύτερο μέρος του RNA ανήκει στο μη κωδικοποιητικό τμήμα του ανθρώπινου γονιδιώματος [57]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNA) διακρίνονται σε μικρού μεγέθους με μήκος <200 nt και μακρά με μήκος ≥200 nt. Τα περισσότερα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNA, lncRNA) εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα εξελικτικής συντήρησης σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας και αυτό περιπλέκει αφενός την ταυτοποίησή τους και αφετέρου τη μελέτη καθορισμού της λειτουργίας τους [58]. Παρόλα αυτά, η περιοχή του υποκινητή σε ένα lncRNA παρουσιάζει τον ίδιο βαθμό συντήρησης με την περιοχή του υποκινητή σε ένα γονίδιο που παράγει πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των lncRNAs είναι ότι δεν αλληλεπιδρούν μόνο με RNA, αλλά και με πρωτεΐνες και χρωματίνη. Αυτό προσδίδει μία ποικιλομορφία στο λειτουργικό τους ρόλο και καθιστά δυνατό τα lncRNAs να ρυθμίζουν είτε αρνητικά είτε θετικά τη γονιδιακή έκφραση [59]. Παρόλο που τα lncRNAs ανήκουν στη μη κωδικοποιητική περιοχή του ανθρώπινου γονιδιώματος, η μελέτη τους είναι αρκετά σημαντική, καθώς ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση [60].

Ο καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική ασθένεια και είναι ήδη γνωστό ότι τα lncRNAs συνδέονται με ογκογένεση. Γι' αυτό το λόγο η μελέτη τους είναι εξαιρετικά σημαντική προκειμένου να διαπιστωθεί η χρήση τους ως προγνωστικοί και διαγνωστικοί βιοδείκτες. Για παράδειγμα, τα lncRNAs στον καρκίνο του παχέος εντέρου δρουν ως ογκοεπαγωγείς ή ως κατασταλτικοί παράγοντες όγκων αλληλεπιδρώντας με μόρια DNA, RNA και πρωτεϊνών. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει αλλαγές στο μάτισμα και την σταθερότητα του RNA επηρεάζοντας την έκφραση του μεταγράφου. Χαρακτηριστικό lncRNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου αποτελεί το HOTAIR, το οποίο υπερεκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα, προκαλεί μεθυλίωση της ιστόνης και αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες, όπως η E-καντερίνη (E-cadherin), αποικοδόμηση της οποίας συμβάλλει στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό lncRNA του παχέος εντέρου είναι το MALAT1, το οποίο ενεργοποιεί το γονίδιο AKAP-9 και συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Το lncRNA MALAT1 συνδέεται με μεταστατικές καταστάσεις πολλών τύπων καρκίνου, όπως του καρκίνου του στόματος, του μελανώματος, του μαστού, του θυροειδούς και του πνεύμονα [61].

### 1.4.2 Ταξινόμηση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs με Βάση τη Γονιδιωματική τους θέση

Τα lncRNAs μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα, συγκριτικά με τους γενετικούς τόπους κωδικοποιητικών γονιδίων (protein-coding gene, pcGene).

Σύμφωνα με την Εικόνα 1.7 [62], τα lncRNAs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πέντε κατηγορίες. Μία από αυτές είναι τα σημαίνοντα lncRNAs (sense lncRNAs), τα οποία καθορίζονται με βάση το πλησιέστερο pcGene και αλληλοεπικαλύπτουν ένα ή περισσότερα εξόνια του pcGene. Η δεύτερη κατηγορία των lncRNAs με βάση τη γονιδιωματική τους θέση είναι τα αντι-σημαίνοντα lncRNAs (antisense lncRNAs). Τα antisense lncRNAs αλληλοεπικαλύπτονται με ένα ή περισσότερα εξόνια του pcGene ή του non-coding Gene (ncGene), αλλά μεταγράφονται με φορά αντίθετη από αυτή της μεταγραφής του mRNA. Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν τα ιντρονικά RNAs (intronic RNAs), τα οποία μεταγράφονται εξ ολοκλήρου από ιντρόνια και δεν αλληλοεπικαλύπτονται με κανένα εξόνιο, ενώ στην τέταρτη κατηγορία ανήκουν τα αμφίδρομα lncRNAs (bidirectional RNAs). Η αμφίδρομη μεταγραφή των lncRNAs ξεκινά κοντά σε ένα pcGene, το οποίο βρίσκεται σε απόσταση μικρότερη από 1kb από το lncRNA, και συνεχίζει τη μεταγραφή του με φορά αντίθετη από αυτή της μεταγραφής του pcGene. Η τελευταία κατηγορία των lncRNAs είναι τα μακρά μεσογονιδιακά (intergenic) lncRNAs, τα οποία μεταγράφονται προς και τις δύο κατευθύνσεις [62].

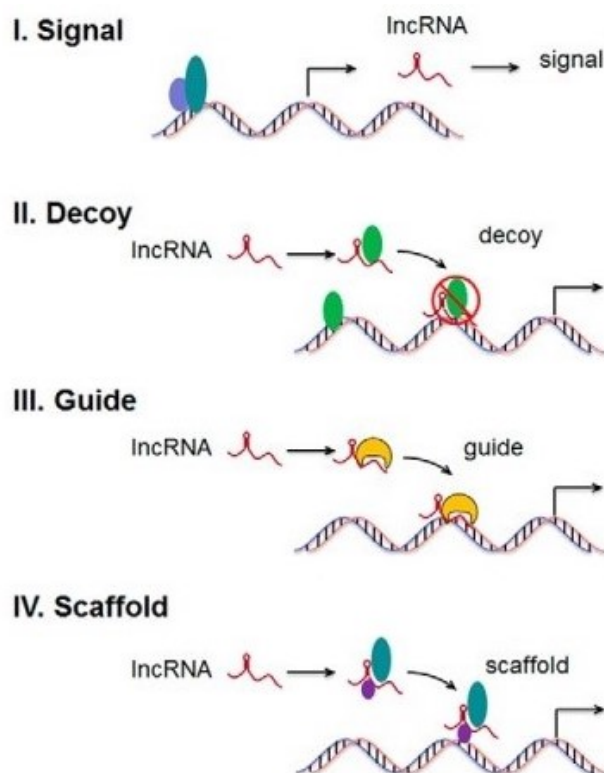


**Εικόνα 1.7** Πέντε κατηγορίες των lncRNAs με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα: μεσογονιδιακά (intergenic), ιντρονικά (intronic), σημαίνοντα (sense), αμφίδρομα (bidirectional) και αντισημαίνοντα (antisense) lncRNAs [62].

### 1.4.3 Ταξινόμηση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs με Βάση το Μηχανισμό Δράσης τους

Τα lncRNAs αλληλεπιδρούν με DNA, RNA και πρωτεΐνες. Με βάση το μηχανισμό δράσης που αφορά αυτές τις αλληλεπιδράσεις τα lncRNAs μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τα lncRNAs, τα οποία δρουν ως μόρια σήματος (signal molecule, Εικ. 1.8 I) [63]. Όπως έχει προαναφερθεί (§1.2.4), τα lncRNAs εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση σε συγκεκριμένους τύπους ιστών και κυττάρων. Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα τα lncRNAs να ανταποκρίνονται σε μοναδικά ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον τους και να λειτουργούν ως μοριακοί σηματοδότες. Η δεύτερη κατηγορία αφορά τα lncRNAs, τα οποία δρουν ως δολώματα (decoys, Εικ. 1.8 II) [63] για μεταγραφικούς παράγοντες. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπουν τους μεταγραφικούς παράγοντες να συνδεθούν σε ρυθμιστικά στοιχεία και να ενεργοποιήσουν ή να αποσιωπήσουν τη διαδικασία της μεταγραφής. Η τρίτη κατηγορία αφορά τα lncRNAs που δρουν ως οδηγοί (guides, Εικ. 1.8 III) [63]. Συγκεκριμένα, τα lncRNAs αυτής της κατηγορίας προσδένονται σε πρωτεΐνες-τελεστές, και τις κατευθύνουν σε αλληλουχίες συγκεκριμένης γονιδιωματικής περιοχής, προκειμένου να ρυθμίσει θετικά ή αρνητικά τη διαδικασία της μεταγραφής. Τέλος, η τέταρτη κατηγορία των lncRNAs αφορά τα lncRNAs που δρουν ως ικρίωματα (scaffold, Εικ. 1.8 III) [63]. Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα lncRNAs συγκεντρώνουν πρωτεΐνες-τελεστές, προκειμένου να δημιουργήσουν ένα ικρίωμα, το οποίο θα ενεργοποιήσει ή απενεργοποιήσει τη διαδικασία της μεταγραφής [63] και θα επηρεάσει την αρχιτεκτονική της χρωματίνης [64].



*Εικόνα 1.8* Τέσσερις κατηγορίες των lncRNAs με βάση το μηχανισμό δράσης τους [63].

#### 1.4.4 Ταξινόμηση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs με Βάση τον Υποκυτταρικό τους εντοπισμό

Τα lncRNAs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τον υποκυτταρικό εντοπισμό και δράση των μεταγράφων τους. Γενικά τα lncRNAs εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου δρουν ως ρυθμιστές της διαδικασίας της μεταγραφής και της δομής της χρωματίνης

και στο κυτταρόπλασμα, όπου επηρεάζουν τις μετα-μεταγραφικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα τη σταθερότητα του mRNA, και τη διαδικασία της μετάφρασης του mRNA. Οι κατηγορίες παρουσιάζονται παρακάτω με περισσότερες λεπτομέρειες ως προς την λειτουργική τους δράση:

- I. **Πυρηνικά lncRNAs:** Ένας σημαντικός αριθμός πυρηνικών lncRNAs επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση επιφέροντας αλλαγές στη δομή της χρωματίνης. Αυτό πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους, όπως (α) με την αλληλεπίδραση των lncRNAs με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη δομή της χρωματίνης ή με το Polycomb κατασταλτικό σύμπλεγμα (Polycomb repressive complex, PRC), (β) με την αποτροπή της πρόσδεσης συγκεκριμένων παραγόντων χρωματίνης σε γονιδιακού τόπους εξαιτίας των lncRNAs και (γ) με την έμμεση αλληλεπίδραση των lncRNAs με ρυθμιστές χρωματίνης μέσω πρωτεϊνών. Τα πυρηνικά lncRNAs μπορούν επίσης να δράσουν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές. Αυτό μπορεί να γίνει (α) είτε ενεργοποιώντας ή αποσιωπώντας γειτονικά γονίδια (*cis* αλληλεπίδραση) ή απομακρυσμένα γονίδια, τα οποία βρίσκονται σε άλλα χρωμοσώματα (*trans* αλληλεπίδραση), (β) είτε ρυθμίζοντας την έκφραση πολλαπλών γειτονικών γονιδίων, (γ) είτε ρυθμίζοντας την έκφραση πολλαπλών απομακρυσμένων γονιδίων που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Επίσης, τα πυρηνικά lncRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση επηρεάζοντας τη μετα-μεταγραφική διαδικασία επάγοντας αλλαγές στη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος. Τέλος τα πυρηνικά lncRNAs συμβάλλουν στην οργάνωση της δομής του κυτταρικού πυρήνα διατηρώντας συγκεκριμένους πυρηνικούς τομείς (nuclear domains, ND). Τα NDs συναντώνται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, είναι μη μεμβρανώδεις δομές χρωματίνης και είναι πλούσιες σε μοναδικά σύνολα πρωτεϊνών και RNA. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των NDs δομών είναι ότι κατακρατούν υπο-επεξεργασμένα RNAs, δεσμεύουν ορισμένες πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA (RNA-binding proteins, RBP) στον πυρήνα και συμβάλλουν στην ανοσοαπόκριση. Γνωστό πυρηνικό lncRNA που συμβάλλει στη διατήρηση των NDs είναι το lncRNA NEAT1 [60].
  
- II. **Κυτταροπλασματικά lncRNAs:** Χαρακτηριστικό παράδειγμα των κυτταροπλασματικών lncRNAs είναι τα microRNA sponges, που αφορούν μη κωδικοποιητικά κυκλικά μόρια τα οποία φέρουν πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης miRNAs στην αλληλουχία τους. Τα lncRNAs HULC και UCA1 δρουν ως microRNA sponges και, ουσιαστικά, ανταγωνίζονται τα mRNAs, προκειμένου να συνδεθούν με τα miRNAs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κάποια mRNAs να μη στοχευθούν από miRNAs και με αυτό τον τρόπο να επηρεαστεί η σταθερότητα και η έκφρασή τους [65].

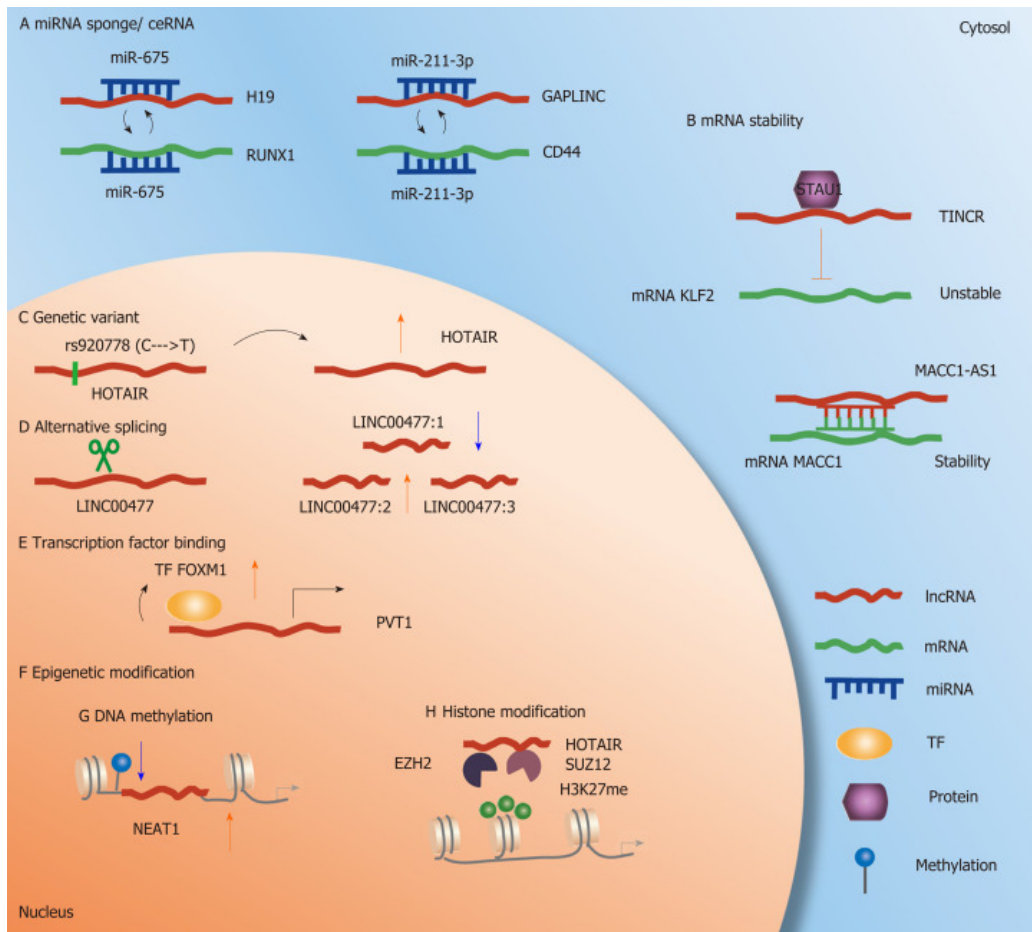
#### 1.4.5 Μοριακές Λειτουργίες και Επιπτώσεις των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNAs

Η μελέτη των Gao et al. [66] έχει περιγράψει τις μοριακές λειτουργίες χαρακτηριστικών lncRNAs που σχετίζονται με το γαστρικό καρκίνο (βλ. Εικ. 1.9 A). Πολλά lncRNAs δρουν ως miRNA sponges, τα οποία ανταγωνίζονται μόρια ενδογενούς RNA και γι' αυτό είναι γνωστά ως ανταγωνιστικά ενδογενή RNA (competing endogenous RNA, ceRNA). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα lncRNAs που δρουν ως ceRNAs να μειώνουν τον αριθμό των miRNAs που πιθανόν να στόχευαν mRNAs. Έχει αποδειχθεί ότι τα lncRNAs που δρουν ως ceRNAs συμβάλλουν στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης και προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διήθηση. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν το lncRNA H19 και το lncRNA GAPLINC, τα οποία στην περίπτωση γαστρικού καρκίνου υπερέκφραζονται. Το lncRNA H19 συσχετίζεται με το miR-675 και οι φαινοτυπικές αλλαγές στο γονίδιο RUNX1 απορρέουν από τον ανταγωνισμό του lncRNA H19 με το miR-675. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει για το lncRNA GAPLINC και το miR-211-3p, ο ανταγωνισμός των οποίων επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου CD44. Σ' αυτή την κατηγορία των lncRNAs που αλληλεπιδρούν με miRs ανήκουν τα lncRNAs ANRIL, GAS5, HOTAIR και MALAT1. Οι επιπτώσεις της υπερέκφρασης του HOTAIR δεν είναι ακόμα γνωστές, από την άλλη δε, η υπερέκφραση του ANRIL επάγει αύξηση του όγκου και διήθηση, η απορρύθμιση του GAS5 επάγει ογκογένεση, ενώ η υπερρύθμιση του MALAT1 επηρεάζει τη χημειοανθεκτικότητα [66].

