



ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



DEPARTMENT OF
Biochemistry &
Biotechnology
UNIVERSITY OF THESSALY

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΩΝ GATA ΣΕ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ DNA ΤΟΥ LNCRNA
RECUR1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΔΑΜΙΑΝΙΔΗ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ,
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2022

**CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION OF THE CELL GENEALOGY
REGULATOR GATA IN REGULATORY DNA SEQUENCES OF THE LNCRNA
RECUR1 IN CANCER**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ♦ Αντώνιος Γιακουντής, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής
- ♦ Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας
- ♦ Σταματία Παπουτσοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Γαστρικός Καρκίνος	7
1.1.1 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά του Γαστρικού Καρκίνου	7
1.1.2 Ανατομικοί Υπότυποι και Ιστολογική Ταξινόμηση του Γαστρικού Καρκίνου	8
1.1.3 Γενετική/Μοριακή Ταξινόμηση του Γαστρικού Καρκίνου	10
1.1.4 Παράγοντες Κινδύνου, Συμπτώματα και Διάγνωση του Γαστρικού Καρκίνου	12
1.2 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες της Οικογένειας GATA	13
1.2.1 Εισαγωγή στους Μεταγραφικούς Παράγοντες GATA	13
1.2.2 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες GATA στον Καρκίνο	16
1.3 Μακρά Μη Κωδικοποιητικά RNAs (Long Non-Coding RNAs, lncRNAs)	17
1.3.1 Εισαγωγή στα lncRNAs	17
1.3.2 Ταξινόμηση των lncRNAs με Βάση την Γονιδιωματική τους Προέλευση	18
1.3.3 Ταξινόμηση των lncRNAs με Βάση τη Λειτουργία τους	19
1.3.4 Ο Ρόλος των lncRNAs στον Καρκίνο	21
1.3.5 Ρύθμιση της Έκφρασης των lncRNAs	23
2. ΣΚΟΠΟΣ	24
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	25
3.1 ΥΛΙΚΑ	25
3.1.1 Πλασμιδιακοί Φορείς	25
3.1.2 Βακτηριακά Στελέχη	26
3.1.3 Κυτταρικές Σειρές	27
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	27

3.2.1 Εξαγωγή RNA (RNA Extraction)	27
3.2.2 Κατεργασία DNάσης (DNase Treatment)	28
3.2.3 Σύνθεση cDNA (cDNA Synthesis)	29
3.2.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)	29
3.2.5 Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση (Site-Directed Mutagenesis, SDM) με Χρήση της Τεχνικής Polymerase Chain Reaction (PCR) και Αντίδραση Λιγάσης	30
3.2.6 Κλωνοποίηση Πλασμιδιακών Φορέων μέσω Μετασηματισμού Βακτηριακών Κυττάρων και Διαγνωστικές Πέψεις/PCRs	33
3.2.7 Δοκιμασία Διπλής Λουσιφεράσης (Dual Luciferase Reporter Assay)	35
3.2.8 Δημιουργία Πλασμιδιακής Κατασκευής για CRISPR-nCas9	36
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
4.1 Επίδραση Καταστολής και Υπερέκφρασης Μεταγραφικών Παραγόντων στην Έκφραση του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του	38
4.2 Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση (SDM) στο GATA Μοτίβο του Υποκινητή του RECUR1	42
4.3 Δοκιμασία Διπλής Λουσιφεράσης (Dual Luciferase Reporter Assay) του Κλωνοποιημένου pGL4.10	44
4.4 Μελέτη Ανοσοκατακρήμνισης Χρωματίνης (ChIP) για τους Μεταγραφικούς Παράγοντες GATA4/6	45
4.5 Δημιουργία Πλασμιδιακής Κατασκευής για CRISPR-nCas9	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	54
6.1 Εισαγωγή στην Τεχνική CRISPR-Cas9	54
6.2 Η Τεχνική CRISPR-nCas9	55
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γαστρικός καρκίνος παρουσιάζει σχετικά υψηλή συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας, παγκοσμίως, και διακρίνεται σε αρκετούς υπότυπους με βάση τόσο ιστολογικά όσο και μοριακά κριτήρια. Οι ασθενείς δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα συμπτώματα στα αρχικά στάδια της νόσου, δυσχεραίνοντας έτσι την άμεση διάγνωση. Για τον λόγο αυτό, μελετάται η χρήση διάφορων μη επεμβατικών μοριακών βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων των lncRNAs, σε εφαρμογές έγκαιρης διάγνωσης, πρόγνωσης ή θεραπείας. Τα lncRNAs κατέχουν διάφορες λειτουργίες, η απορρύθμιση των οποίων συνδέεται ιστο-ειδικά και χρονο-ειδικά με τον καρκίνο. Η ρύθμιση της έκφρασής τους επιτελείται από μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν, επίσης, στην έκφραση πρωτεϊνών, όπως η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων GATA. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη μορφογένεση ιστών, ενώ η έκτοπη έκφρασή τους συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου. Η παρούσα εργασία εστιάζει στο lncRNA RECUR1 και αποσκοπεί στην ανάλυση της ρύθμισης της έκφρασής του, κυρίως από τους παράγοντες GATA4/6. Με την αξιοποίηση διάφορων τεχνικών, επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών με τον υποκινητή του RECUR1, καθώς και η μη αλληλεπίδρασή τους με τον υποκινητή του κωδικοποιητικού γονιδίου-στόχου του. Τέλος, μέσω της εργασίας αυτής, επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση sgRNAs σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα για την χρήση της τεχνικής CRISPR-nCas9 με σκοπό την *ex vivo* τροποποίηση ρυθμιστικών στοιχείων, η οποία αποτελεί μελλοντικό στόχο της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης.

Λέξεις-κλειδιά: γαστρικός καρκίνος, lncRNAs, μεταγραφικοί παράγοντες GATA, κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, RECUR1

ABSTRACT

Gastric cancer has a relatively high incidence and mortality rate worldwide, and is divided into several subtypes, based on histological and molecular criteria. Patients do not show specific symptoms during the early stages of the disease, making it difficult to make an immediate diagnosis. As a result, the use of various non-invasive molecular biomarkers, including lncRNAs, in early diagnosis, prognosis or treatment applications is being studied. LncRNAs have various functions, the deregulation of which is associated with cancer, in a tissue- and time-specific way. Their expression is regulated by transcription factors that are, also, involved in the expression of proteins, such as the GATA family. These factors are related to tissue growth and morphogenesis and their ectopic expression is associated with the occurrence of cancer. This thesis focuses on the lncRNA RECUR1 and aims to analyze the regulation of its expression, mainly by the GATA4/6 factors. Using various techniques, the interaction of these factors with the promoter of RECUR1 was confirmed, as well as their non-interaction with the promoter of its target coding gene. Finally, the cloning of sgRNAs into a suitable plasmid vector for the use of the CRISPR-nCas9 technique, aiming the *ex vivo* modification of regulatory elements, was achieved, setting the first step of the future research goal.

Keywords: gastric cancer, lncRNAs, GATA transcription factors, site-directed mutagenesis (SDM), RECUR1

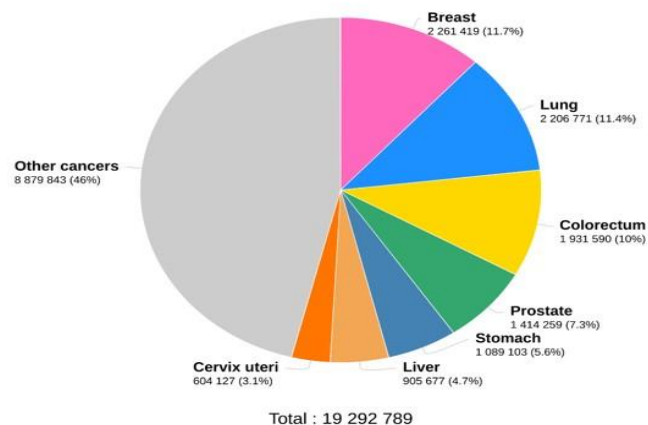
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γαστρικός Καρκίνος

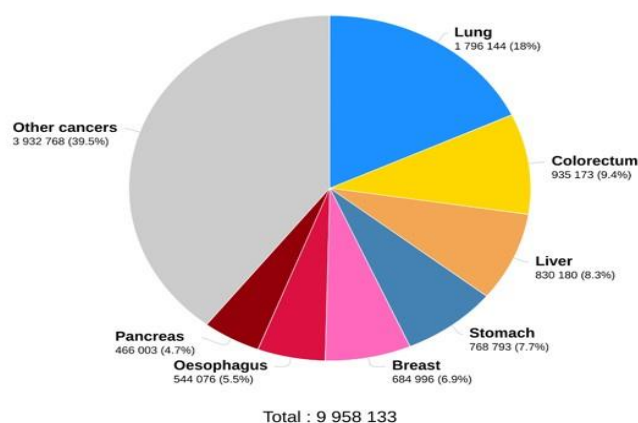
1.1.1 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά του Γαστρικού Καρκίνου

Ο γαστρικός καρκίνος ή καρκίνος του στομάχου είναι μία συχνή μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) και τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC), αποτελεί τον πέμπτο τύπο καρκίνου σε επίπεδο διάγνωσης και τον τέταρτο σε επίπεδο θνησιμότητας, παγκοσμίως, συγκριτικά με άλλους τύπους καρκίνου, για το 2020 (Εικ. 1). Τα υψηλότερα επίπεδα, τόσο των κρουσμάτων όσο και των θανάτων, εντοπίζονται στην Ανατολική Ασία, στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη, καθώς και στη Νότια Αμερική. Επίσης, η συχνότητα εμφάνισης σε άντρες είναι σχεδόν δύο φορές υψηλότερη από εκείνη σε γυναίκες (Εικ. 2) [1].

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages



Estimated number of deaths in 2020, worldwide, both sexes, all ages

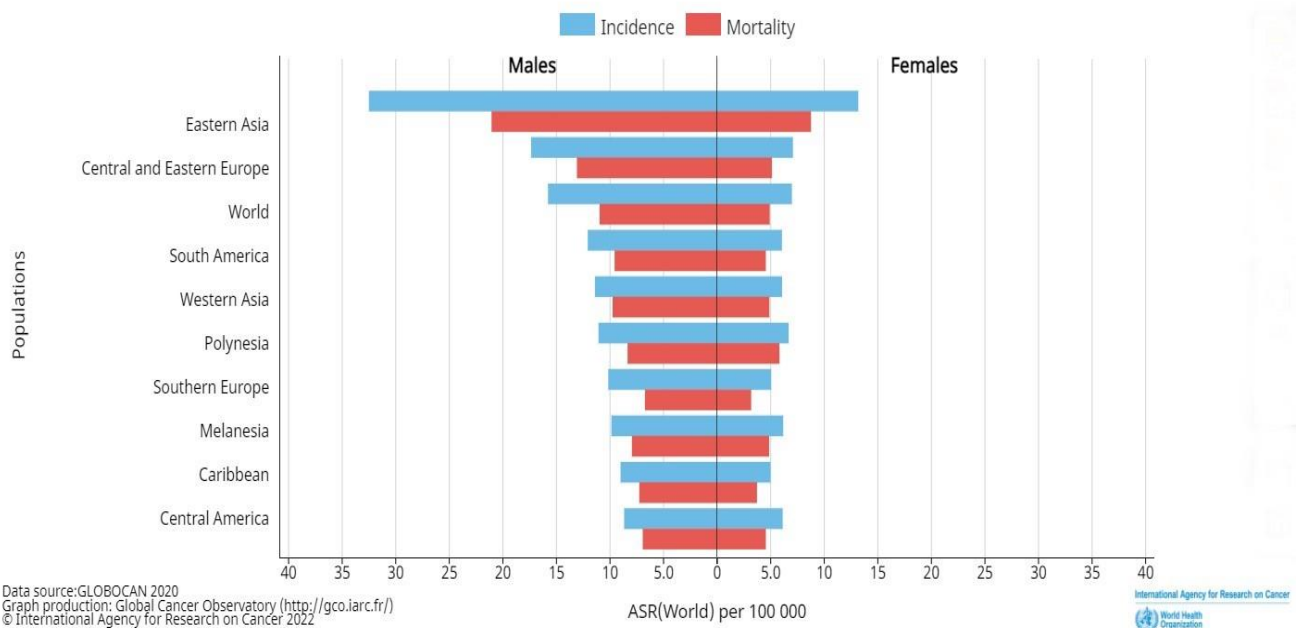


Data source: Globocan 2020
Graph production: Global Cancer
Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer
World Health
Organization

Εικόνα 1: Σύγκριση κρουσμάτων και θανάτων διάφορων τύπων καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2020. Έχουν συμπεριληφθεί όλες οι ηλικίες και τα φύλα. Τα διαγράμματα λήφθηκαν από το WHO/IARC/CANCER TODAY, <https://gco.iarc.fr/today/>.

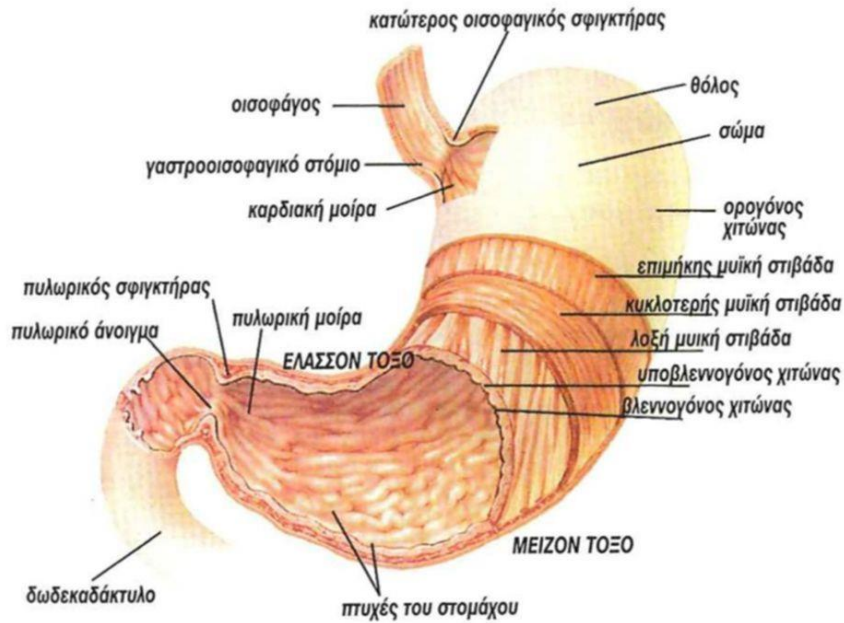
Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, stomach, all ages



Εικόνα 2: Σύγκριση κρουσμάτων και θανάτων του γαστρικού καρκίνου, με βάση διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα και μεταξύ των δύο φύλων, για το έτος 2020. Έχουν συμπεριληφθεί όλες οι ηλικίες. Μία περιοχή υψηλού κινδύνου χαρακτηρίζεται από $ASR > 20$, μεσαίου κινδύνου από $ASR = 10-20$ και χαμηλού κινδύνου από $ASR < 10$ [2]. Το διάγραμμα λήφθηκε από το WHO/IARC/CANCER TODAY, <https://gco.iarc.fr/today/>.

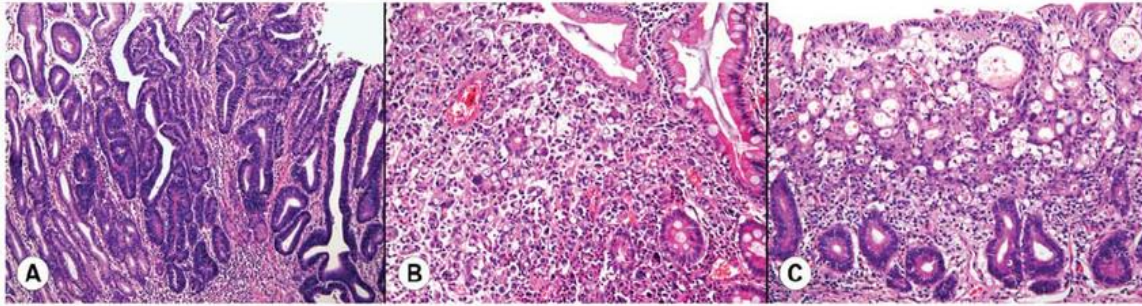
1.1.2 Ανατομικοί Υπότυποι και Ιστολογική Ταξινόμηση του Γαστρικού Καρκίνου

Ο γαστρικός καρκίνος, ανατομικά, διακρίνεται σε δύο υπότυπους: τον εγγύ ή καρδιακό (proximal or cardia) και τον απομακρυσμένο ή μη καρδιακό (distal or non-cardia). Ο πρώτος εντοπίζεται κοντά στην καρδιακή μοίρα του στομάχου και συγκεκριμένα, κοντά στην περιοχή σύνδεσης του οισοφάγου με τον στόμαχο (Εικ. 3). Ο δεύτερος αναφέρεται σε πιο απομακρυσμένες περιοχές του στομάχου. Οι δύο αυτοί υπότυποι τείνουν να έχουν διαφορετικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, καθώς και να προκύπτουν από διαφορετικούς παράγοντες κινδύνου. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μη καρδιακού γαστρικού καρκίνου, σε σχέση με τον καρδιακό [3].



Εικόνα 3: Ανατομία του στομάχου (<https://slideplayer.gr/slide/11136439/>).

Η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του στομάχου βασίζεται στη φαινοτυπική εικόνα του. Συγκεκριμένα, στα πρωταρχικά στάδιά του, διακρίνεται σε τρεις τύπους. Ο τύπος I χαρακτηρίζει τον ιστό ως προεξέχοντα (protruded), ο τύπος II ως επιφανειακό (superficial) και ο τύπος III ως ανασκαμμένο (excavated). Ο ιστός που κατατάσσεται στον τύπο II διακρίνεται περαιτέρω σε υπερυψωμένο (elevated), επίπεδο (flat) ή συνθλιμμένο (depressed). Σε πιο προχωρημένα στάδια, ταξινομείται, με βάση τον Borrmann, σε τέσσερις τύπους. Ο τύπος I αναφέρεται σε πολύποδα χωρίς έλκος και με ευρεία βάση, ο τύπος II σε ιστό με έλκος και υπερυψωμένα και αιχμηρά όρια, ο τύπος III σε έλκος με διάχυτη διήθηση στη βάση και ο τύπος IV σε ιστό με διάχυτη διηθητική πάχυνση του τοιχώματος. Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με γαστρικό καρκίνο τύπου IV συνήθως δεν επιβιώνουν [1]. Επιπλέον, ο γαστρικός καρκίνος, σε πρώιμο στάδιο, μπορεί να ταξινομηθεί σε εντερικό (intestinal), διάχυτο (diffuse), μεικτό (mixed) και αταξινομήτο (unclassified), με βάση τον Laurén (Εικ. 4) [4].



Εικόνα 4: Ιστολογική ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου κατά Laurén: Α) Εντερικός τύπος, το μεγαλύτερο μέρος του όγκου αποτελείται από αδένες παρόμοιους με το βλεννογόνο του παχέος εντέρου ή του στομάχου. Β) Διάχυτος τύπος, αποτελείται αποκλειστικά από μη συνεκτικά καρκινικά κύτταρα που διεισδύουν διάχυτα στο στρώμα, παρουσιάζοντας σχετικά βαθιά διήθηση με μικρό ή καθόλου σχηματισμό αδένων. Γ) Μεικτός τύπος, ο όγκος εμφανίζει χαρακτηριστικά τόσο εντερικού όσο και διάχυτου τύπου ταυτόχρονα. Τα επιφανειακά μέρη του όγκου εμφανίζουν τυπικά χαρακτηριστικά αδένων, όπως στον εντερικό τύπο, ενώ το βαθύτερο τμήμα του όγκου αποτελείται από ακανόνιστους αδένες με μη συνεκτικά μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα με διάχυτη διήθηση, όπως στον διάχυτο τύπο. Τα δείγματα αφορούν γαστρικά καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα και η χρώση τους έγινε με αιματοξυλίνη και ηωσίνη [5].

1.1.3 Γενετική/Μοριακή Ταξινόμηση του Γαστρικού Καρκίνου

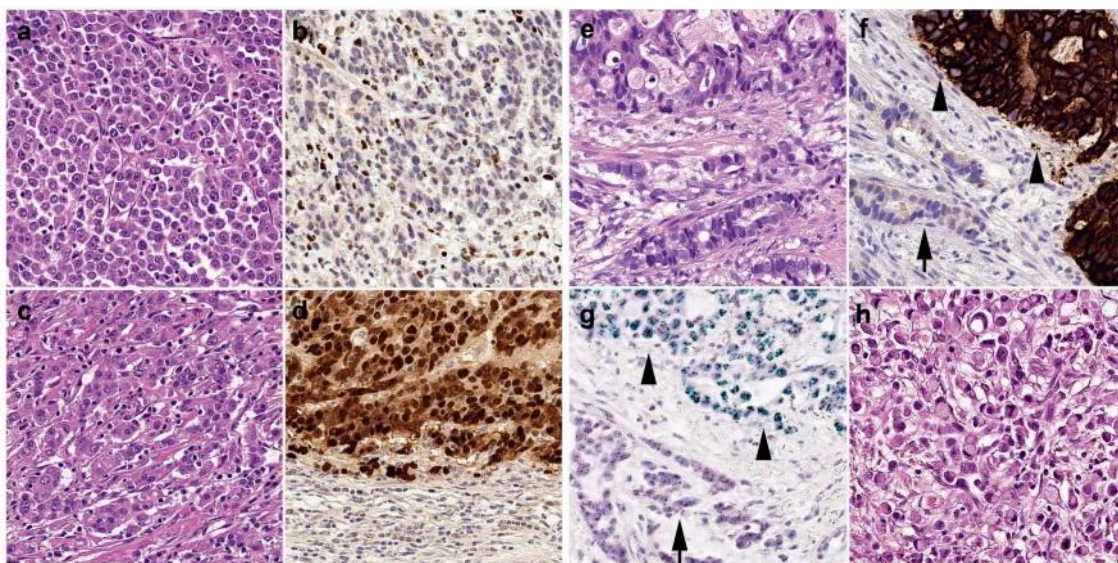
Ο καρκίνος του στομάχου χαρακτηρίζεται από γενετική πολυπλοκότητα. Για τον λόγο αυτό, διακρίνεται σε τέσσερις μοριακούς υπότυπους, οι οποίοι είναι δυνατό να συνυπάρχουν: μικροδορυφορικά ασταθής (microsatellite instable, MSI), EBV θετικός (Epstein-Barr-virus (EBV)-positive), χρωμοσωμικά ασταθής (chromosomal instable, CIN) και γονιδιωματικά σταθερός (genomically stable, GS) γαστρικός καρκίνος (Εικ. 5) [4, 6, 7].

- ♦ Μικροδορυφορικά ασταθής (microsatellite instable, MSI): ο όγκος αυτού του υπότυπου κατατάσσεται ιστολογικά στον εντερικό, κατά Laurén, υπότυπο και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μεταλλάξεων, γενετική ετερογένεια και εκτεταμένη μεθυλίωση νησίδων CpG (CpG-island methylator phenotype, CIMP). Επίσης, διακρίνεται από τη σίγαση του γονιδίου *MLH1*, λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη επιδιόρθωσης DNA. Αποτελείται από πλειομορφικά κύτταρα με ποικίλο μέγεθος και μεγάλο πυρήνα, τα οποία περιβάλλονται από άφθονο φλεγμονώδες στρώμα. Το στρώμα αυτό αποτελείται από πολυμορφοπύρηνα και λεμφοκύτταρα. Ο μικροδορυφορικά ασταθής γαστρικός καρκίνος επικρατεί κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα γυναικείου φύλου και εντοπίζεται στη μη καρδιακή περιοχή του στομάχου. Λόγω της μειωμένης μετάστασης σε λεμφαδένες, προσδίδει περισσότερες πιθανότητες επιβίωσης στον ασθενή [8, 9].
- ♦ EBV θετικός (Epstein-Barr virus (EBV)-positive): ο υπότυπος αυτός οφείλεται σε λανθάνουσα μόλυνση του ιού έρπητα Epstein-Barr (EBV) και χαρακτηρίζεται από πολύπλοκο ιστολογικό

φαινότυπο, ενώ συνοδεύεται και από μεθυλίωση νησίδων CpG (CpG-island methylator phenotype, CIMP) [10]. Επιπρόσθετα, παρατηρείται απορρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης του ανοσοποιητικού και μεταλλάξεις στα γονίδια *PIK3CA* και *ARID1A*, τα οποία κωδικοποιούν την υπομονάδα PI3Kα της κινάσης PI3K και μία υπομονάδα του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI–SNF αντίστοιχα [11]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί υπερμεθυλίωση του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *CDKN2A* και επομένως σίγασή του. Ο συγκεκριμένος υπότυπος επικρατεί στους άντρες και εντοπίζεται κυρίως στην καρδιακή περιοχή του στομάχου και σε υπολείμματα στομάχου μετά από γαστρεκτομή. Επίσης, σχετίζεται με τη διήθηση λεμφοκυττάρων και έχει μειωμένη μετάσταση σε λεμφαδένες [12].

