



Διπλωματική Εργασία:

«Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του lncRNA RECUR1 από μη μεταγραφόμενα και μη κωδικοποιητικά SNP στον καρκίνο»

Μεταπτυχιακός Φοιτητής:
Νικόλαος-Ιάσωνας Βάλτος



Επιβλέπων Καθηγητής:
Αντώνιος Γιακουντής

Αθήνα, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων Καθηγητής

- ✚ **Αντώνιος Γιακουντής:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μέλη Επιτροπής

- **Καλλιόπη Παπαδοπούλου:** Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Δανιέλα Τσίκου:** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας .

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	0
1.1 Γαστρικός καρκίνος	0
1.1.1 Μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου	1
1.1.2 Κληρονομούμενες μεταλλάξεις στον γαστρικό καρκίνο	3
1.1.3 Σημειακοί Πολυμορφισμοί στον Καρκίνο	4
1.2 Ταξινόμηση των SNPs με βάση την λειτουργία τους	6
1.3 Μακρά Μη Κωδικοποιητικά RNA στον Καρκίνο	9
1.3.1 Συσχέτιση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNA με αυξημένη ενεργότητα ενισχυτών	10
1.3.2 Συσχέτιση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNA με επιγενετικές τροποποιήσεις	11
2. Υλικά & Μέθοδοι	16
2.1 Υλικά	16
2.1.1 Κυτταρικές σειρές	16
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς & Βακτηριακά στελέχη	16
2.2 Μέθοδοι	18
2.2.1 Εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων με τη μέθοδο Κατευθυνόμενης Μεταλλαξογένεσης	18
2.2.1.1 Αρχικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης	18
2.2.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από Πηκτή Αγαρόζης	20
2.2.1.3 Τελική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ολοκλήρωση της SDM	20
2.2.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από πηκτή αγαρόζης μετά από ενίσχυση της αλληλουχίας του μεταλλαγμένου Υποκινητή	21
2.2.1.5 Φωσφορυλίωση του μεταλλαγμένου υποκινητή με αντίδραση πολυνουκλεοτιδικής κινάσης (PNK treatment)	22
2.2.1.6 Κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου υποκινητή σε αποφωσφορυλιωμένο PGL4.10 φορέα	22
2.2.1.7 Μετασηματισμός κυττάρων DH5a	23
2.2.1.8 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (Homemade Minipreps)	24
2.2.1.9 Διαγνωστική PCR για την εύρεση του προσανατολισμού των θετικών κλώνων	25
2.2.1.10 Διαμόλυνση του μεταλλαγμένου υποκινητή RECUR1 σε AGS κύτταρα και ανάλυση λουσιφεράσης	26
2.2.3 Διαμόλυνση του μεταλλαγμένου ενισχυτή RECUR1 σε AGS κύτταρα και ανάλυση λουσιφεράσης	27
2.2.4 Γονοτύπηση στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1 με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (dCAPS)	27
2.2.4.1 PCR στο πλαίσιο της dCAPS	28
2.2.4.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης	30
2.2.4.3 Διαγνωστικές πέψεις στα PCR προϊόντα των υποκινητών και ενισχυτών του RECUR1	30
2.2.4.4 Τελική Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης	31
2.2.5 Ποσοτική PCR μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης	31
2.2.6 Κλωνοποίηση δύο sgRNAs στον PX333 φορέα	32
2.2.6.1 Ενσωμάτωση του πρώτου sgRNA	32

2.2.6.2 Ενσωμάτωση του δεύτερου sgRNA	34
2.2.6.3 Αλληλούχηση κατά Sanger.....	34
3. Αποτελέσματα	35
3.1 Γονοτύπηση στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1 με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (dCAPS)	35
3.1.1 Γονοτύπηση στον υποκινητή του RECUR1	36
3.1.2 Γονοτύπηση στον ενισχυτή του RECUR1	37
3.2 Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση.....	38
3.2.1 Επιλογή της κατάλληλα μεταλλαγμένης αλληλουχίας υποκινητή RECUR1	40
3.2.2 Αλληλούχηση του μεταλλαγμένου υποκινητή & ενισχυτή RECUR1	41
3.2.3 Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης στον μεταλλαγμένο υποκινητή του RECUR1.....	42
3.2.4 Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης στον μεταλλαγμένο ενισχυτή του RECUR1	43
3.3 Μελέτη ποσοτικής PCR μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης	44
Τα αποτελέσματα της ChiP-qPCR απέδειξαν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA ₄ και GATA ₆ προσδένονται	44
3.4 Ενσωμάτωση δύο sgRNAs στον PX333 φορέα.....	46
3.4.1 Διάγνωση της ορθής ενσωμάτωσης του sgRNA ₁	46
3.4.2 Διάγνωση της ορθής ενσωμάτωσης του sgRNA ₂	47
4. Συζήτηση	50
5. Βιβλιογραφία	53

Περίληψη

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί έναν από τους κυρίαρχους τύπους καρκίνου όσον αφορά την θνησιμότητα και αυτό οφείλεται κυρίως στην όψιμη διάγνωση του. Τα σημερινά ελλιπή διαγνωστικά αλλά και προγνωστικά εργαλεία ανίχνευσης του γαστρικού καρκίνου χρειάζεται να αντικατασταθούν το συντομότερο δυνατό από καινοτόμους και μη επεμβατικούς βιοδείκτες. Γι' αυτό το σκοπό η μελέτη των lncRNAs καθίσταται πολλά υποσχόμενη λόγω καρκινοειδικότητας στην έκφραση τους. Όσον αφορά τα SNPs που παρατηρούνται συνεχώς σε lncRNAs συμβάλλουν στην απορρύθμιση τους επηρεάζοντας τελικά την δομή, την έκφρασή και την λειτουργία τους.

Η παρούσα εργασία εστιάστηκε στο lncRNA RECUR1 και κυρίως στον υποκινητή και στον ενισχυτή του υπό μελέτη γονιδίου. Αρχικά, στις συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές, επιτεύχθηκαν οι επιθυμητές σημειακές μεταλλάξεις, μέσω της μεθόδου της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, που καταστρέφουν προβλεπόμενα μοτίβα πρόσδεσης GATA μεταγραφικών παραγόντων. Στην πορεία οι αλληλουχίες στόχοι με τα SNP ενδιαφέροντος κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς λουσιφεράσης έτσι ώστε να αξιολογηθεί η ενεργότητα τους συγκριτικά με τις αλληλουχίες που δεν είχαν υποστεί μετάλλαξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επιδιωκόμενες μεταλλάξεις στον υποκινητή του RECUR1 καταστέλλουν σε μεγάλο βαθμό την ενεργότητα τού ενώ το SNP ενδιαφέροντος στον ενισχυτή του RECUR1 φαίνεται να αυξάνει την έκφρασή του.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση, με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (dCAPS), στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1. Στόχος της γονοτύπησης αποτέλεσε ο εντοπισμός της αλληλουχίας άγριου τύπου ή μεταλλαγμένου τύπου που υπάρχει σε πέντε ανθρώπινες γαστρικές κυτταρικές σειρές (AGS, HFE, MKN45, KATOIII, NUGC4). Το αποτέλεσμα που παρουσίασε μεγαλύτερο ενδιαφέρον ήταν το αλληλόμορφο μεταλλαγμένου τύπου που ανιχνεύτηκε στον ενισχυτή RECUR1 της κυτταρικής σειράς MKN45.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChiP-qPCR) αποδείχτηκε ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA₄ και GATA₆ διαδραματίζουν καίριο ρυθμιστικό ρόλο για την μεταγραφή του RECUR1 καθώς προσδένονται σε πολύ μεγάλη ποσότητα στον υποκινητή του RECUR1. Αντίθετα, στον ενισχυτή του RECUR1 η πρόσδεση των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων είναι εμφανώς μικρότερη.

Τέλος, κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς κατάλληλα επιλεγμένα sgRNAs στον PX333 φορέα ο οποίος θα συμβάλει στην υλοποίηση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στο γονίδιο του RECUR1 για γονιδιακή καταστολή (knock-out).

Summary

Gastric cancer is classified as one of the types of cancer with the highest mortality rates because it mostly gets diagnosed at an advanced stage. Therefore, current poor diagnostic and prognostic molecular tools have to be replaced as soon as possible by innovative and non-invasive biomarkers. Thus, the research of lncRNAs is considered as very promising for their cancer specificity expression. Regarding the SNPs, which are constantly observed in lncRNAs, contribute to the dysregulation of lncRNAs affecting the alter of their structure, expression, and function.

This study focused on the promoter and enhancer of the lncRNA RECUR1. Initially, in those sequences were created the SNP of interest, via the method of the site-directed mutagenesis, which destroy predicted GATA transcription factor binding patterns. Then the desired mutated sequences and the respectively non-mutated sequences were cloned into luciferase vector in order to evaluate the expression of the regulatory elements. The results showed that the SNPs of interest in the RECUR1 promoter downregulate its expression while the SNP of interest in the RECUR1 enhancer seems to increase its expression.

In addition, the genotyping of the wild- and mutated-type of RECUR1 promoter and enhancer was performed in five human gastric cell lines (AGS, HFE , MKN45, KATOIII, NUGC4) via Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (dCAPS).The most notable result was the detection of mutated-type allele in the RECUR1 enhancer which exists in MKN45 cell line.

According to the assay of quantitative PCR after chromatin immunoprecipitation (ChiP-qPCR) was proved that the transcription factors GATA4 and GATA6 play a key regulatory role for RECUR1 transcription as they have shown high association with the RECUR1 promoter. In contrast, binding of the same transcription factors at the RECUR1 enhancer was weaker.

Finally, for future application of CRISPR / Cas9 technology, the PX333 vector was used to clone selected sgRNAs in order to target effectively the RECUR1 gene for knock-out approaches.

1. Εισαγωγή

1.1 Γαστρικός καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος (Gastric Cancer, GC) αποτελεί ένα δυσχερές και περίπλοκο πρόβλημα υγείας. Κάθε χρόνο υπολογίζονται σε παγκόσμια κλίμακα παραπάνω από 900.000 νέες περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου και 700.000 θάνατοι. Οι περισσότεροι ασθενείς σε πρώιμο στάδιο γαστρικού καρκίνου δεν εμφανίζουν κάποιο ανησυχητικό σύμπτωμα και αυτό έχει ως συνέπεια, η νόσος να διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Συμπερασματικά, ο γαστρικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα ελλιπή διαγνωστικά ή προγνωστικά εργαλεία. Ακόμα και στην Ιαπωνία που θεωρείται εξαιρετικά προηγμένη στην έρευνα και στις επεμβατικές μεθόδους αντιμετώπισης του γαστρικού καρκίνου, τα επίπεδα επιβίωσης δεν ξεπερνούν τα πέντε χρόνια (για το 60% συνολικά των ασθενών και το 70% σε στάδιο II/III). Συνεπώς, κρίνεται επιτακτική ανάγκη η εύρεση κατάλληλων διαγνωστικών-μη επεμβατικών εργαλείων που θα συμβάλλουν στην πρόληψη και στην έγκαιρη καταπολέμηση της ασθένειας. Μέχρι στιγμής ο καρκίνος του στομάχου, παγκοσμίως, θεωρείται η πέμπτη πιο συχνή μορφή καρκίνου και η τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου [1-3].