Άλλη μία χαρακτηριστική λειτουργία των lncRNAs στο γαστρικό καρκίνο είναι ότι επηρεάζουν τη σταθερότητα του mRNA. Ένα παράδειγμα αποτελεί το lncRNA TINCR (βλ. Εικ. 1.9 B, το οποίο υπερεκφράζεται στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα και επηρεάζει τη σταθερότητα του KLF2 mRNA με τη σύνδεσή του στην πρωτεΐνη STAU1. Το γονίδιο KLF2 ρυθμίζει τη μεταγραφή των εξαρτώμενων από την κυκλίνη γονιδίων κινάσης CDKN1A/p21 και cdkn2b/p15 και αυτό επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των γαστρικών καρκινικών κυττάρων. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκει και το lncRNA MACC1-AS1, το οποίο ενισχύει τη σταθερότητα του MACC1 mRNA και συνεπώς προάγει τη μεταβολική σταθερότητα [66].

Επίσης, τα SNPs στα lncRNAs επάγουν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το lncRNA HOTAIR, όπου το SNP rs920778 TT (C/T) (βλ. Εικ. 1.9C) προκαλεί δυσλειτουργία του γονιδίου και αυτό επιφέρει ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου [66, 67]. Ένα επιπλέον παράδειγμα ύπαρξης SNP σε lncRNA, το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου, και συγκεκριμένα της ατροφικής γαστρίτιδας, είναι το SNP rs17694493 με GG γονότυπο στο lncRNA ANRIL και το SNP rs3200401 με γονότυπο CT του lncRNA MALAT1 [68]. Εκτός από τα SNP, η ποικιλομορφία των lncRNAs αυξάνεται, επίσης, μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος, καθώς αυτό δημιουργεί διαφορετικά μετάγραφα του lncRNA, π.χ. LINC004477 (βλ. Εικ. 1.7 D) [66, 69].





**Εικόνα 1.9** Διαφορετικές μοριακές λειτουργίες των *lncRNAs* στο γαστρικό καρκίνο. (A) Δράση των *lncRNAs* ως *miRNA sponges*, (B) Επιρροή των *lncRNAs* στη σταθερότητα του *mRNA*, (C) SNPs στα *lncRNAs*, (D) Δημιουργία διαφοροποιημένων *lncRNA* μεταγράφων μέσω εναλλακτικού ματίσματος, (E) Αλληλεπίδραση παραγόντων ιστού (TF) με *lncRNAs*, (F) Επιγενετική τροποποίηση επαγόμενη από (G) μεθυλίωση DNA και (H) τροποποίηση ιστόνης μέσω *lncRNAs* [66].

Η απορρύθμιση ενός *lncRNA*, η οποία επάγει ογκογένεση μπορεί να προκληθεί επίσης από την αλληλεπίδραση του *lncRNA* με μεταγραφικούς παράγοντες (transcription factors, TF), όπως για παράδειγμα τους παράγοντες p53 και SP1. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας TF SP1 αλληλεπιδρά με το *lncRNA* AGAP2-AS1 επάγοντας την υπερέκφρασή του στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Το γονίδιο AGAP2-AS1 αναστέλλει τον εξαρτώμενο από την κυκλίνη αναστολέα PS1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την επιδιόρθωση του DNA, και τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη καντερίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μετανάστευση των κυττάρων [66, 70]. Βέβαια, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η αλληλεπίδραση των TFs με *lncRNAs*, όπως αυτή του TF FOXM1 με το *lncRNA* PVT1 συμβάλλει θετικά στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα, καθώς σταθεροποιεί τη μεταγραφή της πρωτεΐνης FOXM1 (βλ. Εικ. 1.9 E) [66, 71].

Επιπλέον, τα lncRNAs μπορούν να επιφέρουν επιγενετικές τροποποιήσεις μέσω της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης της ιστόνης. Η μεθυλίωση του DNA αναφέρεται κυρίως σε νησίδες CpG, οι οποίες βρίσκονται εντός του υποκινητή. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση του DNA του lncRNA NEAT1, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση του lncRNA NEAT1 με το ALKBH5 (βλ. Εικ. 1.9 G), προάγει τη μετάσταση και τη διήθηση στο γαστρικό καρκίνο. Επίσης, η μεθυλίωση ιστόνης από τα lncRNAs συναντάται ως μοριακός μηχανισμός στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, το lncRNA HOTAIR προσλαμβάνει το Polycomb κατασταλακτικό σύμπλεγμα (Polycomb repressive complex, PRC), το οποίο εμπεριέχει το ένζυμο EZH2. Το lncRNA HOTAIR αλληλεπιδρά με το ένζυμο EZH2 του PRC συμπλέγματος, προκαλώντας μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη (H3K27me) (βλ. Εικ. 1.9 H) [66].

Βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα προαναφερθέντα lncRNAs συμβάλλουν στην ανάπτυξη και άλλων τύπων καρκίνου πλην του γαστρικού. Για παράδειγμα, τα lncRNAs HOTAIR και MALAT1 συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου, ενώ το lncRNA MALAT1 συμβάλλει επίσης στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Τέλος, το lncRNA NEAT1 συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, ενώ το lncRNA ALKB5 συμβάλλει στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και το lncRNA ANRIL συμβάλλει στην ανάπτυξη του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

#### **1.4.6 Μακρά Μη Κωδικοποιητικά RNAs στη Διάγνωση και στη Θεραπεία του Γαστρικού Καρκίνου**

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στο γαστρικό καρκίνο είναι η αδυναμία πρόγνωσης και η μη έγκυρη διάγνωσή του εξαιτίας της έλλειψης κλινικών συμπτωμάτων. Τα lncRNAs και συγκεκριμένα ο συνδυασμός διαφορετικών lncRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την πρόγνωση, τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου, καθώς εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση στους ιστούς και ανιχνεύονται στα σωματικά υγρά, όπως το πλάσμα και τα ούρα. Με βάση το τελευταίο χαρακτηριστικό τους πρέπει να τονιστεί ότι τα lncRNAs μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μη-επεμβατικοί μοριακοί δείκτες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το lncRNA H19 το οποίο βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο πλάσμα των ασθενών με γαστρικό καρκίνο, ο οποίος βρίσκεται σε πρώιμα στάδια [72, 73].

Η χημειοθεραπεία και οι χειρουργικές επεμβάσεις αποτελούν τις κύριες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου. Η μεγάλη πρόκληση στη θεραπεία του καρκίνου με τη χρήση φαρμάκων για τη χημειοθεραπεία είναι η ανθεκτικότητα που εμφανίζει ο όγκος στα φάρμακα. Αυτό επάγει τη μείωση της απόδοσης της θεραπείας. Έχει διαπιστωθεί ότι τα lncRNAs στις περισσότερες περιπτώσεις συμβάλλουν στην αύξηση της ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία. Για παράδειγμα, το lncRNA ANRIL υπερεκφράστηκε στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα BGC823, τα οποία εμφανίζουν υψηλή ανθεκτικότητα στο φάρμακο χημειοθεραπείας 5-FU. Ένα ακόμη παρόμοιο παράδειγμα αποτελεί το lncRNA ZFAS1, το

οποίο εμφανίζει υψηλή ανθεκτικότητα στο φάρμακο PTX στα γαστρικά κύτταρα SGC7901, καθώς μεταβάλλει τις εκφράσεις των δεικτών της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (E- και N-καντερίνη και βιμεντίνη) και των πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (κυκλίνη-D1, -E και -B1) [74]. Από την άλλη δε, τα lncRNAs μπορεί να αυξήσουν την ευαισθησία των φαρμάκων στο γαστρικό καρκίνο. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το lncRNA D63785, το οποίο επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και τη διήθηση. Η σίγηση του lncRNA D63785, το οποίο αλληλεπιδρά με το miR-422 καθιστά τα γαστρικά καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στο φάρμακο της δοξορουβικίνης, το οποίο χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία [66].

Η στοχευμένη μοριακή θεραπεία με βάση το RNA αποτελεί ένα καινοτόμο πεδίο έρευνας όσον αφορά τη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου, η οποία βασίζεται στην υψηλή εξειδίκευση του θεραπευτικού στόχου-μορίου, δηλαδή των lncRNAs. Η εφαρμογή των lncRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι είναι ακόμα υπό διερεύνηση και δεν έχει ακόμα εφαρμοστεί σε κλινικό επίπεδο. Για παράδειγμα τα lncRNAs HOTAIR, TINCR και HULC υπερεκφράζονται στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Το lncRNA HOTAIR επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την απόπτωση, το lncRNA TINCR επάγει ογκογένεση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό και το lncRNA HULC επάγει απόπτωση. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CRISPR-Cas9, οι ρυθμιστικές λειτουργίες των lncRNAs μπορεί να τροποποιηθούν και συγκεκριμένα, για τα lncRNAs HOTAIR, TINCR και HULC να επιτευχθεί η σίγησή τους. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετάστασης και της απόπτωσης που προκαλούν τα συγκεκριμένα lncRNAs [66, 72]. Γενικά, το σύστημα CRISPR-Cas9 χρησιμοποιεί ένα μόριο RNA ως οδηγό (single-guide RNA, sgRNA), ο οποίος κατευθύνει την Cas9 πρωτεΐνη στην αλληλουχία-στόχο και σε συνδυασμό με μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι προσδένονται στην πρωτεΐνη Cas9, επιτυγχάνεται η σίγηση ενός γονιδίου [75]. Συνεπώς, η χρησιμότητα του CRISPR-Cas9 ως θεραπευτικό εργαλείο είναι αξιοσημείωτη [66, 72].

## Σκοπός

Τα lncRNAs χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση σε ιστούς και κύτταρα. Τα SNPs των lncRNAs και, συγκεκριμένα, αυτά στην περιοχή του υποκινητή, ο οποίος εισάγει τη διαδικασία της μεταγραφής των lncRNAs, έχουν συσχετιστεί με σημαντικό αριθμό τύπων καρκίνου. Ο βιολογικός αντίκτυπος των lncRNAs είναι ήδη γνωστός, εν αντιθέσει με το μηχανιστικό τους ρόλο στη δημιουργία και στην εξέλιξη του καρκίνου.

Η παρούσα εργασία βασίστηκε σε μη δημοσιευμένα βιοπληροφορικά δεδομένα προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου, τα οποία έδειξαν ότι η έκφραση του Regulatory Cancer Mutation lncRNA 1 (RECUR1) αυξορρυθμίζεται στο γαστρικό καρκίνο εξαιτίας ενός συγκεκριμένου SNP στην περιοχή του υποκινητή του RECUR1, το οποίο αποτελεί το SNP ενδιαφέροντος (SNP of interest). Συγκεκριμένα, τα δεδομένα βιοπληροφορικής ανάλυσης, πάνω στα οποία στηρίχθηκε η παρούσα εργασία, έδειξαν ότι το SNP ενδιαφέροντος επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση του RECUR1. Επιπλέον, το συγκεκριμένο SNP συμπίπτει με τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me3 και H3K27Ac ιστόνης φανερώνοντας τον εντοπισμό του σε ευχρωματίνη. Η μεταγραφική ανάλυση εφαρμόστηκε σε 1029 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, οι οποίες απομονώθηκαν από 559 δείγματα βιοψίας. Τα δεδομένα έδειξαν ότι το προφίλ έκφρασης του RECUR1 είναι χαμηλό σε φυσιολογικά και προ-καρκινικά κύτταρα, αλλά υψηλό σε καρκινικά κύτταρα. Πρέπει να τονιστεί εδώ, ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του lncRNA RECUR1 σε καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλή συχνότητα του αλληλόμορφου του SNP ενδιαφέροντος.

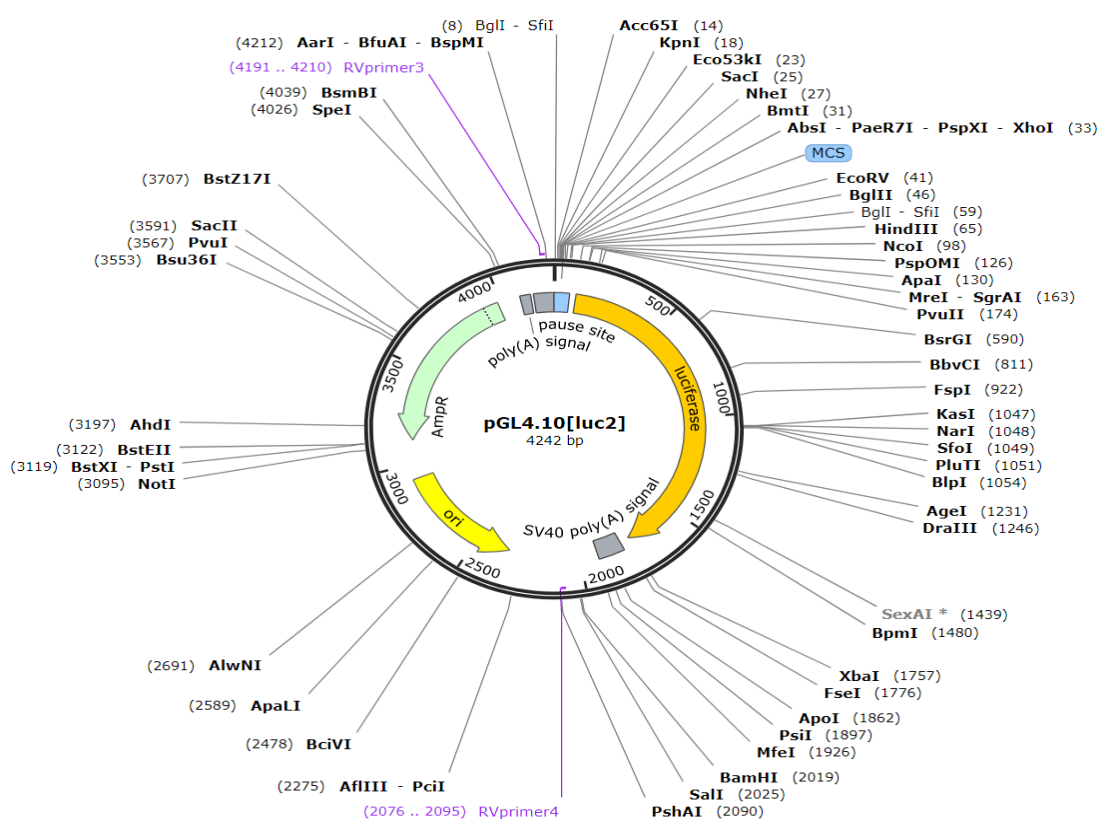
Το SNP ενδιαφέροντος στον υποκινητή του RECUR1, το οποίο φαίνεται να συσχετίζεται με την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου, αποτελεί το υπό μελέτη δείγμα της παρούσας πτυχιακής. Ο ρόλος του SNP ενδιαφέροντος στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου παραμένει ακόμα άγνωστος. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η επιτυχής μεταλλαγή του SNP ενδιαφέροντος στην αλληλουχία του RECUR1 υποκινητή με τη μέθοδο της PCR μέσω της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (site directed mutagenesis, SDM) καθώς και η κλωνοποίηση του υποκινητή με το μεταλλαγμένο ή το φυσιολογικό αλληλόμορφο σε πλασμιδιακούς φορείς λουσιφεράσης με στόχο την μελλοντική μελέτη του ρυθμιστικού τους ρόλου. Η γονοτύπηση της άγριου τύπου (wild type) και μεταλλαγμένου τύπου (mutated type) αλληλουχίας του RECUR1 υποκινητή καθορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS). Επίσης, σκοπό της παρούσας πτυχιακής αποτέλεσε η μελέτη της υπερέκφρασης του lncRNA RECUR1, σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, μία του γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS) και μία του εμβρυϊκού νεφρού (HEK), με τη διεξαγωγή πειραμάτων ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (quantitative PCR, qPCR) έπειτα από επιτυχή *cis* υπερέκφραση με τεχνολογία CRISPR-activation.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Πλασμιδιακοί Φορείς

Η ενσωμάτωση της αλληλουχίας-στόχου του υποκινητή RECUR1 με το μεταλλαγμένο SNP αλληλόμορφο έγινε στον πλασμιδιακό φορέα pGL410 μεγέθους 4242 bp (βλ. Εικ. 2.1, multiple cloning site, MCS). Η διαδικασία κλωνοποίησης είναι η ίδια είτε για το αλληλόμορφο άγριου τύπου είτε για το αλληλόμορφο μεταλλαγμένου τύπου. Γενικά, το pGL410 πλασμίδιο είναι κατάλληλο για μελέτη της ενεργότητας υποκινητών μέσω έκφρασης του γονιδίου ανταποκριτή της λουσιφεράσης (βλ. Εικ. 2.1) που έχει βελτιστοποιηθεί για την έκφραση σε θηλαστικά. Ο κλωνοποιημένος υποκινητής μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης ενεργοποιεί τη μεταγραφή του και ξεκινά να παράγει το ένζυμο της λουσιφεράσης, το οποίο μετατρέπει το υπόστρωμά του (λουσιφερίνη) σε οξυλουσιφερίνη οδηγώντας στην εκπομπή χημειοφωταύγειας. Η ένταση της χημειοφωταύγειας αναδεικνύει την ενεργότητα του κλωνοποιημένου υποκινητή στο πλασμίδιο pGL410. Ένα σήμα πολυαδενυλίωσης του ιού SV40 επιτρέπει τον τερματισμό της μεταγραφής. Το γονίδιο AmpR (βλ. Εικ. 2.1) προσδίδει στο πλασμίδιο ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη και με αυτό τον τρόπο μπορεί να σχηματίσει αποικίες σε περίπτωση που εκτεθεί σε θρεπτικό υλικό LB άγαρ.