- ♦ Χρωμοσωμικά ασταθής (chromosomal instable, CIN): αφορά το 50% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου. Ο καρκινικός ιστός που κατατάσσεται σε αυτό τον υπότυπο, ταξινομείται στον εντερικό τύπο, κατά Laurén, και συνήθως εντοπίζεται στην καρδιακή περιοχή του στομάχου. Χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* και από γονιδιωματική ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορους υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης (όπως *EGFR*, *FGFR2*, *HER2* και *MET*). Στη δεύτερη περίπτωση, οι μεταλλάξεις είναι κέρδους λειτουργίας, με αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη. Ανάλογα με τον υποδοχέα, έχει παρατηρηθεί διαφορετική ταξινόμηση των όγκων ανατομικά, καθώς και διαφορετική συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των δύο φύλων [4]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ενίσχυση των *CCNE1*, *CCND1* και *CDK6*, πρωτεϊνών που έχουν ρόλο μεσολαβητών στον κυτταρικό κύκλο [13].
- ♦ Γονιδιωματικά σταθερός (genomically stable, GS): ο υπότυπος αυτός ταξινομείται ιστολογικά, κατά Laurén, ως διάχυτος και η διάγνωσή του γίνεται σε νεαρή ηλικία. Επίσης, χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στα γονίδια *CDH1* και *RHOA*, μετατοπίσεις μεταξύ των γονιδίων *CLDN18* και *ARHGAP26*, καθώς και από υψηλή έκφραση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την κυτταρική προσκόλληση. Οι μεταλλάξεις του *CDH1* σε γαμετικά κύτταρα οδηγούν σε κληρονόμηση του γαστρικού καρκίνου, με σχετικά αδιαφοροποίητο φαινότυπο και μειωμένες πιθανότητες επιβίωσης. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *RHOA*, που φυσιολογικά κωδικοποιεί μία GTPάση, αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, οδηγώντας σε αλλαγές στη μορφολογία και τη μετανάστευση των κυττάρων, ευνοώντας την ανάπτυξη όγκου. Τα γονίδια *CLDN18* και *ARHGAP26* σχετίζονται με τη λειτουργία των στενοσυνδέσμων του επιθηλίου του στομάχου και την ενεργοποίηση της *RHOA* αντίστοιχα, γι' αυτό και η χρωμοσωμική μετατόπισή τους επηρεάζει την κυτταρική προσκόλληση και τη ρύθμιση της *RHOA*. Έχει παρατηρηθεί ότι δεν

είναι δυνατή η ταυτόχρονη ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο της RHOA και της μετατόπισης *CLDN18-ARHGAP26* [12, 13].



Εικόνα 5: Ιστολογική απεικόνιση της μοριακής ταξινόμησης του γαστρικού καρκίνου: a, b) Μικροδορυφορικά ασταθής, εμφανίζει σταθερό μοτίβο ανάπτυξης (a) και απώλεια έκφρασης του *MLH1* (b). c, d) EBV θετικός, τα καρκινικά κύτταρα που είναι EBV θετικά (c) συχνά εμφανίζουν λεμφοκυτταρική διήθηση και χρώση του πυρήνα μετά από *EBER-in situ* υβριδοποίηση (d). e-g) Χρωμοσωμικά ασταθής, ταξινομείται σε εντερικό τύπο κατά Laurén (e) και χαρακτηρίζεται από ενεργοποιητικές μεταλλάξεις σε κωδικοποιητικά γονίδια υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, όπως ο Her2/neu (f). Η υπερέκφραση του Her2/neu (f) και η γονιδιωματική ενίσχυση του γονιδίου *HER2* (g) μπορεί να είναι ετερογενείς με περιοχές θετικές για τον όγκο (κεφαλές βέλους) καθώς και αρνητικές (βέλη), στον ίδιο πρωτεύοντα όγκο. h) Γονιδιωματικά σταθερός, ταξινομείται συχνά στον διάχυτο τύπο κατά Laurén. Τα δείγματα αφορούν γαστρικό καρκινικό ιστό και έχουν βαφεί με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (a, c, e, h), αντι-*MLH1* ανοσοχρώση (b), *EBER-in situ* υβριδοποίηση (d), Her2/neu ανοσοχρώση (f) ή *HER2-in situ* υβριδοποίηση (g) [4].

1.1.4 Παράγοντες Κινδύνου, Συμπτώματα και Διάγνωση του Γαστρικού Καρκίνου

Η εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να διαφέρουν μεταξύ του καρδιακού και του μη καρδιακού ανατομικού υπότυπου. Ειδικότερα, η προδιάθεση και των δύο υποτύπων αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας, το αρσενικό φύλο, το κάπνισμα, το οικογενειακό ιστορικό, την έλλειψη φυσικής άσκησης, την έκθεση σε ακτινοβολία, την αρνητική πρόσληψη φυτικών ινών και τη φυλή, η οποία σχετίζεται κυρίως με την επιρροή του περιβάλλοντος και λιγότερο με το γονιδίωμα. Αποκλειστικά ο καρδιακός τύπος επηρεάζεται, επιπλέον, από την παχυσαρκία και τη γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (Gastroesophageal Reflux Disease, GERD). Ο μη καρδιακός γαστρικός καρκίνος μπορεί να είναι και αποτέλεσμα της μόλυνσης με *Helicobacter pylori*, της υψηλής πρόσληψης αλατιού, που καταστρέφει

το γαστρικό βλεννογόνο προκαλώντας γαστρίτιδα, της μειωμένης κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών, που συνδέεται με μειωμένη πρόσληψη ορισμένων θρεπτικών συστατικών που βοηθούν στον μεταβολισμό, και της χαμηλής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης, λόγω των αντίστοιχων συνθηκών ζωής [14].

Η χρόνια λοίμωξη με *H. pylori*, και κυρίως των στελεχών που εκφράζουν τον παράγοντα τοξικότητας *cagA* (cytotoxin-associated gene A), οδηγεί, σε μεγάλο ποσοστό, στην εμφάνιση μη καρδιακού γαστρικού καρκίνου. Η μόλυνση μπορεί να προκληθεί κατά την παιδική ηλικία, λόγω ανθυγιεινών συνθηκών διαβίωσης, και να διατηρηθεί, αν δεν θεραπευτεί εγκαίρως. Η ανάπτυξη καρκίνου συντελείται είτε μέσω της δράσης του βακτηρίου, με συνέπεια την πρόκληση φλεγμονής στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, είτε μέσω της δράσης του παράγοντα *cagA*, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της λειτουργίας του στομαχικού επιθηλίου. Αυτές οι μέθοδοι πιθανότατα συντελούνται μαζί [15].

Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, αυτοί μπορεί να αφορούν κληρονομήσιμα αυτοσωμικά σύνδρομα, όπως ο κληρονομικός διάχυτος γαστρικός καρκίνος (Hereditary Diffuse Gastric Cancer, HDGC), ο οικογενής αδενωματώδης πολύποδας (Familial Adenomatous Polyposis, FAP) και το σύνδρομο Peutz–Jeghers (Peutz–Jeghers Syndrome, PJS). Επίσης, οι μονονουκλεοτιδικές μεταλλάξεις, όπως τα SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms), παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση γαστρικού καρκίνου [14].

Η ανάπτυξη του καρκίνου του στομάχου εκδηλώνεται μέσω διάφορων συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, τα πιο κοινά συμπτώματα είναι δυσπεψία, ανορεξία ή πρώιμος κορεσμός, μείωση βάρους και κοιλιακός πόνος. Επίσης, ο καρδιακός γαστρικός καρκίνος σχετίζεται με δυσφαγία ή παλινδρόμηση. Ο καρκίνος του στομάχου μπορεί να διαγνωσθεί με ενδοσκοπική εξέταση, κατά την οποία γίνεται λήψη δειγμάτων για βιοψία. Αν τα συμπτώματα υπάρχουν κατά τη διάγνωση, τότε συνήθως ο ασθενής βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, με συνέπεια να έχει μειωμένες πιθανότητες ίασης [16]. Για αυτό τον λόγο, είναι αναγκαία η εύρεση μοριακών βιοδεικτών που θα επιτυγχάνουν έγκαιρη διάγνωση.

1.2 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες της Οικογένειας GATA

1.2.1 Εισαγωγή στους Μεταγραφικούς Παράγοντες GATA

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας GATA παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και τη μορφογένεση των ιστών. Ειδικότερα, συμμετέχουν στην ανάπτυξη διάφορων ιστών και από τα τρία βλαστικά στρώματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα), συμπεριλαμβανομένου του

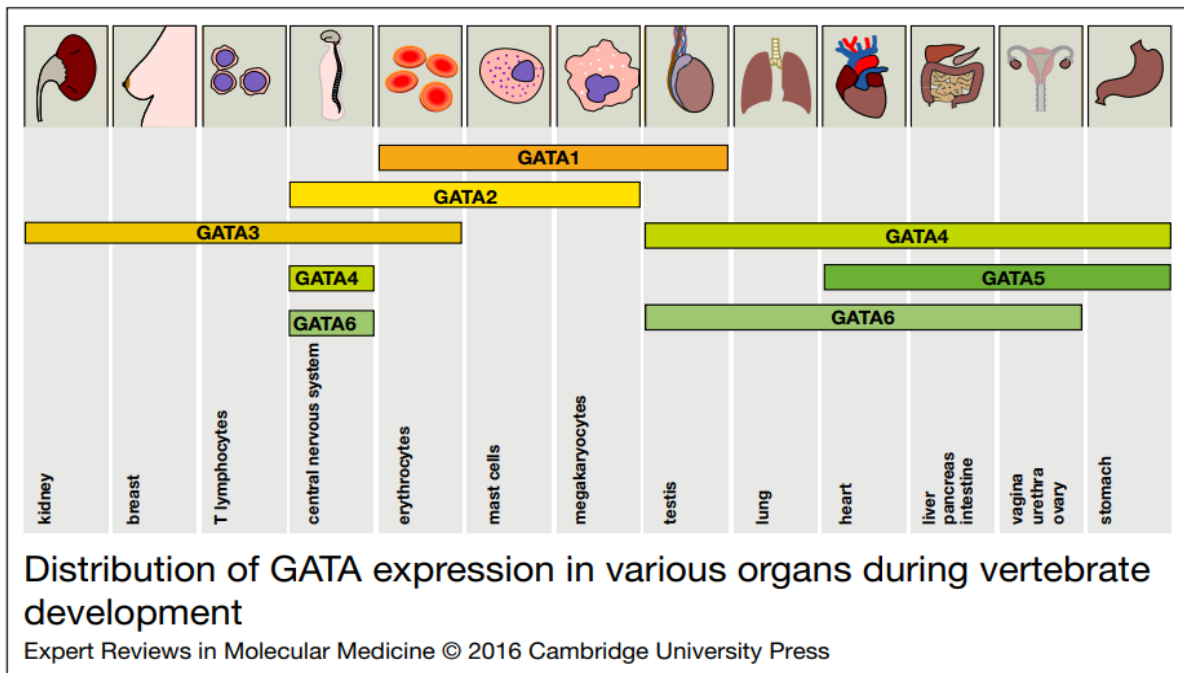
δέρματος, του εγκεφάλου, των γονάδων, του ήπατος, του αιμοποιητικού, του καρδιαγγειακού και του ουρογεννητικού συστήματος. Επίσης, λειτουργούν ως ρυθμιστές της διαφοροποίησης των κυττάρων-προγόνων και του προσδιορισμού κυτταρικής γενεαλογίας. Οι παράγοντες GATA, επιπλέον, κατατάσσονται στους «πρωτοπόρους μεταγραφικούς παράγοντες» (pioneer transcription factors), οι οποίοι είναι ικανοί να αναγνωρίζουν και να προσδένουν ετεροχρωματικές αλληλουχίες DNA, προωθώντας την προσβασιμότητα της χρωματίνης και την επιστράτευση άλλων μεταγραφικών ρυθμιστών [17].

Οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες πήραν το όνομά τους από την αλληλουχία στην οποία προσδένονται: 5'-(A/T)GATA(A/G)-3'. Η συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνωρίζεται από τις δύο επικράτειες δακτύλων ψευδαργύρου του τύπου C2H2 (C2H2-type zinc-finger domains, Cys-X2-C-X17-Cys-X2-Cys), οι οποίες εντοπίζονται σε όλους τους GATA παράγοντες [18]. Η αμινο-τελική και η καρβοξυ-τελική περιοχή των επικρατειών αυτών είναι λιγότερο συντηρημένες, ενώ στην πρώτη εντοπίζονται οι περιοχές ενεργοποίησης [19]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA είναι εξελικτικά συντηρημένοι, για αυτό και εντοπίζονται σε διάφορους οργανισμούς. Στα σπονδυλωτά, υπάρχουν έξι παράλογα των παραγόντων (GATA1-6), τα οποία, με βάση την χρονική και χωρική εντόπισή τους, διακρίνονται σε δύο υποοικογένειες: την αιμοποιητική (GATA1/2/3) και την καρδιακή ή ενδοδερμική (GATA4/5/6) [17].

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA1 εκφράζεται τόσο στα πρώιμα όσο και στα τελείως διαφοροποιημένα κύτταρα και κυρίως σε ερυθροειδή κύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα, μαστοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα του αιμοποιητικού συστήματος [20]. Η λειτουργία του επιτελείται κατά την ερυθροποίηση και σχετίζεται με την ανάπτυξη των κυττάρων, αλλά και με τη δέσμευση και διαφοροποίηση των προγονικών τους. Η δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης μπορεί να είναι επαγωγική ή κατασταλτική έναντι των στόχων της και επιτελείται μέσω αλληλεπιδράσεων με την χρωματίνη [19]. Ο παράγοντας GATA2 εκφράζεται σε κύτταρα που εκφράζεται και ο GATA1, καθώς και σε μη αιμοποιητικούς ιστούς, όπως το ενδοθήλιο μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, το κεντρικό νευρικό σύστημα, τα ουρογεννητικά όργανα, οι πνεύμονες, ο προστάτης και το ενδομήτριο. Επίσης, χαρακτηρίζεται, κυρίως, ως θετικός ρυθμιστής των γονιδίων-στόχων του. Κατά την ερυθροποίηση, ο μεταγραφικός παράγοντας GATA1 υπερεκφράζεται, ενώ ο GATA2 δεν εκφράζεται καθόλου. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι ο δεύτερος είναι ικανός να συμπληρώσει τον πρώτο, σε περίπτωση απώλειάς του. Αυτό το φαινόμενο, που σχετίζεται με την εναλλαγή διαφορετικών παραγόντων GATA σε μία θέση χρωματίνης, ονομάζεται GATA-διακόπτης (GATA-switch) και είναι απαραίτητο για την επέκταση, την επιβίωση και την τελική διαφοροποίηση των ερυθροειδών κυττάρων [21]. Ο παράγοντας GATA3, ο οποίος ανήκει στην ίδια υποοικογένεια με τους

προηγούμενους παράγοντες, εκφράζεται σε μαστικούς αδένες, κεντρικό νευρικό σύστημα, δέρμα, έσω αυτί, νεφρούς, επινεφρίδια και παραθυροειδείς αδένες και είναι σημαντικός για την ανάπτυξη των οργάνων αυτών [22]. Επιπρόσθετα, εκφράζεται στα T-λεμφοκύτταρα, αποτελώντας σημαντικό ρυθμιστή της διαφοροποίησής τους σε T-βοηθητικά τύπου 2 και σχετίζεται τόσο με την φυσική όσο και με την επίκτητη ανοσία [23]. Τα επίπεδα έκφρασής του διαφοροποιούνται ανάλογα με το εκάστοτε στάδιο ανάπτυξης και επιτελεί θετική ή αρνητική ρύθμιση στα γονίδια-στόχους του. Επιπλέον, η έκφραση του GATA3 είναι κυτταρο-ειδική και ευνοεί τη διαφοροποίηση προς μία κυτταρική γενεαλογία, εμποδίζοντας κάποια άλλη [19].

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ιστών, οι οποίοι προέρχονται από το ενδόδερμα και το μεσόδερμα, όπως ο στόμαχος, το έντερο, το πάγκρεας, το ήπαρ, οι πνεύμονες και η καρδιά [24]. Η έκφρασή του είναι ανάλογη του ιστού και του σταδίου ανάπτυξης και μπορεί να έχει είτε θετική είτε αρνητική επίπτωση στην έκφραση των γονιδίων-στόχων. Ο συγκεκριμένος παράγοντας σχετίζεται με στοχευμένη μείωση της μεθυλίωσης του DNA, κατά τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε ενδόδερμα και μεσόδερμα, η οποία μετέπειτα αυξάνεται ώστε να αποτραπεί η ενεργοποίηση εναλλακτικής γενεαλογίας, λόγω μεταγενέστερης πρόσδεσης του GATA4. Ο παράγοντας GATA5 συμμετέχει στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού και θηλυκού ουρογεννητικού συστήματος, καθώς και στη διαφοροποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης, εκφράζεται σε καρδιά, ήπαρ, πάγκρεας, ωοθήκες, πνεύμονες, γαστρεντερική οδό και ουρογεννητικό σύστημα και χαρακτηρίζεται ως παράγοντας ενεργοποίησης [19]. Στην ίδια υποοικογένεια ανήκει και ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6, ο οποίος έχει επαγωγική ή κατασταλτική δράση και σχετίζεται με την ανάπτυξη σε καρδιά, αγγειακό σύστημα, στόμαχο, έντερο, κόλον, ήπαρ, πάγκρεας, πνεύμονες και επινεφρίδια [25]. Κατά την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, ο GATA6, όπως και ο GATA4, προσδένεται σε περιοχή του DNA που έχει στοχευμένα απωλέσει την τροποποίηση μεθυλίωσης. Επιπλέον, ο εν λόγω παράγοντας έχει την ικανότητα να ρυθμίζει άμεσα την έκφραση άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως του GATA4 (Εικ. 6) [19].



Εικόνα 6: Η κατανομή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας GATA κατά την ανάπτυξη των σπονδυλωτών [26].

1.2.2 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες GATA στον Καρκίνο

Διάφοροι τύποι καρκίνου έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις, υπερέκφραση ή απώλεια έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA. Αναλυτικότερα, σημειακές μεταλλάξεις στην αμινο-τελική περιοχή του δακτύλου ψευδαργύρου του παράγοντα GATA1 σχετίζονται με την εμφάνιση οξείας μεγακαρυοβλαστικής λευχαιμίας (DS-AMKL) σε άτομα με σύνδρομο Down, ενώ παρόμοιες μεταλλάξεις στον παράγοντα GATA2 εντοπίζονται στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML) [27]. Επιπλέον, μεταλλάξεις στην καρβοξυ-τελική περιοχή του δακτύλου ψευδαργύρου του παράγοντα GATA3 παρατηρούνται σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Η μειωμένη έκφραση των GATA4 και GATA5, λόγω επιγενετικής σίγασης μέσω μεθυλίωσης, εντοπίζεται στον καρκίνο του στομάχου, των πνευμόνων, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του οισοφάγου, σε γλοιοβλάστωμα και διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β-κυττάρων. Ο παράγοντας GATA6 εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του παγκρέατος [18]. Απώλεια της έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο των ωοθηκών και είναι αποτέλεσμα της απακετυλίωσης των ιστονών H3 και H4 και της απώλειας της τροποποίησης μεθυλίωσης H3K4me3 στον υποκινητή. Επίσης, η έκφραση του GATA6, σε διατηρημένα επίπεδα, σχετίζεται με τον καρκίνο των πνευμόνων, του οισοφάγου, του στομάχου, του παχέος εντέρου και των ωοθηκών [26].

Όσον αφορά τον γαστρικό καρκίνο, αυτός χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4, GATA6 και KLF5. Ο τελευταίος ανήκει στην οικογένεια των Krüppel-like factors και εκφράζεται μαζί με τους παράγοντες GATA, συνεισφέροντας στην εμβρυική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν κοινά σημεία πρόσδεσης και εμφανίζουν ογκογόνο δράση [25, 28]. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν την έκφραση άλλων γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την απόπτωση, την κίνηση, τον πολλαπλασιασμό ή την ανάπτυξη του κυττάρου, όπως οι HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor-4α) και CDX2 (Caudal Type Homeobox 2). Οι μεταγραφικοί παράγοντες-στόχοι τείνουν να εκφράζονται στα ίδια επίπεδα με εκείνα των παραγόντων που τους ρυθμίζουν [29].

Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA, εκτός από τον ρόλο που επιτελούν στα καρκινικά κύτταρα, συμμετέχουν παράλληλα και σε φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως προαναφέρθηκε. Ως αποτέλεσμα δεν είναι δυνατό να αξιοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι, αφού η άμεση στόχευσή τους μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα.

1.3 Μακρά Μη Κωδικοποιητικά RNAs (Long Non-Coding RNAs, lncRNAs)

1.3.1 Εισαγωγή στα lncRNAs

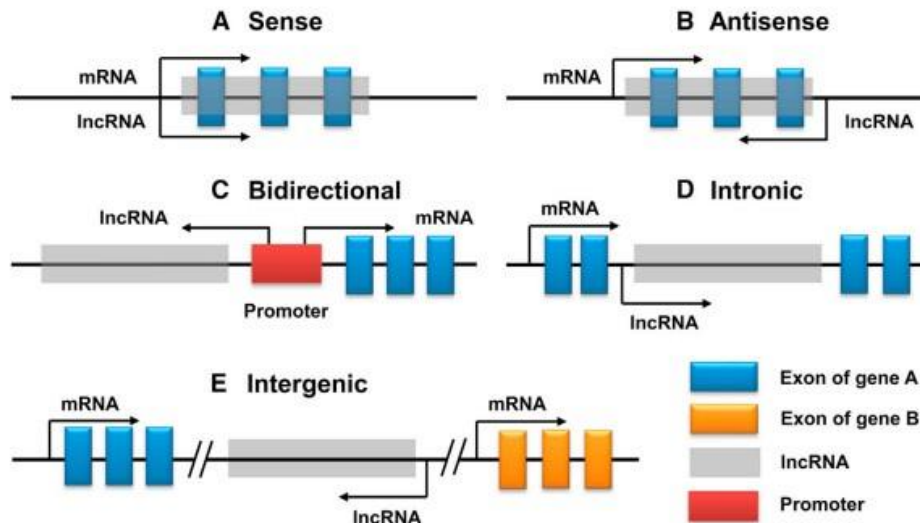
Το ανθρώπινο γονιδίωμα δεν διαθέτει μόνο γονίδια που εκφράζουν πρωτεΐνες, αλλά η πλειοψηφία των μεταγραφόμενων γενετικών τόπων αφορά μη κωδικοποιητικά RNAs. Τα συγκεκριμένα RNAs δεν έχουν την ιδιότητα μετάφρασης σε πρωτεΐνες ή αυτή εμφανίζεται αισθητά μειωμένη, αποδίδοντας ως τελικό προϊόν πολύ μικρά πεπτιδία μήκους <100 αμινοξέων με ασαφή βιολογική λειτουργία. Με βάση το μέγεθός τους, διακρίνονται σε μικρά (small non-coding RNAs) και μακρά (long non-coding RNAs) [30, 31]. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs έχουν μήκος που κυμαίνεται από 200 έως κάποιες χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Η μεταγραφή τους επιτελείται από την RNA πολυμεράση II και υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα. Επίσης, διαθέτουν 5' καλύπτρα και poly-A ουρά στο 3' άκρο τους. Εντοπίζονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή στα μιτοχόνδρια. Στον άνθρωπο, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των lncRNAs είναι χαμηλότερα από εκείνα των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ συνοδεύονται από ισχυρή ιστο-ειδική και συχνά καρκινο-ειδική έκφραση [32].

Ο ρόλος των lncRNAs είναι κυρίως ρυθμιστικός και, συγκεκριμένα, έχουν την ικανότητα να επάγουν ή να καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται μεταξύ άλλων με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο [33]. Ειδικότερα, τα lncRNAs μπορούν να επιτελέσουν τη λειτουργία τους μέσω αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες που είναι

συνδεδεμένοι στον υποκινητή-στόχο ή με πρωτεΐνες που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να συνδέονται απευθείας στο DNA, σε σημείο όπου η αλληλουχία είναι συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία τους, δημιουργώντας έτσι ένα RNA-DNA τριμερές που εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου [30, 32]. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι η μεταγραφή ενός lncRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά την έκφραση γονιδίων που εντοπίζονται σε κοντινές περιοχές, με *cis* ή *trans* τρόπο [34].