Ο καρκίνος του στομάχου, με βάση τα ανατομικά χαρακτηριστικά, διακρίνεται σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και σε αδενοκαρκίνωμα γαστροοισοφαγικής συμβολής. Όσον αφορά τα ιστολογικά κριτήρια, σύμφωνα και με την ταξινόμηση *Lauren*, ο γαστρικός καρκίνος διακρίνεται σε δύο κύριους τύπους, τον εντερικό και τον διάχυτο τύπο [4]. Πέρα από τους δύο διακριτούς τύπους, περιλαμβάνονται οι μικτοί και οι ακαθόριστοι τύποι γαστρικού καρκίνου. Ο διάχυτος τύπος χαρακτηρίζεται από ελλιπή συνεκτικότητα και διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων, τα οποία δεν σχηματίζουν μορφολογία αντίστοιχη των αδένων. Αντίθετα, ο εντερικός τύπος περιέχει γαστρικά αδενοκαρκινώματα που είναι παρόμοια με αυτά του παχέος εντέρου.

Η μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (*Genome-Wide Association study*, *GWAS*) διευκόλυνε την κατηγοριοποίηση των διαφόρων υπότυπων γαστρικού καρκίνου[5]. Ο εντερικός τύπος καρκίνου εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με την μόλυνση από το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), το οποίο συμβάλλει ενεργά στην πορεία της νόσου (από ατροφική γαστρίτιδα, εντερική μεταπλασία, δυσπλασία και τελικά διηθητικό αδενοκαρκίνωμα) [6]. Ένα άλλο παθογόνο που σχετίζεται με τον καρκίνο του στομάχου είναι ο ιός Epstein-Barr[7].

Αυτό το παθογόνο εντοπίζεται συχνά σε κακοήθη κύτταρα αλλά ποτέ σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα. Επιπρόσθετα, επειδή ο εντερικός εμφανίζεται πιο συχνά σε συγκεκριμένες χώρες, όπως η Ιαπωνία, υπάρχουν περιοχές υψηλού κινδύνου και κάποιες χαμηλού. Αντίθετα, ο διάχυτος τύπου γαστρικού καρκίνου παρουσιάζει ομοιόμορφη κατανομή γεωγραφικά και το γενετικό υπόβαθρο διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην εξέλιξη της ογκογένεσης [8].

1.1.2 Μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου

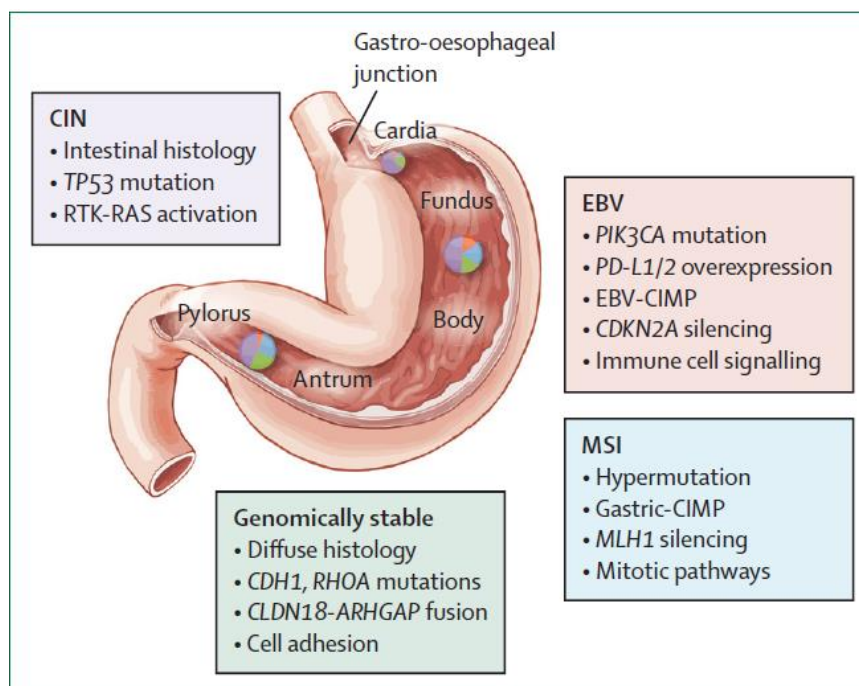
Η ερευνητική κοινοπραξία Cancer Genome Atlas δημοσίευσε τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής ανάλυσης 295 πρωτοπαθών αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου [9]. Σύμφωνα με αυτή την πλήρη αλληλούχηση των γονιδιωμάτων διαχωρίστηκαν τέσσερις διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι όγκων (**Εικόνα 1**). Σε αυτή την μοριακή ταξινόμηση ταυτοποιήθηκαν οι εξής όγκοι:

- Οι χρωμοσωμικά ασταθείς όγκοι (Chromosomal instability, CIN) σε ποσοστό 50%
- Οι μικροδορυφορικά ασταθείς όγκοι (Microsatellite Instability, MSI) σε ποσοστό 22%
- Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι σε ποσοστό 20%
- Οι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV) σε ποσοστό 9%.

Σε συνδυασμό με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά, η παραπάνω ανάλυση ανέδειξε ότι το 73% διάχυτου υπότυπου καρκίνου χαρακτηρίζονται ως γονιδιωματικά σταθεροί. Επίσης, τα αδενοκαρκινώματα γαστροοισοφαγικής συμβολής εμφανίζονται αρκετά συχνά ως CIN. Οι EBV όγκοι εντοπίζονται στο θολό ή στο σώμα του στομάχου και ανιχνεύονται κυρίως στους άνδρες (81%). Αντίθετα, οι MSI όγκοι κατατάσσονται κυρίως στους εντερικούς τύπους καρκίνου και εμφανίζονται ελαφρώς περισσότερο σε γυναikές (56%)

Οι CIN όγκοι χαρακτηρίζονται από ανευπλοειδίες, δομικές αλλαγές όπως μετατοπίσεις και πληθώρα μεταλλάξεων σε πρωτο-ογκογονίδια αλλά και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η μικροδορυφορική αστάθεια συνεπάγεται άμεσα σε γονιδιωματική αστάθεια λόγω ανεπάρκειας επιδιόρθωσης των αναντιστοιχιών του DNA (MMR. MisMatch Repair). Στον σποραδικό γαστρικό καρκίνο, η αδυναμία στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA συνήθως προκαλείται από μια

επιγενετική τροποποίηση στον υποκινητή του MLH1 γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, ο υποκινητής υπερμεθυλιώνεται και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία έκφρασης της MLH1 πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί κομβική πρωτεΐνη στο σύστημα MMR [10].



Εικόνα 1 : Σύνοψη των κύριων χαρακτηριστικών των διαφορετικών μοριακών υπότυπων στον γαστρικό καρκίνο [10]

Το HER2 αποτελεί ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ο οποίος ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και την επιβίωσή τους. Μάλιστα ο HER2 αποτελεί μέλος της οικογένειας των γνωστών υποδοχέων επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Γονιδιακή ενίσχυση ή /και υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 εντοπίζεται μέχρι και στο 20% των περιπτώσεων του γαστρικού καρκίνου και πλέον ο μοριακό έλεγχος για το HER2 αποτελεί μια εξέταση ρουτίνας που εφαρμόζεται κυρίως σε προχωρημένο στάδιο της νόσου [11]. Δυστυχώς, όταν ο HER2 υπερεκφράζεται ο καρκίνος εμφανίζει αυξημένη επιθετικότητα και δυσμενής πρόγνωση. Γενικά, η ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου με βάση τους μοριακούς υπότυπους αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της πρόγνωσης καθώς και της εξατομικευμένης θεραπείας για τον κάθε ασθενή.

1.1.3 Κληρονομούμενες μεταλλάξεις στον γαστρικό καρκίνο

Οι γενετικές παραλλαγές αφορούν διαφορές στην αλληλουχία του DNA (στην κωδική ή μη κωδική περιοχή) και ευθύνονται για την διαφορετικότητα του κάθε ατόμου. Ωστόσο, πέρα από τον φυσιολογικό γενετικό πολυμορφισμό, οι γενετικές παραλλαγές μπορεί να σχετίζονται με την διαφορετική ανθεκτικότητα του κάθε ατόμου έναντι ποικίλων ασθενειών. Από τις πιο κοινές γενετικές παραλλαγές στον γαστρικό καρκίνο είναι οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs) και η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variations, CNVs) [12].

Είναι γνωστό, ότι ο καρκίνος προκαλείται αλλά και ενισχύεται από την συσσώρευση πολυπληθών σωματικών μεταλλάξεων. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις προσδίδουν παραλλακτικότητα στον καρκίνο δυσχεραίνοντας επιπρόσθετα την αντιμετώπιση αυτής της πολυπαραγοντικής ασθένειας. Όσον αφορά τις κληρονομούμενες μεταλλάξεις αντιπροσωπεύουν το 30% του σχετικού κινδύνου εμφάνιση της ασθένειας [13]. Με βάση το οικογενειακό υπόβαθρο ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να διαχωριστεί σε οικογενειακό και σποραδικό (πρωτοεμφανιζόμενο στην οικογένεια).

Το 1998 αποτελεί χρονιά ορόσημο διότι ανακαλύφθηκε μια κληρονομούμενη μετάλλαξη στο γονίδιο *CDH1*, η οποία προδιαθέτει για διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου. Πιο αναλυτικά, τα άτομα τα οποία ανιχνεύονται με μετάλλαξη στο *CDH1*, *CDH1-θετικά*, έχουν 75% πιθανότητα κατά την διάρκεια της ζωής τους να αναπτύξουν γαστρικό καρκίνο και 40% ρίσκο οι γυναίκες να έρθουν αντιμέτωπες με λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα του μαστού [14].

Το *CDH1* γονίδιο κωδικοποιεί την κατχερίνη-E, μια εξαιρετικά σημαντική διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα και είναι υπεύθυνη για τις διακυτταρικές συνδέσεις. Η απώλεια έκφρασης της E-κατχερίνης λόγω μεταλλάξεων σχετίζεται με αυξημένη ικανότητα διήθησης, παρουσία μεταστάσεων και κακή πρόγνωση σε πολλούς τύπους καρκίνου. Το συγκεκριμένο γεγονός οφείλεται σε ποικίλα αίτια. Ένα από αυτά είναι ότι το κυτταροπλασματικό τμήμα των κατχερινών αλληλεπιδρά με β-κατενίνη. Όταν μειώνονται οι κατχερίνες, απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες β-κατενινών οι οποίες μεσώ του μονοπατιού Wnt ενεργοποιούν γονίδια στόχους που προκαλούν αύξηση του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού και αναστολή της απόπτωσης. Επίσης, η απώλεια ή η μειωμένη έκφραση της κατχερίνης-E συμβάλλει στην μεταδιαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) που ξεχωρίζουν για την ικανότητα μετανάστευσης-διήθησης [15].

Από θεραπευτική σκοπιά, η ολική γαστρεκτομή συνιστάται σε άτομα που έχουν μετάλλαξη στο CDH1 ενώ σε νεαρά άτομα (κάτω των 20) απαιτείται συχνή και ενδεδειγμένη ενδοσκοπική παρακολούθηση. Συμπληρωματικά, μεταλλάξεις σε σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια, που προκαλούν κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα, συνευθύνονται σε κάποιες περιπτώσεις για την εμφάνιση καρκίνου του στομάχου. Κάποια παραδείγματα, αφορούν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 (σύνδρομο Li-Fraumeni), στο APC (οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση) και στο STK11 (σύνδρομο Peutz-Jeghers) [16]. Συνοψίζοντας, η μετάλλαξη στο CDH1 γονίδιο αποτελεί σημαντικό μοριακό βιοδείκτη αλλά καλύπτει μόνο το 1-3% των ασθενών με γαστρικό καρκίνο.