Εικόνα 2.1 Πλασμιδιακός χάρτης του pGL410 ([SnapGene](https://www.snapgene.com), [pGL4.10\[luc2\] Sequence and Map \(snapgene.com\)](https://www.snapgene.com/sequence-and-map))

### 2.1.2 Κυτταρικές Σειρές

Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι:

- ✓ AGS: κύτταρα πρωτεύοντος γαστρικού αδενοκαρκινώματος, που εξελίσσονται σε διηθητικούς όγκους κατά την ξενογραφία σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια σε διάστημα έως και 4 εβδομάδων και δεν εμφανίζουν ένδειξη μετάστασης [76].
- ✓ HEK: αθανατοποιημένα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα εμβρυϊκού νεφρού

### 2.1.3 Βακτηριακά Στελέχη

Για τον χημικό μετασχηματισμό του πλασμιδιακού φορέα pGL410 με ένθεμα τον υποκινητή με και χωρίς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5α.

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Μελέτη της Έκφρασης του RECUR1 Υποκινητή

#### 2.2.1.1 CRISPR/dead Cas9

Η μέθοδος CRISPR/dCas9 χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του lncRNA RECUR1. Συγκεκριμένα, στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια pLVU6, τα οποία περιλαμβάνουν το sgRNA. Η έκφραση του sgRNA ρυθμίζεται από τον υποκινητή πολυμεράσης III, το U6, που βρίσκεται στο πλασμίδιο pLVU6. Το sgRNA κατευθύνει την πρωτεΐνη dCas9 στην αλληλουχία-στόχο του RECUR1 υποκινητή και σε συνδυασμό με την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στην αλληλουχία του υποκινητή ενεργοποιείται η μεταγραφή του RECUR1. Οι πλασμιδιακοί φορείς pLVU6 εισήχθησαν στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές AGS και HEK, με διαμόλυνση λεντιών-το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε από έμπειρα μέλη του εργαστηρίου για λόγους ασφαλείας συνεπώς δεν αναφέρεται εκτενώς.

#### 2.2.1.2 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Έπειτα από την επιτυχή διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων με το σύστημα CRISPR-a έναντι του υποκινητή RECUR1, τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA RECUR1 μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative PCR, qPCR). Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA από τις AGS και HEK ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με τριζόλη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MRC) Το απομονωμένο RNA μετατράπηκε σε cDNA με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε qPCR πειράματα. Το RPLP1 χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο κανονικοποίησης για τα qPCR πειράματα. Τα cDNA εκμαγεία με όγκο 4 μl φορτώθηκαν σε αποστειρωμένους qPCR σωλήνες των 0.2 ml. 16 μl

αραιωμένου 2x SYBRGREEN qPCR master mix (KAPA) προστέθηκαν στους qPCR σωλήνες ρυθμίζοντας τον τελικό όγκο των υπό μελέτη δειγμάτων στα 20 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του 16 μl qPCR master mix και οι σχετικές πειραματικές συνθήκες περιγράφονται στους πίνακες 2.1 και 2.2, αντίστοιχα. Τα κανονικοποιημένα αποτελέσματα συγκρίθηκαν έναντι του πλασμιδιακού φορέα pLVU6 χωρίς εισαγμένο sgRNA που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Το λογισμικό Bio-Rad CFX χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση δεδομένων και η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε με βάση τη μέθοδο  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ , όπου το  $C_q$  είναι ο κύκλος ποσοτικοποίησης (Livak et al., 2001).

**Πίνακας 2.1** Απαιτούμενος όγκος αντιδραστηρίων για την προετοιμασία του qPCR master mix για τα lncRNA RECUR1 και RPLP1.

Reagents	V (μl)
KAPA SYBR Mix (2x)	10
WFI	4
Forward and Reverse RECUR1 and RPLP1 qPCR primers	2
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>16</b>

**Πίνακας 2.2** qPCR πειραματικές συνθήκες. Ο τελικός όγκος δείγματος ορίστηκε στα 20 μl, ενώ οι όγκοι του cDNA εκμαγείου και του qPCR master mix ορίστηκαν στα 4 μl και 16 μl, αντίστοιχα.

Steps	Temperature °C (Duration of Steps)
1: incubation	95 °C (5 min)
2: denaturation	95 °C (20 sec)
3: primer annealing	58 °C (20 sec)
4 : extension	72 °C (15 sec)
5: GOTO (additional cycles)	44
6: melting curve	55 °C-95 °C (5 sec), 0.05 °C increment
7: end	12 °C (infinity)

## 2.2.2 Εισαγωγή Σημειακής Μετάλλαξης με τη μέθοδο Κατευθυνόμενης Μεταλλαξογένεσης με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

### 2.2.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Το πλασμίδιο pGL410 με ένθεμα την αλληλουχία-στόχο του lncRNA RECUR1 υπέστη σημειακή μετάλλαξη μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (site-directed mutagenesis, SDM) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Η μεταλλαξογένεση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο ζευγών εκκινητών (primers 1 & 2) και συγκεκριμένα του ανάστροφου εκκινητή 1 και του εμπρόσθιου εκκινητή 2 (βλ. Εικ. 2.2). Ως DNA εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ο κλωνοποιημένος υποκινητής του RECUR1 σε πλασμιδιακό φορέα pGL410 με όγκο 1 μl και συγκέντρωση 10 μg/μl. Το DNA εκμαγείο φορτώθηκε σε αποστειρωμένους PCR σωλήνες των 0.2 ml και 49 μl master mix προστέθηκε στους PCR σωλήνες φθάνοντας τον τελικό όγκο στα 50 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 49 μl master mix και οι σχετικές πειραματικές PCR συνθήκες περιγράφονται στους Πίνακες 2.3 και 2.4, αντίστοιχα.



**Εικόνα 2.2 Παράδειγμα** σημειακής μετάλλαξης με PCR μέσω SDM. Έγινε χρήση δύο σετ εκκινητών, 1 και 2 (primers 1 and 2) και η μεταλλαξογένεση πραγματοποιήθηκε με τον ανάστροφο εκκινητή 1 και τον εμπρόσθιο εκκινητή 2. (Τροποποίηση από Sigma Aldrich, [Cloning Protocol for the Gene-of-Interest into a Plasmid Vector | Sigma-Aldrich](#))



**Πίνακας 2.3** Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την προετοιμασία του PCR master mix για DNA εκμαγείο του RECUR1 υποκινητή κλωνοποιημένου σε pGL410 φορείς, προκειμένου να επιτευχθεί η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση.

Reagents	V (μl)
WFI	34.75
Q5 Buffer (x5)	10.0
10 mM dNTPs (Thermo Scientific)	1.0
Primers: RECUR1_Prom F1 and Recur1_Prom_SDM_R1 (Eurofins Genomic)	1.5
Primers: Recur1_Prom_SDM_F1 and RECUR1_Prom R1 (Eurofins Genomic)	1.5
Q5 Polymerase 5U/μl (Biosystems)	0.25
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>49.0</b>

**Πίνακας 2.4** PCR Πειραματικές συνθήκες για DNA εκμαγείο του RECUR1 υποκινητή κλωνοποιημένου σε φορέα pGL410, προκειμένου να επιτευχθεί η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση. Ο τελικός όγκος δείγματος ορίστηκε στα 50 μl, ενώ ο όγκος του DNA εκμαγείου ορίστηκε στα 1 μl με τελική συγκέντρωση 10 μg/μl.

Steps	Temperature °C (Duration of Steps )
1: incubation	98 °C (30 sec)
2: denaturation	98 °C (10 sec)
3: primer annealing	60 °C (10 sec)
4 : extension	72 °C (20 sec)
5: GOTO (additional cycles)	14
6: incubation	72 °C (2 min)
7: end	12 °C (infinity)

#### 2.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόστηκε στα δείγματα που μελετήθηκαν, προκειμένου να επαληθευτεί ότι η μεταλλαγμένη αλληλουχία-στόχος του υποκινητή RECUR1, πράγματι, ενισχύθηκε με PCR. Το πρώτο βήμα ήταν η παρασκευή 1.0% w/v διαλύματος αγαρόζης με τελικό όγκο 150 ml. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα TBE (0.5x). Το διάλυμα αγαρόζης θερμάνθηκε σε ένα φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύονταν κάθε φορά που σχηματίζονταν φυσαλίδες. Αυτό το στάδιο επαναλήφθηκε έως

όπου το διάλυμα αγαρόζης έγινε διαφανές. Στη συνέχεια, αφού το διάλυμα αγαρόζης κρύωσε, προστέθηκαν σ' αυτό 15 µl EtBr (10 mg/ml). Το διάλυμα αγαρόζης φορτώθηκε σε ένα ειδικό καλούπι για ηλεκτροφόρηση (συνοδευόμενο από ένα χτενάκι πηκτής) και το διάλυμα αγαρόζης εξισορροπήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 min πριν από την εξέταση του, προκειμένου να επιτευχθεί η πήξη του διαλύματος.

3 µl gel loading dye, purple (6x) (New England BioLabs) αναμίχθηκαν με 5 µl ενισχυμένων με PCR υποκινητών RECUR1 (§2.2.2.1) και 10 µl ενέσιμου νερού (WFI). Τα αναμειγμένα δείγματα και ένας 100 bp ladder φορτώθηκαν στα πηγάδια της πηκτής. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης γέλης αγαρόζης DNA πραγματοποιήθηκε σε TBE (0.5x) διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου με την τάση να έχει ρυθμιστεί στα 120 V-130 V.

Οι τιμές του μοριακού βάρους (MW) προσδιορίστηκαν από το Origin Pro 2021, Gel Molecular Weight Analyzer App).

### **2.2.2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με Εκχύλιση από Πηκτή Αγαρόζης**

Η διαδικασία απομόνωσης DNA με εκχύλιση από 1% w/v πηκτή αγαρόζης εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στο NucleoSpin® Gel, PCR Clean-up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel. Συγκεκριμένα, τα DNA θραύσματα των μεταλλαγμένων RECUR1 υποκινητών αποκόπηκαν από την 1% w/v πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιώντας ένα νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε έναν καθαρό erpendorf σωλήνα. Τα βάρη των θραυσμάτων προσδιορίστηκαν και για κάθε 100 mg της πηκτής αγαρόζης με συγκέντρωση 1% w/v προστέθηκαν 200 µl NT ρυθμιστικού διαλύματος. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NucleoSpin® II στήλη, η οποία ήταν τοποθετούμενη σε σωλήνα συλλογής (2 mL). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 11,000 rpm για 1 min. Το διερχόμενο από τη στήλη διάλυμα (flow-through) απορρίφθηκε. Οι μεμβράνες της στήλης πλύθηκαν με προσθήκη 700 µL NT3 ρυθμιστικού διαλύματος και φυγοκεντρήθηκαν στα 11,000 rpm για 1 min. Το διερχόμενο από τη στήλη διάλυμα απορρίφθηκε. Η τελευταία διαδικασία (πλύση) επαναλήφθηκε δύο φορές, προκειμένου να μειωθεί η ποσότητα χαστροπικών αλάτων. Οι μεμβράνες της στήλης στέγνωσαν με φυγοκέντρηση στα 11,000 rpm για 2 min, προκειμένου να απομακρυνθεί το υπόλοιπο ρυθμιστικό NT3. Οι Nucleospin στήλες τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες φυγοκέντρησης των 1.5 ml και η έκλουση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 22 µL NE ρυθμιστικού στη στήλη. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκεντρήθηκαν στα 11,000 rpm για 1 min.

#### 2.2.2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης μετά από Κατευθυνόμενη Μεταλλαξογένεση

Τα δύο απομονωμένα DNA δείγματα με εκχύλιση από πηκτή αγαρόζης αναμίχθηκαν, προκειμένου να φτιάξουν δύο δείγματα των 20 μl. 20 μl του κάθε μικτού δείγματος φορτώθηκαν ως DNA εκμαγείο σε αποστειρωμένους PCR σωλήνες των 0.2 ml. 48 μl PCR master mix προστέθηκαν στους PCR σωλήνες ρυθμίζοντας τον τελικό όγκο του δείγματος στα 50 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 48 μl PCR master mix και οι σχετικές PCR πειραματικές συνθήκες περιγράφονται στους Πίνακες 2.5 και 2.6, αντίστοιχα.

**Πίνακας 2.5** Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την προετοιμασία του PCR master mix για τους υπό μελέτη μεταλλαγμένους RECUR1 υποκινητές.

Reagents	V (μl)
WFI	33.75
Q5 Buffer (x5)	10.0
10 mM dNTPs (Thermo Scientific)	1.0
Primers: RECUR1_Prom F1 (Eurofins Genomic)	1.5
Primers: RECUR1_Prom F1 (Eurofins Genomic)	1.5
Q5 Polymerase 5U/μl (Biosystems)	0.25
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>48.0</b>

**Πίνακας 2.6** Πειραματικές συνθήκες PCR για μεταλλαγμένους RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένους σε φορείς pGL410. Ο όγκος του DNA εκμαγείου ορίστηκε στα 2 μl, ενώ ο τελικός όγκος του δείγματος ρυθμίστηκε στα 50 μl.

Steps	Temperature °C (Duration of Steps )
1: incubation	98 °C (2 min)
2: denaturation	98 °C (1 sec)
3: primer annealing	60 °C (30 sec)
4 : extension	72 °C (45 min)
5: GOTO (additional cycles)	24
6: incubation	72 °C (2 min)
7: end	12 °C (infinity)

#### **2.2.2.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης μετά από Κατευθυνόμενη Μεταλλαξογένεση**

Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης 1.0% w/v πηκτής αγαρόζης εφαρμόστηκε για ενισχυμένους με PCR μεταλλαγμένους μέσω SDM RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένους σε pGL410 φορείς. Η διαδικασία εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην §2.2.2.2.

#### **2.2.2.6 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με Εκχύλιση από Πηκτή Αγαρόζης Μετά από Ενίσχυση της Αλληλουχίας του Μεταλλαγμένου Υποκινητή**

Η διαδικασία απομόνωσης του ενισχυμένου με PCR μεταλλαγμένου RECUR1 υποκινητή πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση από 1% w/v πηκτή αγαρόζης και εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στο NucleoSpin® Gel, PCR Clean-up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel. Περισσότερες λεπτομέρειες παρέχονται στην §2.2.2.3.