1.3.2 Ταξινόμηση των lncRNAs με Βάση την Γονιδιωματική τους Προέλευση

Τα lncRNAs, ανάλογα με τη θέση τους στο γονιδίωμα, μπορούν να διακριθούν σε μεσογονιδιακά (intergenic) και ενδογονιδιακά (intragenic). Τα πρώτα εντοπίζονται σε θέση που βρίσκεται μεταξύ διαδοχικών γονιδίων και δεν συμπίπτει με τη θέση άλλου γονιδίου ή μέρος αυτής. Τα ενδογονιδιακά lncRNAs αποτελούν μέρος γονιδίων που εκφράζουν πρωτεΐνες και διακρίνονται περαιτέρω σε μη κωδικά (antisense), αμφίδρομα (bidirectional), ιντρονικά (intronic) και επικαλυπτόμενα κωδικά (overlapping sense) (Εικ. 7). Τα μη κωδικά lncRNAs προέρχονται από τη μη κωδική αλυσίδα ενός γονιδίου και είτε είναι συμπληρωματικά προς την κωδική αλυσίδα είτε όχι. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται τα φυσικά μη κωδικά μετάγραφα (Natural Antisense Transcripts, NATs), τα οποία διακρίνονται σε *cis*- και *trans*-NATs, με βάση τον εντοπισμό των γονιδίων που επηρεάζουν. Τα αμφίδρομα lncRNAs εντοπίζονται κοντά στον υποκινητή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη, αλλά μεταγράφονται προς την αντίθετη κατεύθυνση και άρα από τον αντίθετο κλώνο. Τα ιντρονικά lncRNAs προέρχονται από ιντρόνια γονιδίων που εκφράζουν πρωτεΐνες. Προκύπτουν είτε από μεμονωμένη μεταγραφή ενός ιντρονίου είτε ως παραπροϊόντα κατά το μάτισμα ενός μορίου mRNA. Τα προϊόντα της πρώτης περίπτωσης αποτελούν τα πλεονάζοντα ιντρονικά lncRNAs. Τα επικαλυπτόμενα κωδικά lncRNAs προκύπτουν από αλληλουχία στην κωδική αλυσίδα που περιέχει ορισμένα εξόνια ή ολόκληρο το γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη και μεταγράφονται προς την ίδια κατεύθυνση με αυτό [35, 36].



Εικόνα 7: Ταξινόμηση των lncRNAs με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα. Α) επικαλυπτόμενα κωδικά, Β) μη κωδικά, C) αμφίδρομα, D) ιντρονικά, E) μεσογονιδιακά [33].

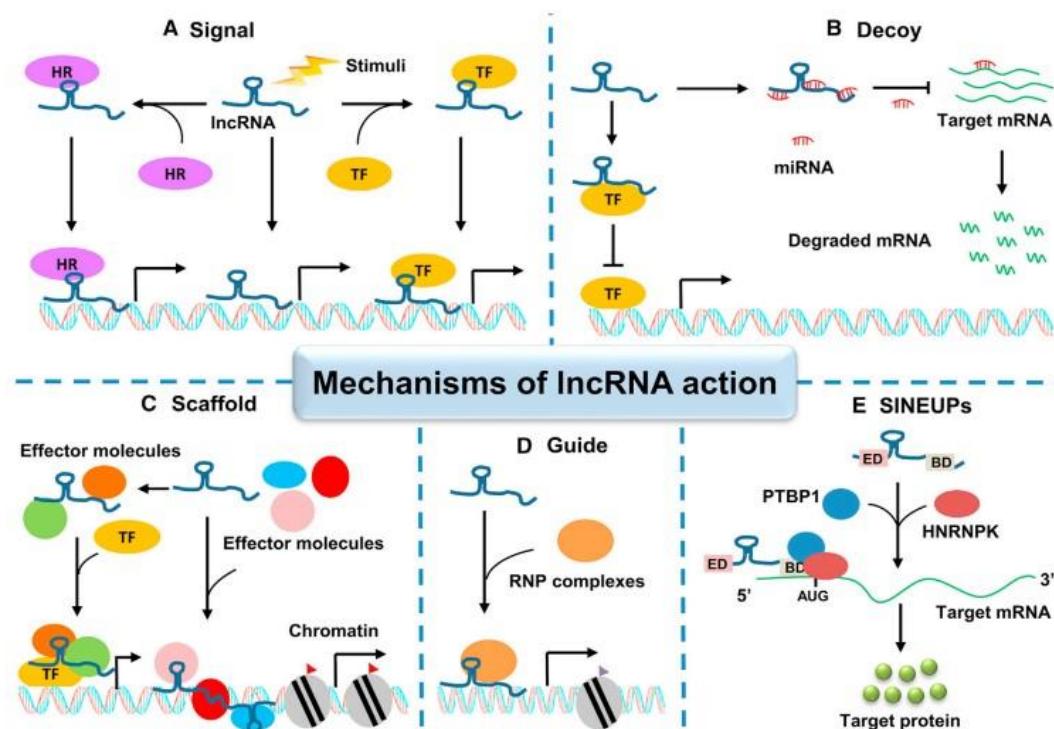
1.3.3 Ταξινόμηση των lncRNAs με Βάση τη Λειτουργία τους

Τα lncRNAs εμφανίζουν διάφορες λειτουργίες ενδοκυτταρικά, οι οποίες εκτελούνται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με πρωτεΐνες, DNA ή RNA. Ως αποτέλεσμα, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη λειτουργία τους σε σηματοδότες (signal), δολώματα (decoy), ικριώματα (scaffold), οδηγούς (guide) και SINEUPs (Εικ. 8).

- ♦ Τα σηματοδοτικά lncRNAs εμπλέκονται, είτε θετικά είτε αρνητικά, σε συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης και η έκφρασή τους υποδηλώνει την ύπαρξη ενεργοποιημένου μονοπατιού [36].
- ♦ Τα lncRNAs-δολώματα δεσμεύουν μεταγραφικούς παράγοντες, microRNAs ή πρωτεΐνες που προσδένονται σε RNA, οδηγώντας τα στην ενεργοποίηση ή απενεργοποίησή τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω πρόκλησης αλλοστερικών τροποποιήσεων, αναστολής της καταλυτικής ενεργότητάς τους ή παρεμπόδισης των σημείων πρόσδεσης [35].
- ♦ Τα lncRNAs-ικριώματα λειτουργούν ως μοριακές σκαλωσιές, επιτρέποντας τη συναρμολόγηση διάφορων πρωτεϊνικών συμπλόκων και τη μετέπειτα μεταφορά τους σε συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα. Η συγκεκριμένη λειτουργία των lncRNAs συντελεί μεταξύ άλλων στον επιγενετικό και μεταγραφικό έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων [35, 37].
- ♦ Τα καθοδηγητικά lncRNAs συνδέονται με ρυθμιστικά ή ενζυμικά ενεργά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία κατευθύνουν σε περιοχές-στόχους του γονιδιώματος. Με αυτό τον τρόπο,

ρυθμίζουν διάφορα συμβάντα σε σηματοδοτικά μονοπάτια, καθώς και την έκφραση διάφορων γονιδίων [36].

- ♦ Τα SINEUPs είναι φυσικά και συνθετικά μη κωδικά lncRNAs, τα οποία βοηθούν στη μετάφραση των mRNA-στόχων, χωρίς να επηρεάζουν τα επίπεδα συγκέντρωσής τους. Τα συγκεκριμένα lncRNAs διαθέτουν ένα ενσωματωμένο ανεστραμμένο στοιχείο SINE (Short Interspersed Nuclear Element), το οποίο εντοπίζεται στην επικράτεια του τελεστή (effector domain) και προσδίδει βιολογική ενεργότητα, καθώς και μία περιοχή πρόσδεσης, η οποία προσδίδει εξειδίκευση στον στόχο [33].



Εικόνα 8: Ταξινόμηση των lncRNAs με βάση τη λειτουργία τους. Απεικονίζονται: Α) Σηματοδότης: ελέγχεται από ερέθισμα (stimuli) και δρα συνδεόμενος απευθείας στο DNA ή μετά από πρόσδεση σε μεταγραφικό παράγοντα (TF) ή ορμονικό υποδοχέα (HR). Β) Δόλωμα: αλληλεπιδρά με microRNA (miRNA) ή μεταγραφικό παράγοντα (TF), αποτρέποντάς τα να συνδεθούν στους στόχους τους. Γ) Ικρίωμα: σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα με διάφορες πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων. Δ) Οδηγός: συνδέεται με πρωτεΐνες ή σύμπλοκα και τις μεταφέρει στον στόχο τους, επηρεάζοντας τη ρύθμιση της έκφρασης διάφορων γονιδίων. Ε) SINEUPs: αυξάνουν τη μετάφραση των mRNA-στόχων τους, χωρίς να επηρεάζουν τα επίπεδα συγκέντρωσής τους, μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες PTBP1 και HNRNPK και δημιουργώντας ένα σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης [33].

1.3.4 Ο Ρόλος των lncRNAs στον Καρκίνο

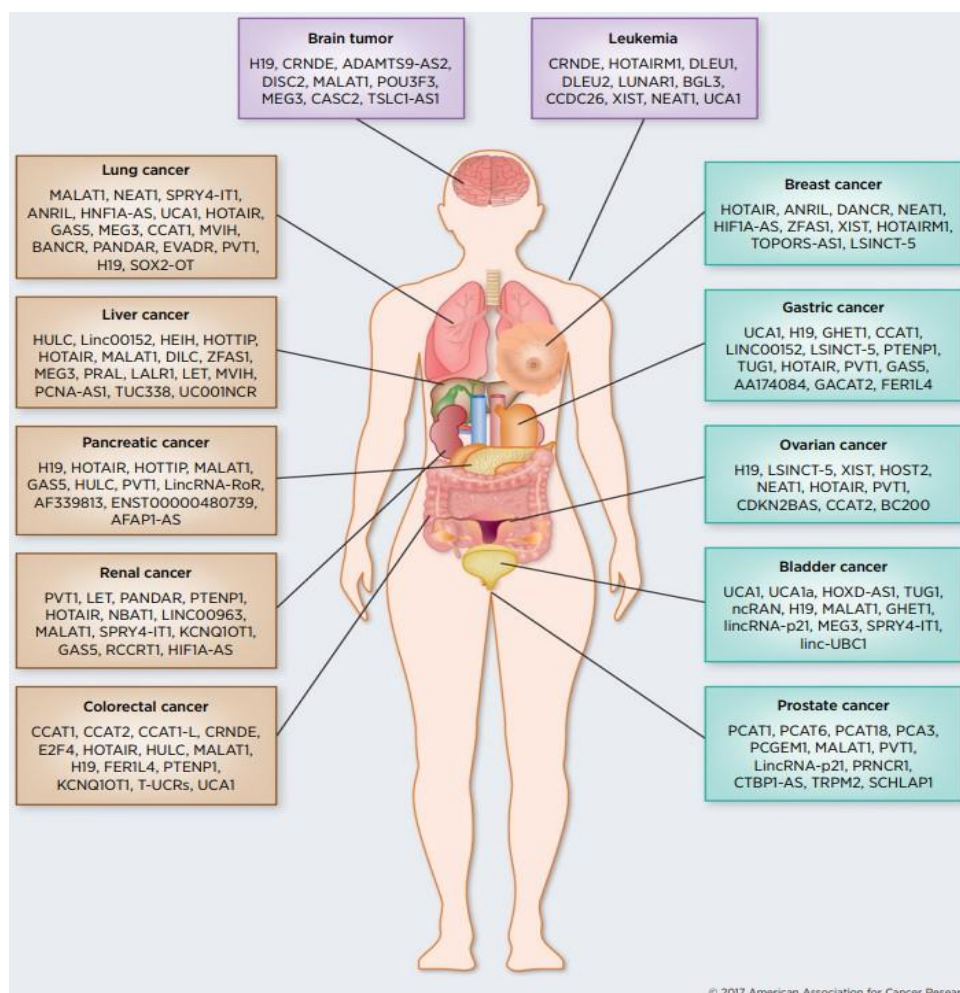
Τα lncRNAs εμπλέκονται σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τα PI3K/AKT, MAPK και Wnt/ β -catenin, λειτουργώντας ογκοεπαγωγικά ή ογκοκατασταλτικά. Για τον λόγο αυτό, lncRNAs που έχουν υποστεί μεταλλάξεις στα γονιδιά τους, συνεπικουρούμενα και από μη φυσιολογική έκφραση, οδηγούν σε αποδιοργάνωση των μονοπατιών και κατ' επέκταση στην εμφάνιση καρκίνου. Επίσης, ορισμένα lncRNAs βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος, να εισβάλουν σε άλλους ιστούς, ενισχύοντας τη μετάσταση, καθώς και να είναι ανθεκτικά έναντι της χημειοθεραπείας [38].

Τα lncRNAs, αν και εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα, σε σχέση με τα mRNAs, εμφανίζουν ιστο-ειδική και χρονο-ειδική έκφραση και ανιχνεύονται εύκολα, τα ίδια ή μεταβολίτες τους, στα σωματικά υγρά (όπως αίμα, ούρα, σάλιο). Στο αίμα, συγκεκριμένα, εντοπίζονται και προστατεύονται μέσα σε εξωσώματα, τα οποία είναι μία μορφή εξωκυτταρικού κυστιδίου με διάμετρο 40-150nm που περικλείεται από λιπιδική διπλοστιβάδα και μεταφέρει υλικά εντός και εκτός του κυττάρου [39]. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά προσφέρουν τη δυνατότητα αξιοποίησης ορισμένων lncRNAs ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες για διάγνωση και πρόγνωση διάφορων τύπων καρκίνου, μέσω της ανίχνευσης των επιπέδων τους. Τα επίπεδα των lncRNAs τείνουν να παρεκκλίνουν από τα φυσιολογικά, σε περιπτώσεις καρκίνου, και είναι ανάλογα της σοβαρότητας της ασθένειας. Επιπλέον, ο συνδυασμός ανίχνευσης περισσότερων του ενός lncRNA-βιοδεικτών εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία, μειώνοντας κατ' επέκταση τα επίπεδα θνησιμότητας λόγω έγκαιρης διάγνωσης ή πρόγνωσης [33].

Σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, παρατηρείται έκτοπη έκφραση διαφορετικών lncRNAs, ενώ υπάρχουν και κάποια κοινά μεταξύ διαφορετικών μορφών της νόσου (Εικ. 9). Συγκεκριμένα, στον καρκίνο του μαστού τα HOTAIR (HOX Transcript Antisense Intergenic RNA) [40] και ANRIL (Antisense Noncoding RNA in the INK4 locus ή CDKN2B-AS) [41] υπερεκφράζονται και αλληλεπιδρούν με παράγοντες σίγασης γονιδίων, επιτυγχάνοντας ογκοεπαγωγική δράση. Το HOTAIR εντοπίζεται, επίσης, στον καρκίνο παχέος εντέρου, ήπατος, πνευμόνων και γαστρεντερικού, ενώ το ANRIL στη λευχαιμία και στον καρκίνο του προστάτη. Τα παραπάνω lncRNAs μπορούν να αξιοποιηθούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου εκφράζεται και το H19 [42], το οποίο αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς καταστολείς. Ειδικότερα, βρίσκεται σε αμοιβαία αρνητική ρύθμιση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, αφού η συγκεκριμένη καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου του H19, ενώ εκείνο εμποδίζει την έκφρασή της. Το H19 προωθεί τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και υπερεκφράζεται, επιπλέον, στον καρκίνο ήπατος, μαστού, οισοφάγου, πνευμόνων, παγκρέατος, στομάχου, ουροδόχου κύστης και

τραχήλου της μήτρας. Το MALAT1 [Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript ή NEAT2 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 2)] [43] υπερεκφράζεται στον καρκίνο πνευμόνων, μαστού, προστάτη, ωθηκών και ουροδόχου κύστης και σχετίζεται με την μετα-μεταγραφική ρύθμιση, συμμετέχοντας στην ανάπτυξη καρκίνου και στη μετάσταση αυτού. Για τον λόγο αυτό, εμφανίζει πιθανή χρήση ως βιοδείκτη και θεραπευτικό στόχο [44].

Όσον αφορά τον γαστρικό καρκίνο, έχει παρατηρηθεί έκτοπη έκφραση ορισμένων lncRNAs, όπως των H19, HOTAIR, MALAT1, GAPLINC, ANRIL, BANCER, HULC και FENDRR. Ειδικότερα, τα H19, UCA1 και LINC00152 είναι δυνατό να ανιχνευθούν σε δείγμα πλάσματος ασθενούς με σκοπό τη διάγνωση, ενώ τα H19, HOTAIR, UCA1, PVT1 και TINCR, με σκοπό την πρόγνωση. Επιπρόσθετα, ορισμένα lncRNAs, όπως εκείνα που βοηθούν στην αντίσταση φαρμακευτικής θεραπείας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων εξατομικευμένων θεραπειών [45].



Εικόνα 9: lncRNAs και οι τύποι καρκίνου με τους οποίους σχετίζονται [36].

1.3.5 Ρύθμιση της Έκφρασης των lncRNAs

Η έκφραση των lncRNAs ρυθμίζεται με τρόπο ανάλογο με εκείνο της έκφρασης των πρωτεϊνών. Για αυτό τον λόγο, υπάρχουν μεταγραφικοί παράγοντες και επιγενετικές τροποποιήσεις της χρωματίνης ή της αλληλουχίας DNA, που εντοπίζονται και ρυθμίζουν τους αντίστοιχους γενετικούς τόπους. Επιπλέον, η έκφραση των lncRNAs επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές και τις αναπτυξιακές συνθήκες, που διέπουν το κάθε κύτταρο. Παρ' όλα αυτά, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των lncRNAs είναι χαμηλότερα από εκείνα των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [46, 47].

Οι διάφορες ιδιότητες των lncRNAs, τα επίπεδα έκφρασής τους και η ιστο-ειδικότητα που εμφανίζουν, οφείλονται στις τροποποιήσεις των ιστονών και τη μεθυλίωση του DNA στην περιοχή των υποκινητών των αντίστοιχων γονιδίων [47]. Ειδικότερα, η μεθυλίωση του DNA επιτελείται στα δινουκλεοτίδια CpG και κυρίως στο νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης (C), μετατρέποντας την αλληλουχία-στόχο σε ετεροχρωματίνη. Η κυτοσίνη, που θα υποστεί μεθυλίωση, θα μετατραπεί σε θυμίνη, με εξελικτική συνέπεια τη μείωση των CpG νησίδων. Οι υποκινητές των lncRNAs είναι φτωχοί σε CpG νησίδες, συνεπώς εντοπίζονται σε περιοχή που υπόκειται υπερμεθυλίωση, για αυτό και τα αντίστοιχα γονίδια έχουν μειωμένη έκφραση. Όσον αφορά τις τροποποιήσεις των ιστονών, οι H3K4me3 και H3K27me3, οι οποίες είναι τρι-μεθυλίωσεις σε κατάλοιπο λυσίνης στην ιστόνη 3 και είναι ενεργοποιητική και κατασταλτική αντίστοιχα, μπορούν να συνυπάρξουν στην περιοχή των υποκινητών. Σε ώριμα κύτταρα, μία από τις δύο τροποποιήσεις χάνεται, ενώ η άλλη διατηρείται. Ως αποτέλεσμα, η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων αποτελεί κυτταρο-ειδικό ή/και ιστο-ειδικό χαρακτηριστικό [32].

Η ενεργότητα των υποκινητών των lncRNAs μπορεί, επίσης, να επηρεαστεί από τη δράση διάφορων microRNAs, τα οποία εμποδίζουν την έκφραση παραγόντων, όπως για παράδειγμα των μεθυλοτρανσφερασών. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αρκετοί υποκινητές των lncRNAs οι οποίοι διαθέτουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες, που συμμετέχουν στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή, τα γονίδια των lncRNAs διαθέτουν διαφορετικούς τρόπους έκφρασης, ώστε να εκφράζονται ασύγχρονα σε σχέση με τα γονίδια που βρίσκονται στην ίδια θέση και εκφράζουν πρωτεΐνες (βλ. υποενότητα 1.3.2) [32, 34].

2. ΣΚΟΠΟΣ

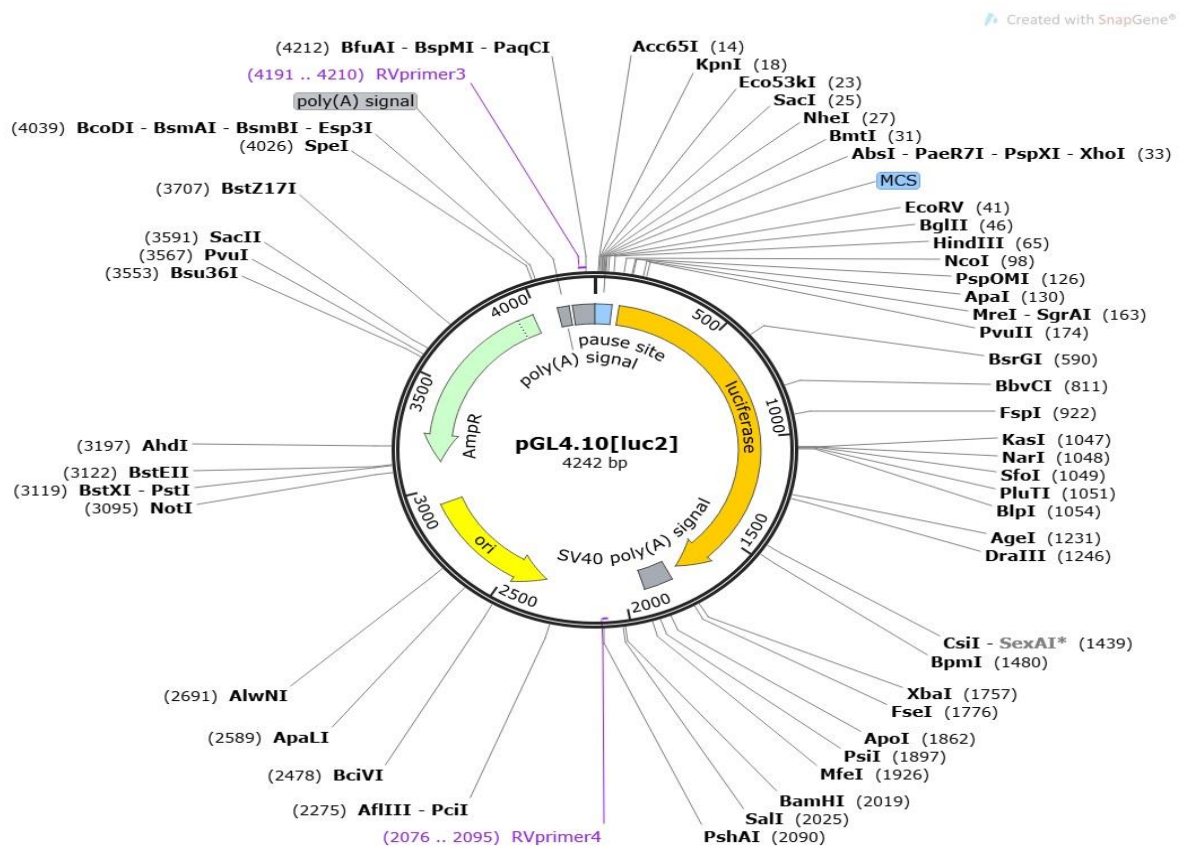
Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στην ανάλυση της ρύθμισης της έκφρασης του Regulatory Cancer Mutation LncRNA 1 (RECUR1), μέσω του υποκινητή του. Ειδικότερα, η μετάλλαξη στην αλληλουχία GATA του υποκινητή, που συντελέστηκε με τη μέθοδο Κατευθυνόμενης Μεταλλαξιγένεσης (Site-Directed Mutagenesis, SDM) μέσω PCR, και η, μετέπειτα, κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα για τη διεξαγωγή Διπλής Δοκιμασίας Λουσιφεράσης (Dual Luciferase Reporter Assay), είχαν σκοπό να δείξουν εάν η έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA επηρεάζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA. Επιπλέον, η χρήση της qPCR τεχνικής, σε περιπτώσεις καταστολής ή υπερέκφρασης των GATA μεταγραφικών παραγόντων, στόχευε στον έλεγχο της επιρροής που έχει η έκφρασή τους στην έκφραση του RECUR1 και του mRNA του γονιδίου-στόχου του. Μέσω της εφαρμογής της ίδιας τεχνικής, μετά από την τεχνική Ανοσοκατακρήμνισης Χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP), επιδιώχθηκε, επίσης, η μελέτη της πρόσδεσης των συγκεκριμένων παραγόντων στους Wild-Type (WT) υποκινητές των RECUR1 και γονιδίου-στόχου. Τέλος, η κλωνοποίηση των κατάλληλων single guide RNAs (sgRNAs) σε συγκεκριμένο πλασμίδιο, έθεσε τον μελλοντικό στόχο της εργασίας, για επίτευξη σημειακής μεταλλαξιγένεσης *ex vivo* στην περιοχή του υποκινητή του RECUR1.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