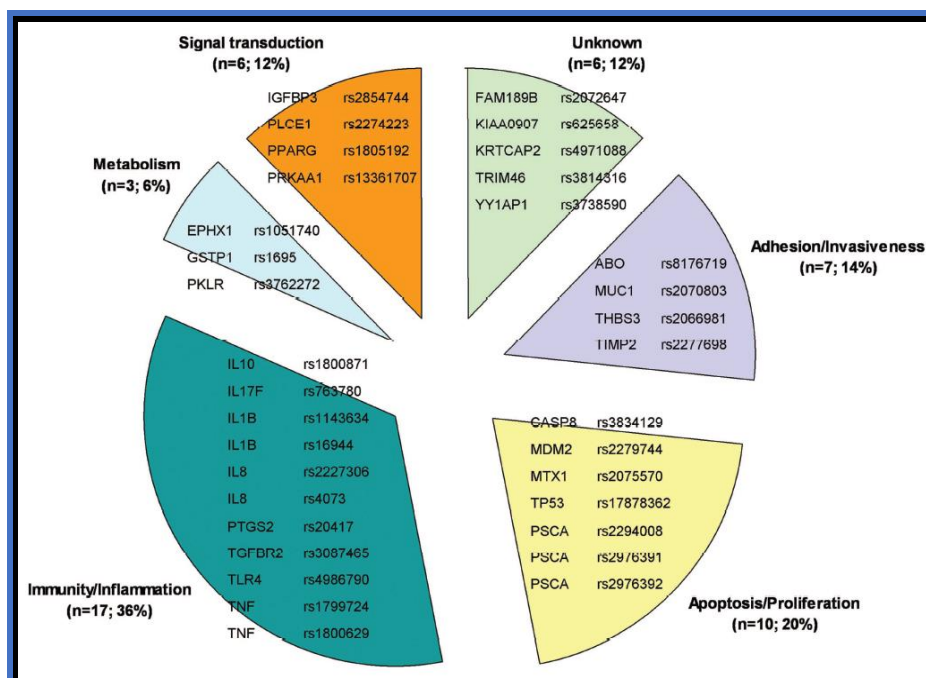
Πέρα από την εύρεση γονιδίων υψηλής διεισδυτικότητας, όπως το CDH1, κρίνεται εξίσου σημαντικό να βρεθούν και μεταλλάξεις γονιδίων χαμηλότερου ρίσκου ως προς την εμφάνιση της ασθένειας. Αυτή η αναζήτηση, έχει οδηγήσει στην κατηγοριοποίηση και ομαδοποίηση συγκεκριμένων αλληλόμορφων που συνολικά παρουσιάζουν αξιοσημείωτο κίνδυνο. Προς αυτή την κατεύθυνση κινήθηκαν και οι Simone Mocellin *et.al*, οι οποίοι μελέτησαν, μέσω μετα-ανάλυσης 2.841 πολυμορφισμούς σε 952 διαφορετικά γονίδια. Το 97% των πολυμορφισμών αφορούσαν SNPs τα οποία βρίσκονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό σε εσώνια και ρυθμιστικές περιοχές [17].

1.2 Σημειακοί Πολυμορφισμοί στον Καρκίνο

Χαρακτηριστικά, ένα SNP (C>T , rs1799724) έχει εντοπιστεί στον υποκινητή του γονιδίου TNF (χρωμόσωμα 6p21.3) [17]. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια γνωστή προφλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία ονομάζεται παράγοντας νέκρωσης όγκου (Tumor Necrosis Factor, TNF). Ο TNF έχει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι μολυσματικών παραγόντων και φαίνεται να σχετίζεται στην παθογένεση αυτοάνοσων ασθενειών. Στην εξέλιξη του καρκίνου ο TNF παρουσιάζει πλειοτροπική συμμετοχή. Ένα επιπλέον SNP (C>T SNP rs2294008), το οποίο βρίσκεται στο πρώτο εξόνιο του PSCA γονιδίου (χρωμόσωμα 8q24.2), οδηγεί σε διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης, αλλάζοντας το κωδικόνιο

έναρξης και τελικά προκαλώντας μειωμένη μεταγραφή [18]. Αρχικά, το PSCA είχε ταυτοποιηθεί ως ειδικό αντιγόνο στο καρκίνο του προστάτη λόγω της υπερέκφρασης του. Όμως στην πορεία ανακαλύφθηκε η εμπλοκή του PSCA και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως ο γαστρικός στον οποίο εμποδίζει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [17].

Ένα πολύ καλά μελετημένο γονίδιο που συμμετέχει στην ογκογένεση διαφόρων καρκίνων είναι αυτό του MUC1 [19]. Το συγκεκριμένο κωδικοποιεί μια γλυκοπρωτεΐνη, την βλεννίνη 1, σχετιζόμενη με την κυτταρική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Η βλεννίνη 1 χρησιμοποιείται ευρέως ως κλινικός δείκτης ογκογένεσης με την κοινή ονομασία CA15.3. Ίσως και όχι τόσο τυχαία μετάλλαξη έχει επίσης εντοπιστεί και στον συγκεκριμένο γενετικό τόπο (rs2070803-G>A-χρωμόσωμα:1q22). Συμπληρωματικά, το γονίδιο MUC1 παρουσιάζει ισχυρή ανισοροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD) με ποικίλα γονίδια συμπεριλαμβανομένων των KRTCAP2, THBS3, MTX1, PKLR and HCN3. Τα προαναφερόμενα SNPs αποτελούν ένα μικρό δείγμα του συνόλου των SNPs που σχετίζονται με τον γαστρικό καρκίνο (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Γενετικές παραλλαγές ισχυρά συσχετιζόμενες με τον γαστρικό καρκίνο (υψηλό ή ενδιάμεσο ρίσκο με βάση τα κριτήρια της Βενετίας). Οι γενετικές παραλλαγές ομαδοποιούνται με βάση την κύρια λειτουργία των γονιδίων. n= το σύνολο των βάσεων δεδομένων στον οποίον διεξήχθη η μετά-ανάλυση [17].

Το πιο σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι αδιαμφισβήτητα το p53. Ο p53 μεταγραφικός παράγοντας έχει βασικό ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιοστάση των οργάνων. Μέσω της αλληλεπίδρασης του p53 με το DNA, ελέγχονται γονίδια στόχοι

που συμμετέχουν σε κρίσιμες λειτουργίες των κυττάρων όπως η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η επιδιόρθωση του DNA και η απόπτωση. Συμπληρωματικά, η p53 αποτελεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη η οποία ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Περίπου το 60% όλων των περιπτώσεων καρκίνου εμφανίζουν μεταλλάξεις στο p53 γονίδιο [20]. Αναλυτικότερα, έχουν εντοπιστεί 581 SNPs από τα οποία τα 420 αποδείχθηκαν μη συνώνυμα (non synonymous SNPs, nsSNPs) δηλαδή με τελική τροποποίηση στην δομή και λειτουργία του p53 [21]. Επιπρόσθετα, από τα 420 nsSNPs ξεχώρισαν 16 που χαρακτηρίστηκαν ως ιδιαίτερα επιβλαβή και είχαν άμεση σύνδεση με καρκινικούς όγκους. Τέλος, η συντριπτική πλειοψηφία των SNPs ,435, εντοπίστηκαν στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UnTranslated Region, UTR) αλλά και πολλά SNPs βρέθηκαν στην 5' UTR διαταράσσοντας έτσι την σταθερότητα του mRNA. Γενικά, ένα SNP στην 3' UTR επηρεάζει άμεσα την μετα-μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων είτε μέσω προβληματικής μετάφρασης του mRNA είτε μειώνοντας τον χρόνο ημιζωής του RNA .

1.2.1 Ταξινόμηση των SNPs με βάση την λειτουργία τους

Έχουν αναφερθεί συγκεκριμένα SNPs, μεταγραφικοί παράγοντες καθώς και διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια (Differentially Expressed Genes, DEGs) σε διαφορετικά στάδια του γαστρικού καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, το μεγαλύτερο ποσοστό των SNPs ανιχνεύονται στο στάδιο II καθώς και στο χρωμόσωμα 19 [22]. Ενώ το στάδιο III του GC εμφανίζει τα λιγότερα SNPs. Το χρωμόσωμα Y παρουσιάζεται με μηδενικά SNPs. Τα DEGs μαζί με τα αντίστοιχα SNPs μπορούν να λειτουργήσουν ως μοριακές υπογραφές συμβάλλοντας στην έγκαιρη διάγνωση αλλά και στην εξέλιξη της νόσου.

Ένα πολύ σημαντικό DEG , το CDCA5, στο στάδιο I του GC ρυθμίζεται ανοδικά [23]. Η αποσιώπησή του CDCA5 λειτουργεί ογκοκατασταλτικά και χρησιμοποιείται για την πρόληψη διάγνωσης του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [22, 23]. Το DENND5A με την σειρά του αποτελεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο ρυθμίζεται καθοδικά ειδικά στο στάδιο II του GC. Ένα γνωστό γονίδιο, το CLDN4, το οποίο συσχετίζεται με το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, όταν ρυθμίζεται ανοδικά παρουσιάζεται υπομεθυλίωση του DNA [24]. Όσον αφορά τα SNPs, πέρα από την ιστοειδικότητα τους, έχουν ισχυρή συσχέτιση με συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το KEGG, MAPK , mTOR και PI3K-AKT (**Πίνακας 1**). Το KEGG μονοπάτι εμπλέκεται με την διαδικασία της απόπτωσης στην οποία το γονίδιο ATF4

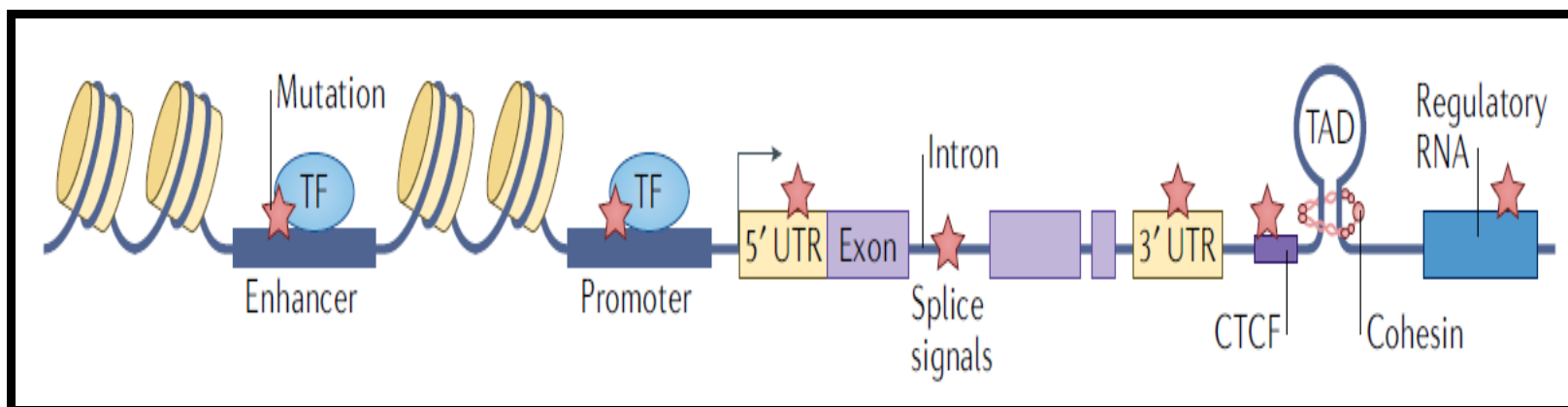
(Activating Transcription Factor 4) έχει υποστεί σημειακές μεταλλάξεις σε αξιοσημείωτο ποσοστό. Σύμφωνα και με την ονομασία του, αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος συγκαταλέγεται στους υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους. Η υπερέκφραση του ATF4 προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα ιδιαίτερη ανθεκτικότητα έναντι διαφόρων φαρμάκων [25]. Το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K/AKT εξασφαλίζει την φυσιολογική λειτουργία των κυτταρικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού. Συμπληρωματικά, αναφέρονται στο PI3K μονοπάτι 40 γονίδια με μεταλλάξεις και οι πιο συχνές εντοπίζονται στο γονίδιο VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A). Το VEGFA συμμετέχει στην αγγειογένεση που είναι απαραίτητη για την μετάσταση και άρα την εξάπλωση των πρωτοπαθών καρκινικών όγκων. Επιπρόσθετα, το VEGFA θεωρείται καλός βιοδείκτης για την εξέλιξη ή ύφεση του όγκου και παραμένει ένας σημαντικός θεραπευτικός στόχος για τον γαστρικό καρκίνο [22].

Ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας είναι ο CTCF ο οποίος είναι απαραίτητος για την οργάνωση του γονιδιώματος σε κάθε διαφορετικό τύπο κυττάρων. Ο CTCF διαθέτει 11 διαφορετικές περιοχές επικράτειας που μπορούν να δεσμευτούν με DNA αλλά και με άλλες πρωτεΐνες. Έχουν παρατηρηθεί πολλές σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις που αλληλοεπιδρά ο CTCF ως μονωτής, επιφέροντας αλλαγή στην δομή της χρωματίνης. Αυτή η δομική αλλαγή προκαλεί διαταραχή των ορίων των τοπολογικά συσχετιζόμενων τομέων (TADs, Topologically associated Domains) που επηρεάζει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Ο CTCF αναφέρεται σε διάφορους καρκίνους (όπως μελάνωμα, λευχαιμία, καρκίνος του ενδομητρίου αλλά ειδικά στον γαστρικό καρκίνο έχουν παρατηρηθεί συγκεκριμένες μεταλλάξεις στις θέσεις δέσμευσης του CTCF που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως μοριακές υπογραφές [26].

Τέλος, ο διαχωρισμός των μεταλλάξεων οδηγών από τις μεταλλάξεις που χαρακτηρίζονται ως συνεπιβάτες αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα [27]. Οι μεταλλάξεις οδηγοί επιδρούν θετικά στην εξέλιξη της νόσου ενώ οι μεταλλάξεις συνεπιβάτες δεν προσφέρουν κανένα εξελεγκτικό πλεονέκτημα και κρίνονται ως μη λειτουργικοί. Η μη κωδική περιοχή, που είναι τουλάχιστον 50 φορές μεγαλύτερη από την κωδική, χρειάζεται να μελετηθεί εκτενέστερα για την εύρεση μεταλλάξεων οδηγών που συμμετέχουν στους μηχανισμούς της ογκογένεσης (**Εικόνα 3**).

Πίνακας 1 : Κατηγοριοποίηση των γονιδίων (με SNPs) με το αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι [22].

Pathway	Sample ratio (%)				
	83.3	66.7	50	33.3	16.7
Apoptosis Pathway	<i>ATF4, CTSB, FOS</i>	<i>CAPN, CTSH, CTSZ, JUN, LMNA</i>	<i>BAD, CASP3, CASP7, CTSD, MAP2K2, MCL1, TNFSF10</i>	<i>BIRC3, CAPN2, CTSS, DAXX, NFKBIA, XIAP</i>	<i>BCL2A1, CTSC, CTSF, DIABLO, FADD, RIPK1</i>
Gastric Cancer		<i>CDKN1A, RXRA, AXIN1</i>	<i>DVL1, MYC, ERBB2, MAP2K2, MAPK1, TGFBR2, CDH1</i>	<i>REG4, BAK1, RXRB, FZD6, CCND1, AKT1, SMAD3, JUP</i>	<i>CDX2, MUC2, CDH17, GADD45B, DVL3, FRAT2, CTNNB1, SHC2, AKT2, MTOR, CDKN1B</i>
MAPK Signaling pathway	<i>ATF4, FOS</i>	<i>DUSP1, PAK2</i>	<i>CASP3, DUSP3, JUN, JUND, MAP2K2, MAPKAPK3, MAX, MYC, PAK1, RAC1, RAC2, TGFBR2</i>	<i>DAXX, PDGFRA, RAP1A, RRAS2</i>	<i>GNG12, MAP2K7, MAP3K11, MAP3K2, MAP4K4, MAPK8IP3, MAPKAPK2, MECOM, PRKCA, RAP1B</i>
mTOR Pathway	<i>RHOA (100), EIF4B, SEC13</i>	<i>MAPKAP1</i>	<i>DDIT4, MAP2K2</i>	<i>CAB39, DEPTOR, FZD6, MLST8</i>	<i>AKT1S1, CLIP1, EIF4EBP1, INSR, MTOR, PRKCA, ULK1</i>
PI3K-AKT signaling pathway	<i>ATF4, EIF4B, VEGFA</i>	<i>CDKN1A, GNG10, ITGA3, ITGB1, LAMB1, RXRA</i>	<i>DDIT4, IL4R, ITGB4, MAP2K2, MCL1, MYC, RAC1</i>	<i>CCND1, CCND3, LAMC1, MLST8, SYK, YWHAB, YWHAH</i>	<i>ATF6B, BAD, CCND2, CDKN1B, CRTC2, EIF4EBP1, EPHA2, GNG12, GNG5, ITGB5, LPAR2, MTOR, PRKCA, PTK2, RBL2, YWHAH, YWHAG</i>



Εικόνα 3: Το σύνολο των πιθανών μεταλλάξεων που μπορούν να συμβούν στην μη κωδική περιοχή και ευρύτερα στις ρυθμιστικές περιοχές [26]

1.3 Μακρά Μη Κωδικοποιητικά RNA στον Καρκίνο

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (Long non coding, lncRNAs) είναι ncRNA που βρίσκονται εκτενώς σε όλα τα είδη ευκαρυωτικών κυττάρων και εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με διάφορους μηχανισμούς, όπως την ρύθμιση της μεταγραφής, της μετάφρασης, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών καθώς και την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια [28-30]. Επομένως, συμμετέχουν σε ζωτικής σημασίας βιολογικές διεργασίες που επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων, τη γήρανση και γενικότερα την κυτταρική ανάπτυξη. Είναι γνωστό ότι τα lncRNA έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με πολλά microRNA (miRNA sponge) και κατά συνέπεια να ρυθμίσουν επιλεκτικά την γονιδιακή έκφραση [31]. Η εξακρίβωση των περιοχών δέσμευσης των miRNAs ίσως παρέχει πληροφορίες για την λειτουργία και την ρύθμιση των lncRNAs που σε μεγάλο ποσοστό παραμένει άγνωστη [32].

Τα lncRNAs, ορίζονται ως μη κωδικοποιητικά μετάγραφα με τουλάχιστον 200 νουκλεοτίδια που σε κάποιες ελάχιστες περιπτώσεις δύναται να μεταφράσονται σε μικρά πεπτίδια. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων τα lncRNA υπόκεινται σε μεταγραφική ρύθμιση και με βάση το μάτισμα αποκτούν την λειτουργία τους. Αυτή, πολλές φορές είναι ευρεία καθώς υπάρχουν lncRNAs, όπως το TUG1, τα οποία έχουν ρυθμιστικό ρόλο και στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου [33]. Γενικά, τα lncRNAs εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης και συνήθως αλληλοεπιδρούν με άλλα μόρια (ενίοτε και με το «εαυτό» τους) μέσω της τριτοταγής του δομής.

Τα lncRNAs χρησιμεύουν ως ογκοκατασταλτικοί ή ογκοεπαγόμενοι παράγοντες σε διάφορους καρκίνους. Όμως η κατηγοριοποίηση δεν είναι πάντα διακριτή διότι υπάρχουν και lncRNA όπως το MALAT, το οποίο αναφέρεται ως ογκοεπαγωγικό σε πολλούς τύπους καρκίνου αλλά φαίνεται να παρουσιάζει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες στον καρκίνο του μαστού [34]. Έχει αποδειχθεί ότι η απορρύθμιση των lncRNAs σχετίζεται με την επιβίωση και την εξέλιξη του όγκου. Πληθώρα γενετικών παραλλαγών και σημειακών μεταλλάξεων συμβάλλουν στην απορρύθμιση των lncRNAs, επηρεάζοντας τελικά την δομή, την έκφραση και την λειτουργία τους [35]. Πιο αναλυτικά, έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 315.234 μεταλλάξεις σε lncRNAs ανάμεσα σε 34 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Οι περισσότερες μεταλλάξεις

εντοπίστηκαν στον καρκίνο του δέρματος, στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στον γαστρικό καρκίνο [32, 36].

Έχουν ταυτοποιηθεί lncRNAs τα οποία ρυθμίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα είτε συμβάλλοντας με την σταθεροποίηση τους είτε προωθώντας την αποσύνθεσή τους. Επιπρόσθετα, καθίσταται πλέον γνωστό ότι τα lncRNAs εμπλέκονται στο σχηματισμό των βρόχων χρωματίνης διευκολύνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποκινητών και ενισχυτών[37]. Συμπερασματικά, τα lncRNAs συμμετέχουν στην τροποποίηση της διαμόρφωσης της χρωματίνης μέσω της αλληλεπίδρασης τους με RNA που δεσμεύουν πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs). Ειδικά, τα πυρηνικά RBPs εντοπίζονται στην ευχρωματίνη, κυρίως στον υποκινητή γονιδίων, συμβάλλοντας στην ρύθμιση της μεταγραφής.

1.3.1 Συσχέτιση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNA με αυξημένη ενεργότητα ενισχυτών

Ακόμα και στην περιοχή των ενισχυτών που θεωρείται κατεξοχήν μη κωδικοποιητική ρυθμιστική περιοχή έχουν παρατηρηθεί προϊόντα μεταγραφής τα οποία ονομάζονται eRNAs [38]. Τα περισσότερα eRNAs μεταγράφονται αμφίδρομα και επειδή δεν υπόκεινται στην διαδικασία του ματίσματος είναι αρκετά ασταθή [39]. Ο ρόλος τους είναι σε μεγάλο βαθμό ασαφής αλλά θεωρούνται ότι προωθούν τον σχηματισμό των βρόχων χρωματίνης, διευκολύνουν την μεταγραφή και γενικότερα διευκολύνουν την λειτουργία του ενισχυτή.

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι εκτός από τους γενετικούς τόπους των ενισχυτών που παράγουν αποκλειστικά eRNAs υπάρχουν και αυτοί που παράγουν και lncRNAs. Πολλοί υποστηρίζουν ότι τα συγκεκριμένα lncRNAs εμφανίζουν μεγάλη συνάφεια λειτουργίας με τα eRNAs, δρώντας σε ένα βαθμό συνεπικουρικά. Παρόλα αυτά, η πολυπλοκότητα του γονιδιώματος δεν περιορίζεται σε μονοσήμαντες εξηγήσεις. Σύμφωνα με γονιδιωματικές αναλύσεις το 30-60% των γονιδίων των lncRNA βρίσκονται κοντά ή/και επικαλύπτουν ρυθμιστικές περιοχές που έχουν χαρακτηριστικά ενισχυτών [40]. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι πολλοί υποκινητές των lncRNA παρουσιάζουν διττή φύση, διαθέτοντας και χαρακτηριστικά ενισχυτή. Παράλληλα, ειδικά lncRNA χαρακτηρίζονται ως *cis*-ρυθμιστές, αυξάνοντας την έκφραση των γονιδίων που εντοπίζονται κοντά στον γενετικό τους τόπο [40] [41].