#### **2.2.2.7 Φωσφορυλίωση DNA Άκρων με Αντίδραση Πολυνουκλεοτιδικής Κινάσης**

Η αντίδραση πολυνουκλεοτιδικής κινάσης πραγματοποιήθηκε, προκειμένου να φωσφορυλιωθούν τα DNA άκρα. Συγκεκριμένα, η πολυνουκλεοτιδική κινάση T4 καταλύει τη μεταφορά ενός τελικού φωσφόρου του ATP στο 5' υδροξυτελικό άκρο μορίου DNA (<https://international.neb.com/products/m0201-t4-polynucleotide-kinase#Product%20Information>, T4 Polynucleotide Kinase, NEB). Η φωσφορυλίωση των DNA άκρων είναι απαραίτητη, προκειμένου να ενωθούν τα φωσφορυλιωμένα DNA άκρα με πλασμίδια (που έχουν υποστεί πέψη) μέσω της αντίδρασης λιγάσης, όπως περιγράφεται στην §2.2.2.9. Το ένζυμο DNA λιγάση καταλύει το σχηματισμό ομοιοπολικού φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3'-OH στο άκρο της αλυσίδας του πλασμιδιακού DNA και της 5'-φωσφορικής ομάδας στο άκρο της αλυσίδας των φωσφορυλιωμένων DNA άκρων (<https://international.neb.com/products/m0202-t4-dna-ligase#Product%20Information>, T4 DNA Ligase). Τα συστατικά της PNK αντίδρασης δίνονται στον Πίνακα 2.7. Η PNK αντίδραση διεξήχθη υπό συνθήκες θέρμανσης στους 37 °C για 30 min.

**Πίνακας 2.7** Όγκοι αντιδραστηρίων για την αντίδραση πολυνουκλεοτιδικής κινάσης (PNK), η οποία έλαβε χώρα για τον υπό μελέτη μεταλλαγμένο με *SDM RECUR1* υποκινητή. Ο τελικός όγκος του δείγματος ορίστηκε στα 30  $\mu$ l.

Reagents	V ( $\mu$ l)
WFI	4.0
T4 Ligase Buffer (10x)	3.0
T4 PNK Enzyme	1.5
10 mM rATP	1.5
Eluted DNA	20.0
<b>Final Sample Volume</b>	<b>30.0</b>

#### 2.2.2.8 Καθαρισμός των Προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για το Μεταλλαγμένο *RECUR1* Υποκινητή

Η διαδικασία καθαρισμού των PCR προϊόντων στοχεύει στη μείωση της συγκέντρωσης άλατος στα υπό μελέτη DNA δείγματα και στην απομάκρυνση περιττών συστατικών, όπως π.χ. ενζύμων. Η διαδικασία καθαρισμού PCR διεξήχθη όπως περιγράφεται στο NucleoSpin® Gel, PCR Clean up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel. Συγκεκριμένα, ο όγκος του DNA δείγματος ρυθμίστηκε στα 100  $\mu$ l χρησιμοποιώντας ενέσιμο νερό (WFI) και αναμίχθηκε με 200  $\mu$ l NT ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα φορτώθηκε σε Nucleospin στήλη, η οποία τοποθετήθηκε σε erppendorf tube των 2 ml και φυγοκεντρήθηκε στα 11,000 rpm για 1 min. Το διερχόμενο από τη στήλη διάλυμα (flow-through) απορρίφθηκε και η μεμβράνη πυριτίου της στήλης εκλούστηκε με 700  $\mu$ l NT3. Η στήλη φυγοκεντρήθηκε στα 11,000 rpm για 1 min και το διερχόμενο από τη στήλη διάλυμα. Η τελευταία διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές, προκειμένου να μειωθεί η ποσότητα των χαστροπικών αλάτων στο υπό μελέτη δείγμα. Η μεμβράνη της στήλης φυγοκεντρήθηκε στα 11,000 rpm για 2 min, προκειμένου να απομακρυνθεί το υπόλοιπο ρυθμιστικό NT3. Η έκλυση των DNA δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος NE, έως ότου ο όγκος γίνει 40  $\mu$ l και επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Τέλος, τα εκλούόμενα DNA δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 11,000 rpm για 1min.

#### 2.2.2.9 Αντίδραση Λιγάσης

Η αντίδραση λιγάσης είχε ως σκοπό την ένθεση του απομονωμένου και μεταλλαγμένου DNA του *RECUR1* υποκινητή σε πλασμιδιακούς φορείς pGL410 που έχουν υποστεί πέψη. Οι όγκοι των αντιδραστηρίων για την αντίδραση λιγάσης δίνονται στον Πίνακα 2.8. Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 16 °C για 16 hrs.

**Πίνακας 2.8** Όγκοι αντιδραστηρίων για την αντίδραση λιγάσης, η οποία έλαβε χώρα για ένα μεταλλαγμένο RECUR1 υποκινητή κλωνοποιημένο σε φορέα pGL410. Ο τελικός όγκος του δείγματος ήταν 20 µl, ενώ ο όγκος του DNA εκμαγείου ήταν 16 µl και του PCR master mix στα 4 µl.

Reagents	V (µl)
T4 Ligase Buffer (1x)	2.0
T4 Ligase Enzyme	1.0
Digested pGL410 vector EcoRV	1.0
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>4.0</b>

#### 2.2.2.10 Μετασηματισμός Κυττάρων DH5α με Θερμικό Σοκ

100 µl κυττάρων DH5α αναμίχθηκαν με 10 µl πλασμιδίων (που προήλθαν από την αντίδραση της λιγάσης) με ένθεμα το μεταλλαγμένο RECUR1 υποκινητή και το μείγμα επωάστηκε σε πάγο για 20 min. Έπειτα, διεξήχθη μια διαδικασία θερμικού σοκ θερμαίνοντας το δείγμα στους 42 °C για 50 sec και αμέσως μετά, ψύχοντάς το σε πάγο για 2 min. 110 µl του θερμικά σοκαρισμένου δείγματος αναμίχθηκαν μέσω στροβιλισμού με 890 µl υγρού θρεπτικού υλικού LB και το μείγμα τοποθετήθηκε σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37 °C και 160 rpm για 50 min. 350 µl του επωασμένου δείγματος φορτώθηκε σε ένα τρυβλίο με LB άγαρ και αμπικιλίνη χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur και το δείγμα εξισορροπήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο (37 °C), όπου και παρέμεινε καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας, προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας. Στη συνέχεια, οι βακτηριακές καλλιέργειες απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το άκρο της πιπέτας και προστέθηκαν σε 3 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37 °C και 210 rpm για 16-20 hrs.

#### 2.2.2.11 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (Mini Preparation)

2 ml βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε στους 4 °C και 13,000 rpm για 2 min. Το προκύπτον ίζημα διαλύθηκε σε 100 µl ρυθμιστικού διαλύματος I (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1000 µg/ml RNaseA, θερμοκρασία 4°C) και έπειτα στροβιλίστηκε μέχρι να επιτευχθεί πλήρης διάλυση του ιζήματος. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος II (1% SDS, 0.2 M NaOH, θερμοκρασία δωματίου) και το δείγμα αναμίχθηκε απαλά και χειροκίνητα και αφέθηκε για εξισορρόπηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. 150 µl ρυθμιστικού διαλύματος III (0.3 M οξικό κάλιο, pH 5.5, 4 °C θερμοκρασία) προστέθηκαν στο δείγμα και το τελικό προϊόν τοποθετήθηκε στον πάγο για 5 min. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στους 4 °C και 13,000 rpm για 15 min. Το υπερκείμενο ανακτήθηκε και αναμίχθηκε με 1 ml 100% EtOH και τοποθετήθηκε στους -80 °C για 20min. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στους 4 °C και 13,000 rpm για 20 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα διαλύθηκε σε 600 µl 70% EtOH και φυγοκεντρήθηκε στους 4 °C και 13,000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο

απορρίφθηκε και το ίζημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 min, προκειμένου να στεγνώσει. Το ίζημα επαναεναλωρήθηκε σε 70 µl WFI και θερμάνθηκε στους 65 °C για ~10 min έως ότου να διαλυθεί πλήρως.

#### 2.2.2.12 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Απομονωμένου Πλασμιδιακού DNA με σκοπό ταυτοποίηση θετικών κλώνων έναντι του μεταλλαγμένου πλασμιδιακού υποκινητή

Απομονωμένο πλασμιδιακό DNA εκμαγείο με όγκο 1 µl φορτώθηκε σε αποστειρωμένους PCR σωλήνες των 0.2 ml. 49 µl PCR master mix προστέθηκαν σε PCR σωλήνα με τον τελικό όγκο του δείγματος να ανέρχεται στα 50 µl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 49 µl PCR master mix και οι σχετικές PCR πειραματικές συνθήκες περιγράφονται στους Πίνακες 2.9 και 2.10, αντίστοιχα.

**Πίνακας 2.9** Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την προετοιμασία του PCR master mix για ενίσχυση του μεταλλαγμένου RECUR1 υποκινητή από πλασμιδιακό υπόστρωμα.

Reagents	V (µl)
WFI	40.2
KAPA Taq Buffer A (10x) 15 mM MgCl <sub>2</sub> (KAPABIOSYSTEMS)	5.0
10 mM dNTPs (Thermo Scientific)	1.0
Primers: RECUR1_Prom F1 and RECUR1_Prom R1 (Eurofins Genomic)	2.0
KAPA Taq 5U/µl (Biosystems)	0.8
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>49.0</b>

**Πίνακας 2.10** Συνθήκες PCR αντίδρασης για ταυτοποίηση θετικών κλώνων έναντι του μεταλλαγμένου RECUR1 υποκινητή σε pGL410 φορείς. Ο τελικός όγκος δείγματος ρυθμίστηκε στα 50 µl, ο όγκο του 20x αραιωμένου DNA εκμαγείου ρυθμίστηκε στο 1 µl, ενώ ο όγκος του PCR master mix στα 40 µl.

Steps	Temperature °C (Duration of Steps)
1: incubation	95 °C (3 min)
2: denaturation	95 °C (10 sec)
3: primer annealing	60 °C (20 sec)
4 : extension	72 °C (1 min & 10 sec)
5: GOTO (additional cycles)	39
6: incubation	72 °C (2 min)
7: end	12 °C (infinity)

### 2.2.2.13 Επιβεβαίωση των Θετικά Μετασηματισμένων Κλώνων με Διαγνωστική Πέψη

Δείγμα πλασμιδιακού DNA από τους επιβεβαιωμένους με PCR θετικούς κλώνους (2.2.2.12) φορτώθηκαν σε αποστειρωμένους erppendorf σωλήνες των 1.5 ml με σκοπό την ανεκάρτητη επιβεβαίωση της ένθεσης με διαγνωστική πέψη. 40 μl PCR master mix προστέθηκαν στους erppendorf σωλήνες ρυθμίζοντας τον τελικό όγκο στα 50 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του 40 μl master mix για την αντίδραση της πέψης δίνονται στον Πίνακα 2.11. Το δείγμα υπέστη πέψη υπό συνθήκες θέρμανσης 37 °C για 2 hrs (ένζυμο: KpnI High Fidelity (NEB) με περιοριστική θέση 5'... GGTAC... 3').

**Πίνακας 2.11** Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για το παρασκεύασμα του master mix πέψης. Ο τελικός όγκος δείγματος ρυθμίστηκε στα 50 μl, ο όγκος του DNA εκμαγείου ρυθμίστηκε στα 10 μl, ενώ ο όγκος του master mix πέψης ρυθμίστηκε στα 40 μl.

<b>Reagents</b>	<b>V (μl)</b>
<i>WFI</i>	33
<i>Buffer CutSmart 100 (10x) (NEB)</i>	5
<i>KpnI High-Fidelity (NEB)</i>	2
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>40</b>

### 2.2.2.14 Διαγνωστική Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης μετά από Αντίδραση Πέψης

Η ηλεκτροφόρηση της 2% w/v πηκτής αγαρόζης διεξήχθη σε μεταλλαγμένους με PCR μέσω SDM RECUR1 υποκινητές, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην §2.2.2.2.

### 2.2.3 Γονοτύπηση Άγριου Τύπου και Μεταλλαγμένου Τύπου Αλληλουχίας RECUR1 Υποκινητή με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

Η μέθοδος derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο που επιτρέπει την ανίχνευση μικρών μεταλλάξεων, όπως SNP, σε ενισχυμένα γνωστά αλληλόμορφα κάνοντας χρήση ενζύμων περιορισμού. Συγκεκριμένα, η dCAPS μέθοδος χρησιμοποιεί την PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου και διαμορφώνει μία κατάλληλη περιοχή αναγνώρισης με τη χρήση κατάλληλων primers στην αλληλουχία-στόχο, προκειμένου η άγριου τύπου ή η μεταλλαγμένη αλληλουχία-στόχος να υποστεί διαγνωστική πέψη.



### 2.2.3.1 Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Στην παρούσα εργασία, PCR πειράματα διεξήχθησαν στα πλαίσια της dCAPS μεθόδου για άγριου τύπου (μη μεταλλαγμένους) και μεταλλαγμένους υποκινητές του RECUR1. DNA εκμαγεία RECUR1 υποκινητών κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410 με όγκο 1 μl και συγκέντρωση 5 μg/μl φορτώθηκαν σε αποστειρωμένους PCR σωλήνες των 0.2 ml. Έπειτα, προστέθηκαν 49 μl PCR master mix ρυθμίζοντας τον τελικό όγκο στα 50 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 49 μl PCR master mix χρησιμοποιώντας dCAPS εκκινητές, καθώς και οι σχετικές PCR πειραματικές συνθήκες περιγράφονται στους Πίνακες 2.12 και 2.13, αντίστοιχα.

**Πίνακας 2.12** Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την προετοιμασία PCR master mix που χρησιμοποιήθηκαν για δείγματα RECUR1 υποκινητών κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410.

Reagents	V (μl)
WFI	40.2
KAPA Taq Buffer A (10X) 15 mM MgCl <sub>2</sub> (KAPABIOSYSTEMS)	5.0
10 mM dNTPs (Thermo Scientific)	1.0
Primers dCAP F1R1 for RECUR1	2.0
KAPA Taq 5U/μl (Biosystems)	0.8
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>49.0</b>

**Πίνακας 2.13** PCR πειραματικές συνθήκες για RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένους σε pGL410 φορείς κάνοντας χρήση dCAPS εκκινητών. Ο τελικός όγκος δείγματος ρυθμίστηκε στα 50 μl, ο όγκος του PCR master mix ρυθμίστηκε στα 49 μl και ο όγκος του αραιωμένου DNA εκμαγείου ρυθμίστηκε στα 1 μl με τελική συγκέντρωση 5 μg/μl.

Steps	Temperature °C (Duration of Steps)
1: incubation	95 °C (5 min)
2: denaturation	95 °C (30 sec)
3: primer annealing	60 °C (20 sec)
4 : extension	72 °C (30 sec)
5: GOTO (additional cycles)	45
6: incubation	72 °C (2 min)
7: end	12 °C (infinity)

### 2.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης εφαρμόστηκε για τα υπό μελέτη δείγματα, προκειμένου να επαληθευτεί ότι η αλληλουχία-στόχος στον υποκινητή RECUR1 (άγριου τύπου ή μεταλλαγμένου) ενισχύθηκε με PCR. Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής αγαρόζης και της ηλεκτροφόρησής της διεξήχθη, όπως περιγράφεται στην §2.2.2.2.

### 2.2.3.3 Καθαρισμός των Προϊόντων Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για τον RECUR1 Υποκινητή

Η διαδικασία καθαρισμού των PCR προϊόντων για τον άγριου τύπου και μεταλλαγμένου τύπου μέσω SDM RECUR1 υποκινητή διεξήχθη, όπως περιγράφεται στο NucleoSpirin® Gel, PCR Clean up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel. Η πλήρης διαδικασία περιγράφεται στην §2.2.2.8.