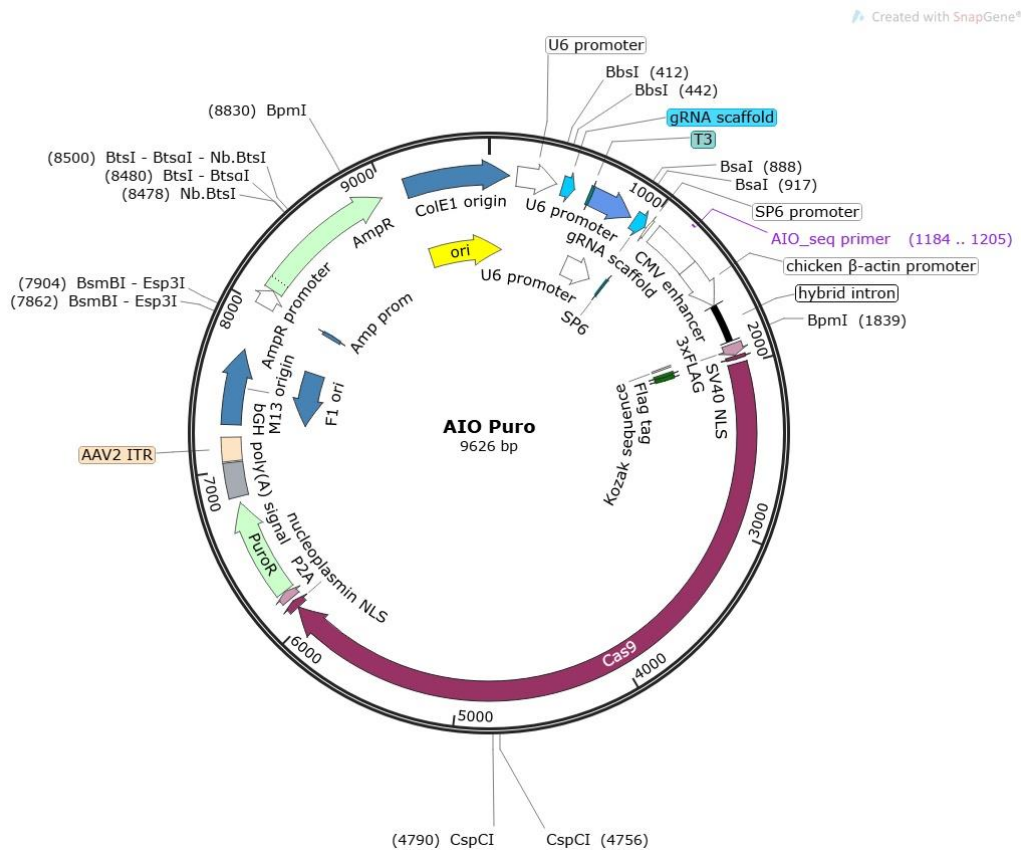
3.1.1 Πλασμιδιακοί Φορείς

- ♦ **pGL4.10 [luc2]**: πλασμίδιο μεγέθους 4242bp, το οποίο δεν διαθέτει υποκινητή αλλά έχει περιοχή πολυσυνδέτη (multiclonal site, MCS) για την εισαγωγή επιθυμητής αλληλουχίας. Χρησιμοποιείται στη Δοκιμασία Λουσιφεράσης (Luciferase Reporter Assay) σε ευκαρυωτικά κύτταρα, για τη μέτρηση της ενεργότητας του επιθυμητού υποκινητή ή ενισχυτή. Συγκεκριμένα, διαθέτει το γονίδιο αναφοράς (reporter gene) luc2, που εκφράζει την πρωτεΐνη της λουσιφεράσης, και επιτυγχάνει υψηλή έκφραση και μειωμένη μη ειδική μεταγραφή. Επίσης, διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Εικ. 10).



Εικόνα 10: Χάρτης του πλασμιδίου pGL4.10 [luc2] (<https://www.addgene.org/vector-database/2933/>).

- ♦ **All-In-One Puro:** πλασμίδιο μεγέθους 9626bp, το οποίο εκφράζει την πρωτεΐνη Cas9 με ενεργότητα νικάσης και χρησιμοποιείται στην τεχνική CRISPR-nCas9 σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Διαθέτει δύο θέσεις για εισαγωγή δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που εκφράζουν sgRNAs, καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας στην πουρομικίνη και την αμικιλίνη (Εικ. 11).



Εικόνα 11: Χάρτης του πλασμιδίου All-In-One Puro (<https://www.addgene.org/74630/>).

3.1.2 Βακτηριακά Στελέχη

- ♦ **DH5a:** αποτελεί μη παθογόνο στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* και χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση και αποθήκευση κοινών πλασμιδίων. Ο γονότυπός του είναι F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-. Οι μεταλλάξεις που διαθέτει βοηθούν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας των μετασχηματισμών. Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του πλασμιδίου pGL4.10 [luc2].
- ♦ **XL1Blue:** αποτελεί μη παθογόνο στέλεχος του βακτηρίου *E. coli*. Ο γονότυπός του είναι endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+). Είναι εκ φύσεως ανθεκτικό στην τετρακυκλίνη και χρησιμοποιείται,

κυρίως, για blue/white selection. Οι μεταλλάξεις που διαθέτει, ενισχύουν την ποιότητα των DNA minipreps και την σταθερότητα του εκάστοτε ενθέματος. Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του πλασμιδίου All-In-One Puro.

- ♦ **Stb13:** αποτελεί μη παθογόνο στέλεχος του βακτηρίου *E. coli*. Διαθέτει τον γονότυπο F-glnV44 recA13 mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 leu mtl-1 και εμφανίζει φυσική ανθεκτικότητα στην στρεπτομυκίνη. Επίσης, είναι χρήσιμο για κλωνοποίηση και αποθήκευση λεντικών και ρετροϊκών φορέων. Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του πλασμιδίου All-In-One Puro.

3.1.3 Κυτταρικές Σειρές

- ♦ **AGS:** αποτελεί ανθρώπινη κυτταρική σειρά πρωτεύοντος γαστρικού αδενοκαρκινώματος.
- ♦ **HFE145:** αποτελεί ανθρώπινη κυτταρική σειρά που προέρχεται από παρακαρκινικό επιθήλιο στομάχου.
- ♦ **MKN45:** αποτελεί ανθρώπινη κυτταρική σειρά μεταστατικού γαστρικού αδενοκαρκινώματος.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Εξαγωγή RNA (RNA Extraction)

Η εξαγωγή RNA (RNA extraction) από ευκαρυωτικά κύτταρα γίνεται με σκοπό να προετοιμαστούν τα δείγματα για την εκτέλεση της τεχνικής qPCR. Αρχικά, στα κύτταρα που έχουν ληφθεί από κυτταροκαλλιέργεια, προστίθενται άμεσα 1000μl μείγματος θειοκυανικής γουανιδίνης και φαινόλης (TRI Reagent®, MRC, Cat. No: TR118) και, αφού επωαστούν για 1' σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρονται σε πάγο. Έπειτα, προστίθενται 200μl χλωροφορμίου και υπόκεινται σε vortex για 30". Ύστερα, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε 14000rpm, 4°C για 5' και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε διαφορετικό 1,5ml tube. Στο συγκεκριμένο tube, τοποθετούνται, επίσης, 500μl ισοπροπανόλης και 5μl γλυκογόνου, γίνεται ήπια ανακίνηση και μετά από επώαση για 10' σε πάγο, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 15' σε 14000rpm, 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Μετά, γίνεται φυγοκέντρηση σε 14000rpm, 4°C για 10', το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το tube αφήνεται με ανοιχτό καπάκι, ώστε να

στεγνώσει το ίζημα. Τέλος, το ίζημα κάθε δείγματος επαναδιαλύεται σε 40μl ενέσιμου dH₂O απουσία RNασών (RNase free WFI) και θερμαίνεται στους 65°C για 5'. Ακολουθεί vortex και spin των δειγμάτων, καθώς και μέτρηση των συγκεντρώσεών τους με την χρήση του Quawell Q3000 UV DNA/Proteins Analyzer, πριν αποθηκευτούν στους -80°C.

3.2.2 Κατεργασία DNάσης (DNase Treatment)

Η διαδικασία αυτή γίνεται μετά την εξαγωγή RNA (βλ. υποενότητα 3.2.1), ώστε να καταστραφούν όλα τα μόρια DNA, μέσω της δράσης DNάσης. Αναλυτικότερα, για κάθε δείγμα ετοιμάζεται αντίδραση με τελικό όγκο 30μl, η οποία περιέχει:

- ♦ 25μl από το δείγμα (η συγκέντρωση του RNA δεν ξεπερνά τα 10μg συνολικά)
- ♦ 3μl 10x DNaseI Buffer (ThermoFisher Scientific, Cat. no: EN0521)
- ♦ 1μl DNase I (ThermoFisher Scientific, Cat. no: EN0521)
- ♦ 0,5μl RNaseOUT (Invitrogen, Cat. Nos: 28025-013/28025-021)
- ♦ 0,5μl ενέσιμου dH₂O (WFI)

Γίνεται vortex και spin σε κάθε δείγμα και, έπειτα, τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα. Μετά τη συγκεκριμένη επώαση, με σκοπό τον καθαρισμό τους, τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο και στο καθένα προστίθενται 40μl οξικού νατρίου (3M, pH 5.6) και κατάλληλος όγκος ενέσιμου dH₂O (WFI) για τελικό όγκο 400μl. Στη συνέχεια, εισάγονται 400μl φαινόλης/χλωροφορμίου και τα δείγματα αφού υποστούν vortex, φυγοκεντρώνονται σε 14000rpm, 4°C για 5'. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο 1,5ml tube και προστίθενται 1000μl παγωμένης αιθανόλης 100% και 5μl γλυκογόνου. Γίνεται ήπια ανακίνηση και το κάθε δείγμα τοποθετείται στους - 80°C για 1 ώρα. Ύστερα, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 30' σε 14000 rpm, 4°C, το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% και επαναφυγοκεντρώνονται σε 14000rpm, 4°C για 10'. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με προσοχή και το tube αφήνεται με ανοιχτό καπάκι, ώστε να στεγνώσει το ίζημα. Τέλος, το ίζημα κάθε δείγματος επαναδιαλύεται σε 20μl ενέσιμου dH₂O (WFI) και θερμαίνεται στους 65°C για 5'. Ακολουθεί vortex και spin των δειγμάτων, καθώς και μέτρηση των συγκεντρώσεών τους με την χρήση του Quawell Q3000 UV DNA/Proteins Analyzer, πριν αποθηκευτούν στους -80°C.

3.2.3 Σύνθεση cDNA (cDNA Synthesis)

Το τελευταίο στάδιο προετοιμασίας των δειγμάτων είναι η δημιουργία μορίων cDNA από μόρια RNA. Ειδικότερα, για κάθε δείγμα λαμβάνεται 1μg από το αντίστοιχο μετά την κατεργασία DNάσης (βλ. υποενότητα 3.2.2) και διαλύεται σε ποσότητα ενέσιμου dH₂O (WFI) για τελικό όγκο 10μl. Σε κάθε αραιωμένο δείγμα προστίθενται 1μl από 100μM Random Hexamers και 1μl από 10mM dNTPs και ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 5'. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται:

- ♦ 4μl 5x First-Strand Buffer [250mM Tris-HCl (pH 8.3 at room temperature), 375mM KCl, 15mM MgCl₂] (Invitrogen, Cat. Nos: 28025-013/28025-021)
- ♦ 2μl 100mM DTT (Invitrogen, Cat. Nos: 28025-013/28025-021)
- ♦ 0,5μl RNaseOUT (Invitrogen, Cat. Nos: 28025-013/28025-021)
- ♦ 1μl M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat. Nos: 28025-013/28025-021)
- ♦ 0,5μl ενέσιμου dH₂O (WFI)

Τα δείγματα επώάζονται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες. Μετά τη συγκεκριμένη επώαση, ακολουθεί προσθήκη 380μl ενέσιμου dH₂O (WFI) σε κάθε δείγμα και αποθήκευση στους -20°C.

3.2.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παρεμβολή φθορίζουσας χρωστικής μεταξύ των αλυσίδων δίκλωνου μορίου DNA, με συνέπεια την εκπομπή και καταγραφή σήματος κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου. Για την εκτέλεσή της, η αντίδραση που χρησιμοποιείται έχει τελικό όγκο 20μl και περιέχει:

- ♦ 10μl 2x Buffer SYBRGreen Mix (ThermoFisher Scientific)
- ♦ 2μl 10μM Forward & Reverse Primer Mix (Eurofins Genomics)
- ♦ 4μl δείγματος cDNA ή DNA
- ♦ 4μl ενέσιμου dH₂O (WFI)

Η συσκευή που χρησιμοποιείται είναι η Bio-RAD CFX Connect Real-Time System και το πρωτόκολλο που ακολουθείται για κάθε αντίδραση είναι το εξής:

- ♦ 95°C για 5' (προ-αποδιάταξη)
 - ♦ 95°C για 20" (αποδιάταξη)
 - ♦ 58°C για 20" (υβριδοποίηση)
 - ♦ 72°C για 15" (επέκταση) και καταγραφή του σήματος
- } 45 κύκλοι

- ♦ 55°C-95°C, αύξηση κατά 0,5°C για 5'' (Δημιουργία Melting Curve) και καταγραφή του σήματος
- ♦ 12°C επ' άπειρον (συντήρηση)

Μετά τη λήψη των αποτελεσμάτων, η κανονικοποίησή τους γίνεται με την χρήση των αποτελεσμάτων των γονιδίων ιδιοσύστατης έκφρασης, *GAPDH* και *RPLP1*, τα οποία εισάγονται ως εκκινητές στα αντίστοιχα δείγματα. Αρχικά, γίνεται ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με τον τύπο $\frac{1}{2}^{\wedge} Cq \text{ mean}$ δείγματος, λόγω του ότι για κάθε δείγμα γίνονται δύο τεχνικές επαναλήψεις (duplicates). Έπειτα, γίνεται κανονικοποίηση με τον τύπο $\frac{\text{τιμή ποσοτικοποίησης δείγματος}}{\text{τιμή ποσοτικοποίησης αντίστοιχου δείγματος ιδιοσύστατων γονιδίων}}$. Για τη δημιουργία γραφήματος fold change χρησιμοποιούνται οι τιμές που εξάγονται από τον τύπο $\frac{\text{τιμή κανονικοποίησης δείγματος}}{\text{τιμή κανονικοποίησης αρνητικού μάρτυρα}} * 100$.

Στην περίπτωση της χρήσης της τεχνικής qPCR μετά από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP), ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Μετά τη λήψη των αποτελεσμάτων, η κανονικοποίησή τους γίνεται με την χρήση των αποτελεσμάτων των αρνητικών μαρτύρων, δηλαδή του δεύτερου εξονίου του γονιδίου της μυοσίνης (Myo Exon 2) και μίας περιοχής στο χρωμόσωμα 1 (Neg Chrom 1), τα οποία εισάγονται ως εκκινητές στα αντίστοιχα δείγματα. Αρχικά, γίνεται ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με τον τύπο $\frac{1}{2}^{\wedge} Cq \text{ mean}$ δείγματος, λόγω του ότι για κάθε δείγμα γίνονται δύο τεχνικές επαναλήψεις (duplicates). Έπειτα, γίνεται κανονικοποίηση με τον τύπο $\frac{\text{τιμή ποσοτικοποίησης δείγματος IP}}{\text{τιμή ποσοτικοποίησης Input DNA}}$. Το Input DNA αποτελεί την χρωματίνη που χρησιμοποιείται στο πείραμα. Για τη δημιουργία γραφήματος fold change χρησιμοποιούνται οι τιμές που εξάγονται από τον τύπο $\frac{\text{τιμή κανονικοποίησης δείγματος}}{\text{τιμή κανονικοποίησης αρνητικού μάρτυρα}}$. Δημιουργείται γράφημα ως προς τον κάθε αρνητικό μάρτυρα.

3.2.5 Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση (Site-Directed Mutagenesis, SDM) με Χρήση της Τεχνικής Polymerase Chain Reaction (PCR) και Αντίδραση Λιγάζης

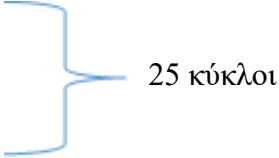
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αλλαγή βάσεων του GATA μοτίβου που διαθέτει ένας υποκινητής οδηγεί σε μείωση ή απώλεια της ενεργότητάς του, όταν εκείνος ελέγχεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας GATA. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως η μετατροπή του μοτίβου από GATA σε GGCA μειώνει αρκετά την ενεργότητα του υποκινητή [48].

Με σκοπό την εισαγωγή της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο μοτίβο GATA του υποκινητή του lncRNA RECUR1, χρησιμοποιείται η τεχνική PCR. Ειδικότερα, γίνονται τρεις ξεχωριστές αντιδράσεις (Εικ. 12). Αρχικά, στην πρώτη γίνεται χρήση του πρόσθιου Wild-Type (WT) εκκινητή για τον συγκεκριμένο υποκινητή σε συνδυασμό με τον ανάστροφο εκκινητή που διαθέτει την μετάλλαξη. Στη δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιείται ο πρόσθιος εκκινητής που διαθέτει την μετάλλαξη σε συνδυασμό με τον ανάστροφο WT εκκινητή για τον συγκεκριμένο υποκινητή. Ως εκμαγείο χρησιμοποιείται ένα πλασμίδιο pGL4.10, το οποίο διαθέτει ενσωματωμένη την WT αλληλουχία του υποκινητή του RECUR1. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε gel αгарόζης 1% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο και, αφού επιβεβαιωθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, γίνεται εκτομή της ζώνης. Μετέπειτα, οι ζώνες των αντιδράσεων τοποθετούνται σε ξεχωριστά 1,5ml tubes και καθαρίζονται με την χρήση του kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Gel & PCR Clean-Up (REF 740609.250). Αφού γίνει μέτρηση των συγκεντρώσεων των προϊόντων, κατάλληλες ποσότητες τους αναμειγνύονται, ώστε το τελικό μείγμα να χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο στην τρίτη PCR.

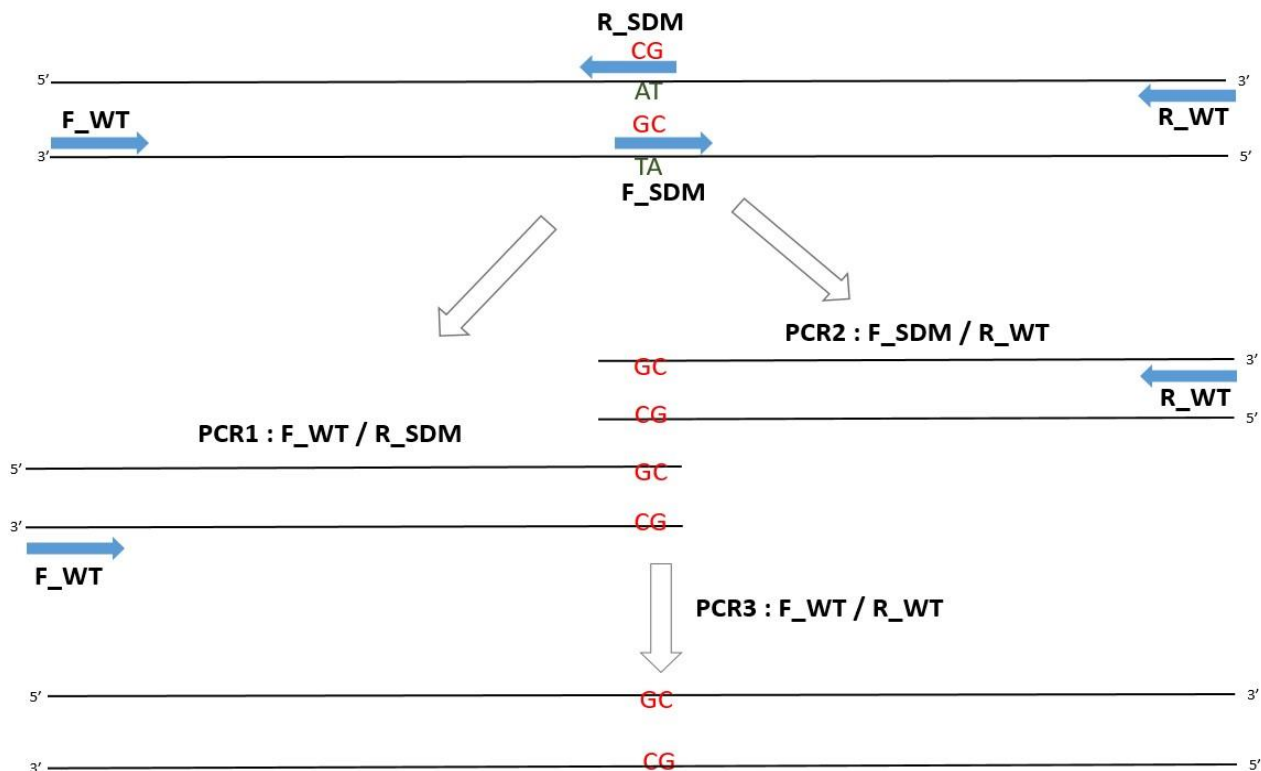
Στην τελική αντίδραση, χρησιμοποιούνται και οι δύο WT εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος) για τον συγκεκριμένο υποκινητή. Μετά το τέλος της αντίδρασης, γίνεται ηλεκτροφόρηση, εκτομή και καθαρισμός της επιθυμητής ζώνης και μέτρηση της συγκέντρωσης του προϊόντος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ο τελικός όγκος και των τριών αντιδράσεων είναι 25μl και περιέχουν:

- ♦ 5μl 5x KAPA HiFi Fidelity Buffer (KapaBiosystems, Cat. No: KK2101)
- ♦ 0,5μl 10mM dNTPs
- ♦ 1μl 10μM Forward Primer (Eurofins Genomics)
- ♦ 1μl 10μM Reverse Primer (Eurofins Genomics)
- ♦ 1μl 10ng/μl Template
- ♦ 0,2μl 1U/μl KAPA HiFi DNA polymerase (KapaBiosystems, Cat. No: KK2101)
- ♦ 16,3μl ενέσιμου dH₂O (WFI)

Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθείται για τις δύο πρώτες αντιδράσεις είναι:

- ♦ 95°C για 3' (προ-αποδιάταξη)
 - ♦ 98°C για 20" (αποδιάταξη)
 - ♦ 60°C για 15" (υβριδοποίηση)
 - ♦ 72°C για 40" (επέκταση)
 - ♦ 72°C για 5' (μετα-επέκταση)
- 
- 25 κύκλοι

Το ίδιο πρωτόκολλο εφαρμόζεται και στην τρίτη αντίδραση αλλά το στάδιο της επέκτασης εφαρμόζεται για 1' 10", λόγω του αναμενόμενου μεγέθους του προϊόντος.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των τριών PCRs που πραγματοποιούνται με σκοπό την επίτευξη κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης. Με πράσινο συμβολίζονται τα νουκλεοτίδια της WT αλληλουχίας, ενώ με κόκκινο εκείνα που εισάγονται ως επιθυμητές μεταλλάξεις. Με F_WT και R_WT συμβολίζονται ο πρόσθιος και ο ανάστροφος WT εκκινητής αντίστοιχα, ενώ με F_SDM και R_SDM συμβολίζονται ο πρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη αντίστοιχα.

Με σκοπό να επιτελεστεί η αντίδραση λιγάσης και λόγω του ότι ο πλασμιδιακός φορέας pGL4.10 που θα χρησιμοποιηθεί έχει ήδη υποστεί πέψη, με το ένζυμο EcoRV, και αποφωσφορυλίωση, στο τελικό PCR προϊόν γίνεται φωσφορυλίωση των άκρων του με αντίδραση πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μl και η σύστασή της είναι η εξής:

- ♦ 10μl Template (PCR προϊόν)
- ♦ 2μl 10x Buffer T4 Polynucleotide Kinase (Takara)
- ♦ 1μl 10U/μl T4 Polynucleotide Kinase (Takara, Cat. No: 2021A)
- ♦ 1μl 10mM dATPs
- ♦ 6μl ενέσιμου dH₂O (WFI)

Η επώαση για την επίτευξη της αντίδρασης γίνεται στους 37°C για 30'. Κατά την επώαση αυτή, η πολυνουκλεοτιδική κινάση T4 καταλύει τη μεταφορά ενός τελικού φωσφόρου του ATP στο 5' υδροξυτελικό άκρο του μορίου DNA. Στη συνέχεια, γίνεται καθαρισμός του φωσφορυλιωμένου PCR προϊόντος με την χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου και μέτρηση της συγκέντρωσής του, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο σημείο της υποενότητας 3.2.2.