Οι ενισχυτές που παράγουν και lncRNA παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένη ενεργότητα, η οποία εν μέρη εξηγείται από την στρατολόγηση της RNA pol II, των

RBPs καθώς και παραγόντων ματίσματος που απαιτούνται για τον σχηματισμό του ώριμου lncRNA. Η απόλυτη διευκρίνιση της έντονης ενεργότητας αυτών των ενισχυτών βρίσκεται υπό διερεύνηση, ωστόσο το εναλλακτικό μάτισμα οδηγεί σε ώριμα lncRNA με διαφορετικά μοτίβα πρόσδεσης και άρα δυνατότητα αλληλεπίδρασης με πολλαπλούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Γενικά, η ενεργότητα του ενισχυτή εξαρτάται από το σύμπλεγμα των μεταγραφικών παραγόντων που προσδέονται σε αυτόν. Ο συνδυασμός των μεταγραφικών παραγόντων ενεργοποιεί ή αναστέλλει την λειτουργία του ενισχυτή όπως στην περίπτωση των BET αναστολέων [42]. Είναι σημαντικό να διακρίνουμε τα μοτίβα πρόσδεσης, συνήθως 6-10bp, των μεταγραφικών παραγόντων και στην πορεία να ελέγξουμε εάν τελικά επηρεάζουν την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου. Ωστόσο, ο βαθμός επίδρασης που μπορεί να ασκήσει κατά περίπτωση μια γενετική παραλλαγή που διαταράσσει τα μοτίβα πρόσδεσης δεν αποτελεί πάντα απλή υπόθεση καθώς ένας απομακρυσμένος ενισχυτής μπορεί να απέχει πολλές Mbs από το εκάστοτε γονίδιο στόχο. Παράλληλα, ένας μακρινός ενισχυτής αλληλεπιδρά με ένα ή περισσότερους τοπικούς υποκινητές και ενισχυτές. Πολλές φορές, καθίσταται προτιμότερο να μελετηθούν μεταγραφικοί παράγοντες, συμπαράγοντες, που δεν προσδέονται άμεσα στο γονιδίωμα. Ένα παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη p300, ακετυλτρανσφεράση ιστόνης, της οποίας η παρουσία αποτελεί ισχυρή ένδειξη, έως και 82% πρόβλεψη, ότι η ρυθμιστική περιοχή προσομοιάζει σε ενισχυτή [43] [44] [45].

1.3.2 Συσχέτιση των Μακρών Μη Κωδικοποιητικών RNA με επιγενετικές τροποποιήσεις

Πέρα από την αλληλεπίδραση των lncRNAs με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, αναφέρεται συχνά η συμμετοχή τους σε επιγενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες αλλάζουν την διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και κατά συνέπεια επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν ως τελικό αποδεκτή είτε το DNA είτε ιστόνες (συνηθέστερα ιστόνη 3). Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι προσθήκες ή αφαιρέσεις μεθυλομάδων σε κυτοσίνες που βρίσκονται σε CpG νησίδες στον υποκινητή ή ενισχυτή των γονιδίων. Όσον αφορά τις μεθυλιώσεις καταστέλλουν την έκφραση διότι εμποδίζουν την πρόσδεση καίριων μεταγραφικών παραγόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χαμηλή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CDX2 που αποδίδεται στο 30% των

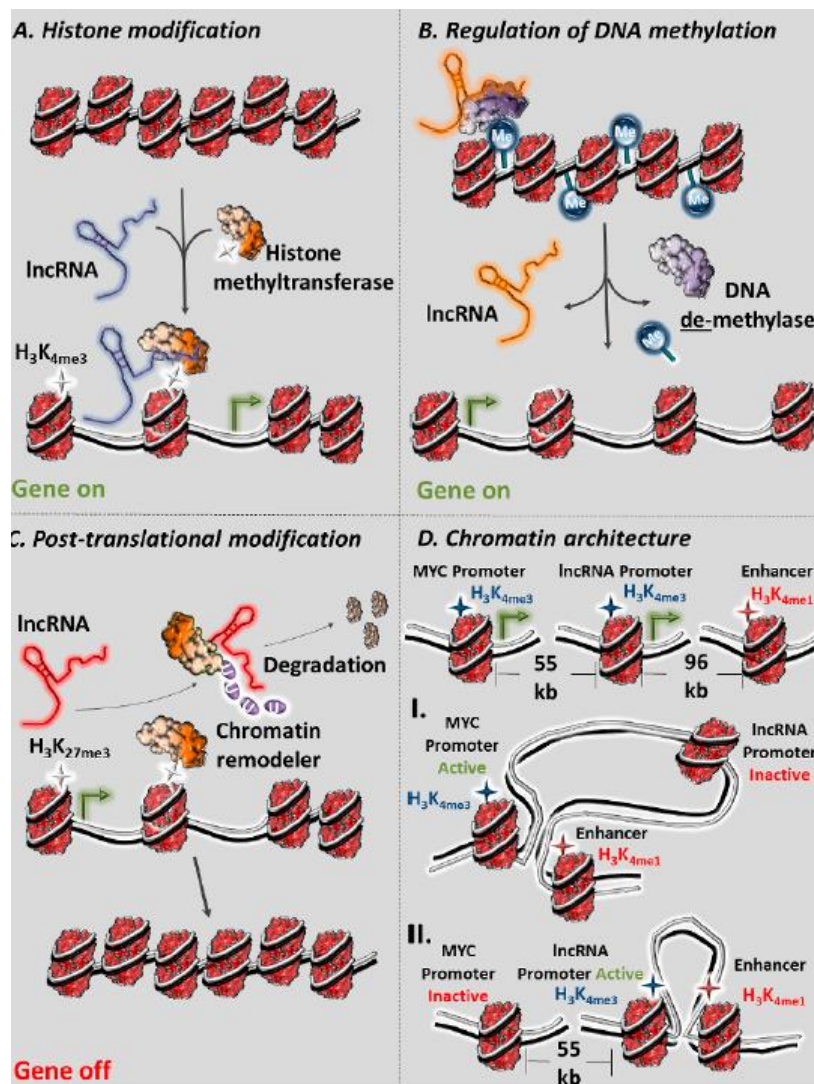
περιπτώσεων καταστολής του και οφείλονται στην υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου [46]. Το CDX2 δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο του οποίου η μειωμένη έκφραση ή/και λειτουργία του συμβάλλει στην δημιουργία και την εξέλιξη σποραδικών αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου (CRC). Ειδικά, ο μεταγραφικός παράγοντας του CDX2 δραστηριοποιείται στον πυρήνα των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και θεωρείται απαραίτητος για την εντερική ανάπτυξη και διαφοροποίηση [47]. Μάλιστα, ο CDX2 αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη καθώς η έκφραση του σχετίζεται με εξαιρετική επιβίωση στα στάδια II- III του CRC με συνολικά 70% χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου[48].

Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου εμφανίζονται έντονες υπομεθυλίωσεις σε CpGs με αποτέλεσμα να εκφράζονται γονίδια που βρίσκονταν σε καταστολή. Παρομοίως, εμφανίζονται υπερμεθυλίωσεις στους υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Το τελικό αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση οδηγεί σε γονιδιωματική αστάθεια ευνοώντας τα καρκινικά κύτταρα.

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις ιστονών περιλαμβάνουν προσθήκη ή απομάκρυνση μεθυλομάδων, ακετυλομάδων και φωσφορυλικών ομάδων στις ουρές των ιστονών (σε N-τερματικά αμινοξικά κατάλοιπα Λυσίνης ή Αργινίνης). Αυτές οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις αλλάζουν την δομή της χρωματίνης και την καθιστούν ή μεταγραφικά ενεργή (ευχρωματίνη) ή μη προσβάσιμη από την πλειονότητα των μεταγραφικών παραγόντων (ετεροχρωματίνη). Για παράδειγμα, ο συνδυασμός ή η μεμονωμένη παρουσία των συγκεκριμένων επιγενετικών σημάτων H3K4me1, H3K27ac και H3K79me3, σηματοδοτούν ανοικτή προσβάσιμη χρωματίνη με αποτέλεσμα να ευνοείται η μεταγραφή μέσω και από την στρατολόγηση των μεταγραφικών συνεργοποιητών. Τα πυρηνικά lncRNAs αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες και λειτουργούν ως καθοδηγητές, σταθεροποιητές και ικρίωματα. Χαρακτηριστικά, ένα από τα πιο γνωστά lncRNA, το Xist, αλληλεπιδρά και κατευθύνει μεθυλτρανσφεράσες ιστονών για την απενεργοποίηση του ενός χρωμοσώματος X [29, 49].

Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός της τριπλής έλικας RNA-DNA έχει φανεί ότι επηρεάζει την αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης ,ειδικότερα όταν έχουμε την εμπλοκή των lncRNA σε αυτή την έλικα [50]. Για παράδειγμα, υπάρχουν lncRNA (όπως το MEG3, το HOTAIR και το PARTICL) τα οποία αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα μοτίβα δινουκλεοτίδιων GA, διευκολύνοντας την στρατολόγηση του πολυκομβικού συμπλέγματος 2 (PRC2) και τελικά καταστέλλοντας, H3K27me3,

υποκινητές γονιδίων. Συμπληρωματικά, έχει αποδειχθεί ότι τα lncRNA μπορούν να στοχεύσουν πολλαπλές, διαδοχικές αλλά και διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Ίσως αυτές οι αλληλουχίες να αποτελούν τον δίαυλο των lncRNA για να επιτύχουν τις αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας εντός του γονιδιώματος, με τον σχηματισμό τελικά των TADs. Φυσικά η μεσολάβηση των CTCF αλλά και πολλών πρωτεϊνικών συμπλόκων είναι απαραίτητη, ειδικά σε πιο τοπικό επίπεδο για τον σχηματισμό της δομής τους γονιδιώματος. Τέλος, ταυτοποιούνται lncRNA, τα οποία συμμετέχουν στην τριπλή έλικα RNA-DNA, τα οποία στοχεύουν επιλεκτικά συγκεκριμένες ομάδες χρωμοσωμάτων όπως τα ακροκεντρικά και άλλα που δρουν καθολικά [50].



Εικόνα 4: Μοριακή λειτουργία των lncRNAs στη ρύθμιση της χρωματίνης. (A) lncRNA, το οποίο συμβάλλει στην επιγενετική τροποποίηση καθοδηγώντας ή αποτρέποντας την μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης. (B) Άλλα lncRNA που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω απομεθυλίωσης των γονιδίων-στόχων. (C) Μια άλλη λειτουργία του lncRNA είναι ότι καθορίζει τη μετα-μεταφραστική σταθερότητα των τροποποιητών χρωματίνης. (D) Ρυθμιστικές περιοχές των lncRNAs, όπως ο υποκινητής του PVT1, ανταγωνίζεται τον υποκινητή του γονιδίου-στόχου MYC ως προς την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους ενισχυτές, οι οποίοι εάν συνδεθούν με τον υποκινητή του MYC εννοούν εξελικτικά τον καρκίνο [49].

Ενώ η λειτουργία των περισσότερων lncRNAs που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, θεωρούνται ότι θα μπορέσουν στο μέλλον να αποτελέσουν αξιόπιστοι βιοδείκτες λόγω των ειδικών μοτίβων έκφρασης που παρουσιάζουν ιστοειδικά αλλά και καρκινοειδικά [51]. Επιπρόσθετα, από μόνα τους τα SNPs και τα lncRNAs αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για την εξέλιξη της νόσου καθώς και για την πρόγνωση[52, 53]. Ως φυσικό επακόλουθο ο συνδυασμός τους, δηλαδή ανάλυση γονιδιώματος-μεταγραφώματος, θα διαχωρίσει κατάλληλα τους ασθενείς ανάλογα με τον κίνδυνο που διατρέχουν.