### 2.2.3.4 Διαγνωστική Πέψη Καθαρισμένων Προϊόντων Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

15 μl DNA εκμαγείων RECUR1 υποκινητών (άγριου τύπου και μεταλλαγμένου τύπου μέσω SDM) που προέρχονται από τη διαδικασία καθαρισμού των PCR προϊόντων (§2.2.3.3) φορτώθηκαν σε αποστειρωμένους erpendorf σωλήνες των 1.5 ml. 35 μl master mix πέψης προστέθηκαν στους erpendorf σωλήνες ρυθμίζοντας τον τελικό όγκο στα 50 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του master mix πέψης με όγκο 35 μl δίνονται στον Πίνακα 2.14. Τα δείγματα υπέστησαν πέψη υπό συνθήκες θέρμανσης στους 37 °C για 2 hrs χρησιμοποιώντας το ισοσχιζομερές περιορισμού ενδονουκλεάσης Bshf1 (HaeIII) (ενζυκόζη) με θέση περιορισμού 5'...GG ▲CC...3'. Η πέψη στη συγκεκριμένη περίπτωση λειτουργεί ως διαγνωστικό εργαλείο, δηλαδή ανιχνεύει την απουσία ή παρουσία του SNP και με αυτό τον τρόπο επαληθεύεται η ύπαρξη άγριου τύπου ή μεταλλαγμένου τύπου αλληλουχίας, αντίστοιχα.

**Πίνακας 2.14** Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την παρασκευή του master mix πέψης. Ο τελικός όγκος δείγματος για την αντίδραση πέψης ρυθμίστηκε στα 50 μl, ενώ οι όγκοι του master mix πέψης και του ενισχυμένου DNA εκμαγείου ρυθμίστηκαν στα 15 μl και 35 μl, αντίστοιχα

Reagents	V (μl)
WFI	28.5
Buffer 10xEQ (enzyquest)	5.0
Restriction endonuclease Bshf1(HaeIII) isoschizomer (enzyquest)	1.5
<b>Total Master Mix Volume</b>	<b>35.0</b>

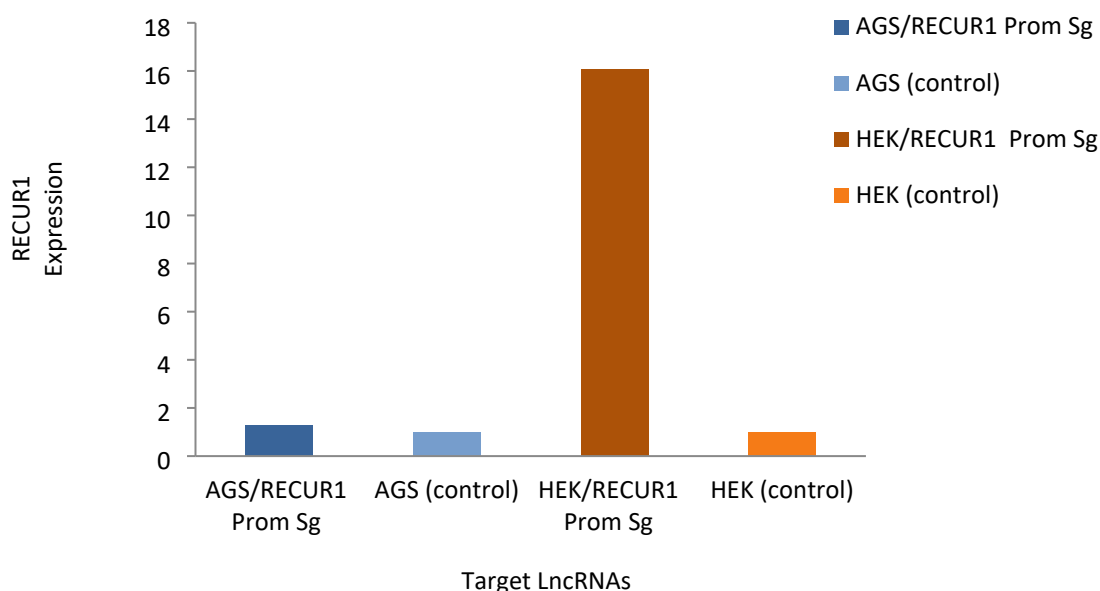
#### **2.2.3.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης Μετά την Αντίδραση Πέψης**

Προκειμένου να διαγνωσθεί, εάν η υπό μελέτη αλληλουχία του RECUR1 υποκινητή υπέστη πέψη ή όχι, εφαρμόζεται ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης με συγκέντρωση 2% w/v για τα υπό μελέτη δείγματα. Η διαδικασία της παρασκευής πηκτής αγαρόζης και της ηλεκτροφόρησής της περιγράφεται αναλυτικά στην §2.2.2.2.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Μελέτη υπερέκφρασης του lncRNA RECUR1 σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές με το σύστημα CRISPR-activation

Η τεχνολογία CRISPR-activation χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να καταστεί δυνατή η υπερέκφραση του lncRNA RECUR1, στις ανθρώπινες αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές AGS και HEK. Η διαδικασία μεταγραφής στο RECUR1 ενεργοποιήθηκε με τη μέθοδο CRISPR/dCas9 στοχεύοντας τον υποκινητή του lncRNA με ένα sgRNA (Prom sgRNA) πλησίον του SNP, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο άδειος πλασμιδιακός φορέας στα ίδια κύτταρα. Ως γονίδιο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το RPLP1. Σύμφωνα με τα qPCR αποτελέσματα στην Εικόνα 3.1, στόχευση του υποκινητή με sgRNA επάγει σημαντικά υψηλή έκφραση του RECUR1 στα HEK κύτταρα. Αντίθετα, η έκφραση του RECUR1 στα AGS κύτταρα δείχνει να είναι ανεπηρέαστη. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τα HEK κύτταρα, είναι κατάλληλα για πειραματικές μελέτες, καθώς επάγουν υψηλή έκφραση του RECUR1 μέσω CRISPR-a.

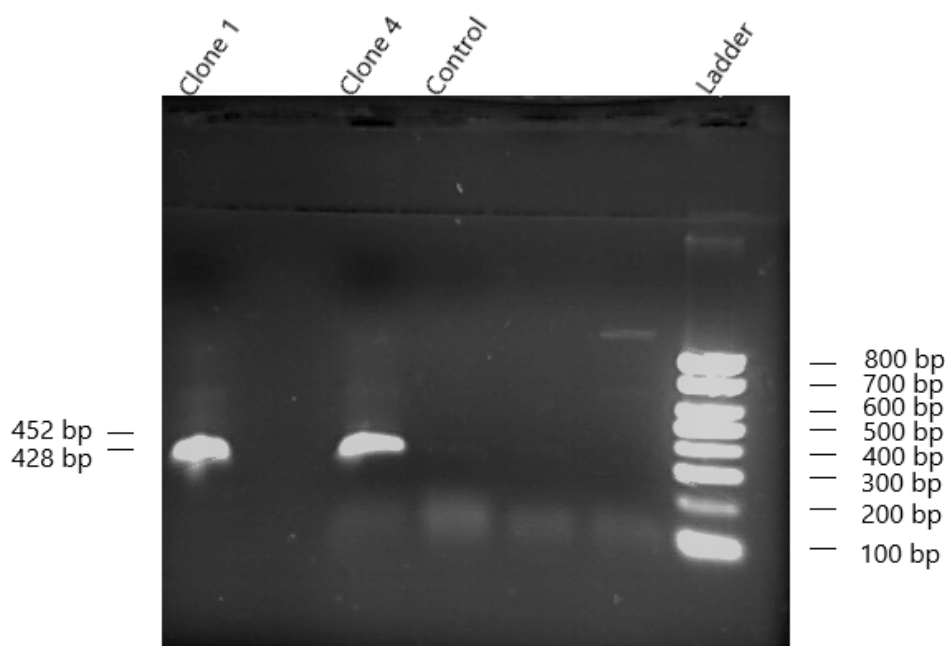


**Εικόνα 3.1** Υπερέκφραση του lncRNA RECUR1 σε AGS και HEK κυτταρικές σειρές χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR-activation. Η διαδικασία μεταγραφής του RECUR1 στα AGS και HEK κύτταρα ενεργοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος CRISPR/dCas 9 στοχεύοντας τον υποκινητή του συγκεκριμένου lncRNA (Prom sgRNA) και συγκρίνοντας με άδειο φορέα (control).

#### 3.2 Γονοτύπηση Άγριου Τύπου RECUR1 Υποκινητή με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

Έχοντας επιβεβαιώσει πειραματικά τον ρυθμιστικό ρόλο της περιοχής του υποκινητή όπου εδρεύει το SNP, ακολούθησε γονοτύπηση των κλωνοποιημένων σε φορέα pGL410 τμημάτων, που είχε προηγηθεί στα πλαίσια προηγούμενης πτυχιακής εργασίας. Ο υποκινητής του RECUR1 κλωνοποιημένος με φορά 5'-3' και 3'-5' σε pGL410 γονοτυπήθηκε, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία του άγριου τύπου αλληλόμορφου ή αλλιώς η

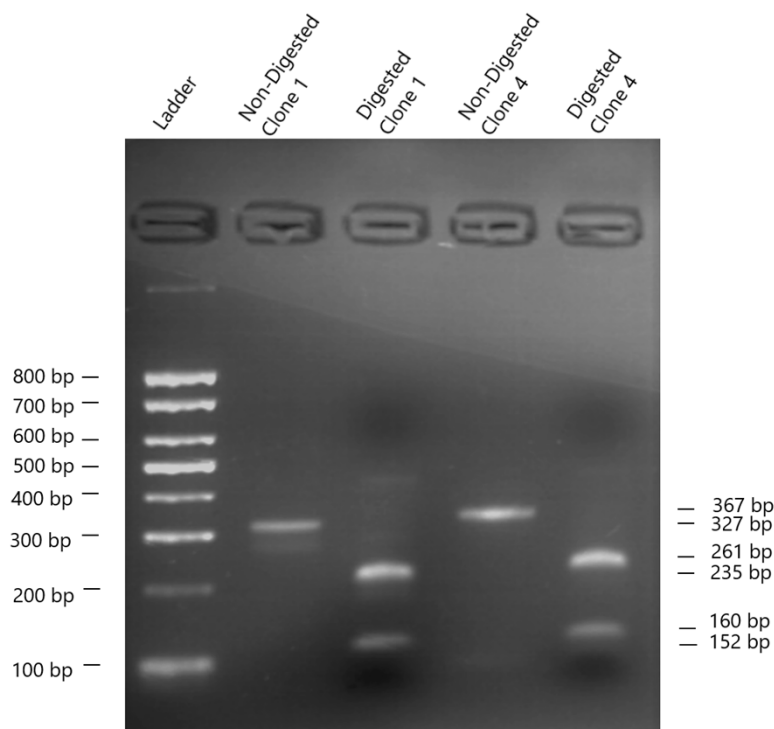
απουσία του ενδιαφέροντος SNP (SNP of interest) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο dCAPS. Οι δύο προσανατολισμοί εξυπηρετούν ως έναν στάδιο ελέγχου καθότι μόνο ο ομόρροπος προς την μεταγραφή του γονιδίου προσανατολισμός θα πρέπει να είναι ενεργός. Το πρώτο βήμα ήταν να ενισχυθεί με PCR η αλληλουχία υποκινητή-στόχου χρησιμοποιώντας τους dCAPS εκκινητές. Οι εκκινητές dCAPS σχημάτισαν μια κατάλληλη θέση αναγνώρισης (από το ένζυμο περιορισμού) μόνο για το ένα από τα δύο αλληλόμορφα του SNP εντός της αλληλουχίας του υποκινητή-στόχου. Προκειμένου να διαπιστωθεί, εάν τα υπό μελέτη δείγματα όντως ενισχύθηκαν, εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης στις ενισχυμένες με PCR 5'-3' και 3'-5' αλληλουχίες του RECUR1 υποκινητή (Εικ. 3.2). Η εικόνα 3.2 δείχνει τα ενισχυμένα προϊόντα των δύο κλώνων πλασμιδίου, 1 και 4, με το μοριακό βάρος (molecular weight, MW) να έχει υπολογιστεί στα ~452 bp και ~428 bp, αντίστοιχα. Σύμφωνα με την εικόνα 3.2, οι ζώνες μοριακού βάρους των υπό μελέτη δειγμάτων, των κλώνων 1 και 4, μπορούν να χαρακτηριστούν ως "broadened" αποκαλύπτοντας πιθανή υπερφόρτωση DNA δειγμάτων στην πηκτή αγαρόζης. Αυτό σημαίνει ότι λιγότεροι κύκλοι ενίσχυσης θα μπορούσαν να είχαν χρησιμοποιηθεί κατά την PCR ή ότι τα φορτωμένα DNA εκμαγεία θα μπορούσαν να είχαν περαιτέρω αραιωθεί. Ωστόσο δεδομένου ότι ακολουθούν στάδια απομόνωσης, πέψης και εκ νέου ηλεκτροφόρησης, η αυξημένη ποσότητα DNA είναι απαραίτητη τελικά για την αξιόπιστη ανίχνευση των μικρών μοριακών μεγεθών που θα προκύψουν από την γονοτύπηση.



**Εικόνα 3.2** Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αγαρόζης για RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp. Το EtBr (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England Biolabs) αναμίχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5X TBE ρυθμιστικό διάλυμα.

Αφού τα παραπάνω PCR προϊόντα καθαρίστηκαν (clean up process), προκειμένου να μειωθεί η περιεκτικότητα των αλάτων, υπέστησαν πέψη με το ένζυμο Bshf1 (HaeIII). Η

εικόνα 3.3 δείχνει τους αρνητικούς (non-digested) και θετικούς (digested) μάρτυρες των κλώνων 1 και 4 που προκύπτουν από την αντίδραση πέψης. Οι ζώνες μοριακού βάρους για τους αρνητικούς μάρτυρες των κλώνων 1 και 4 προσδιορίστηκαν ότι είναι 367 bp και 327 bp, αντίστοιχα. Οι ζώνες μοριακού βάρους για τους θετικούς μάρτυρες προσδιορίστηκαν ότι είναι 261 bp και 160 bp για τον κλώνο 1 και 235 bp και 152 bp για τον κλώνο 4. Η πέψη των RECUR1 υποκινητών με τη χρήση του ενζύμου Bshf1 (HaeIII) ήταν εφικτή και αυτό υποδεικνύει ότι η αλληλουχία του κλωνοποιημένου υποκινητή είναι όντως άγριου τύπου.



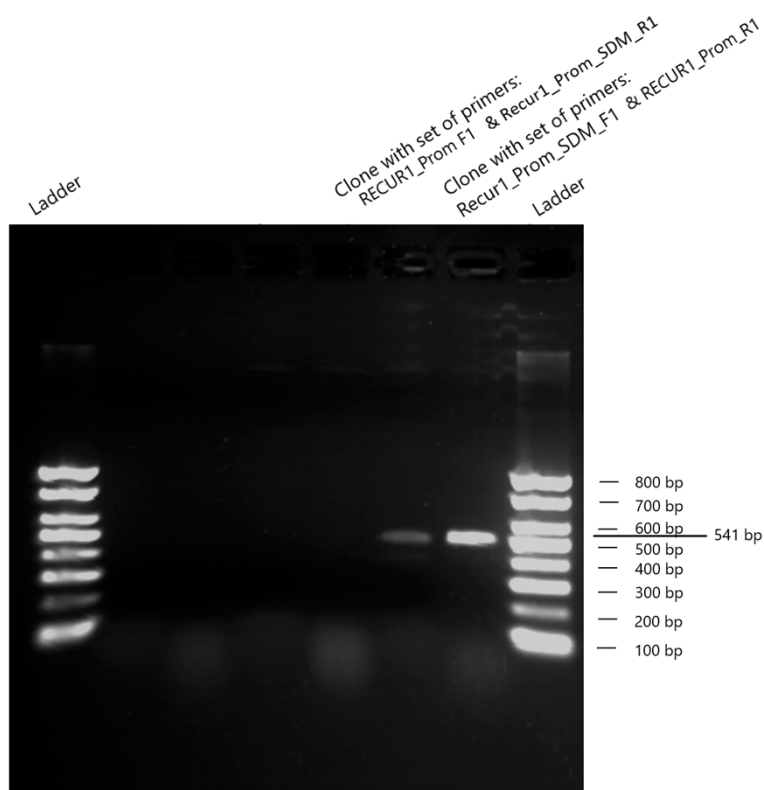
**Εικόνα 3.3** Ηλεκτροφόρηση 2% w/v πηκτής αγαρόζης για αρνητικούς μάρτυρες (non-digested) και θετικούς μάρτυρες (digested) RECUR1 υποκινητών κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410. Η διαγνωστική πέψη πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο Bshf1 (HaeIII). Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp. Το EtBr (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs) αναμίχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5X TBE ρυθμιστικό διάλυμα.