Μετάπειτα, με σκοπό την εισαγωγή του μεταλλαγμένου υποκινητή του RECUR1 στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10, επιτελείται αντίδραση λιγάσης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μl και η σύστασή της είναι η εξής:

- ♦ 15μl DNA insert
- ♦ 50ng pGL4.10 [luc2] digested vector
- ♦ 2μl 10x Buffer T4 DNA ligase reaction (NEB, Cat. No: B0202S)
- ♦ 1μl T4 DNA ligase (Minotech, Cat. No: 202-1)
- ♦ Ποσότητα ενέσιμου dH₂O (WFI) μέχρι τον τελικό όγκο

Η επώαση για την επίτευξη της αντίδρασης γίνεται στους 16°C για 16 ώρες με την χρήση της συσκευής Bio-RAD MJ Mini Personal Thermal Cycler. Επίσης, παράλληλα, επιτελείται και μία αντίδραση χωρίς το ένθεμα-στόχο, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας.

3.2.6 Κλωνοποίηση Πλασμιδιακών Φορέων μέσω Μετασηματισμού Βακτηριακών Κυττάρων και Διαγνωστικές Πέψεις/PCRs

Ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων γίνεται με την τεχνική του θερμικού σοκ. Αναλυτικότερα, 200μl βακτηρίων DH5α αναμειγνύονται με 10μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Επωάζονται για 20' σε πάγο, μετά για 50'' στους 42°C και έπειτα για 2' σε πάγο. Στη συνέχεια, προστίθεται ποσότητα θρεπτικού μέσου Luria Broth (LB) για τελικό όγκο 1ml και η αντίδραση επωάζεται για 50' στους 37°C με ανάδευση στα 160rpm. Μετά το πέρας της επώασης, 350μl της αντίδρασης απλώνονται με γυάλινη πιπέτα Pasteur σε τρυβλίο που περιέχει LB agar με αμικικιλίνη, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί στους 37°C. Το τρυβλίο επανατοποθετείται στους 37°C για να επωαστεί για τουλάχιστον 16 ώρες, με σκοπό την ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών. Έπειτα, με σκοπό τη δημιουργία υγρών καλλιιεργειών, προστίθεται μία αποικία, που αναπτύχθηκε στο τρυβλίο, σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 2ml θρεπτικού μέσου LB με αμικικιλίνη και υπόκειται επώαση στους 37°C με ανάδευση στα 210rpm για τουλάχιστον 16 ώρες.

Στη συνέχεια, αποβλέποντας στην απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep), η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 2' σε 4°C και 11000rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 100μl του διαλύματος I (50mM Tris, 10mM EDTA, 100ng/μl RNaseA, ddH₂O) και η αντίδραση υπόκειται vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Ύστερα, προστίθενται 200μl του διαλύματος II (1% SDS, 0.2M NaOH, ddH₂O) και, αφού η αντίδραση ανακινηθεί ήπια, επωάζεται για 5' σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, στην αντίδραση προστίθενται 150μl του διαλύματος III (3.0M KOAc pH5.5, ddH₂O) και, μετά από ήπια ανακίνηση, επωάζεται για 5' σε πάγο, πριν φυγοκεντρηθεί για 15' σε 4°C και 13000rpm. Μετά το πέρας της συγκεκριμένης φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο 1,5ml tube και αναμειγνύεται με 1ml 100% αιθανόλης, πριν τοποθετηθεί στους -80°C για 20'. Μετέπειτα, φυγοκεντρείται για 20' σε 4°C και 13000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθενται 600μl 70% αιθανόλης και φυγοκεντρείται για 5' σε 4°C και 13000rpm. Τέλος, το υπερκείμενο αφαιρείται με προσοχή, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 100μl ενέσιμου dH₂O (WFI).

Για να εξακριβωθεί το γεγονός ότι η όλη παραπάνω διαδικασία έχει αποδώσει το επιθυμητό αποτέλεσμα, γίνεται μία διαγνωστική PCR και μία διαγνωστική πέψη των θετικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του ενθέματος. Ειδικότερα, με την χρήση της 1/30 αραίωσης των minipreps, δημιουργείται αντίδραση με τελικό όγκο 50μl που περιέχει:

- ♦ 5μl 10x KAPA Taq Buffer A (KapaBiosystems, Cat. No: KB1003)
- ♦ 0,5μl 10mM dNTPs
- ♦ 1μl 10μM Forward WT Primer (Eurofins Genomics)
- ♦ 1μl 10μM Reverse WT Primer (Eurofins Genomics)
- ♦ 1μl Template (miniprep δείγμα)
- ♦ 0,25μl 5U/μl KAPA Taq DNA polymerase (KapaBiosystems, Cat. No: KE1000)
- ♦ Ποσότητα ενέσιμου dH₂O (WFI) μέχρι τον τελικό όγκο

Το πρωτόκολλο PCR που ακολουθείται είναι το εξής:

- ♦ 95°C για 3' (προ-αποδιάταξη)
 - ♦ 95°C για 30'' (αποδιάταξη)
 - ♦ 60°C για 15'' (υβριδοποίηση)
 - ♦ 72°C για 1' 10'' (επέκταση)
 - ♦ 72°C για 5' (μετα-επέκταση)
- 25 κύκλοι

Για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του ενθέματος, επιτελείται διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου με την χρήση του ενζύμου KpnI. Το συγκεκριμένο ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει την

αλληλουχία 5'-GGTAC/C-3' σε ένα σημείο στον σκελετό του πλασμιδίου pGL4.10 και σε ένα σημείο κοντά στο 5' άκρο του ενθέματος. Η αντίδραση της πέψης έχει τελικό όγκο 50μl και είναι η εξής:

- ♦ 5μl Template (miniprep δείγμα)
- ♦ 5μl 10x Buffer rCutSmart (NEB, Cat. No: B6004S)
- ♦ 1μl 20000U/ml KpnI-High Fidelity (NEB, Cat. No: R3142S)
- ♦ 39μl ενέσιμου dH₂O (WFI)

Για την επίτευξή της γίνεται επώαση στους 37°C για 4h. Τα προϊόντα των παραπάνω διαγνωστικών τεχνικών ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 1%.

Μετά το πέρας των διαγνωστικών τεχνικών, ένα από τα θετικά δείγματα επανακαλλιεργείται στις αρχικές συνθήκες και, έπειτα, αφού γίνει απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep) με το kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Plasmid (REF 740588.250), αποστέλλεται για αλληλούχηση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας CeMIA (<https://cemia.eu/service/sanger-sequencing/>). Μέσω της αλληλούχησης, η οποία επιτελείται με τον εκκινητή RV3 που προσδένεται στον σκελετό του πλασμιδιακού φορέα pGL4.10 [luc2], επιβεβαιώνεται η επιθυμητή εισαγωγή του ενθέματος σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

3.2.7 Δοκιμασία Διπλής Λουσιφεράσης (Dual Luciferase Reporter Assay)

Η Δοκιμασία Διπλής Λουσιφεράσης πραγματοποιείται σε AGS γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Σε 24-well plate τοποθετούνται 200000 κύτταρα σε κάθε πηγαδάκι και το plate επωάζεται στους 37°C. Την επόμενη ημέρα, επιτελείται η διαμόλυνση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, αναμειγνύεται ποσότητα των πλασμιδίων pGL4.10 (100ng/μl) και pCMV-Renilla (20ng/μl) με ποσότητα πολυαιθυλενιμίνης (PEI) και το μείγμα τοποθετείται στα πηγαδάκια. Η πολυαιθυλενιμίνη έχει την ιδιότητα να συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια, δημιουργώντας λιποσφαιρίδια, τα οποία εισάγονται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης, επιτυγχάνοντας διαμόλυνση. Για κάθε δείγμα δημιουργούνται δύο ή τρεις τεχνικές επαναλήψεις (duplicates ή triplicates).

Μετά από επώαση του plate για 20 ώρες στους 37°C, τα κύτταρα κάθε πηγαδιού καθαρίζονται από το θρεπτικό μέσο. Η λύση τους και η μετέπειτα προσθήκη υποστρωμάτων της Firefly και της Renilla λουσιφεράσης, με σκοπό την μέτρηση της ενεργότητάς τους, γίνεται με την χρήση του kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Cat. No: E1910). Ειδικότερα, η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται μετά από προσθήκη 100μl 5x Passive Lysis Buffer σε κάθε πηγαδάκι και ανάδευση του plate για 30'. Η μέτρηση γίνεται στη συσκευή Lumat3 LB9508 Berthold Technologies. Αρχικά,

για κάθε δείγμα, σε 1,5ml tube εισάγονται 20μl του διαλύματος που περιέχει τα κύτταρα. Έπειτα, προστίθενται 20μl του Luciferase Assay Reagent II και γίνεται μέτρηση της Firefly για 5". Ύστερα, γίνεται προσθήκη 20μl του Stop & Glo® Reagent και μέτρηση της Renilla για 5".

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας γίνεται με βάση των τύπο $\frac{\text{ενεργότητα Firefly}}{\text{ενεργότητα Renilla}}$.

Στην περίπτωση των πολλαπλών τεχνικών επαναλήψεων, υπολογίζεται ο μέσος όρος των λόγων. Παράλληλα, υπολογίζεται και η τυπική απόκλιση για κάθε δείγμα. Αυτοί οι δύο όροι χρησιμοποιούνται στη δημιουργία γραφήματος κανονικοποίησης, ενώ για τη δημιουργία γραφήματος fold change χρησιμοποιούνται οι τιμές που εξάγονται από τον τύπο $\frac{\text{τιμή λόγου κανονικοποίησης δείγματος}}{\text{τιμή λόγου κανονικοποίησης αρνητικού μάρτυρα}}$.

3.2.8 Δημιουργία Πλασμιδιακής Κατασκευής για CRISPR-nCas9

Το πλασμίδιο AIO Puro τροποποιείται με σκοπό να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για τροποποίηση του γονιδιώματος γαστρικών καρκινικών κυττάρων, με την χρήση της τεχνικής CRISPR-nCas9 (βλ. παράρτημα). Η ένθεση των κατάλληλων δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που εκφράζουν sgRNAs (single guide RNAs) γίνεται με την τεχνική Golden Gate Cloning. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί ένζυμα κοπής τύπου IIS, τα οποία κόβουν κάποιες βάσεις δίπλα από την αλληλουχία που αναγνωρίζουν. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται προεξέχοντα άκρα τεσσάρων βάσεων, τα οποία, λόγω του ότι δεν ανήκουν στην αλληλουχία αναγνώρισης, δίνουν την ευκαιρία για απαλοιφή του σημείου κοπής μετά την ένθεση των αλληλουχιών-στόχων.

Αναλυτικότερα, για την ένθεση του πρώτου δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου, το πλασμίδιο υπόκειται πέψη με το ένζυμο BbsI, το οποίο έχει δύο θέσεις αναγνώρισης στο συγκεκριμένο πλασμίδιο και κόβει στο σημείο 5'-GAAGAC(N₂)/(N₆)-3'. Η αντίδραση πέψης επωάζεται στους 37°C για 4 ώρες, έχει τελικό όγκο 50μl και περιέχει:

- ♦ 1500ng vector AIO Puro (template)
- ♦ 5μl 10x Buffer rCutSmart (NEB, Cat. No: B6004S)
- ♦ 2μl 20000U/ml BbsI-High Fidelity (NEB, Cat. No: R3539S)
- ♦ Ποσότητα ενέσιμου dH₂O (WFI) μέχρι τον τελικό όγκο

Μετά το πέρας της επώασης, το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε gel αгарόζης 1%. Αν η πέψη είναι επιτυχής, η επιθυμητή ζώνη αφαιρείται, τοποθετείται σε 1,5ml tube, καθαρίζεται με την

χρήση του kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Gel & PCR Clean-Up (REF 740609.250) και μετριέται η συγκέντρωσή της μέσω της συσκευής Quawell Q3000 UV DNA/Proteins Analyzer.

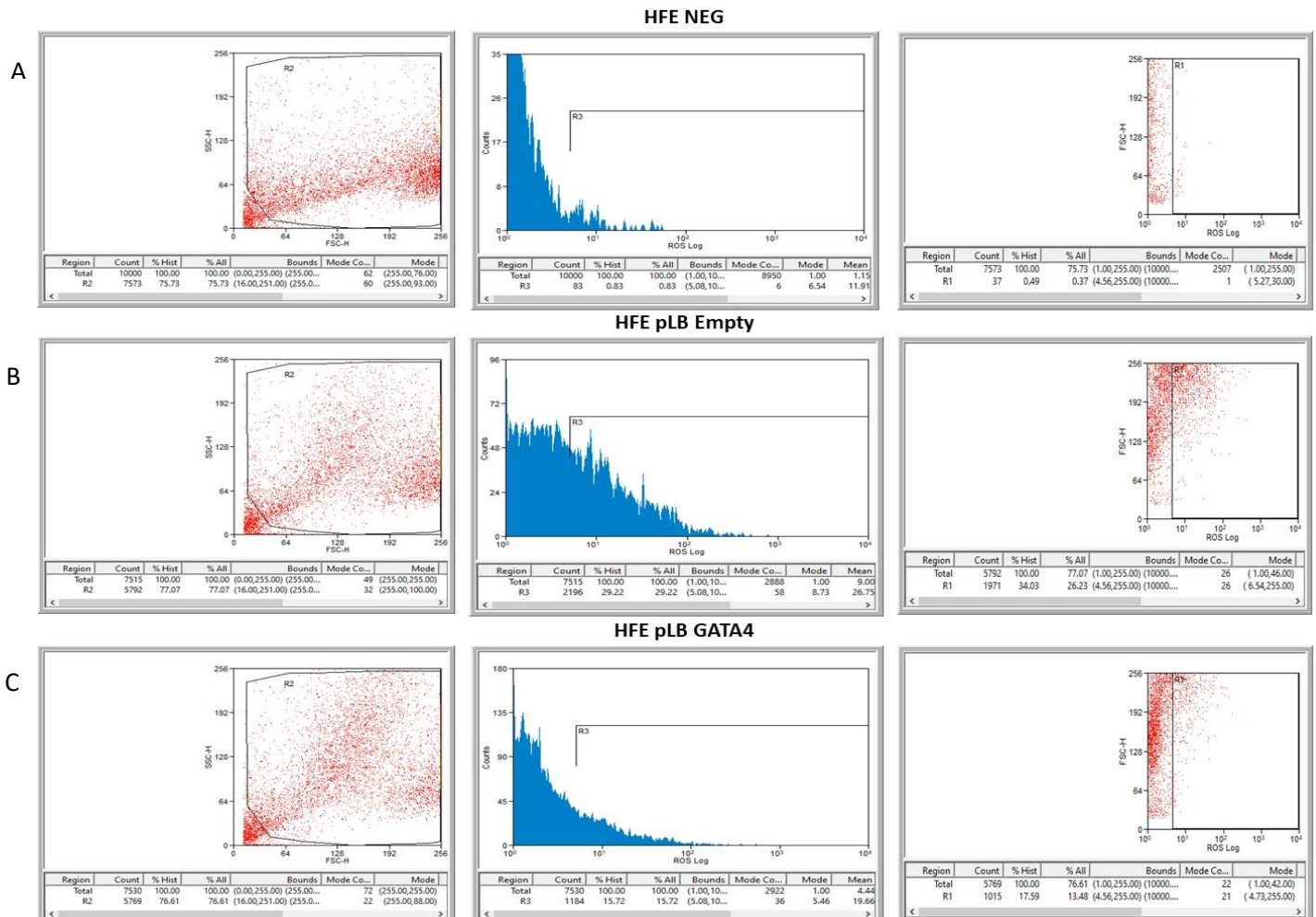
Στη συνέχεια, γίνεται υβριδοποίηση των μονόκλωνων πρόσθιων και ανάστροφων αλληλουχιών του ολιγονουκλεοτιδίου-στόχου. Συγκεκριμένα, σε 1,5ml tube αναμειγνύονται 2μl από κάθε μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο (100μM) και 96μl buffer υβριδοποίησης (100mM KOAc, 30mM Hepes, 2mM MgAc). Το tube τοποθετείται σε dH₂O που βράζει για 5' και μετά αφήνεται, ώστε να ελαττωθεί η θερμοκρασία σταδιακά. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, επιτελείται αντίδραση λιγάσης του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου με το κομμένο πλασμίδιο, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.5. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εισάγονται 10μl ενθέματος. Έπειτα, γίνεται μετασχηματισμός κυττάρων XL1Blue με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης, δημιουργία υγρών καλλιιεργειών, απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep) και διαγνωστική PCR για την εξακρίβωση σωστής ένθεσης, ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρεται στην υποενότητα 3.2.6. Στη συγκεκριμένη PCR, χρησιμοποιείται ο ανάστροφος εκκινητής AIO_seq, ο οποίος προσδένεται στον σκελετό του πλασμιδίου, και ο πρόσθιος εκκινητής, που αναγνωρίζει την αλληλουχία του ενθέματος. Επίσης, λόγω επιθυμητού μεγέθους, ο χρόνος επέκτασης του προϊόντος διαμορφώνεται σε 50". Ένα από τα θετικά για την ένθεση δείγματα, καθαρίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και μετριέται η συγκέντρωσή του, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο σημείο της υποενότητας 3.2.2.

Για την ένθεση του δεύτερου δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου, που θα εκφράζει το δεύτερο sgRNA, το πλασμίδιο υπόκειται πέψη με το ένζυμο BsaI (10000U/ml, NEB, Cat. No: R0535S), το οποίο έχει δύο θέσεις αναγνώρισης στο συγκεκριμένο πλασμίδιο και κόβει στο σημείο 5'-GGTCTC(N₁)/(N₅)-3'. Η διαδικασία πέψης, καθώς και εκείνες που ακολουθούν γίνονται όμοια με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, στην αντίδραση λιγάσης εισάγονται 4μl ενθέματος και μετασχηματίζονται κύτταρα Stb13 (50μl). Επίσης, επιτελούνται δύο διαγνωστικές PCRs. Ειδικότερα, η πρώτη αφορά τη σωστή ένθεση του δεύτερου ολιγονουκλεοτιδίου και χρησιμοποιείται ο ανάστροφος εκκινητής AIO_seq και ο πρόσθιος εκκινητής, που αναγνωρίζει την αλληλουχία του ενθέματος. Ο χρόνος επέκτασης του προϊόντος διαμορφώνεται σε 50". Η δεύτερη αποσκοπεί στον έλεγχο της ταυτόχρονης ένθεσης και των δύο ολιγονουκλεοτιδίων και εκτελείται στις ίδιες συνθήκες με την πρώτη, χρησιμοποιώντας τον πρόσθιο εκκινητή του πρώτου ολιγονουκλεοτιδίου και τον ανάστροφο εκκινητή του δεύτερου ολιγονουκλεοτιδίου. Μετά από τις διαγνωστικές PCRs, ένα από τα θετικά δείγματα επανακαλλιεργείται στις αρχικές συνθήκες. Έστερα, γίνεται απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep) με το kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Plasmid (REF 740588.250) και το δείγμα αποστέλλεται για αλληλούχηση με τον εκκινητή AIO_seq στην εταιρεία CeMIA.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επίδραση Καταστολής και Υπερέκφρασης Μεταγραφικών Παραγόντων στην Έκφραση του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του

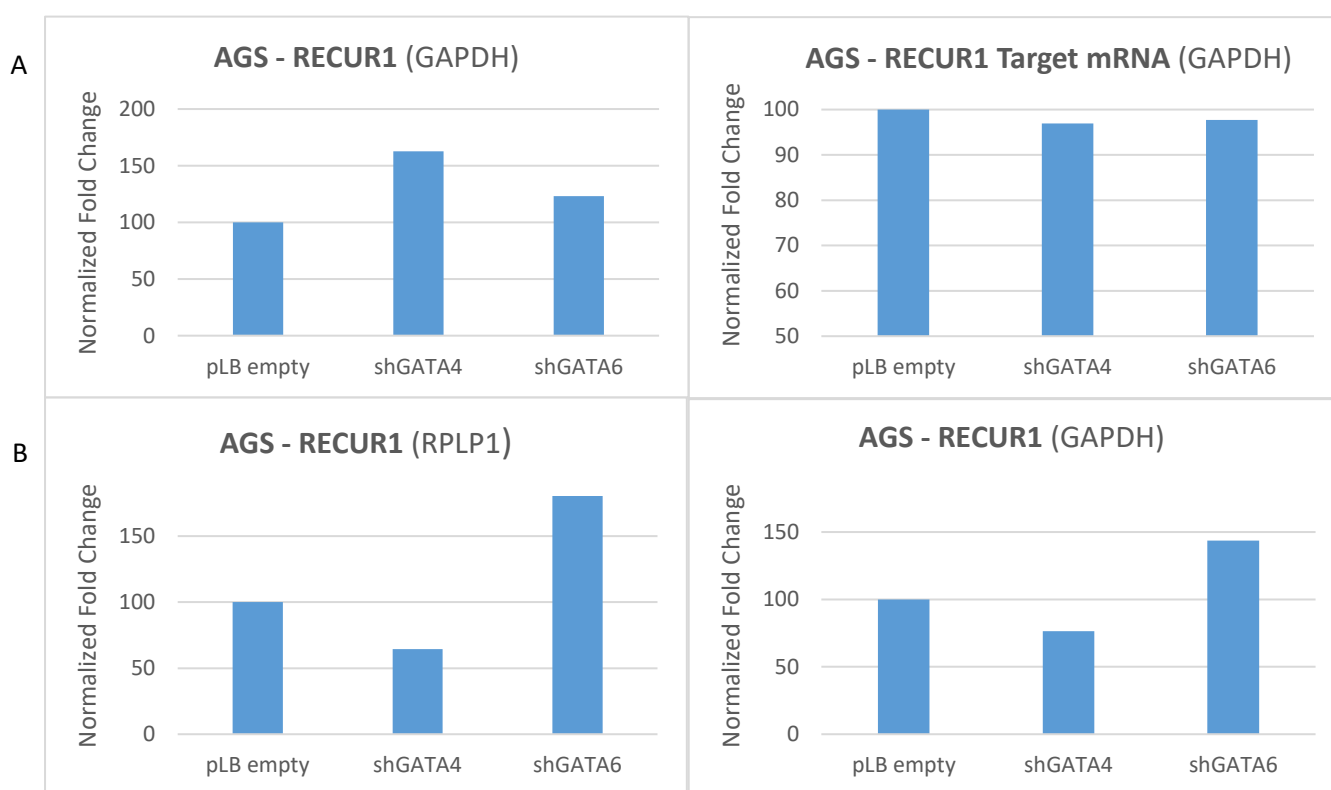
Με σκοπό να επιτευχθεί καταστολή ή υπερέκφραση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων, έγινε διαμόλυνση κυττάρων, επιλεγμένων κυτταρικών σειρών, με τα κατάλληλα πλασμίδια. Πριν από την επιθυμητή διαμόλυνση, προηγήθηκε άλλη μία αντίστοιχη και τα κύτταρα εξετάστηκαν, μέσω συστήματος κυτταρομετρίας ροής και συγκεκριμένα μέσω του εξειδικευμένου τύπου διαλογής κυττάρων FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), για να ελεγχθεί η ικανότητα και το ποσοστό διαμόλυνσής τους. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζονται μόνο τα HFE145 κύτταρα, καθώς τα AGS και τα MKN45 είχαν ελεγχθεί σε παλαιότερα πειράματα από το εργαστήριο. Φαίνεται πως η συγκεκριμένη διαμόλυνση επιτεύχθηκε σε χαμηλό ποσοστό.



Εικόνα 13: Αποτελέσματα από FACS για τα HFE145 κύτταρα. Α) Αφορά κύτταρα που δεν έχουν διαμολυνθεί και αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Β) Αφορά κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδιο (pLB) που δεν διαθέτει κάποιο ένθεμα, ωστόσο εκφράζει την πρωτεΐνη GFP ως γονίδιο-ανταποκριτής. C) Αφορά κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδιο (pLB) που εκφράζει shRNA (short hairpin RNA) έναντι του GATA4. Σύμφωνα με το ιστόγραμμα, ο φθορισμός που σχετίζεται με το ποσοστό διαμόλυνσης και εκπέμπεται από αριθμό κυττάρων είναι σχετικά χαμηλός.