Σκοπός Εργασίας

Ένας από τους βασικούς σκοπούς της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η γονοτύπηση του άγριου τύπου και μεταλλαγμένου τύπου του RECUR1 υποκινητή και RECUR1 ενισχυτή. Η γονοτύπηση των επιθυμητών αλληλουχιών-στόχων πραγματοποιήθηκε σε πέντε ανθρώπινες γαστρικές κυτταρικές σειρές (AGS, HFE, NUGC4, KATOIII, MKN45) με την μέθοδο dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic sequence). Επιπρόσθετα, ένας σημαντικός στόχος ήταν η επίτευξη δύο διαφορετικών και διακριτών σημειακών μεταλλάξεων σε σημεία ενδιαφέροντος στον υποκινητή του RECUR1. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η μεταλλαγή ενός SNP ενδιαφέροντος στον ενισχυτή του RECUR1. Οι επιδιωκόμενες μεταλλάξεις υλοποιήθηκαν με την μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (SDM, Site Directed Mutagenesis). Ακολούθησαν, οι κλωνοποιήσεις των υποκινητών και ενισχυτών, με και χωρίς SDM, σε πλασμιδιακούς φορείς λουσιφεράσης έτσι ώστε να μετρηθεί η ενεργότητα των συγκεκριμένων ρυθμιστικών στόχων. Η παρούσα πειραματική πορεία περιελάμβανε ακόμη, την μελέτη της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6 στην άγρια τύπου αλληλουχία του υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1 μέσω ποσοτικής PCR μετά από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP-qPCR). Τέλος, για την μελλοντική αξιοποίηση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 για γονιδιακή καταστολή μέσω μεταλλαξογένεσης (knock-out), κλωνοποιήθηκαν τα κατάλληλα sgRNAs στον PX333 πλασμιδιακό φορέα.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Κυτταρικές σειρές

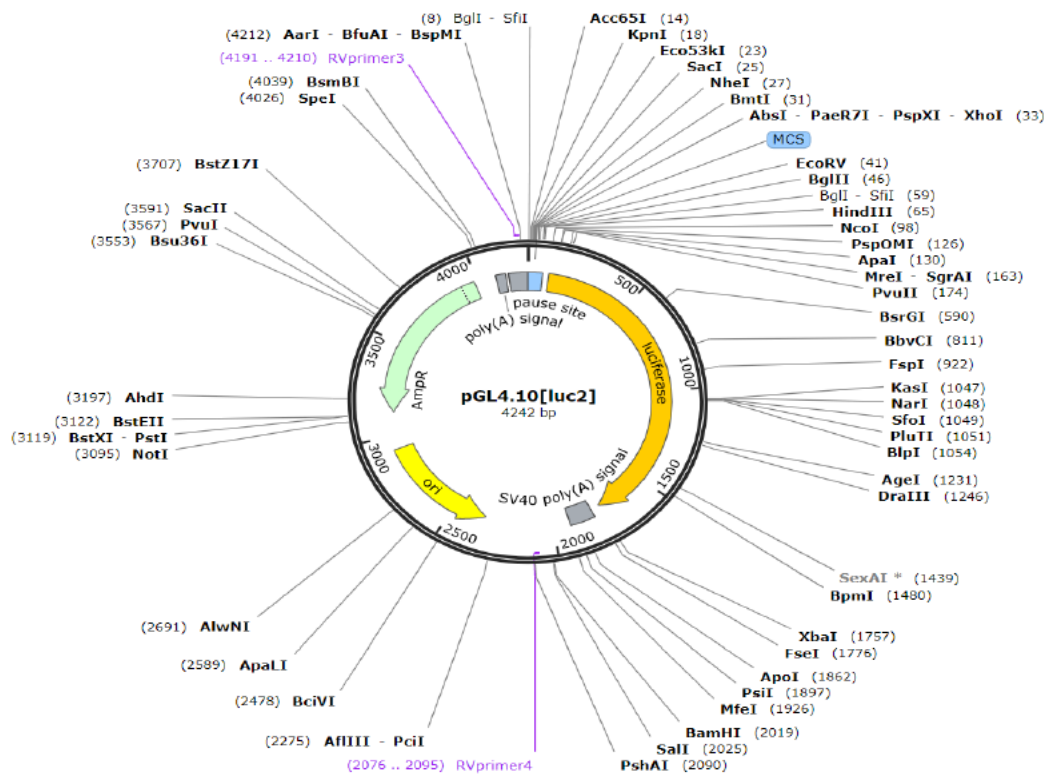
Τα χαρακτηριστικά των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω:

- AGS: Πρωτεύον γαστρικός όγκος χωρίς ένδειξη μετάστασης
- HFE: Αθανατοποιημένα φυσιολογικά επιθηλιακά γαστρικά κύτταρα
- NUGC4: Παραγαστρικοί λεμφαδένες στην αρχή της μετάστασης
- KATOIII: Απομακρυσμένοι λεμφαδένες, πλευρική μετάσταση
- MKN45: Φτωχά συνεκτικό αδενοκαρκίνωμα με εστία μετάστασης στο ήπαρ

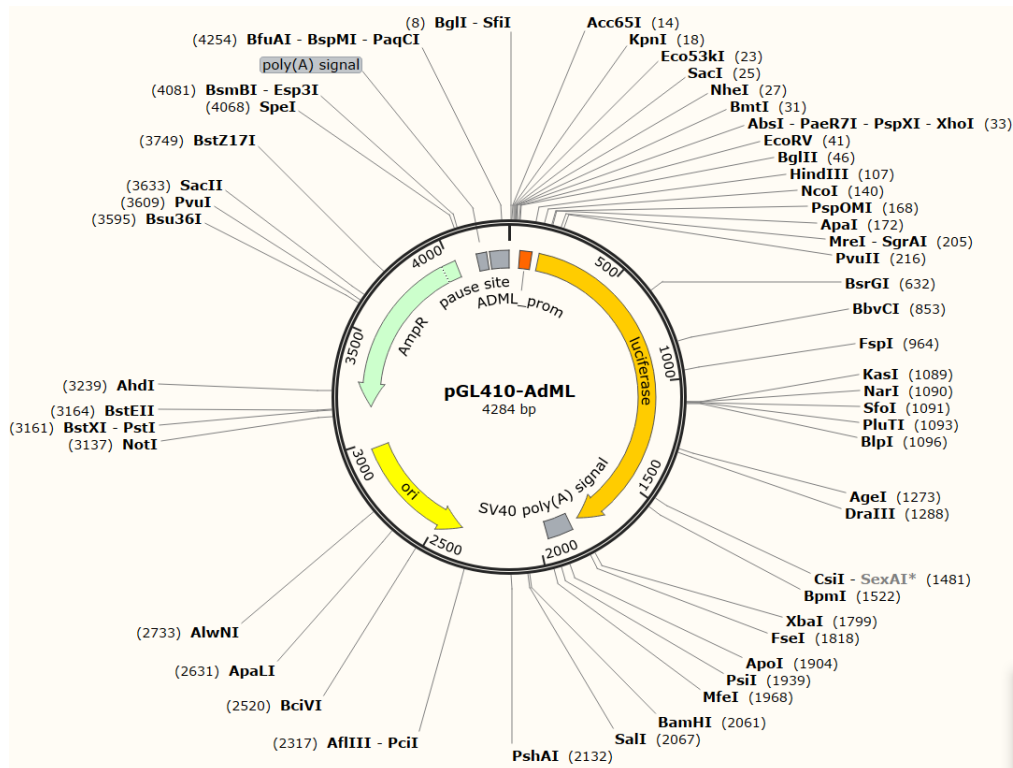
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς & Βακτηριακά στελέχη

Για την κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου υποκινητή του RECUR1 χρησιμοποιήθηκε ο PGL4.10 φορέας (**Εικόνα 5**) ενώ για την κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου ενισχυτή του RECUR1 χρησιμοποιήθηκε ο AdML φορέας (**Εικόνα 6**). Όσον αφορά τον PX333 φορέα (**Εικόνα 7**) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των δύο sgRNAs (single guided RNAs) που απαιτούνται στην τεχνολογία CRISPR/Cas9.

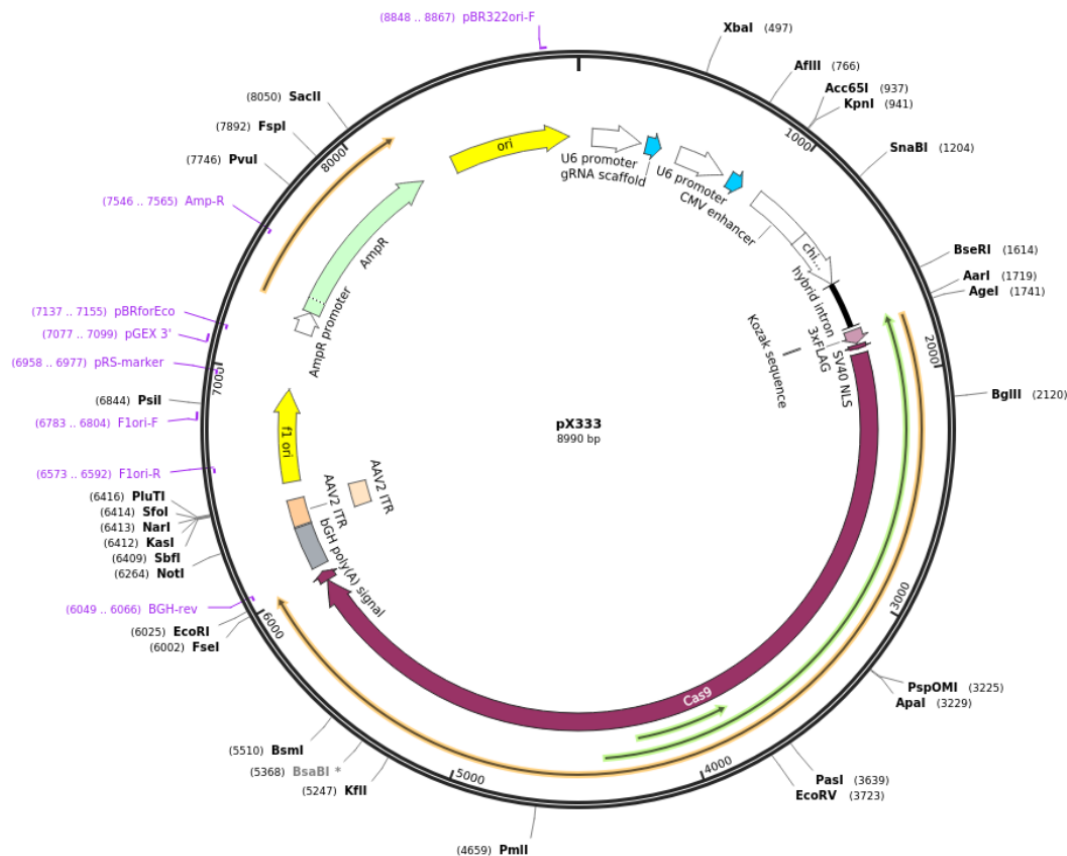
Ο μετασχηματισμός με θερμικό σοκ των κυττάρων έγινε κυρίως με το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5α. Επίσης, όταν είχε πραγματοποιηθεί ξεχωριστά η κλωνοποίηση του sgRNA₁ και sgRNA₂ χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα για μετασχηματισμό τα στελέχη *E. coli* XL1blue και *E. coli* Stbl3.