### 3.3 Κατευθυνόμενη Μεταλλαξογένεση

#### 3.3.1 Εισαγωγή του SNP Ενδιαφέροντος με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης στο RECUR1 Υποκινητή

Το πρωτόκολλο SDM εφαρμόστηκε σε RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένους σε φορείς pGL410, προκειμένου να μεταλλαχθεί το SNP του ενδιαφέροντος στο δίκλωνο πλασμιδιακό DNA σε μια συγκεκριμένη θέση ώστε να προκύψει το άλλο αλληλόμορφο που απαντάται στην φύση. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σύνολα εκκινητών, F1 & SDM\_R1 και SDM\_F1 & R1 (βλ. Εικ. 2.2). Η εικόνα 3.4 παρουσιάζει τα προϊόντα των μεταλλαγμένων με PCR μέσω SDM RECUR1 υποκινητών, τα οποία διαγνώστηκαν με 1% w/v ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.

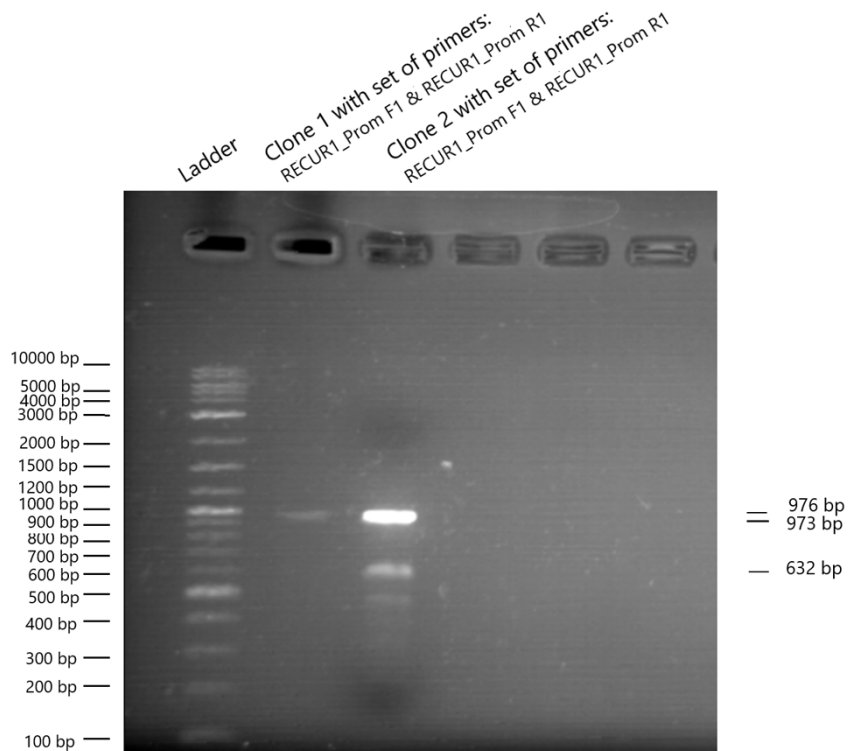
Το μοριακό βάρος των μεταλλαγμένων RECUR1 υποκινητών προσδιορίζεται ~541 bp. Παρατηρείται ικανοποιητική ενίσχυση των κύριων προϊόντων χωρίς τον σχηματισμό παραπροϊόντων.



**Εικόνα 3.4** Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αγαρόζης για μεταλλαγμένους με PCR μέσω SDM RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp. Το EtBr (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs) αναμίχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5X TBE ρυθμιστικό διάλυμα.

### 3.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για το Πλήρες Μήκος της Αλληλουχίας του Μεταλλαγμένου RECUR1 Υποκινητή

Αφού ενισχύθηκαν επιτυχώς οι δύο μεταλλαγμένες αλληλουχίες, ακολούθησε ισόποση ανάμειξη τους και χρήση τους ως εκμαγείο σε νέα ενίσχυση χρησιμοποιώντας μόνο ένα σετ εκκινητών, F1 & R1, προκειμένου να συντεθεί το πλήρες μήκος της αλληλουχίας του υποκινητή. Η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης για PCR προϊόντα επιβεβαίωσε την ενίσχυση των ειδικών προϊόντων (Εικ. 3.5). Η εικόνα 3.5 δείχνει ότι το μοριακό βάρος των RECUR1 υποκινητών (κλώνων 1 και 2) σε φορείς pGL410 προσδιορίζεται να είναι ~ 974 bp. Με άλλα λόγια, το συνολικό μήκος του RECUR1 υποκινητή είναι ελάχιστα μικρότερο των 1000 bp, συνεπώς η ενίσχυση ήταν πετυχημένη και ειδική.



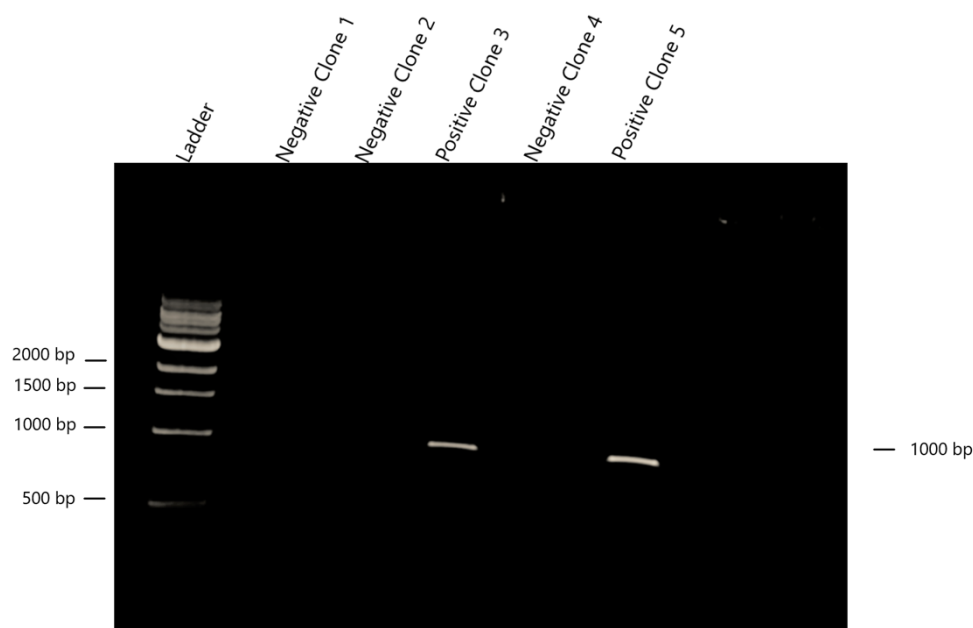
**Εικόνα 3.5** Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αγαρόζης για μεταλλαγμένους με PCR μέσω SDM RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410. Μετά την εισαγωγή του SNP ενδιαφέροντος με PCR στην αλληλουχία του RECUR1 υποκινητή, το δείγμα ενισχύθηκε ξανά με PCR χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά ένα σετ εκκινητών για το πλήρες μήκος της αλληλουχίας. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 1 Kbp plus. Το EtBr (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs) αναμείχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5X TBE ρυθμιστικό διάλυμα.

### 3.3.3 Διάγνωση Θετικών Κλώνων RECUR1 Υποκινητών Μετά από Μετασχηματισμό DH5α Κυττάρων

Έπειτα από την επιτυχημένη ενίσχυση με PCR της μεταλλαγμένης αλληλουχίας του RECUR1 υποκινητή, ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με εκχύλιση από πηκτή αγαρόζης, η φωσφορυλίωση των DNA άκρων μέσω της αντίδρασης της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης, ο καθαρισμός των PCR προϊόντων και η ένθεση του απομονωμένου και μεταλλαγμένου DNA του RECUR1 υποκινητή σε πλασμιδιακούς φορείς pGL410, που έχουν υποστεί πέψη, ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων DH5α με θερμικό σοκ και η απομόνωση του DNA σε μικρή κλίμακα από τα μετασχηματισμένα βακτηριακά DH5α κύτταρα με σκοπό την απομόνωση του μεταλλαγμένου πλασμιδιακού DNA του RECUR1 υποκινητή. Έπειτα, διεξήχθη ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας-στόχου του μεταλλαγμένου RECUR1 υποκινητή και πραγματοποιήθηκε η διάγνωση των θετικών και αρνητικών κλώνων με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης. Η εικόνα 3.6 δείχνει τη ταυτοποίηση των θετικών κλώνων του RECUR1 υποκινητή στο φορέα pGL410 με τη χρήση ηλεκτροφόρησης 1% w/v πηκτής αγαρόζης. Το μοριακό βάρος των ζωνών για τους θετικούς κλώνους αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος των RECUR1 υποκινητών και είναι 1000 bp. Με βάση τα αποτελέσματα,



συμπεραίνεται ότι οι κλώνοι 3 και 5 είναι θετικοί ως προς την ένθεση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας του υποκινητή.

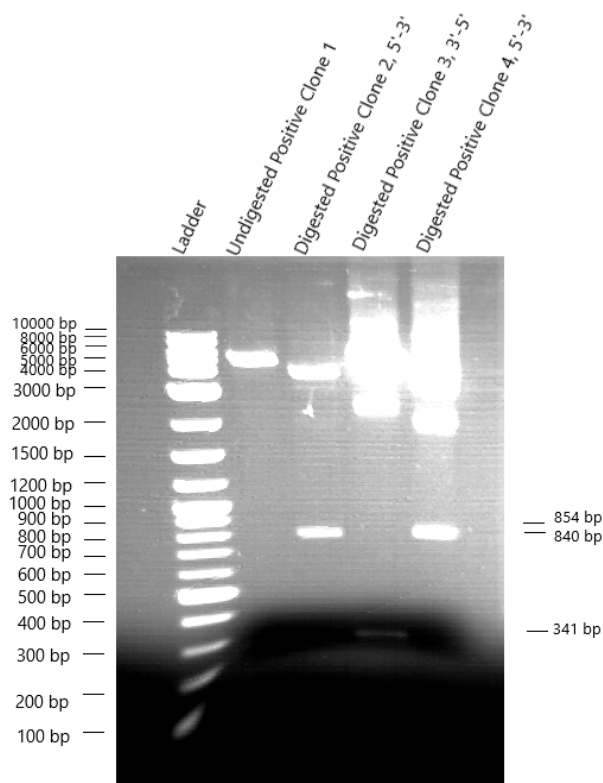


**Εικόνα 3.6** Διάγνωση αρνητικών και θετικών κλώνων μεταλλαγμένων RECUR1 υποκινητών κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410 χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση 1.0% w/v ηλεκτροφόρησης. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 1 Kbp plus. Το EtBr (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το Gel Loading Dye, Purple (6x) (New England BioLabs) αναμείχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5X TBE ρυθμιστικό διάλυμα.

### 3.3.4 Προσδιορισμός του Προσανατολισμού ένθεσης των Μεταλλαγμένων RECUR1 Υποκινητών Κλωνοποιημένων σε pGL410 Φορείς

Οι μεταλλαγμένοι RECUR1 υποκινητές υπέστησαν πέψη με τη χρήση του ενζύμου KpnI HF, που κόβει μια φορά στο πλασμιδιακό φορέα pGL410 και μια δεύτερη φορά ασύμμετρα εντός του κλωνοποιημένου ενθέματος, προκειμένου να προσδιοριστεί ο προσανατολισμός τους με βάση τις τιμές του μοριακού βάρους των προϊόντων που έχουν υποστεί πέψη. Συγκεκριμένα, η εικόνα 3.7 δείχνει ότι οι κλώνοι 2 και 4 εμφανίζουν προσανατολισμό 5'-3' και μοριακό βάρος ~847 bp, ενώ ο κλώνος 3 παρουσιάζει προσανατολισμό 3'-5' και μοριακό βάρος ~340 bp .

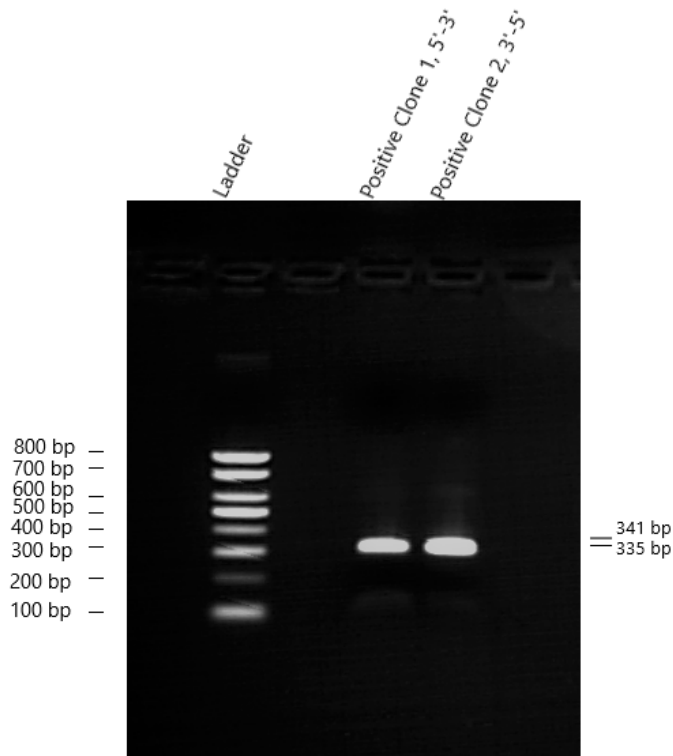
Ένα άλλο σημείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη στην εικόνα 3.7 είναι η ύπαρξη απροσδόκητων ζωνών για τους κλώνους 2 και 4 με μοριακό βάρος μεταξύ ~2,000-5,000 bp. Αυτό αποκαλύπτει ότι η πέψη είναι ελλιπής. Θα έπρεπε να είχε χρησιμοποιηθεί χαμηλότερη συγκέντρωση DNA εκμαγείου ή μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου KpnI.



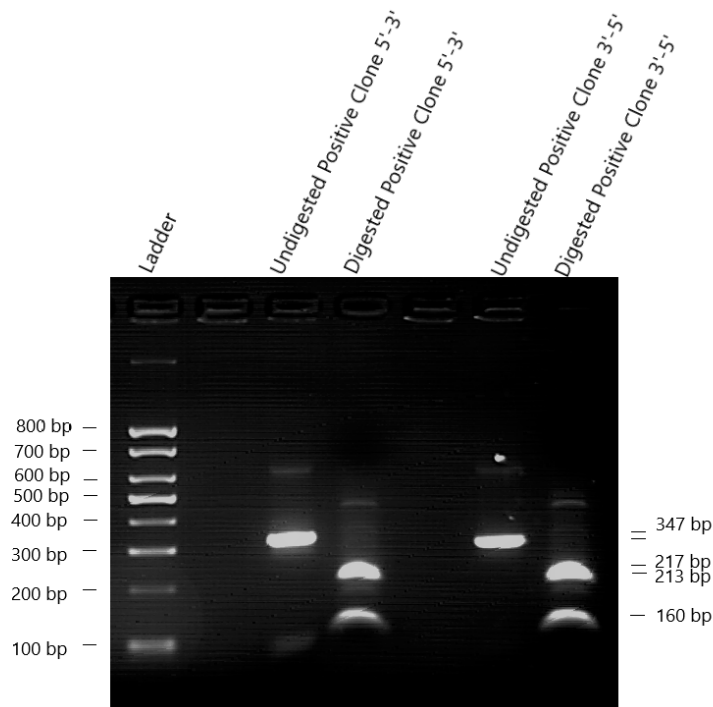
**Εικόνα 3.7** Ηλεκτροφόρηση 2% w/v πηκτής αγαρόζης για αρνητικούς μάρτυρες (*non-digested*) και θετικούς μάρτυρες (*digested*) μεταλλαγμένων *RECUR1* υποκινητών κλωνοποιημένων σε φορείς *pGL410*. Η διαγνωστική πέψη πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο *KpnI HF*. Ο προσανατολισμός των θετικών μαρτύρων των *RECUR1* υποκινητών ορίστηκε με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι θετικοί μάρτυρες 2 και 4 έχουν προσανατολισμό 5'-3', ενώ ο θετικός μάρτυρας 3 έχει προσανατολισμό 3'-5'. Το *ladder* που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 1 Kbp plus. Το *EtBr* (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το *Gel Loading Dye, Purple (6x)* (*New England BioLabs*) αναμείχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5x TBE ρυθμιστικό διάλυμα.