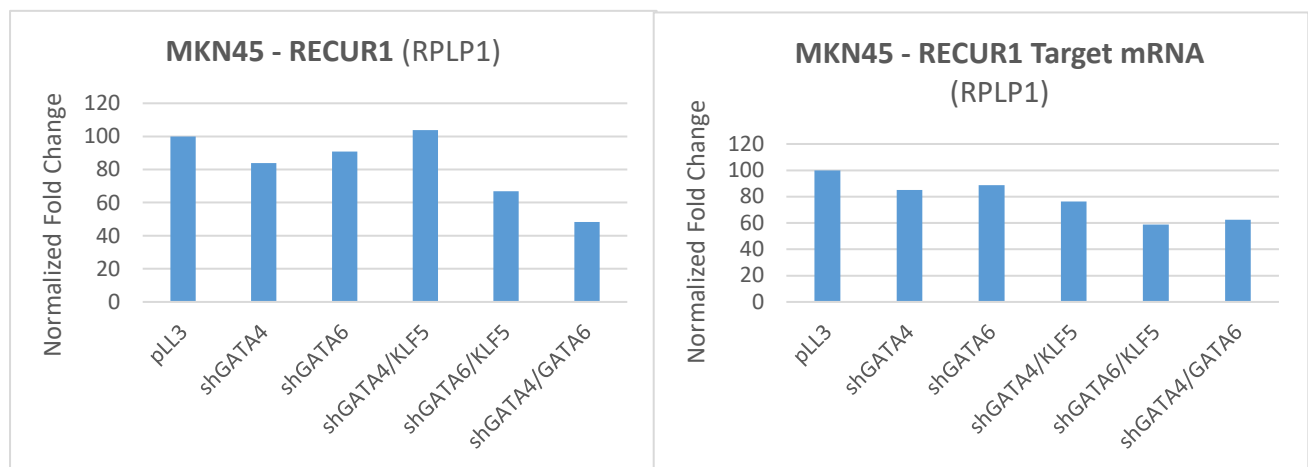
Τα κύτταρα, μετά τη διαμόλυνσή τους, επεξεργάστηκαν κατάλληλα για τη διεξαγωγή της τεχνικής qPCR. Η καταστολή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 επιτεύχθηκε σε AGS γαστρικά καρκινικά κύτταρα και, με τους κατάλληλους εκκινητές, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του. Στην περίπτωση του RECUR1, η qPCR επαναλήφθηκε (Εικ. 14). Επίσης, με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, το πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε MKN45 κύτταρα, τα οποία γενικά εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά διαμόλυνσης με το πλασμίδιο pLB (>81%). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η καταστολή έκφρασης επιτεύχθηκε και σε συνδυασμούς των μεταγραφικών παραγόντων GATA, είτε μεταξύ τους είτε με τον μεταγραφικό παράγοντα KLF5 (Εικ. 15). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την έκφραση του γονιδίου *RPLP1* ή του *GAPDH*.

Όσον αφορά την έκφραση του RECUR1, φαίνεται πως επηρεάζεται αρνητικά από την καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, παρά το αποτέλεσμα της πρώτης δοκιμής, ενώ τείνει να επηρεάζεται θετικά από την καταστολή του GATA6. Στην περίπτωση του γονιδίου-στόχου, τα επίπεδα έκφρασής του μειώνονται ελάχιστα και στις δύο περιπτώσεις.



Εικόνα 14: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα από qPCR σε διαμολυσμένα AGS κύτταρα. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο pLB χωρίς ένθεμα χρησιμοποιούνται ως αρνητικός μάρτυρας. Α) Στα διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν βάσει της έκφρασης του *GAPDH*. Β) Στα διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1, καθώς αφορούν την επανάληψη του πειράματος. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν βάσει της έκφρασης του *RPLP1* και του *GAPDH*, για επιβεβαίωση.

Όσον αφορά τα ΜΚΝ45 κύτταρα, η έκφραση του RECUR1, φαίνεται πως επηρεάζεται αρνητικά από την καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και λιγότερο αρνητικά από την καταστολή του GATA6. Με την καταστολή και των δύο, σημειώνεται μείωση των επιπέδων έκφρασης σχεδόν κατά 50%. Επίσης, η παράλληλη καταστολή των KLF5 και GATA4, εμφανίζει ελάχιστη αύξηση της έκφρασης του RECUR1, ενώ ο συνδυασμός καταστολής των KLF5 και GATA6 εμφανίζει σχετική μείωση. Στην περίπτωση του γονιδίου-στόχου, τα επίπεδα έκφρασής του μειώνονται σε όλες τις περιπτώσεις. Η μεγαλύτερη διαφορά εντοπίζεται στους συνδυασμούς καταστολής μεταγραφικών παραγόντων και κυρίως στην καταστολή των GATA4/GATA6 και GATA6/KLF5.

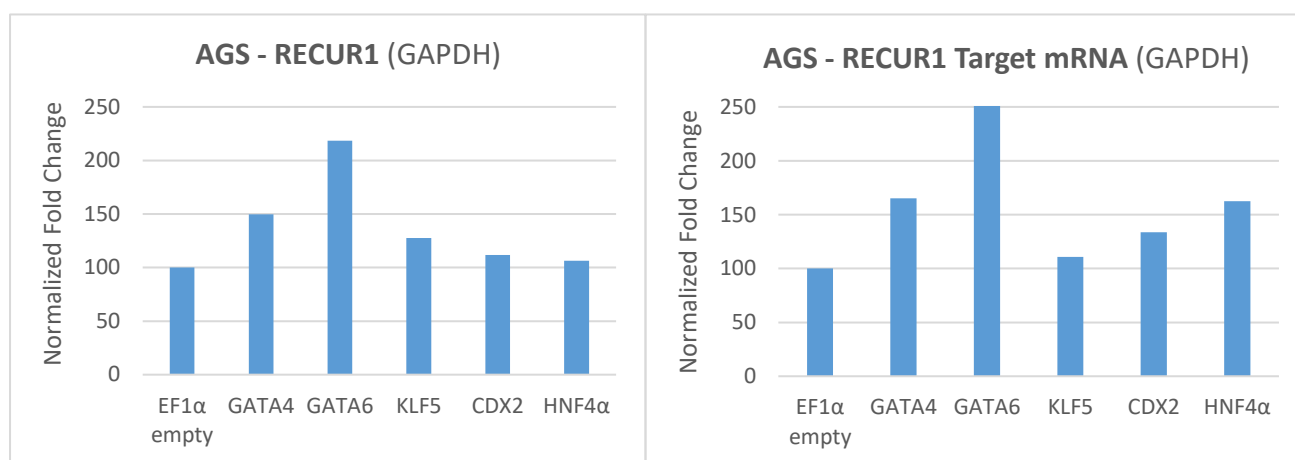


Εικόνα 15: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα από qPCR σε διαμολυσμένα ΜΚΝ45 κύτταρα. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο pLL3 χωρίς ένθεμα χρησιμοποιούνται ως αρνητικός μάρτυρας. Στα διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν βάσει της έκφρασης του *RPLP1*.

Η υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων έλαβε μέρος σε AGS γαστρικά καρκινικά κύτταρα και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του. Η τροποποίηση αυτή αφορούσε τους παράγοντες GATA4, GATA6, KLF5, CDX2 και HNF4a (Εικ. 16). Το συγκεκριμένο πείραμα επιτελέστηκε και σε HFE145 κύτταρα του αθανатоποιημένου φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου, για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Σε αυτή την περίπτωση ελέγχθηκε και η επίδραση της ταυτόχρονης υπερέκφρασης των GATA4/GATA6. Επίσης, για το γονίδιο-στόχο ελέγχθηκε μόνο η επίδραση της υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA (Εικ. 17). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την έκφραση του γονιδίου *GAPDH*.

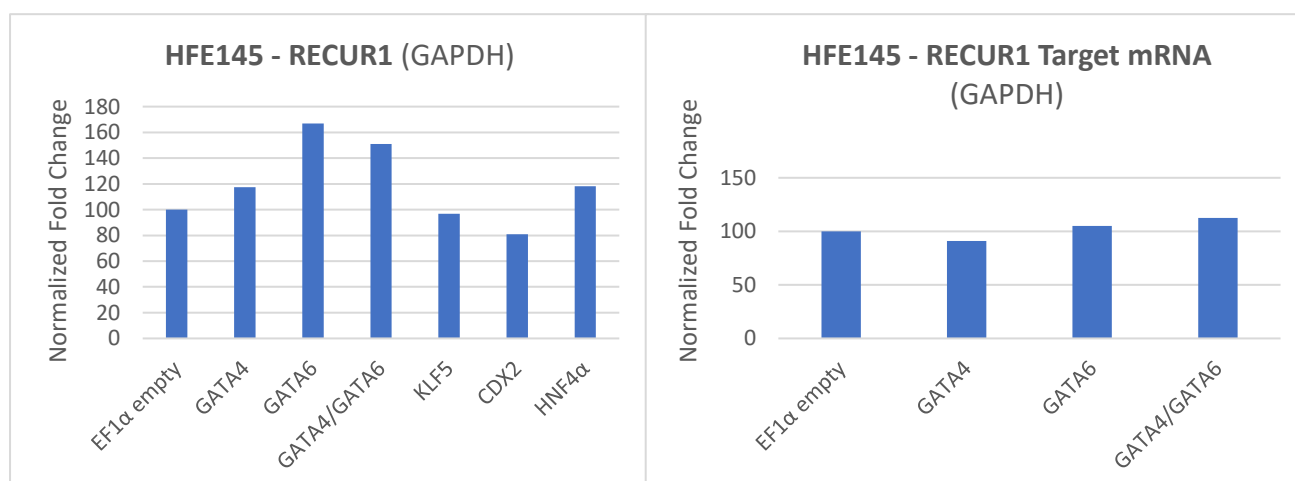
Στα AGS κύτταρα, η υπερέκφραση των παραγόντων οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του RECUR1. Τα μεγαλύτερα επίπεδα παρατηρούνται με την υπερέκφραση του παράγοντα GATA6 και με εκείνη του GATA4. Η υπερέκφραση των υπόλοιπων παραγόντων προκαλεί ελάχιστη αύξηση. Όσον αφορά

τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου, παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο επίδρασης, ενώ η υπερέκφραση του HNF4α φαίνεται πως έχει μεγαλύτερη θετική επιρροή.



Εικόνα 16: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα από qPCR σε διαμολυσμένα AGS κύτταρα. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο EF1α χωρίς ένθεμα χρησιμοποιούνται ως αρνητικός μάρτυρας. Στα διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν βάσει της έκφρασης του *GAPDH*.

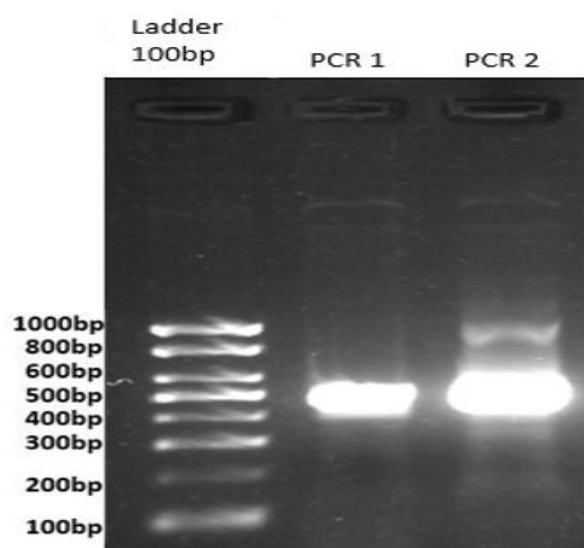
Στα HFE145 κύτταρα, η υπερέκφραση των παραγόντων επηρεάζει θετικά την έκφραση του RECUR1, ενώ εκείνη του KLF5 και του CDX2 εμφανίζει ελαφρώς αρνητική επιρροή. Τα μεγαλύτερα επίπεδα παρατηρούνται με την υπερέκφραση του παράγοντα GATA6 και με εκείνη των GATA4/GATA6. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου, δεν εμφανίζουν μεγάλη διαφορά από την έκφραση του αρνητικού μάρτυρα.



Εικόνα 17: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα από qPCR σε διαμολυσμένα HFE145 κύτταρα. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο EF1α χωρίς ένθεμα χρησιμοποιούνται ως αρνητικός μάρτυρας. Στα διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν βάσει της έκφρασης του *GAPDH*.

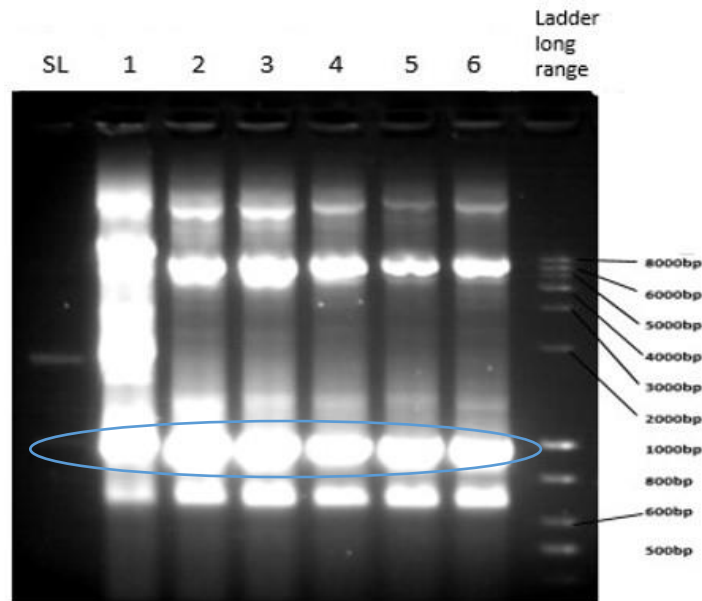
4.2 Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση (SDM) στο GATA Μοτίβο του Υποκινητή του **RECUR1**

Με σκοπό να επιτελεστεί ο συγκεκριμένος τύπος μεταλλαξιγένεσης, έγιναν τρεις αντιδράσεις PCR. Οι δύο πρώτες ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1%, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής με βάση τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν (Εικ. 18). Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος της πρώτης αντίδρασης (PCR 1) είναι 494bp, ενώ εκείνο της δεύτερης αντίδρασης (PCR 2) είναι 524bp.



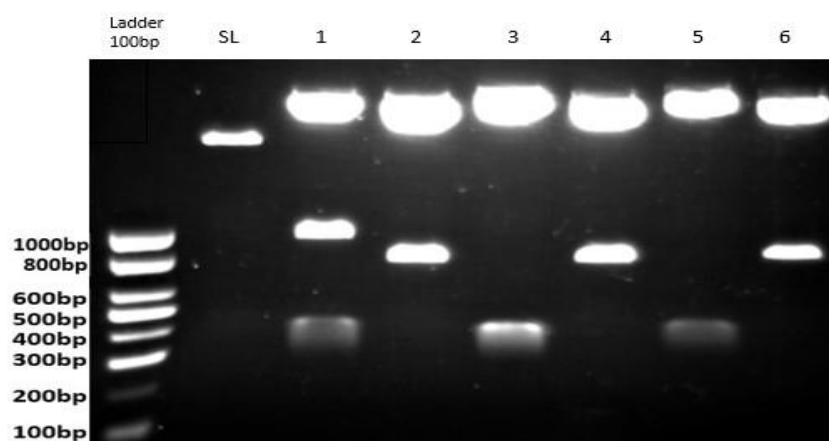
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR 1 και PCR 2, σε gel αγαρόζης 1%. Με βάση τις ζώνες του ladder 100bp (Enzyquest), φαίνεται πως τα προϊόντα έχουν μέγεθος ~500bp, το οποίο είναι κοντά στα επιθυμητά μεγέθη.

Μετά την εισαγωγή του προϊόντος της τρίτης PCR σε πλασμίδιο pGL4.10 και την κλωνοποίηση αυτού, μέσω μετασχηματισμού βακτηρίων DH5α, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep) από επτά βακτηριακές αποικίες, συμπεριλαμβανομένης μίας από την αντίδραση που δεν διέθετε το ένθεμα-στόχο (self-ligation). Σε αυτά τα minipreps, εκτελέστηκε διαγνωστική PCR και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1% (Εικ. 19). Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης είναι 981bp.



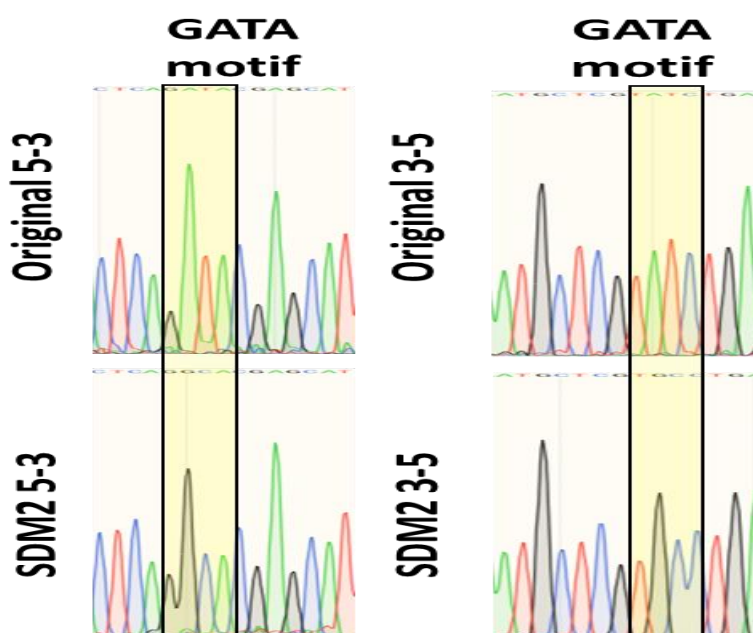
Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR, σε gel αγαρόζης 1%. Το δείγμα SL αντιστοιχεί στο self-ligation και αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα 1-6 αντιστοιχούν σε πλασμίδια που θεωρητικά διαθέτουν ως ένθεμα τη μεταλλαγμένη αλληλουχία του υποκινητή του RECUR1. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν έχει γίνει αραίωση των miniprepers που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις, γι' αυτό και παρουσιάζονται ζώνες σε ύψος ~6000bp, το οποίο αντιστοιχεί στο συνολικό μέγεθος του πλασμιδίου, καθώς και παραπροϊόντα. Με βάση τις ζώνες του ladder long range (Enzyquest), φαίνεται πως τα προϊόντα έχουν μέγεθος <1000bp, το οποίο αντιστοιχεί στο επιθυμητό.

Έπειτα, έγινε διαγνωστική πέψη των δειγμάτων, ώστε να προσδιοριστεί ο προσανατολισμός ένθεσης της αλληλουχίας-στόχου. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1% (Εικ. 20). Λόγω των σημείων πέψης του ενζύμου KpnI, προϊόν με μέγεθος 230bp αντιστοιχεί σε προσανατολισμό 5'>3', ενώ με μέγεθος 760bp αντιστοιχεί σε προσανατολισμό 3'>5'.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής πέψης, σε gel αγαρόζης 1%. Το δείγμα SL αντιστοιχεί στο self-ligation και αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα 1-6 αντιστοιχούν σε πλασμίδια που διαθέτουν ως ένθεμα τη μεταλλαγμένη αλληλουχία του υποκινητή του RECUR1. Με βάση τις ζώνες του ladder 100bp (Enzyquest), τα δείγματα 2, 4, 6 έχουν μέγεθος ~800bp, ενώ τα 3,5 έχουν ~400bp. Η δεύτερη περίπτωση δεν αντιστοιχεί στην επιθυμητή, αλλά επιλέχθηκε ένα ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω, λόγω κακής ηλεκτροφόρησης του ladder σε μικρά μοριακά μεγέθη.

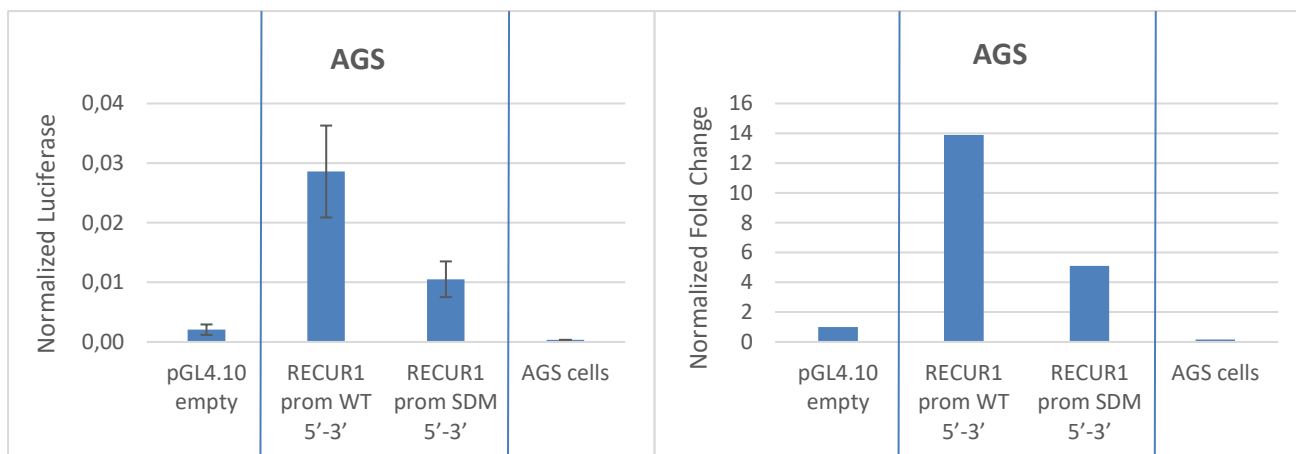
Από τα παραπάνω θετικά δείγματα, επιλέχθηκε ένα για κάθε προσανατολισμό ενθέματος. Τα δείγματα αυτά αλληλουχίστηκαν κατά Sanger από την εταιρεία CeMIA, χρησιμοποιώντας τον εκκινητή RV3, ο οποίος προσδένεται στον σκελετό του πλασμιδίου pGL4.10. Με βάση το χρωματογράφημα της κάθε αντίδρασης, αποδείχθηκε πως η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του GATA μοτίβου του υποκινητή του RECUR1 ήταν επιτυχής στα ενθέματα και των δύο προσανατολισμών (Εικ. 21).



Εικόνα 21: Αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger των επιλεγμένων δειγμάτων με προσανατολισμό ενθέματος 5'→3' και 3'→5', σε μορφή χρωματογραφήματος που εστιάζει στην αλληλουχία ενδιαφέροντος. Για κάθε προσανατολισμό παρουσιάζεται η WT αλληλουχία (5'-GATA-3'), καθώς και η μεταλλαγμένη (5'-GGCA-3').

4.3 Δοκιμασία Διπλής Λουσιφεράσης (Dual Luciferase Reporter Assay) του Κλωνοποιημένου pGL4.10

Στοχεύοντας στη μέτρηση της ενεργότητας του μεταλλαγμένου υποκινητή του RECUR1, πραγματοποιήθηκε Δοκιμασία Διπλής Λουσιφεράσης (Dual Luciferase Reporter Assay) σε AGS γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Εκτός από το πλασμίδιο pGL4.10 που φέρει τον μεταλλαγμένο, ως προς το μοτίβο GATA, υποκινητή, χρησιμοποιήθηκε και το αντίστοιχο που διαθέτει τον Wild-Type (WT) υποκινητή. Το σήμα που αποδίδεται από τον πρώτο είναι φανερά μικρότερο από εκείνο του τελευταίου (Εικ. 22).