Εικόνα 5: Πλασμιδιακός χάρτης του PGL4.10 (SnapGene)



Εικόνα 6: Πλασμιδιακός χάρτης του AdML (SnapGene)



Εικόνα 7: Πλασμιδιακός χάρτης του PX333 (SnapGene)

2.2 Μέθοδοι

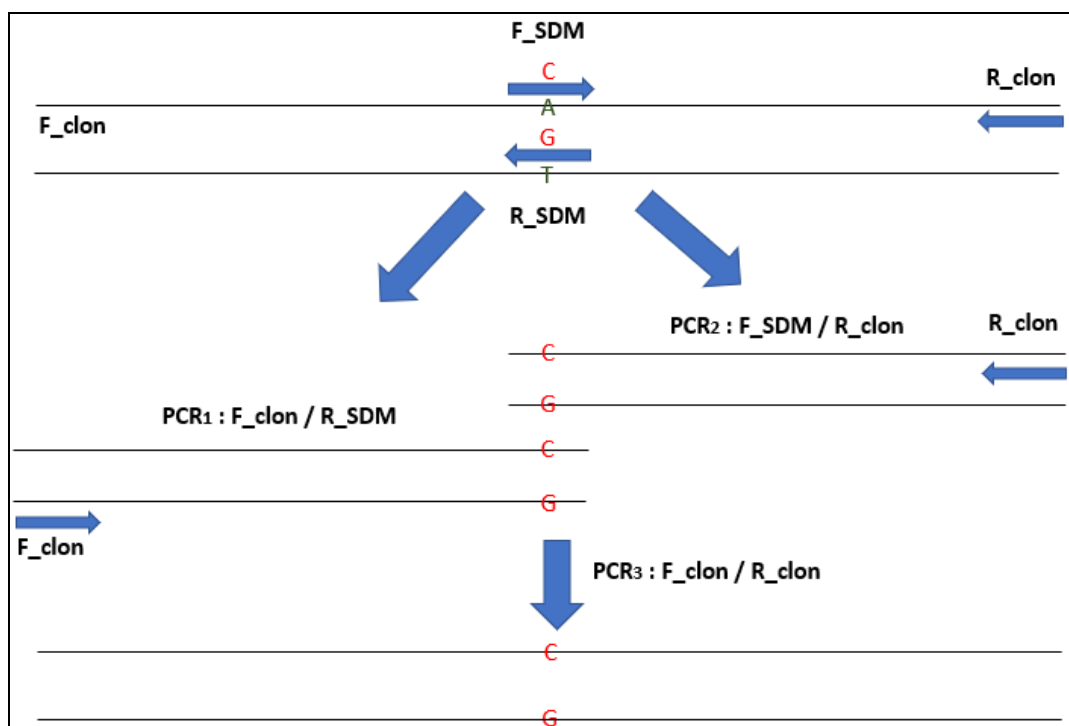
2.2.1 Εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων με τη μέθοδο Κατευθυνόμενης Μεταλλαξογένεσης

2.2.1.1 Αρχικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης

Για να επιτευχθούν δύο ξεχωριστές σημειακές μεταλλάξεις στον υποκινητή του RECUR1, χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο ο κλωνοποιημένος φορέας PGL4.10 που είχε ως ένθεμα την αλληλουχία αγρίου τύπου του υπό μελέτη υποκινητή.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) με την χρήση δύο διαφορετικών αντιπαράλληλων ζευγών εκκινητών έτσι ώστε να προκύψουν δύο ενισχυμένα τμήματα του υποκινητή με τις επιθυμητές μεταλλάξεις. Ολόκληρη η διαδικασία της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (Site Directed Mutagenesis, SDM) απεικονίζεται επεξηγηματικά στην **Εικόνα 7**. Τα αντιδραστήρια

και οι πειραματικές συνθήκες των PCR αναφέρονται αντίστοιχα στον **Πίνακα 2** και **Πίνακα 3**.



Εικόνα 7: Το σύνολο των PCR και των εκκινητών που απαιτούνται για την ολοκλήρωση της SDM. Η αρχική αλληλουχία του *RECUR1* υποκινητή έχει πράσινο χρώμα ενώ οι τελικές-επιθυμητές σημειακές μεταλλάξεις διακρίνονται με κόκκινο χρώμα.

Πίνακας 2: Το σύνολο των αντιδραστηρίων για τις πρώτες 2 PCR στην μέθοδο Κατευθυνόμενης Μεταλλαξογένεσης (Site Directed Mutagenesis, SDM)

Reagents		Volumes ($V_T = 50 \mu\text{L}$)
	Buffer 10x	5 μL
	dNTPs 10mM (Thermo Scientific)	1 μL
PCR1	Primer F_Clon Primer SDM-R	2 μL
PCR2	Primer SDM_F Primer R_Clon (Eurofins Genomics)	2 μL
	Ktag 5 u/ μl (KAPA Biosystems)	0,25 μL
	WFI	40,75 μL
	Template (<i>PGLA10 RECUR1</i> prom.clone 1 ,10ng/ μl)	1 μL

Πίνακας 3: Πειραματικές συνθήκες για τις αρχικές PCR στην SDM

Conditions	°C	Minutes
Initial denaturation	95	3:00
Denaturation	95	0:30
Annealing	60	0:15
Extension	72	0:40
Repeats	25 cycles	
Final Extension	72	5:00

2.2.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από Πηκτή Αγαρόζης

Μετά τις PCR, στα δύο δείγματα που προέκυψαν (SDM_1+SDM_2) πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.0% w/v), έτσι ώστε να παρατηρηθεί εάν υπήρχε ικανοποιητική ενίσχυση των επιθυμητών προϊόντων.

Στην συνέχεια, αφού επιβεβαιώθηκαν τα επιθυμητά θραύσματα DNA (~500bp) αποκόπηκαν από την πηκτή αγαρόζης έτσι ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία της απομόνωσης DNA με εκχύλιση όπως περιγράφεται στο NucleoSpin® Gel, PCR Clean-up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel.

Τέλος έγινε ποσοτικοποίηση των DNA με Quawell: $SDM_1= 116\text{ng}/\mu\text{L}$ και $SDM_2= 27,6\text{ ng}/\mu\text{L}$

2.2.1.3 Τελική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ολοκλήρωση της SDM

Τα δύο απομονωμένα δείγματα (SDM_1+SDM_2) αναμίχθηκαν ισόποσα έτσι ώστε να αποκτηθεί ένα συνδυαστικό DNA εκμαγείο (SDM_{all}). Συμπερασματικά, ο τελικός όγκος του DNA εκμαγείου ήταν 5 μL (1 μL SDM_1 + 4 μL SDM_2). Ακολούθησε, η τελική PCR με τα αντιδραστήρια και τις πειραματικές συνθήκες που αναφέρονται παρακάτω (Πίνακας 4 και Πίνακας 5).

Πίνακας 4: Το σύνολο των αντιδραστηρίων για την τελική PCR

Reagents	Volumes
Buffer 5x HF	5μL
dNTPs 10mM (Thermo Scientific)	0,5μL
Primer F_Clon (Eurofins Genomic)	1μL
Primer R Clon RECUR1 prom (Eurofins Genomic)	1μL
HF Ktag 5 u/μl (Biosystems)	0,15μL
WFI	37,35μL
Template (PCR template)	5μL

Πίνακας 5: Πειραματικές συνθήκες τελικής PCR

Conditions	°C	Minutes
Initial denaturation	95	3:00
Denaturation	95	0:30
Annealing	60	0:15
Extension	72	1:00
Repeats	35 cycles	
Final Extension	72	5:00

2.2.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από πηκτή αγαρόζης μετά από ενίσχυση της αλληλουχίας του μεταλλαγμένου Υποκινητή

Μετά την τελική PCR, στο SDM_{all} δείγμα που προέκυψε, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.0% w/v), έτσι ώστε να παρατηρηθεί εάν υπήρχε ικανοποιητική ενίσχυση του επιθυμητών προϊόντος.

Στην συνέχεια, αφού επιβεβαιώθηκε τα επιθυμητό θραύσμα DNA (~1000bp) αποκόπηκε από την πηκτή αγαρόζης έτσι ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία της απομόνωσης DNA με εκχύλιση όπως περιγράφεται στο NucleoSpin® Gel, PCR

Clean-up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση των DNA με Quawell: $SDM_{all} = 92,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$

2.2.1.5 Φωσφορυλίωση του μεταλλαγμένου υποκινητή με αντίδραση πολυνουκλεοτιδικής κινάσης (PNK treatment)

Για μια αποδοτική κλωνοποίηση ειδικά σε περιπτώσεις ένθεσης έπειτα από πέψη με τυφλά άκρα, συνιστάται η φωσφορυλίωση του ενθέματος και παράλληλα η αποφωσφορυλίωση του εκάστοτε φορέα. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός χρησιμοποιείται έτσι ώστε το ένζυμο της DNA λιγάσης (που καταλύει το σχηματισμό ομοιοπολικών φωσφοδιεστερικών δεσμών) να ενώσει επιτυχημένα τα άκρα του ενθέματος με τα άκρα του φορέα, αποφεύγοντας να ενωθούν μεταξύ τους μόνο τα άκρα του πλασμιδίου χωρίς ένθεμα. Στην προκειμένη περίπτωση το προς μελέτη ένθεμα είναι ο μεταλλαγμένος υποκινητής του RECUR1. Για την ολοκλήρωση της PNK αρκούν μόλις 30 λεπτά στους $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και το σύνολο των συστατικών που απαιτούνται είναι τα εξής:

- 20 μL PCR product (14 μL $SDM_{all}2$ + 6 μL $SDM_{all}1$)
- 2,5 μL Buffer 10x
- 1 μL T4 PNK
- 1 μL ATP
- 0,5 μL dH₂O

2.2.1.6 Κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου υποκινητή σε αποφωσφορυλιωμένο PGL4.10 φορέα

Μετά την απαραίτητη διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων (όπως περιγράφεται στο NucleoSpin® Gel, PCR Clean up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel) για την απομάκρυνση κυρίως των αλάτων και των ενζύμων από την PNK, έλαβε χώρα η αντίδραση της λιγάσης για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της κλωνοποίησης. Ο PGL4.10 φορέας είχε υποστεί πέψη και τα άκρα του ήταν αποφωσφορυλιωμένα. Η αντίδραση της λιγάσης για να ολοκληρωθεί περιλαμβάνει αναμονή 16 ώρες στους $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και το σύνολο των αντιδραστηρίων που απαιτούνται είναι τα ακόλουθα:

- ο 7,5 μL insert (567,5ng /1000bp)
- ο 1 μL vector (79,2 ng)

- ο 1μL buffer ligase (NEB)
- ο 0,5μL ligase T4 (minotech)

2.2.1.7 Μετασχηματισμός κυττάρων DH5a

Μετά την αντίδραση λιγάσης, χρησιμοποιήθηκαν 5 μl που περιείχαν πλασμίδια τα οποία πλέον είχαν ως ένθεμα τον μεταλλαγμένο υποκινητή του RECUR1, και αναμίχθηκαν με 50 μl DH5a κύτταρα έτσι ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία του μετασχηματισμού τους με θερμικό σοκ. Τα βήματα του πρωτοκόλλου του μετασχηματισμού αναγράφονται αναλυτικά:

- 1) Μετά την παραλαβή των DH5a κυττάρων από τους -80 °C γίνεται ταχεία ανάμιξη των 50μl κυττάρων με τα 5 μl των υπό μελέτη πλασμιδίων και το μίγμα επωάζεται σε πάγο για 20 min.
- 2) Ακολουθεί θερμικό σοκ (heat block) του δείγματος στους 42 °C για 50 sec και άμεσα παραμονή του στον πάγο για 2 min.
- 3) Τα 55 μl του θερμικά σοκαρισμένου δείγματος αναμίχθηκαν μέσω στροβιλισμού (vortex) με 945μl υγρού θρεπτικού υλικού LB και το μίγμα μεταφέρθηκε σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37 °C, 160 rpm και για 50 min.
- 4) 350 μl του επωασμένου δείγματος φορτώθηκε σε ένα τρυβλίο με LB άγαρ-αμπικιλίνη και το δείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- 5) Το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο (37 °C), όπου και παρέμεινε καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.
- 6) Στη συνέχεια, 10 αποικίες των βακτηριακών καλλιεργειών, απομονώθηκαν και προστέθηκαν σε 4 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB.
- 7) Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37 °C , 210 rpm, για τουλάχιστον 16 ώρες.