### 3.4 Γονοτύπηση Μεταλλαγμένου Τύπου *RECUR1* Υποκινητή με τη μέθοδο *Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*

Στην §3.3 περιγράφηκε η διαδικασία με την οποία εισήλθε στην αλληλουχία-στόχο του *RECUR1* υποκινητή το SNP ενδιαφέροντος. Οι μεταλλαγμένοι *RECUR1* υποκινητές που προέκυψαν γονοτυπήθηκαν με τη μέθοδο *dCAPS*, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ένθεση του SNP ενδιαφέροντος. Το πρώτο βήμα ήταν να ενισχυθούν με PCR τα υπό μελέτη δείγματα και να εφαρμοστεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 1% w/v πηκτική αγαρόζης (βλ. Εικ. 3.8), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση των δειγμάτων. Η εικόνα 3.8 δείχνει διαχωρισμένα τμήματα DNA με βάση το μοριακό βάρος για τα ενισχυμένα προϊόντα δύο θετικών κλώνων του *RECUR1* υποκινητή, του κλώνου 1 (5'-3') και του κλώνου 2 (3'-5'). Το μοριακό βάρος των κλώνων 1 και 2 υπολογίστηκε στα 335 bp και 341 bp, αντίστοιχα.



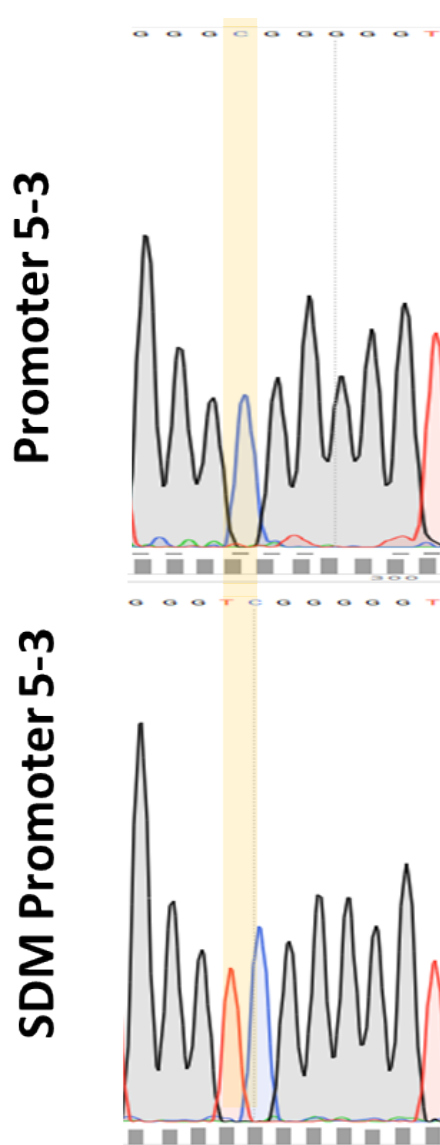
**Εικόνα 3.8** Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αгарόζης για μεταλλαγμένους με PCR μέσω SDM RECUR1 υποκινητές κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp. Το EtBr (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το Gel Loading Dye, Purple (6x) (New England BioLabs) αναμίχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5x TBE ρυθμιστικό διάλυμα.



**Εικόνα 3.9** Ηλεκτροφόρηση 2% w/v πηκτής αгарόζης για αρνητικούς μάρτυρες (non-digested) και θετικούς μάρτυρες (digested) μεταλλαγμένων RECUR1 υποκινητών κλωνοποιημένων σε φορείς pGL410. Η διαγνωστική πέψη πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο Bshf1 (HaeIII). Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp. Το EtBr (10 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA, ενώ το Gel Loading Dye, Purple (6x) (New England BioLabs) αναμίχθηκε με δείγματα DNA για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το 0.5x TBE ρυθμιστικό διάλυμα.

Μέρος του διαλύματος της PCR υποβλήθηκε σε καθαρισμό, προκειμένου να επιτευχθεί μείωση της συγκέντρωσης αλάτων και άλλων περιττών συστατικών, όπως ενζύμων. Τα προϊόντα που προέκυψαν από τον καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA υπέστησαν πέψη με το ένζυμο Bshf1 (HaeIII). Η εικόνα 3.9 δείχνει τα αποτελέσματα της διαγνωστικής πέψης για τους δύο θετικούς κλώνους, 1 (5'-3 ') και 2 (3'-5'), των RECUR1 υποκινητών. Το μοριακό βάρος των αρνητικών μαρτύρων προσδιορίστηκε στα 347 bp, ενώ το μοριακό βάρος των θετικών μαρτύρων προσδιορίστηκε στα 217 bp και 160 bp για τον κλώνο 1 και στα 213 bp και 160 bp για τον κλώνο 2.

### 3.5 Αλληλούχηση Μεταλλαγμένου RECUR1 Υποκινητή



Εικ. 3.10 DNA αλληλούχηση του RECUR1 υποκινητή με προσανατολισμό 5'-3 '.

Παρόλο που η γονοτύπηση με dCAPs δεν φανέρωσε αλλαγή του νουκλεοτιδίου, ένα δείγμα πλασμιδιακού φορέα με κλωνοποιημένο τον μεταλλαγμένο υποκινητή στάλθηκε στη CEMIA SA για αλληλούχηση. Γενικά η γονοτύπηση με χρήση της μεθόδου dCAPs είναι μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος για ανίχνευση μεταλλάξεων που προκύπτουν από αντικατάσταση βάσεων. Ωστόσο στο υπό μελέτη SNP, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο προκύπτει από ένθεση μιας νέας βάσης και συνεπώς η αδυναμία ανίχνευσης του με dCAPs πρέπει να επιβεβαιωθεί και από ανεξάρτητη αλληλούχηση. Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger (Εικ. 3.10), αποδεικνύεται ότι ο RECUR1 υποκινητής μεταλλάχθηκε επιτυχώς με τη χρήση του SDM πρωτοκόλλου. Αυτό δείχνει ότι το ένζυμο περιορισμού Bshf1 (HaeIII) με θέση περιορισμού τεσσάρων bp (5'... GG CC...3') δεν εμφανίζει πάντα την κατάλληλη πιστότητα, και ειδικά, στην παρούσα μελέτη, όπου πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του νουκλεοτιδίου T στην αλληλουχία του RECUR1 υποκινητή. Συγκεκριμένα, το ένζυμο στα υπό μελέτη δείγματα έκοψε την αλληλουχία του υποκινητή στις νουκλεοτιδικές βάσεις GG, οι οποίες βρίσκονται αμέσως μετά το εισαγόμενο SNP (T). Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο οι θετικοί μάρτυρες των μεταλλαγμένων RECUR1 υποκινητών (βλ. Εικ. 3.9) εμφανίζουν το ίδιο μοριακό βάρος με αυτό των άγριου τύπου RECUR1 υποκινητών (βλ. Εικ. 3.3).

Συμπερασματικά, πραγματοποιήθηκε πειραματική απόδειξη του ρυθμιστικού ρόλου της ανοδικής lncRNA RECUR1 αλληλουχίας στην έκφραση του lncRNA RECUR1 μεταγράφου σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές με χρήση της τεχνολογίας CRISPR-activation. Ακολούθησε επιτυχής κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του υπό μελέτη SNP και εν συνεχεία κλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10, ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Μελλοντικά οι μοριακές κατασκευές που προέκυψαν μπορούν να αξιοποιηθούν για την μελέτη της ενεργότητας του συγκεκριμένου υποκινητή με και χωρίς το μεταλλαγμένο SNP, μέσω της ανίχνευσης βιοφωταυγείας.

#### 4. Συζήτηση

Τα lncRNAs αποτελούν ένα ενδιαφέρον πεδίο μελέτης, καθώς, μεταξύ άλλων, συνιστούν εν δυνάμει μοριακούς βιοδείκτες πρόληψης και διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου εξαιτίας της υψηλής εξειδίκευσης που εμφανίζουν σε κύτταρα και ιστούς [54]. Κατάλληλοι lncRNA-βιοδείκτες μπορούν να αναπτυχθούν για την πρόληψη και διάγνωση του γαστρικού καρκίνου, οι οποίοι θα εντοπίζονται σε σωματικά βιολογικά υγρά, όπως ούρα και αίμα, και η λήψη των σωματικών αυτών υγρών είναι μη-επεμβατική και ανώδυνη για τον ασθενή [77]. Παράλληλα, σημειακές μεταλλάξεις που προδιαθέτουν για την εμφάνιση της νόσου, μέσω ενίσχυσης της έκφρασης ογκοεπαγωγικών lncRNA, μπορούν να αξιοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες προκειμένου οι φορείς τους να ενταχθούν στις ομάδες υψηλού κινδύνου με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου, δεκαετίες προτού αυτή εκδηλωθεί. Ένα παράδειγμα τέτοιου lncRNA είναι το RECUR1 και η σημειακή μετάλλαξη που το συνοδεύει στην αλληλουχία του υποκινητή, τα οποία αποτέλεσαν το επίκεντρο της παρούσας εργασίας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης που πραγματοποιήθηκε για την υπερέκφραση του lncRNA RECUR1 στις ανθρώπινες αθανάποποιημένες κυτταρικές σειρές AGS και HEK με τεχνολογία CRISPR-activation, αποδείχτηκε ότι ο υποκινητής του RECUR1 στη σειρά HEK εμφανίζει υψηλότερη ανταπόκριση στο σύστημα CRISPR-a, ενώ η έκφραση του RECUR1 παραμένει αμετάβλητη στη σειρά AGS. Συγκεκριμένα, η έκφραση του lncRNA RECUR1 είναι 16 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στις HEK κυτταρικές σειρές, ενώ η έκφραση του lncRNA RECUR1 είναι μόλις 1.3 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στις AGS κυτταρικές σειρές. Δεδομένου ότι το συγκεκριμένο sgRNA βρίσκεται εντός του κλωνοποιημένου τμήματος του υποκινητή και πλησίον του SNP, αποδεικνύεται και πειραματικά ότι αυτή η περιοχή έχει λειτουργικό ρόλο και μπορεί να εκκινήσει την μεταγραφή του lncRNA. Ενώ κανείς θα ανέμενε ότι η ανταπόκριση του RECUR1 θα ήταν υψηλότερη στις γαστρικές καρκινικές σειρές AGS, αυτό τελικά δεν παρατηρήθηκε. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων που στρατολογούνται στην AGS κυτταρική σειρά για να επάγουν την έκφραση του RECUR1 απέτρεψε την πρόσβαση του sgRNA στον υποκινητή. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η ετεροχρωματινοποίηση του υποκινητή στη σειρά AGS, που απέτρεψε την πρόσβαση του sgRNA. Συνήθως, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων υποκινητή-χρωματίνης, το ξεδίπλωμα του υποκινητή δεν είναι πάντα εφικτό. Γενικά, η επιγενετική ρύθμιση των υποκινητών των lncRNAs διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική τους εξειδίκευση μεταξύ καρκινικών σειρών. Οι αλληλεπιδράσεις υποκινητή-χρωματίνης θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα αξιοσημείωτο ερευνητικό πεδίο στο εγγύς μέλλον.

Υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία [78-80], οι οποίες αναφέρουν ότι η στόχευση του lncRNA με το σύστημα CRISPR-activation δεν ήταν επιτυχής και αυτό αποτελεί ένα συχνό φαινόμενο. Για παράδειγμα, η μελέτη των Yamazaki et al. [78] διερεύνησε την υπερέκφραση του πυρηνικού lncRNA NEAT1 με το σύστημα CRISPRa. Το lncRNA NEAT1 εμπλέκεται στη σύνθεση των παρασιγμάτων (paraspeckles, πυρηνικά σώματα), τα οποία

είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση ή δέσμευση RNA ή πρωτεϊνών επηρεάζοντας τη ρύθμιση των γονιδίων. Με αυτό τον τρόπο τα NEAT1 συνδέονται με την ανάπτυξη ασθενειών, όπως αυτή του καρκίνου, και με ιικές μολύνσεις. Στις περιπτώσεις της ανάπτυξης καρκίνου ο αριθμός των NEAT1 μεταγράφων εμφανίζεται μεγάλος. Γι' αυτό το λόγο η συγκεκριμένη μελέτη [78] διερεύνησε το ρόλο των NEAT1 σε HAP1 κυτταρικές σειρές με το σύστημα CRISPRa επιτυγχάνοντας την αύξηση των NEAT1 έως και 3 φορές σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Ένα ακόμα παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Ho et al. [79], η οποία διερεύνησε το ρόλο του lncRNA PCGEM1, το οποίο εμπλέκεται στη ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη. Με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 επετεύχθη η αύξηση της έκφρασης του PCGEM1 έως και 1.5 φορές σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα [79]. Παρόλα αυτά, στην παρούσα πτυχιακή επετεύχθη η υπερέκφραση του lncRNA RECUR1 στα HEK κύτταρα. Γενικά, η επιγενετική ρύθμιση των υποκινητών των lncRNAs διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική τους εξειδίκευση μεταξύ των καρκινικών σειρών και οι αλληλεπιδράσεις υποκινητή-χρωματίνης θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα αξιοσημείωτο ερευνητικό πεδίο στο εγγύς μέλλον.

Βέβαια, ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Bester et al. [80], η οποία εφάρμοσε το σύστημα CRISPRa για τη στόχευση των υποκινητών των μη κωδικών γονιδίων TUNA σε MOLM14, K562 και HL60 κυτταρικές σειρές λευχαιμίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης επετεύχθη έως και 33 φορές, σε αντίθεση με τη χαμηλή έκφραση του TUNA στις K562 και HL60 κυτταρικές σειρές. Αυτό αποδεικνύει ότι η εφαρμογή του συστήματος CRISPRa δεν επάγει πάντοτε υψηλά επίπεδα έκφρασης σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Η μελέτη των Bester et al. [80] αναδεικνύει επίσης το ρόλο των sgRNAs στην απόδοση της έκφρασης των lncRNAs. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση τουλάχιστον τεσσάρων sgRNAs για την εφαρμογή του συστήματος CRISPRa στο μη κωδικό γονίδιο MIAT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το MIAT εμφανίζει υψηλά ποσοστά υπερέκφρασης στις MOLM14 κυτταρικές σειρές και μόνο δύο sgRNAs επάγουν υψηλά επίπεδα έκφρασής του [80].

Τα πειράματα της παρούσης εργασίας έδειξαν ότι η κατευθυνόμενη εισαγωγή του SNP στην αλληλουχία-στόχο του RECUR1 υποκινητή ήταν εφικτή με τη μέθοδο της PCR μέσω SDM. Μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS) σε συνδυασμό με ανάλυση eQTL μπορούν να αναδείξουν την επίδραση των SNPs στα επίπεδα έκφρασης των lncRNAs μεταγράφων. Για παράδειγμα, η μελέτη του Shen et al. [81] έδειξε ότι η παραλλαγή του SNP rs1317082 (T>C) που βρίσκεται στο εξόνιο 1 του lncRNA CCSlnc362 διαδραματίζει έναν προστατευτικό ρόλο για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, η παραλλαγή του SNP rs1317082 (T>C) δημιουργεί μία θέση σύνδεσης του miR-4658 και αυτό επάγει τη μείωση της έκφρασης του CCSlnc362, τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την προώθηση της απόπτωσης των κυττάρων.