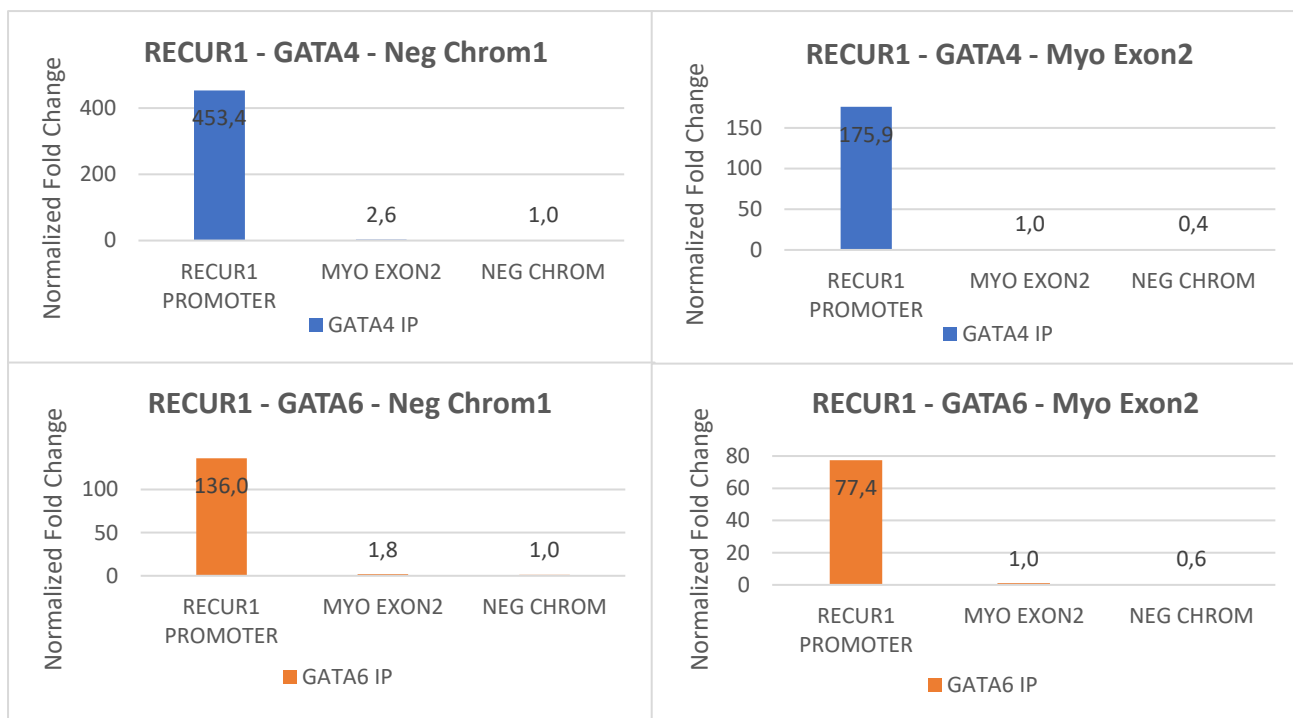
Εικόνα 22: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα από τη Δοκιμασία Διπλής Λουσιφεράσης σε AGS κύτταρα. Η ποσότητα του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση ήταν 100ng/μl. Το σήμα από μη διαμολυσμένα κύτταρα, καθώς και εκείνο από κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο pGL4.10 που δεν διαθέτει κάποιο ένθεμα, αποτελούν αρνητικούς μάρτυρες. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν τα κανονικοποιημένα επίπεδα σήματος που αποδίδονται από τη δράση της λουσιφεράσης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

4.4 Μελέτη Ανοσοκατακρήμνισης Χρωματίνης (ChIP) για τους Μεταγραφικούς Παράγοντες GATA4/6

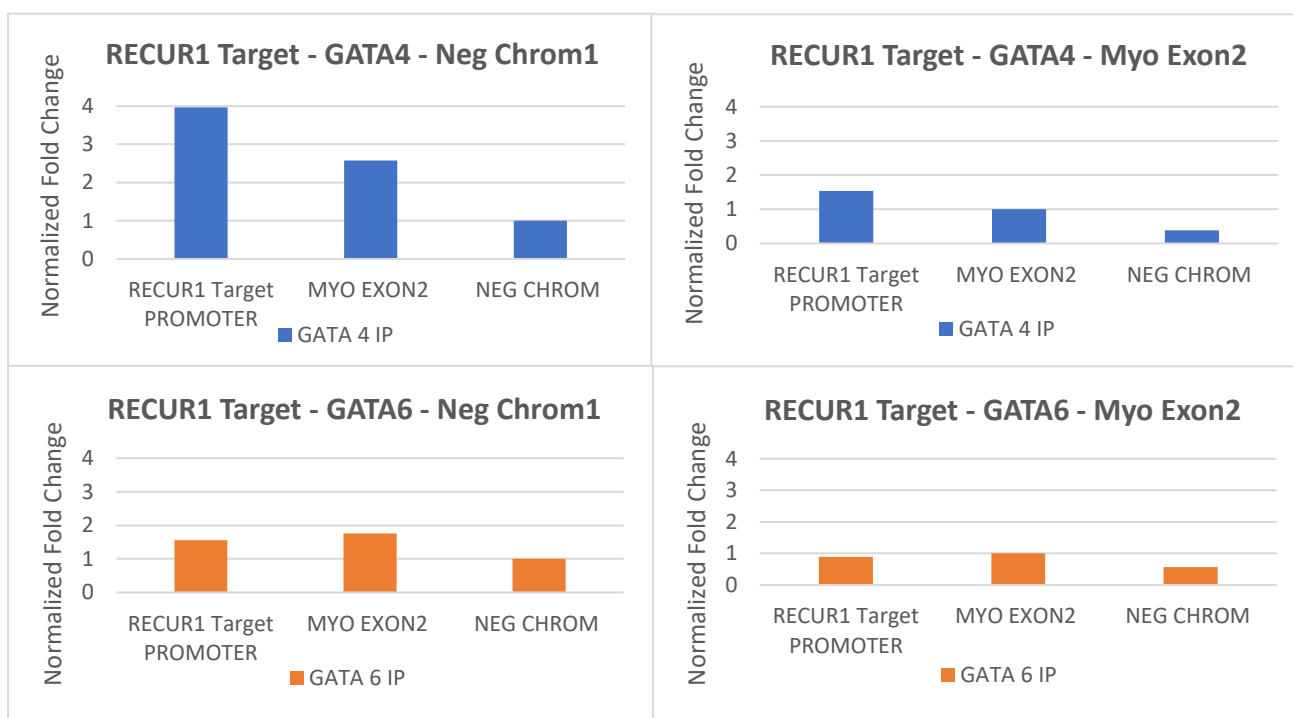
Με σκοπό να προσδιοριστεί η πρόσδεση ή μη των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 στους Wild-Type (WT) υποκινητές του RECUR1 και του γονιδίου-στόχου του, επιτελέστηκε η τεχνική qPCR μετά από Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP). Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές για τον κάθε υποκινητή, καθώς και το DNA, στο οποίο ήταν προσδεμένοι οι συγκεκριμένοι παράγοντες, ως εκμαγείο. Επίσης, ως αρνητικοί μάρτυρες ορίστηκαν περιοχές του γονιδιώματος, στις οποίες δεν προσδέονται οι παράγοντες GATA4/6, όπως το δεύτερο εξόνιο του γονιδίου της μυοσίνης (Myo Exon 2) και μία περιοχή στο χρωμόσωμα 1 (Neg Chrom 1).

Στην περίπτωση του υποκινητή του RECUR1 (Εικ. 23), και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες εμφανίζουν υψηλή πρόσδεση στην αλληλουχία-στόχο τους. Αυτό συμπεραίνεται από τη μεγάλη συγκέντρωση της συγκεκριμένης περιοχής DNA, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Επιπλέον, φαίνεται πως ο παράγοντας GATA4 υπερτερεί στην περιοχή, σε σχέση με τον GATA6.

Όσον αφορά τον υποκινητή του γονιδίου-στόχου (Εικ. 24), ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 τείνει να εμφανίζει μεγαλύτερη πρόσδεση, σε σχέση με τον GATA6. Παρ' όλα αυτά, και στις δύο περιπτώσεις, η συγκέντρωση της περιοχής-στόχου είναι ελάχιστα αυξημένη, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.



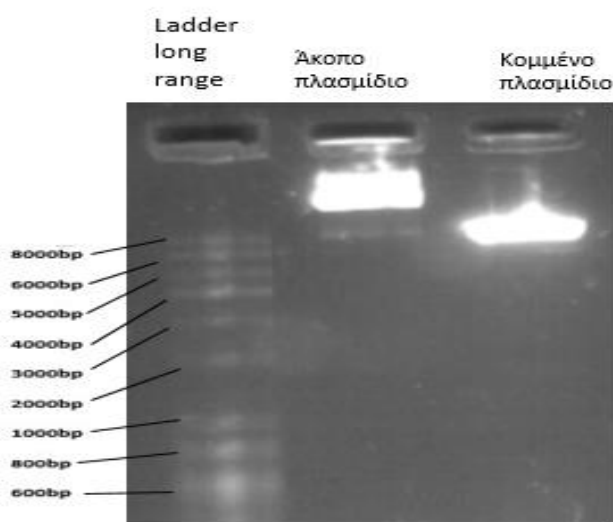
Εικόνα 23: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα από qPCR μετά από ChIP. Αφορούν τον WT υποκινητή του RECUR1. Σε κάθε διάγραμμα, η κανονικοποίηση γίνεται βάσει των αρνητικών μαρτύρων Neg Chrom1 ή Myo Exon2. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την χρωματίνη στην οποία προσδένεται ο παράγοντας GATA4, ενώ με πορτοκαλί εκείνα που σχετίζονται με την χρωματίνη στην οποία προσδένεται ο παράγοντας GATA6.



Εικόνα 24: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα από qPCR μετά από ChIP. Αφορούν τον WT υποκινητή του γονιδίου-στόχου του RECUR1. Σε κάθε διάγραμμα, η κανονικοποίηση γίνεται βάσει των αρνητικών μαρτύρων Neg Chrom1 ή Myo Exon2. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την χρωματίνη στην οποία προσδένεται ο παράγοντας GATA4, ενώ με πορτοκαλί εκείνα που σχετίζονται με την χρωματίνη στην οποία προσδένεται ο παράγοντας GATA6.

4.5 Δημιουργία Πλασμιδιακής Κατασκευής για CRISPR-nCas9

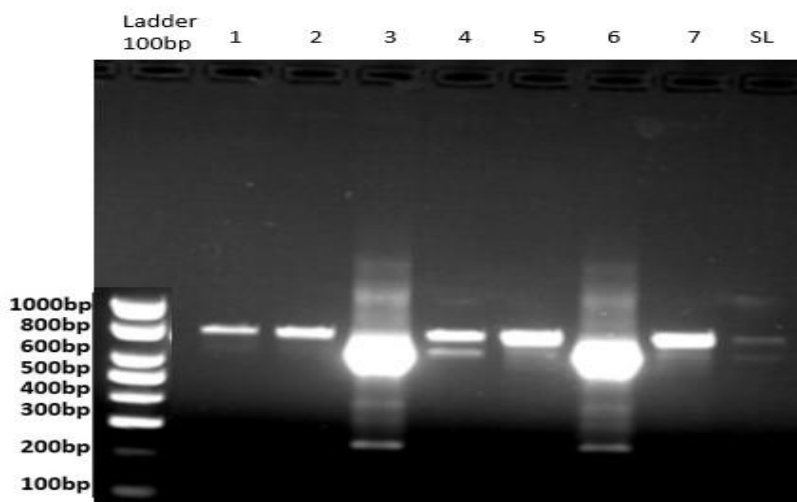
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται πως οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA συμμετέχουν στη ρύθμιση του lncRNA RECUR1. Δεδομένου ότι οι βιοδοκιμές λουσιφεράσης αποτελούν ένα αμιγώς *in vitro* πείραμα που δεν λαμβάνει υπόψη του τη δομή της χρωματίνης, μελλοντικά είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί στοχευμένη *ex vivo* μεταλλαξιγένεση που θα τροποποιεί το μοτίβο GATA στον υποκινητή του RECUR1 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, αξιοποιώντας την τεχνολογία CRISPR-editing. Με αυτό τον σκοπό, πραγματοποιήθηκε κατάλληλη τροποποίηση του πλασμιδιακού φορέα AIO Puro. Στοχεύοντας στην κλωνοποίηση του πρώτου δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου, που εκφράζει ένα από τα single guide RNAs (sgRNAs), το πλασμίδιο AIO Puro υπέστη πέψη με το ένζυμο BbsI. Το 10% της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε gel αγαρόζης 1%, για να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι η αντίδραση επιτελέστηκε σωστά (Εικ. 25). Το συγκεκριμένο ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει το πλασμίδιο σε δύο θέσεις. Ως αποτέλεσμα, αφαιρείται ένα μικρό μέρος του πλασμιδίου (30bp).



Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση του 10% της αντίδρασης πέψης του AIO Puro με BbsI, σε gel αγαρόζης 1%. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση του πλασμιδίου που δεν έχει υποστεί πέψη. Με βάση τις ζώνες του ladder long range (Enzyquest), το μέγεθος του άκοπου και του κομμένου πλασμιδίου είναι μεγαλύτερο από 8000bp, όπως και το επιθυμητό.

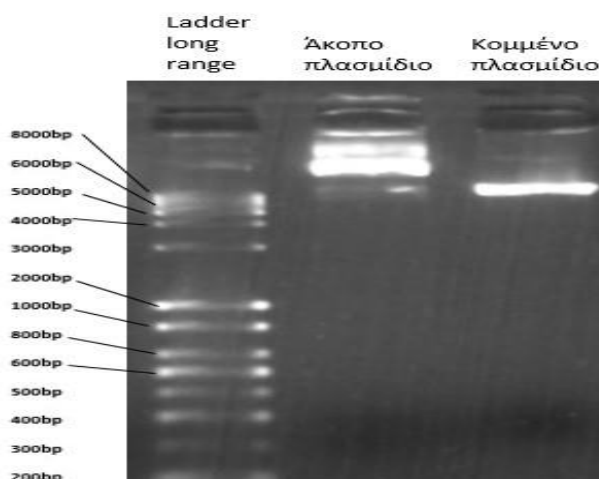
Μετά την ένθεση του πρώτου δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου στο πλασμίδιο AIO Puro και την κλωνοποίηση αυτού, μέσω μετασχηματισμού βακτηρίων XL1Blue, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep) από οκτώ βακτηριακές αποικίες, συμπεριλαμβανομένης μίας από την αντίδραση που δεν διέθετε το ένθεμα-στόχο (self-ligation). Η 1/30 αραιώση των minipreps αυτών χρησιμοποιήθηκε στη διεξαγωγή διαγνωστικής PCR, για την εξακρίβωση της ένθεσης του πρώτου

ολιγονουκλεοτιδίου. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1% (Εικ. 26). Το επιθυμητό μέγεθος των θετικών αντιδράσεων αναμένεται να είναι ~775bp.



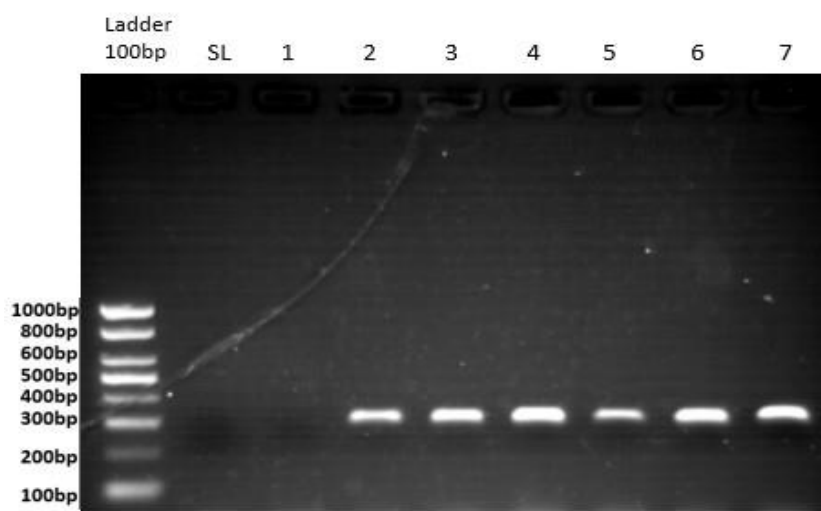
Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR, σε gel αγαρόζης 1%. Το δείγμα SL αντιστοιχεί στο self-ligation και αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα 1-7 αντιστοιχούν σε πλασμίδια που θεωρητικά διαθέτουν το πρώτο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο ως ένθεμα. Με βάση τις ζώνες του ladder 100bp (Enzyquest), τα δείγματα 1, 2, 4, 5, 7 έχουν μέγεθος ~800bp, ενώ τα 3, 6 έχουν ~700bp. Ως θετικά θεωρούνται τα δείγματα 3 και 6.

Από τα θετικά δείγματα επιλέχθηκε το δείγμα 6. Για να κλωνοποιηθεί το δεύτερο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο στο πλασμίδιο AIO Puro, το τελευταίο υπέστη πέψη με το ένζυμο BsaI. Το 10% της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε gel αγαρόζης 1% (Εικ. 27). Το συγκεκριμένο ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει το πλασμίδιο σε δύο θέσεις και, για αυτό τον λόγο, αφαιρείται ένα μικρό μέρος του πλασμιδιακού φορέα (29bp).



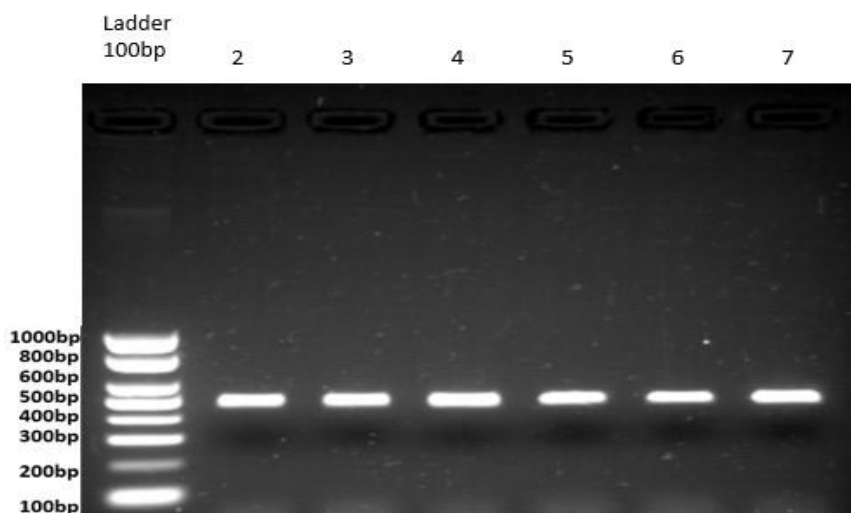
Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση του 10% της αντίδρασης πέψης του AIO Puro με BsaI, σε gel αγαρόζης 1%. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση του πλασμιδίου που δεν έχει υποστεί πέψη. Με βάση τις ζώνες του ladder long range (Enzyquest), το μέγεθος του άκοπου και του κομμένου πλασμιδίου είναι μεγαλύτερο από 8000bp, όπως και το επιθυμητό.

Μετά την ένθεση του δεύτερου δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου, το πλασμίδιο κλωνοποιήθηκε, μέσω μετασχηματισμού βακτηρίων *Stb13*. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep) από οκτώ βακτηριακές αποικίες, συμπεριλαμβανομένης μίας από την αντίδραση που δεν διέθετε το ένθεμα-στόχο (self-ligation). Για τη διεξαγωγή διαγνωστικής PCR, για την επιβεβαίωση της ένθεσης του δεύτερου ολιγονουκλεοτιδίου, τα minipreps αραιώθηκαν κατά 1/30. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1% (Εικ. 28). Το αναμενόμενο μέγεθος των θετικών, για την ένθεση, δειγμάτων είναι ~300bp.



Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR, σε gel αγαρόζης 1%. Το δείγμα SL αντιστοιχεί στο self-ligation και αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα 1-7 αντιστοιχούν σε πλασμίδια που θεωρητικά διαθέτουν το δεύτερο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο ως ένθεμα. Με βάση τις ζώνες του ladder 100bp (Enzyquest), τα δείγματα 2-7 έχουν μέγεθος ~300bp, γι' αυτό θεωρούνται θετικά στην ένθεση.

Τα θετικά δείγματα της παραπάνω διαγνωστικής PCR χρησιμοποιήθηκαν σε μία ακόμα διαγνωστική αντίδραση, ώστε να επιβεβαιωθεί η ταυτόχρονη ένθεση και των δύο ολιγονουκλεοτιδίων. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1% (Εικ. 29). Το μέγεθος των δειγμάτων που διαθέτουν και τα δύο ολιγονουκλεοτίδια είναι ~450bp.



Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διαγνωστικής PCR, σε gel αγαρόζης 1%. Τα δείγματα 2-7 αντιστοιχούν σε πλασμίδια που θεωρητικά διαθέτουν και τα δύο ολιγονουκλεοτίδια. Με βάση τις ζώνες του ladder 100bp (Enzyquest), όλα τα δείγματα έχουν μέγεθος ~500bp και θεωρούνται θετικά.

Στη συνέχεια, το δείγμα 2 αλληλουχήθηκε κατά Sanger από την εταιρεία CeMIA, χρησιμοποιώντας τον εκκινητή AIO_seq, ο οποίος προσδένεται στον σκελετό του πλασμιδιακού φορέα AIO Puro. Το αποτέλεσμα της αλληλούχησης επιβεβαίωσε, σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, την ορθή ενσωμάτωση και των δύο δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Διάφοροι τύποι καρκίνου, κυρίως εκείνοι του ανώτερου γαστρεντερικού συστήματος, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα θνησιμότητας. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη κλινικών συμπτωμάτων σε πρώιμα στάδια και, κατά συνέπεια, στη διάγνωσή τους σε προχωρημένα στάδια [49]. Για την επίτευξη της έγκαιρης διάγνωσης, πρόγνωσης ή θεραπείας, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν διάφοροι μοριακοί βιοδείκτες. Τον συγκεκριμένο ρόλο μπορούν να επιτελέσουν ορισμένα lncRNAs, βάσει των χαρακτηριστικών που διαθέτουν. Τα lncRNAs σχετίζονται με τη ρύθμιση της έκφρασης διάφορων γονιδίων, σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και επιγενετικό επίπεδο, και έχει παρατηρηθεί πως η απορρύθμιση της έκφρασής τους εμπλέκεται στην καρκινογένεση, στην εξέλιξη του όγκου, καθώς και στη μετάσταση αυτού [50, 51]. Επίσης, τα lncRNAs είναι ιστο-ειδικά και ανιχνεύσιμα σε βιολογικά υλικά, αποτελώντας τους κατάλληλους μη επεμβατικούς βιοδείκτες [52, 53].

Παραδείγματα τέτοιων lncRNAs είναι το UCA1 (Urothelial Cancer Associated 1), που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση στον γαστρικό καρκίνο [54], το CCAT1 (Colon Cancer Associated Transcript 1), το οποίο υποβοηθά τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων στον καρκίνο του παχέος εντέρου [55], το GAS5 (Growth Arrest-Specific 5), που ρυθμίζει την κυτταρική απόπτωση στον καρκίνο του προστάτη, του παχέος εντέρου και του στομάχου [56], καθώς και το HNF1A-AS1 (HNF1 Homeobox A Antisense RNA 1), το οποίο επιταχύνει την κυτταρική ανάπτυξη στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και του παχέος εντέρου [57]. Επιπλέον, το MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1), το οποίο προωθεί τη μετάσταση στον καρκίνο των πνευμόνων, της ουροδόχου κύστης, του παχέος εντέρου και του παγκρέατος, και το HOTAIR (HOX Antisense Intergenic RNA), που σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων και τη μετάσταση στον καρκίνο του μαστού, του παγκρέατος, του στομάχου και του παχέος εντέρου, χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες στους παραπάνω τύπους καρκίνου [58].

Όσον αφορά την περίπτωση του γαστρικού καρκίνου, εκτός από τα HOTAIR, GAS5 και UCA1, ως βιοδείκτες αξιοποιούνται τα H19 [59] και HULC (Highly Upregulated in Liver Cancer) [60, 61], τα οποία υπερεκφράζονται και σχετίζονται με την καρκινική μετάσταση, καθώς και το GAPLINC (Gastric Adenocarcinoma Predictive Long Intergenic NonCoding RNA), που υπερεκφράζεται και υποβοηθά την εισβολή των καρκινικών κυττάρων [62]. Επίσης, ως βιοδείκτης του καρκίνου του στομάχου μπορεί να χρησιμοποιηθεί το TUG1 (Taurine Upregulated 1), το οποίο είναι ανάλογο της εισβολής και του σταδίου του καρκίνου [63], το PVT1 (Plasmacytoma Variant Translocation 1), το οποίο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα από τον παράγοντα FOXM1 και εντοπίζεται στα στομαχικά υγρά

[64, 65], και τα UEGC1 και UEGC2, που εντοπίζονται σε εξωσώματα και των οποίων τα αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με πρώιμα στάδια του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου [66, 67]. Η ερευνητική μελέτη, της οποίας είναι μέρος η παρούσα εργασία, αποσκοπεί στη μελλοντική χρήση του RECUR1 ως επιπρόσθετου βιοδείκτη.