Ένα ακόμη αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των υποκινητών είναι ο προσανατολισμός τους συγκριτικά με την μεταγραφόμενη αλληλουχία του γονιδίου. Στην παρούσα εργασία επετεύχθη η εισαγωγή του SNP ενδιαφέροντος στον RECUR1 υποκινητή και εν συνεχεία η κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας με προσανατολισμό 5'-3' και 3'-5' στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10. Αυτοί οι υποκινητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω πειράματα στο εγγύς μέλλον, προκειμένου να διερευνηθούν, i) οι συνθήκες (π.χ μεταγραφικοί παράγοντες) ρύθμισης και ενεργοποίησης του RECUR1 υποκινητή και ii) αν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του SNP επηρεάζει τη διαδικασία της μεταγραφής του RECUR1. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η λειτουργία των υποκινητών είναι μονοκατευθυντική (unidirectional), η κλωνοποίηση του και με τους δύο προσανατολισμούς με και χωρίς την μεταλλαξογένεση δημιουργεί μια πλήρη εργαλειοθήκη για την μελέτη του μαζί με τους κατάλληλους αρνητικούς μάρτυρες. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία όπως οι ενισχυτές, η δράση των οποίων είναι αμφίδρομη (bidirectional). Γενικά, οι ενισχυτές αλληλεπιδρούν με τους υποκινητές, προκειμένου να αυξήσουν την έκφραση των γονιδίων, αλλά ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν την έκφραση των lncRNAs αλλά και επηρεάζονται από τα lncRNA μετάγραφα βρίσκεται υπο μελέτη. Επιπλέον, όπως δείχνει η μελέτη των Wu et al. [82], ο υποκινητής ενός lncRNA μπορεί να επικαλύπτεται με ρυθμιστικά στοιχεία κωδικοποιητικών γονιδίων. Η αμφίδρομη μεταγραφή δημιουργεί ανάντη του υποκινητή αντίγραφα προς κατεύθυνση αντίθετη από τη μεταγραφή του κωδικοποιητικού γονιδίου. Τα αντίγραφα αυτά είναι συνήθως μη σταθερά [82].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρόβλημα αξιοπιστίας που εντοπίστηκε στη dCAPs γονοτύπηση μετά την ένθεση του SNP ενδιαφέροντος στην αλληλουχία του υποκινητή. Συγκεκριμένα, το ένζυμο Bshf1 (HaeII) (με τη θέση περιορισμού 5'... GG CC... 3') δεν διέκρινε την μεταλλαγμένη αλληλουχία με αποτέλεσμα την αποτυχία ορθής γονοτύπησης με dCAPs. Γι' αυτό το λόγο, το μοριακό βάρος των θετικών μαρτύρων του μεταλλαγμένου RECUR1 υποκινητή (βλ. Εικ 3.9) είναι σχεδόν το ίδιο με το μοριακό βάρος των θετικών μαρτύρων του άγριου τύπου RECUR1 υποκινητή (βλ. Εικ. 3.3). Η αποτυχία της ορθής γονοτύπησης με dCAPs οφείλεται στην ειδική περίπτωση αυτού του SNP στην οποία το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο προκύπτει όχι από αντικατάσταση μίας υπάρχουσας βάσης, αλλά από ένθεση ενός έξτρα νουκλεοτιδίου, όπως φαίνεται και από το αποτέλεσμα της αλληλούχησης.

Τις τελευταίες δεκαετίες ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών [83-86] επικεντρώνεται στη διερεύνηση του ρόλου του υποκινητή διάφορων lncRNAs σχετιζόμενων με ασθένειες, όπως αυτή του καρκίνου, στη διαδικασία μεταγραφής. Ο ρόλος του υποκινητή στη διαδικασία της μεταγραφής του lncRNA επηρεάζεται, από την αλληλεπίδρασή του με μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, πειράματα μπορούν να διεξαχθούν στο μέλλον, προκειμένου να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του RECUR1 υποκινητή και των παραγόντων μεταγραφής CDX2, HNF4 και GATA6, καθώς επηρεάζουν τη διαφοροποίηση της μεταγραφής των γονιδίων και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στον γαστρικό καρκίνο. Ο παράγοντας CDX2 συνδέεται με το γαστρικό καρκίνο, τον καρκίνο του παχέος εντέρου,



του θυροειδούς, των ωοθηκών, της ουροδόχου κύστης και του προστάτη. Η έκφραση του CDX2 αυξάνεται με μόλυνση από το βακτήριο του *Helicobacter pylori* και συνδέεται με τον καρκίνο της βλεννογόνου της καρδιάς. Επίσης, η αυξημένη έκφραση του CDX2 συσχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [83]. Παρόλα αυτά, δεν είναι εξακριβωμένο, εάν ο παράγοντας CDX2 μπορεί να αποτελέσει μοριακό βιοδείκτη για την πρόγνωση του γαστρικού καρκίνου [84]. Ο παράγοντας HNF4α φαίνεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου, καθώς έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στο γαστρικό καρκίνο. Έχει αποδειχθεί ότι η μείωση της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α συμβάλλει στην καταστολή της κυκλίνης, τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή ανάπτυξης όγκου. Γι' αυτό, ο παράγοντας HNF4α θα μπορούσε να αποτελέσει έναν θεραπευτικό στόχο [85]. Ο παράγοντας GATA6 συναντάται στο γαστρικό, οισοφαγικό και παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα [86]. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η σίγηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ, αντιθέτως, η υπερέκφρασή τους επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δημιουργία των μοριακών κατασκευών στα πλαίσια της παρούσης μεταπτυχιακής διατριβής μπορεί να ανοίξει μελλοντικά τον δρόμο για την διερεύνηση της δράσης τέτοιων μεταγραφικών παραγόντων στην ρύθμιση του RECUR1.

## Βιβλιογραφία

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Kim, S.J. and C.W. Choi, *Common Locations of Gastric Cancer: Review of Research from the Endoscopic Submucosal Dissection Era*. J Korean Med Sci, 2019. **34**(35): p. e231.
3. Rao, J.N. and J.Y. Wang, in *Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth*. 2010: San Rafael (CA).
4. Yu, X., et al., *Clinicopathologic characteristics and prognosis of proximal and distal gastric cancer*. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 1037-1044.
5. Siewert, J.R. and H.J. Stein, *Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction*. Br J Surg, 1998. **85**(11): p. 1457-9.
6. Kim, Y.J., et al., *Prognostic effect of different etiologies in patients with gastric cardia cancer*. Medicine (Baltimore), 2019. **98**(50): p. e18397.
7. Piso, P., et al., *Proximal versus distal gastric carcinoma--what are the differences?* Ann Surg Oncol, 2000. **7**(7): p. 520-5.
8. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17036.
9. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
10. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
11. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. Int J Cancer, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
12. Pasechnikov, V., et al., *Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(38): p. 13842-62.
13. Fujiwara, Y., et al., *Effects of age on survival and morbidity in gastric cancer patients undergoing gastrectomy*. World J Gastrointest Oncol, 2017. **9**(6): p. 257-262.
14. Kim, J.H., et al., *Endoscopic features suggesting gastric cancer in biopsy-proven gastric adenoma with high-grade neoplasia*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(34): p. 12233-40.
15. Machairas, N., et al., *The value of staging laparoscopy in gastric cancer*. Ann Gastroenterol, 2017. **30**(3): p. 287-294.
16. Richman, D.M., et al., *Beyond gastric adenocarcinoma: Multimodality assessment of common and uncommon gastric neoplasms*. Abdom Radiol (NY), 2017. **42**(1): p. 124-140.
17. Waldum, H.L., et al., *Gastrin May Mediate the Carcinogenic Effect of Helicobacter pylori Infection of the Stomach*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(6): p. 1522-7.
18. Luebke, T., et al., *Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis*. World J Surg, 2005. **29**(11): p. 1422-7; discussion 1428.
19. Ming, S.C., *Gastric carcinoma. A pathobiological classification*. Cancer, 1977. **39**(6): p. 2475-85.
20. 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.
21. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
22. Correa, P. and M.B. Piazuelo, *The gastric precancerous cascade*. J Dig Dis, 2012. **13**(1): p. 2-9.

23. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. *Nature*, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
24. Morales-Sanchez, A. and E.M. Fuentes-Panana, *Epstein-Barr Virus-associated Gastric Cancer and Potential Mechanisms of Oncogenesis*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017. **17**(6): p. 534-554.
25. Yang, J., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype*. *Cancer Lett*, 2020. **495**: p. 191-199.
26. Ratti, M., et al., *Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches*. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(22): p. 4151-4162.
27. Ling, Y., et al., *Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020. **18**: p. 3301-3308.
28. Giam, M. and G. Rancati, *Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos*. *Cell Div*, 2015. **10**: p. 3.
29. Park, C.K., et al., *Receptor tyrosine kinase amplified gastric cancer: Clinicopathologic characteristics and proposed screening algorithm*. *Oncotarget*, 2016. **7**(44): p. 72099-72112.
30. Robert, F. and J. Pelletier, *Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation*. *Front Genet*, 2018. **9**: p. 507.
31. Cheng, T. and X. Zhan, *Pattern recognition for predictive, preventive, and personalized medicine in cancer*. *EPMA J*, 2017. **8**(1): p. 51-60.
32. Deng, N., et al., *Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility*. *Oncotarget*, 2017. **8**(66): p. 110635-110649.
33. He, C., et al., *Polymorphic rs9471643 and rs6458238 upregulate PGC transcription and protein expression in overdominant or dominant models*. *Mol Carcinog*, 2016. **55**(5): p. 586-99.
34. Rintisch, C., et al., *Natural variation of histone modification and its impact on gene expression in the rat genome*. *Genome Res*, 2014. **24**(6): p. 942-53.
35. Yang, L., et al., *Effects of a functional variant c.353T>C in snai1 on risk of two contextual diseases. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **189**(2): p. 139-48.
36. Dunna, N.R., et al., *Association of thymidylate synthase 5'-UTR 28bp tandem repeat and serine hydroxymethyltransferase C1420T polymorphisms with susceptibility to acute leukemia*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(4): p. 1719-23.
37. Mavaddat, N., et al., *Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. **107**(5).
38. Liu, W., et al., *A functional SNP rs1892901 in FOSL1 is associated with gastric cancer in Chinese population*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 41737.
39. Jiang, Y., et al., *Association between PRKAA1 rs13361707 T>C polymorphism and gastric cancer risk: Evidence based on a meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(14): p. e0302.
40. Wang, Z., et al., *Identification of new susceptibility loci for gastric non-cardia adenocarcinoma: pooled results from two Chinese genome-wide association studies*. *Gut*, 2017. **66**(4): p. 581-587.
41. Saeki, N., et al., *rs2294008T, a risk allele for gastric and gallbladder cancers, suppresses the PSCA promoter by recruiting the transcription factor YY1*. *Genes Cells*, 2015. **20**(5): p. 382-91.
42. Jang, J., C. Ahn, and S.K. Park, *Genome-wide association study to discover susceptible loci for gastric cancer in Korean population*. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 2018. **66**: p. S295.

43. Giral, H., U. Landmesser, and A. Kratzer, *Into the Wild: GWAS Exploration of Non-coding RNAs*. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 181.
44. Kirchner, S., et al., *Alteration of protein function by a silent polymorphism linked to tRNA abundance*. *PLoS Biol*, 2017. **15**(5): p. e2000779.
45. Saeki, N., H. Sakamoto, and T. Yoshida, *Mucin 1 gene (MUC1) and gastric-cancer susceptibility*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(5): p. 7958-73.
46. de Oliveira, J.G. and A.E. Silva, *Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(11): p. 1235-42.
47. Shin, Y., et al., *Epigenetic Modification of CFTR in Head and Neck Cancer*. *J Clin Med*, 2020. **9**(3).
48. de Oliveira, J.G., et al., *Influence of functional polymorphisms in TNF-alpha, IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(12): p. 9159-70.
49. Cuykendall, T.N., M.A. Rubin, and E. Khurana, *Non-coding genetic variation in cancer*. *Curr Opin Syst Biol*, 2017. **1**: p. 9-15.
50. Fagny, M., et al., *Nongenetic cancer-risk SNPs affect oncogenes, tumour-suppressor genes, and immune function*. *Br J Cancer*, 2020. **122**(4): p. 569-577.
51. Sandoval-Borquez, A., et al., *Noncoding Genomics in Gastric Cancer and the Gastric Precancerous Cascade: Pathogenesis and Biomarkers*. *Dis Markers*, 2015. **2015**: p. 503762.
52. Pao, J.B., et al., *Association of Genetic Variants of Small Non-Coding RNAs with Survival in Colorectal Cancer*. *Int J Med Sci*, 2018. **15**(3): p. 217-222.
53. Skierucha, M., et al., *Molecular alterations in gastric cancer with special reference to the early-onset subtype*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(8): p. 2460-74.
54. Bianchi, J.J., et al., *Not all cancers are created equal: Tissue specificity in cancer genes and pathways*. *Curr Opin Cell Biol*, 2020. **63**: p. 135-143.
55. Law, P.J., et al., *Association analyses identify 31 new risk loci for colorectal cancer susceptibility*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 2154.
56. Jacome, A.A., et al., *Personalized medicine in gastric cancer: Where are we and where are we going?* *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(3): p. 1160-71.
57. Diamantopoulos, M.A., P. Tsiakanikas, and A. Scorilas, *Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer*. *Ann Transl Med*, 2018. **6**(12): p. 241.
58. Li, D. and M.Q. Yang, *Identification and characterization of conserved lncRNAs in human and rat brain*. *BMC Bioinformatics*, 2017. **18**(Suppl 14): p. 489.
59. Johnsson, P., et al., *Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(3): p. 1063-71.
60. Sun, Q., Q. Hao, and K.V. Prasanth, *Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression*. *Trends Genet*, 2018. **34**(2): p. 142-157.
61. Siddiqui, H., et al., *Roles of long non-coding RNAs in colorectal cancer tumorigenesis: A Review*. *Mol Clin Oncol*, 2019. **11**(2): p. 167-172.
62. Latge, G., et al., *Natural Antisense Transcripts: Molecular Mechanisms and Implications in Breast Cancers*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(1).
63. Mathy, N.W. and X.M. Chen, *Long non-coding RNAs (lncRNAs) and their transcriptional control of inflammatory responses*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(30): p. 12375-12382.
64. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm*. *Cancer Res*, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
65. Zhang, X., et al., *lncRNA MACC1-AS1 sponges multiple miRNAs and RNA-binding protein PTBP1*. *Oncogenesis*, 2019. **8**(12): p. 73.

66. Gao, Y., et al., *Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(24): p. 3401-3412.
67. Pan, W., et al., *A functional lncRNA HOTAIR genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility*. Mol Carcinog, 2016. **55**(1): p. 90-6.
68. Petkevicius, V., et al., *Association of Long Non-Coding RNA Polymorphisms with Gastric Cancer and Atrophic Gastritis*. Genes (Basel), 2020. **11**(12).
69. Conesa, A., et al., *A survey of best practices for RNA-seq data analysis*. Genome Biol, 2016. **17**: p. 13.
70. Qi, F., et al., *Long noncoding AGAP2-AS1 is activated by SP1 and promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer*. J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 48.
71. Xu, M.D., et al., *A Positive Feedback Loop of lncRNA-PVT1 and FOXM1 Facilitates Gastric Cancer Growth and Invasion*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(8): p. 2071-2080.
72. Tan, H., et al., *Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications*. Theranostics, 2020. **10**(19): p. 8880-8902.
73. Barth, D.A., et al., *lncRNA and Mechanisms of Drug Resistance in Cancers of the Genitourinary System*. Cancers (Basel), 2020. **12**(8).
74. Wei, L., et al., *Noncoding RNAs in gastric cancer: implications for drug resistance*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 62.
75. Shakirova, K.M., V.Y. Ovchinnikova, and E.B. Dashinimaev, *Cell Reprogramming With CRISPR/Cas9 Based Transcriptional Regulation Systems*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 882.
76. Busuttil, R.A., et al., *An orthotopic mouse model of gastric cancer invasion and metastasis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 825.
77. Liu, H., et al., *Long Non-coding RNA LINC00941 as a Potential Biomarker Promotes the Proliferation and Metastasis of Gastric Cancer*. Front Genet, 2019. **10**: p. 5.
78. Yamazaki, T., et al., *CRISPRa-mediated NEAT1 lncRNA upregulation induces formation of intact paraspeckles*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **504**(1): p. 218-224.
79. Ho, T.T., et al., *Regulation of PCGEM1 by p54/nrb in prostate cancer*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34529.
80. Bester, A.C., et al., *An Integrated Genome-wide CRISPRa Approach to Functionalize lncRNAs in Drug Resistance*. Cell, 2018. **173**(3): p. 649-664 e20.
81. Shen, C., et al., *Variant of SNP rs1317082 at CCSlnc362 (RP11-362K14.5) creates a binding site for miR-4658 and diminishes the susceptibility to CRC*. Cell Death Dis, 2018. **9**(12): p. 1177.
82. Wu, A.C.K. and F.J. Van Werven, *Transcribe this way: Rap1 confers promoter directionality by repressing divergent transcription*. Transcription, 2019. **10**(3): p. 164-170.
83. Zhang, Y., et al., *Expression of CDX2 in gastric cardia adenocarcinoma and its correlation with H. pylori and cell proliferation*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 54973-54982.
84. Masood, M.A., A. Loya, and M.A. Yusuf, *CDX2 as a prognostic marker in gastric cancer*. Acta Gastroenterol Belg, 2016. **79**(2): p. 197-200.
85. Chang, H.R., et al., *HNF4alpha is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer*. Gut, 2016. **65**(1): p. 19-32.
86. Sulahian, R., et al., *An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer*. Oncogene, 2014. **33**(49): p. 5637-48.