Η απορρύθμιση της έκφρασης των lncRNAs στον καρκίνο επηρεάζεται άμεσα από τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων [57]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η έκφραση του RECUR1 μειώνεται με την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, συμπεραίνοντας πως ο συγκεκριμένος παράγοντας σχετίζεται με την ενεργοποίηση του αντίστοιχου υποκινητή. Το γεγονός πως τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 δεν μειώνονται με την καταστολή του παράγοντα GATA6, κυρίως στα AGS γαστρικά καρκινικά κύτταρα, ίσως οφείλεται στο ότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά εκφράζει, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μεγαλύτερα επίπεδα τον παράγοντα GATA6 σε σχέση με τον GATA4, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται επαρκής καταστολή [29, 68]. Επίσης, ο συνδυασμός καταστολής και των δύο παραγόντων, ο οποίος οδηγεί σε μεγάλη μείωση των επιπέδων έκφρασης του RECUR1, αποδεικνύει τη συσχέτισή τους τόσο με την ενεργοποίηση του αντίστοιχου υποκινητή όσο και μεταξύ τους, αφού πιθανότατα ο ένας αναπληρώνει τον άλλον σε περιπτώσεις απώλειας. Η υπερέκφραση των παραγόντων GATA οδηγεί σε υπερέκφραση του RECUR1. Η έκφραση του συγκεκριμένου lncRNA, στην περίπτωση υπερέκφρασης του GATA6, πιθανότατα υπερτερεί στα AGS κύτταρα, βάσει του λόγου που προαναφέρθηκε. Οι αλλαγές στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων KLF5, CDX2 και HNF4a δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα το RECUR1, ενισχύοντας την αντίληψη πως η έκφρασή του επιτελείται από τους παράγοντες GATA.

Τα αποτελέσματα της Δοκιμασίας Διπλής Λουσιφεράσης, η οποία βασίστηκε στην κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του μοτίβου GATA στον υποκινητή του RECUR1, έδειξαν πως η μετάλλαξη επηρεάζει αρνητικά την ενεργότητα αυτού, μειώνοντας αρκετά την έκφραση της λουσιφεράσης. Με αυτό τον τρόπο, υποδεικνύεται η αλληλεπίδραση του υποκινητή με τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα αποτελέσματα της τεχνικής ChIP, τα οποία έδειξαν πως ο υποκινητής του RECUR1 κατακρημνίστηκε τόσο με αντισώματα έναντι του GATA4 όσο και του GATA6.

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως η έκφραση του γειτονικού γονιδίου του RECUR1, που αποτελεί και πιθανό στόχο του, δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την αρνητική αλλαγή έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA. Μόνο ο συνδυασμός καταστολής παραγόντων οδηγεί σε κάποια σχετική μείωση της έκφρασης του mRNA του. Κατά την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, μεγάλη επιρροή παρατηρείται στα AGS γαστρικά καρκινικά κύτταρα, η

οποία δεν επιβεβαιώνεται από τα HFE145 κύτταρα του αθανατοποιημένου φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της τεχνικής ChIP, οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4/6 προσδένονται ελάχιστα έως καθόλου στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου, επιβεβαιώνοντας την ελάχιστη επίδρασή τους στα επίπεδα έκφρασής του. Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να υποστηρίξουν μια καρκινο-ειδική ρύθμιση του γονιδίου-στόχου του RECUR1 από το ίδιο το lncRNA μετάγραφο, ενώ ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων GATA εντοπίζεται κυρίως στην άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση του lncRNA και όχι του γειτονικού του mRNA-στόχου.

Η κλωνοποίηση των κατάλληλων δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, που εκφράζουν τα επιθυμητά sgRNAs, στο πλασμίδιο AIO Puro έθεσε τον μελλοντικό στόχο της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης. Ειδικότερα, η χρήση της τεχνικής CRISPR-nCas9 (βλ. παράρτημα) αποσκοπεί στην κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του μοτίβου GATA στον υποκινητή του RECUR1 σε επιλεγμένες κυτταρικές σειρές. Ως αποτέλεσμα, προβλέπεται ο έλεγχος της επίδρασης της συγκεκριμένης μετάλλαξης στην αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA με τον υποκινητή-στόχο, υπό τις περίπλοκες συνθήκες αρχιτεκτονικής χρωματίνης, που επικρατούν εντός του κυττάρου.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

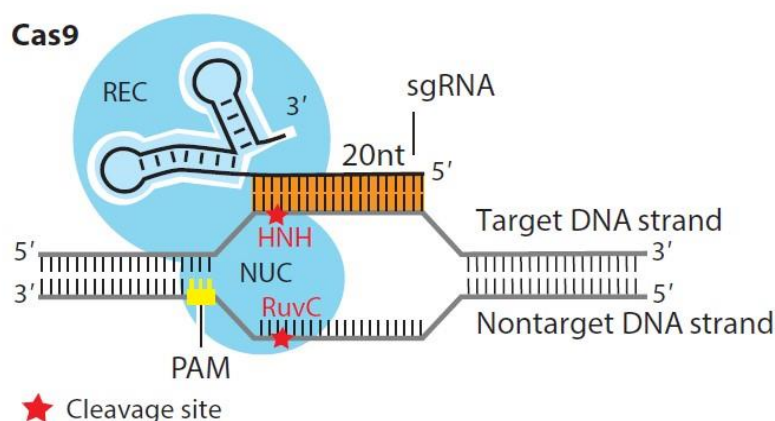
6.1 Εισαγωγή στην Τεχνική CRISPR-Cas9

Η τεχνική CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-CRISPR associated protein 9) βασίζεται στο ανοσοποιητικό σύστημα των προκαρυωτικών κυττάρων, έναντι των ιών και των φάγων. Ειδικότερα, το σύστημα αυτό ανακαλύφθηκε στο βακτήριο *Escherichia coli* και δίνει τη δυνατότητα στα βακτήρια και τα αρχαία να αποκτούν ανοσία έναντι των ξένων γενετικών υλικών που εισάγονται στο κύτταρο [69, 70].

Το CRISPR-Cas9 σύστημα αποτελείται από την πρωτεΐνη Cas9 και ένα guide RNA (gRNA). Η Cas9 διαθέτει έξι επικράτειες. Συγκεκριμένα, η REC I είναι εκείνη που δεσμεύει το gRNA, η Γέφυρα Έλικας (Bridge Helix) συμμετέχει στη διάσπαση της DNA αλληλουχίας-στόχου, ενώ η ύπαρξη της REC II επικράτειας δεν είναι πλήρως κατανοητή. Οι επικράτειες HNH και RuvC έχουν ενεργότητα ενδονουκλεάσης και η ταυτόχρονη δράση τους οδηγεί στην πέψη δίκλωνου DNA, δημιουργώντας λεία άκρα. Επίσης, η επικράτεια αλληλεπίδρασης με την αλληλουχία PAM (PAM Interacting Domain) είναι υπεύθυνη για την έναρξη σύνδεσης της Cas9 με την αλληλουχία-στόχο. Το gRNA είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA, το οποίο έχει μήκος 20 βάσεων και η διαμόρφωσή του στο χώρο έχει σχήμα T. Χρησιμοποιείται από την πρωτεΐνη Cas9 ως οδηγός για την εύρεση της DNA αλληλουχίας-στόχου, καθώς το 5' άκρο του είναι συμπληρωματικό προς την αλληλουχία PAM [71, 72]. Η αλληλεπίδραση αυτή παρέχει εξειδίκευση στη διάσπαση του γονιδιώματος, η οποία επιτελείται τρεις βάσεις ανοδικά της PAM. Η αλληλουχία PAM (Protospacer Adjacent Motif) εντοπίζεται στο 3' άκρο του DNA-στόχου. Με βάση την προέλευση του συστήματος CRISPR-Cas9, αναγνωρίζεται διαφορετικό PAM. Συγκεκριμένα, η SpCas9, η οποία προέρχεται από το *Streptococcus pyogenes*, αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-NGG-3' ή 5'-NAG-3', ενώ η SaCas9, που προέρχεται από το *Staphylococcus aureus*, αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-NNGRRT-3' [73].

Η δράση του συστήματος CRISPR-Cas9 ξεκινάει με την πρόσδεση του gRNA στην πρωτεΐνη Cas9. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης και, συνεπώς, σε ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη Cas9 αναγνωρίζει την αλληλουχία PAM, ξεδιπλώνει τη διπλή έλικα του DNA και προσδέεται στη συμπληρωματική, του gRNA, αλληλουχία. Η Cas9 επιτελεί τη δράση της νουκλεάσης μόνο όταν ζευγαρώσει με την αλληλουχία-στόχο (Εικ. 30) [71]. Η ρήξη που προκαλείται είναι δίκλωνη και μπορεί να επιδιορθωθεί είτε με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ), είτε με ομόλογα κατευθυνόμενη επιδιόρθωση (Homology Directed Repair, HDR). Ο πρώτος μηχανισμός είναι επιρρεπής σε λάθη και προάγει ενθέσεις ή απαλοιφές στη θέση της ρήξης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκληθούν αλλαγές ανοιχτού πλαισίου ή να δημιουργηθεί πρόωρο

κωδικόνιο τερματισμού, οδηγώντας σε διακοπή ή εξάλειψη της λειτουργίας των γονιδίων-στόχων. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι λιγότερο επιρρεπής σε σφάλματα, καθώς απαιτεί την ύπαρξη μίας ομόλογης αλληλουχίας, η οποία συνεισφέρει στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί, κατ' επέκταση, να αξιοποιηθεί για τη διόρθωση γενετικών αλλαγών και την πρόκληση επιθυμητών μεταλλάξεων (Εικ. 31) [69, 71].



Εικόνα 30: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος CRISPR-Cas9 κατά την αλληλεπίδρασή του με την DNA αλληλουχία-στόχο [74].

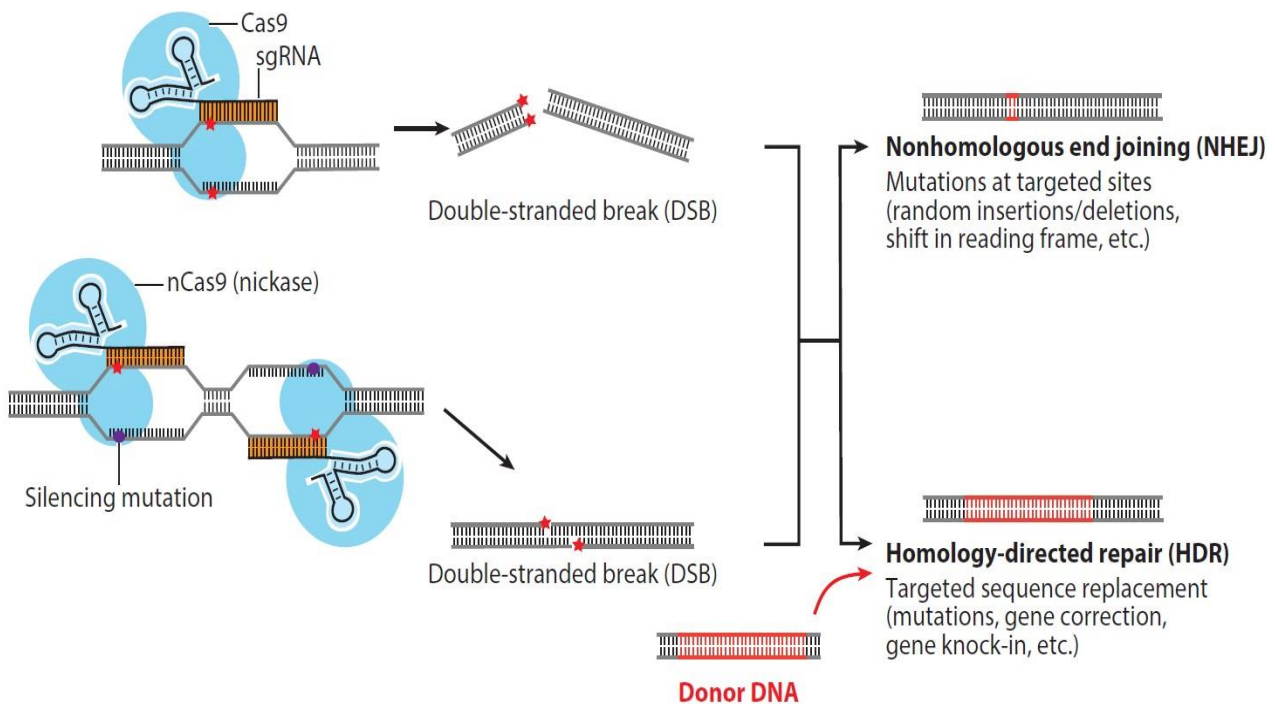
6.2 Η Τεχνική CRISPR-nCas9

Το CRISPR-Cas9 σύστημα βασίζεται μόνο σε ένα gRNA και μπορεί να επιτελέσει τη λειτουργία του ακόμα κι αν η αλληλουχία-στόχος δεν είναι πλήρως συμπληρωματική προς αυτό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δράση της Cas9 σε σημεία μακριά από την περιοχή-στόχο του γονιδιώματος, προκαλώντας ανεπιθύμητες μεταλλάξεις. Η συγκεκριμένη δράση τείνει να συμβαίνει σε επίπεδα όμοια με εκείνα της δράσης στην περιοχή-στόχο. Για τον λόγο αυτό, πρέπει να ελέγχεται και να αποφεύγεται, ώστε να αποτραπεί η βλάβη στα φυσιολογικά κυτταρικά γονιδιώματα [75].

Η προσπέλαση αυτού του προβλήματος επιτυγχάνεται με την χρήση ζεύγους πρωτεϊνών με ενεργότητα νικάσης (σύστημα CRISPR-nCas9, Εικ. 31). Ειδικότερα, δημιουργήθηκε μία παραλλαγή της Cas9, η οποία εμφανίζει απώλεια λειτουργίας λόγω των μεταλλάξεων D10A και H840A στις επικράτειες RuvC και HNH αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα, η Cas9 δημιουργεί μονόκλωνες και όχι δίκλωνες ρήξεις, ενώ για την επίτευξη των τελευταίων απαιτούνται δύο gRNAs και δύο πρωτεΐνες. Με την χρήση του συστήματος CRISPR-nCas9, η επιλογή της περιοχής-στόχου γίνεται με βάση την ύπαρξη της αλληλουχίας PAM σε κάθε αλυσίδα. Λόγω του ότι τα πιθανά PAM απέχουν κάποια

απόσταση μεταξύ τους, οι δύο θέσεις διάσπασης εμφανίζουν μία ελάχιστη απόσταση περίπου 40-50 νουκλεοτιδίων [69, 71].

Η αύξηση του μεγέθους της περιοχής-στόχου μειώνει την πιθανότητα δράσης του συστήματος σε άλλη θέση, λόγω του ότι είναι ελάχιστα πιθανή η παρουσία παρόμοιας αλληλουχίας σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Επίσης, οι μονόκλωνες ρήξεις που μπορεί να προκύψουν σε μη επιθυμητά σημεία, έχουν τη δυνατότητα να επιδιορθωθούν από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης υψηλής πιστότητας του κυττάρου. Τέλος, η δημιουργία προεξεχόντων άκρων, που επιτελείται από τη δράση του ζεύγους νικασών στα σημεία διάσπασης, δίνει τη δυνατότητα χρήσης του συστήματος για τροποποίηση του γονιδιώματος (genome editing), καθώς παρέχει μεγαλύτερο έλεγχο στην ακριβή επεξεργασία και ενσωμάτωση αλληλουχιών [71].



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση των συστημάτων CRISPR-Cas9 και CRISPR-nCas9 και των τρόπων επιδιόρθωσης των ρήξεων που προκαλούν στο δίκλωνο DNA-στόχο [74].

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
2. Ang, T.L. and K.M. Fock, *Clinical epidemiology of gastric cancer*. Singapore Med J, 2014. **55**(12): p. 621-8.
3. Thrift, A.P. and H.B. El-Serag, *Burden of Gastric Cancer*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020. **18**(3): p. 534-542.
4. Rocken, C., *Molecular classification of gastric cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(3): p. 293-301.
5. Chong, Y., et al., *DNA methylation status of a distinctively different subset of genes is associated with each histologic Lauren classification subtype in early gastric carcinogenesis*. Oncol Rep, 2014. **31**(6): p. 2535-44.
6. Riquelme, I., et al., *Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 24750-79.
7. Alessandrini, L., et al., *Proposed Molecular and miRNA Classification of Gastric Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(6).
8. Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
9. 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.
10. Dong, M., et al., *Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma*. Hum Pathol, 2016. **53**: p. 25-34.
11. Chia, N.Y. and P. Tan, *Molecular classification of gastric cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(5): p. 763-9.
12. Sunakawa, Y. and H.J. Lenz, *Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network*. Curr Treat Options Oncol, 2015. **16**(4): p. 17.
13. Chen, T., X.Y. Xu, and P.H. Zhou, *Emerging molecular classifications and therapeutic implications for gastric cancer*. Chin J Cancer, 2016. **35**: p. 49.
14. Karimi, P., et al., *Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(5): p. 700-13.
15. Correa, P., *Gastric cancer: overview*. Gastroenterol Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 211-7.
16. Joshi, S.S. and B.D. Badgwell, *Current treatment and recent progress in gastric cancer*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 264-279.
17. Tremblay, M., O. Sanchez-Ferras, and M. Bouchard, *GATA transcription factors in development and disease*. Development, 2018. **145**(20).
18. Huilgol, D., et al., *Transcription Factors That Govern Development and Disease: An Achilles Heel in Cancer*. Genes (Basel), 2019. **10**(10).
19. Romano, O. and A. Miccio, *GATA factor transcriptional activity: Insights from genome-wide binding profiles*. IUBMB Life, 2020. **72**(1): p. 10-26.
20. Gutierrez, L., et al., *Regulation of GATA1 levels in erythropoiesis*. IUBMB Life, 2020. **72**(1): p. 89-105.
21. Bresnick, E.H., et al., *Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(13): p. 5819-31.
22. Wan, Y.Y., *GATA3: a master of many trades in immune regulation*. Trends Immunol, 2014. **35**(6): p. 233-42.
23. Zaidan, N. and K. Ottersbach, *The multi-faceted role of Gata3 in developmental haematopoiesis*. Open Biol, 2018. **8**(11).
24. Gong, Y., et al., *GATA4 inhibits cell differentiation and proliferation in pancreatic cancer*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0202449.
25. Sun, Z. and B. Yan, *Multiple roles and regulatory mechanisms of the transcription factor GATA6 in human cancers*. Clin Genet, 2020. **97**(1): p. 64-72.
26. Lentjes, M.H., et al., *The emerging role of GATA transcription factors in development and disease*. Expert Rev Mol Med, 2016. **18**: p. e3.

27. Fujiwara, T., *GATA Transcription Factors: Basic Principles and Related Human Disorders*. Tohoku J Exp Med, 2017. **242**(2): p. 83-91.
28. Chia, N.Y., et al., *Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development*. Gut, 2015. **64**(5): p. 707-19.
29. Sulahian, R., et al., *An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer*. Oncogene, 2014. **33**(49): p. 5637-48.
30. Peng, W.X., P. Koirala, and Y.Y. Mo, *LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer*. Oncogene, 2017. **36**(41): p. 5661-5667.
31. Fatica, A. and I. Bozzone, *Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(1): p. 7-21.
32. Wu, Z., et al., *Regulation of lncRNA expression*. Cell Mol Biol Lett, 2014. **19**(4): p. 561-75.
33. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
34. Bunch, H., *Gene regulation of mammalian long non-coding RNA*. Mol Genet Genomics, 2018. **293**(1): p. 1-15.
35. Jarroux, J., A. Morillon, and M. Pinskaya, *History, Discovery, and Classification of lncRNAs*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1008**: p. 1-46.
36. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm*. Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
37. Balas, M.M. and A.M. Johnson, *Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer*. Noncoding RNA Res, 2018. **3**(3): p. 108-117.
38. Ma, Y., et al., *Membrane-lipid associated lncRNA: A new regulator in cancer signaling*. Cancer Lett, 2018. **419**: p. 27-29.
39. Huang, T. and C.X. Deng, *Current Progresses of Exosomes as Cancer Diagnostic and Prognostic Biomarkers*. Int J Biol Sci, 2019. **15**(1): p. 1-11.
40. Liu, X.H., et al., *Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 92.
41. Kong, Y., C.H. Hsieh, and L.C. Alonso, *ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B Locus With Roles in Cancer and Metabolic Disease*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 405.
42. O'Brien, S.J., et al., *Increased Expression of Long Non-coding RNA H19 is Associated With Colon Cancer Recurrence*. J Surg Res, 2022. **269**: p. 59-68.
43. Li, Z.X., et al., *MALAT1: a potential biomarker in cancer*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 6757-6768.
44. Chan, J.J. and Y. Tay, *Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(5).
45. Fattahi, S., et al., *LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: A novel approach to personalized medicine*. J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3189-3206.
46. Gloss, B.S. and M.E. Dinger, *The specificity of long noncoding RNA expression*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 16-22.
47. Ulitsky, I. and D.P. Bartel, *lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms*. Cell, 2013. **154**(1): p. 26-46.
48. Mazaud-Guittot, S., et al., *GATA4 autoregulates its own expression in mouse gonadal cells via its distal 1b promoter*. Biol Reprod, 2014. **90**(2): p. 25.
49. Abdi, E., et al., *LncRNA polymorphisms and upper gastrointestinal cancer risk*. Pathol Res Pract, 2021. **218**: p. 153324.
50. 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.
51. Tian, X., et al., *Differentially Expressed lncRNAs in Gastric Cancer Patients: A Potential Biomarker for Gastric Cancer Prognosis*. J Cancer, 2017. **8**(13): p. 2575-2586.
52. 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.
53. Shao, Y., et al., *Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer*. Cancer, 2014. **120**(21): p. 3320-8.

54. Gong, P., et al., *LncRNA UCA1 promotes tumor metastasis by inducing miR-203/ZEB2 axis in gastric cancer*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(12): p. 1158.
55. Pang, Q., et al., *Increased expression of long intergenic non-coding RNA LINC00152 in gastric cancer and its clinical significance*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(6): p. 5441-7.
56. Yang, X., et al., *Long non-coding RNA GAS5 in human cancer*. *Oncol Lett*, 2020. **20**(3): p. 2587-2594.
57. Yang, J., H. Niu, and X. Chen, *GATA1-Activated HNF1A-AS1 Facilitates the Progression of Triple-Negative Breast Cancer via Sponging miR-32-5p to Upregulate RNF38*. *Cancer Manag Res*, 2021. **13**: p. 1357-1369.
58. Li, J., et al., *Regulation of lncRNA and Its Role in Cancer Metastasis*. *Oncol Res*, 2016. **23**(5): p. 205-17.
59. Liu, Y., et al., *Potential Role of lncRNA H19 as a Cancer Biomarker in Human Cancers Detection and Diagnosis: A Pooled Analysis Based on 1585 Subjects*. *Biomed Res Int*, 2019. **2019**: p. 9056458.
60. Zhao, Y., et al., *Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical and in vitro investigation*. *Oncol Rep*, 2014. **31**(1): p. 358-64.
61. Yu, X., et al., *HULC: an oncogenic long non-coding RNA in human cancer*. *J Cell Mol Med*, 2017. **21**(2): p. 410-417.
62. Hu, Y., et al., *Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer*. *Cancer Res*, 2014. **74**(23): p. 6890-902.
63. Baliou, S., et al., *Role of taurine, its haloamines and its lncRNA TUG1 in both inflammation and cancer progression. On the road to therapeutics? (Review)*. *Int J Oncol*, 2020. **57**(3): p. 631-664.
64. Ding, J., et al., *Expression and clinical significance of the long non-coding RNA PVT1 in human gastric cancer*. *Onco Targets Ther*, 2014. **7**: p. 1625-30.
65. 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.
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. Yuan, L., et al., *Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance*. *Mol Cancer*, 2020. **19**(1): p. 96.
68. Ayanbule, F., N.S. Belaguli, and D.H. Berger, *GATA factors in gastrointestinal malignancy*. *World J Surg*, 2011. **35**(8): p. 1757-65.
69. Yi, L. and J. Li, *CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1866**(2): p. 197-207.
70. Pellagatti, A., et al., *Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease*. *Arch Toxicol*, 2015. **89**(7): p. 1023-34.
71. Gupta, D., et al., *CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing*. *Life Sci*, 2019. **232**: p. 116636.
72. Ghaemi, A., et al., *CRISPR-cas9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy*. *Life Sci*, 2021. **267**: p. 118969.
73. Zhang, J.H., et al., *Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering*. *Bioengineered*, 2016. **7**(3): p. 166-74.
74. Wang, H., M. La Russa, and L.S. Qi, *CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond*. *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 227-64.
75. Ma, Y., L. Zhang, and X. Huang, *Genome modification by CRISPR/Cas9*. *FEBS J*, 2014. **281**(23): p. 5186-93.