2.2.1.8 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (Homemade Minipreps)

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τα απαραίτητα βήματα για την απομόνωση των πλασμιδίων. Πιο αναλυτικά, εφαρμόστηκε η εξής διαδικασία:

1. 2 ml βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρώνται στους 4 °C ,στις 11,000 rpm και για 2 min.
2. Στο ίζημα μετά την φυγοκέντρωση προστίθενται 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος I (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1000 μg/ml RNaseA, θερμοκρασία 4°C) και εν συνεχεία vortex μέχρι να επιτευχθεί πλήρης διάλυση του ιζήματος.
3. Ακολουθεί προσθήκη 200 μl καινούργιου ρυθμιστικού διαλύματος II (1% SDS, 0.2 M NaOH, θερμοκρασία δωματίου), ήπια ανάμιξη του δείγματος και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
4. Ακόμα, προστίθενται 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος III (0.3 M οξικό κάλιο, pH 5.5, 4 °C θερμοκρασία) και το τελικό προϊόν παραμένει στον πάγο για 5 min.
5. Πραγματοποιείται μία επιπλέον φυγοκέντρωση στους 4 °C, στις 13,000 rpm και για 15 min.
6. Κρατιέται μόνο το υπερκείμενο, το οποίο σε νέο tube, αναμιγνύεται με 1 ml 100% EtOH και μεταφέρεται στους -80 °C για 20min.
7. Στην πορεία, το διάλυμα φυγοκεντρείται στους 4 °C ,στις 13,000 rpm και για 20 min.
8. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ το ίζημα διαλύεται σε 600 μl 70% EtOH και φυγοκεντρείται ξανά στους 4 °C, στις 13,000 rpm και για 5 min.
9. Το ίζημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 10-15 min, προκειμένου να στεγνώσει.
10. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μl WFI και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 65 °C / 5 min έως ότου να διαλυθεί πλήρως.
11. Τέλος, επειδή προτιμάται η αραίωση 1:30, μεταφέρουμε 1μl του προκύπτον διαλύματος σε νέο tube που περιέχει 29 μl WFI. Αφού το διάλυμα θερμανθεί ξανά σε υδατόλουτρο στους 65 °C / 5 min,

πραγματοποιείται σύντομο vortex-spin και τα δείγματα είναι έτοιμα για να ξεκινήσει η διαδικασία της διαγνωστικής PCR.

2.2.1.9 Διαγνωστική PCR για την εύρεση του προσανατολισμού των θετικών κλώνων

Συνολικά, ελέγχθηκαν 10 κλώνοι, από τους οποίους προέκυψαν και οι δύο προσανατολισμοί. Αρχικά, στα ίδια 10 δείγματα από την απομόνωση πλασμιδίων ερευνηθήκε το σύνολο των δειγμάτων που ο μεταλλαγμένος υποκινητής είχε κλωνοποιηθεί με προσανατολισμό 5'-3' και το σύνολο των δειγμάτων που το ένθεμα του μεταλλαγμένου υποκινητή είχε 3'-5' προσανατολισμό. Προφανώς, στην περίπτωση των μη θετικών κλώνων δεν θα είχαμε ενισχυόμενο προϊόν. Συμπερασματικά, για το προαναφερόμενο σκοπό εφαρμόστηκε PCR-προσανατολισμού, κατά την οποία ο ένας εκκινητής σχεδιάζεται πάνω στον πλασμιδιακό φορέα και ο δεύτερος στο ένθεμα ώστε να δίνει προϊόν μόνο κατά την ένθεση ενός συγκεκριμένου προσανατολισμού. Οι απαιτούμενες πειραματικές συνθήκες και τα αντιδραστήρια αναφέρονται αναλυτικά στον **Πίνακα 6** και **Πίνακα 7**. Για την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης του προσανατολισμού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1.0% w/v).

Πίνακας 6: Συνθήκες PCR αντίδρασης για εύρεση προσανατολισμού των θετικών κλώνων

Conditions	°C	Minutes
Initial denaturation	95	3:00
Denaturation	95	0:10
Annealing	60	0:10
Extension	72	1:20
Repeats	20 cycles	
Final Extension	72	2:00

Πίνακας 7: Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την ενίσχυση του μεταλλαγμένου RECUR1 υποκινητή σε pGL4.10 φορείς

Reagents	Volumes ($V_T = 50 \mu\text{L}$)
Buffer 10x	5 μL
dNTPs 10mM (Thermo Scientific)	0,5 μL
5'-3' Primer R_Clon Primer RV	2 μL
3'-5' Primer F_Clon Primer RV (Eurofins Genomics)	2 μL
Ktag 5 u/ μL (KAPA Biosystems)	0,15 μL
WFI	41,35 μL
Template (<i>Home minipreps SDM</i>)	1 μL

2.2.1.10 Διαμόλυνση του μεταλλαγμένου υποκινητή RECUR1 σε AGS κύτταρα και ανάλυση λουσιφεράσης

Αφού ανιχνεύτηκαν οι θετικοί κλώνοι από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης, επιλέχτηκαν δύο αποικίες οι οποίες δώσανε θραύσματα διαφορετικού προσανατολισμού (μία με 5'-3' και μία με 3'-5'). Οι συγκεκριμένες αποικίες επανακαλλιεργήθηκαν και ξανά απομονώθηκαν τα πλασμίδια τους αυτή την φορά με commercial minipreps, kit με την διαδικασία που περιγράφεται στο NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel.

Στην συνέχεια 100ng, από τα δύο πλασμίδια με τους αντιπαράλληλους μεταλλαγμένους υποκινητές RECUR1, χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση τους σε AGS κύτταρα. Η διαμόλυνση επιτεύχθηκε με γενετικά τροποποιημένους λεντιούς και πιο συγκεκριμένα με HEK Lentix cells.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της λουσιφεράσης (μοντέλο λουμινόμετρου: Lumat3 LB9508 Berthold technologies) έτσι ώστε να καθοριστεί η βιοφωταύγεια του μεταλλαγμένου υποκινητή RECUR1.

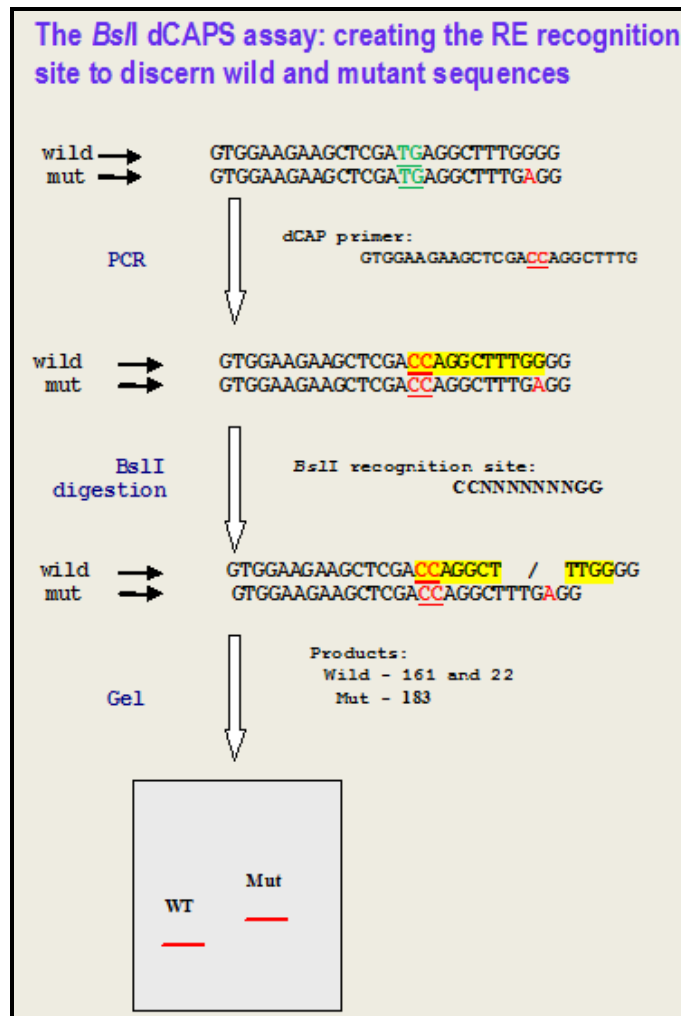
2.2.3 Διαμόλυνση του μεταλλαγμένου ενισχυτή RECUR1 σε AGS κύτταρα και ανάλυση λουσιφεράσης

Για την μετάλλαξη του ενισχυτή του RECUR1 με την SDM μέθοδο ακολουθήθηκαν ακριβώς οι ίδιες διαδικασίες όπως περιγράφονται παραπάνω (2.2.1-2.2.9). Η μόνη διαφορά είναι ότι στην κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου ενισχυτή χρησιμοποιήθηκαν ADML φορείς σε αντίθεση με τους PGL4.10 που χρησιμοποιούνται κατά κόρον από το εργαστήριο για την μελέτη των υποκινητών. Αναλυτικότερα, η διαφορά εντοπίζεται στην αλληλουχία AdML που λειτουργεί ως ένας στοιχειώδης υποκινητής (minimal promoter) που δύναται να ενεργοποιηθεί παρουσία ενός κλωνοποιημένου ενισχυτή.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της λουσιφεράσης (μοντέλο λουμινόμετρου: Lumat3 LB9508 Berthold technologies) έτσι ώστε να καθοριστεί η ενεργότητα του ενισχυτή του RECUR1 .

2.2.4 Γονοτύπηση στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1 με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (dCAPS)

Η τεχνική dCAPS χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση του άγριου ή μεταλλαγμένου τύπου στην εκάστοτε αλληλουχία-στόχο. Φυσικά οι ρυθμιστικές-μη κωδικοποιητικές περιοχές αποτελούν στόχοι υψηλού ενδιαφέροντος. Αναλυτικότερα, με την χρήση κατάλληλων dCAPs εκκινητών δημιουργούνται, πριν από το αλληλόμορφο που αναζητείται, μία ή περισσότερες αναντιστοιχίες στο εκμαγείο DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ή καταστροφή θέσεων αναγνώρισης από επιλεγμένα ένζυμα πέψης. Συμπληρωματικά, ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της μεθόδου dCAPS απεικονίζεται λεπτομερώς στην **Εικόνα 8**. Στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκαν διαγνωστικές πέψεις στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1 σε πολλές κυτταρικές σειρές (AGS, HFE, MKN45, KATOIII, NUGC4).



Εικόνα 8: Παράδειγμα της μεθόδου dCAPS στο οποίο ενισχύεται μέσω της PCR η αλληλουχία-στόχος (CC) και διαμορφώνεται η αντίστοιχη περιοχή αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού (*Bs*II). Στην προκειμένη περίπτωση η άγρια τύπου αλληλουχία υφίσταται διαγνωστική πέψη και διαχωρίζεται ευκρινώς από την μεταλλαγμένη αλληλουχία ύστερα από την ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή αгарόζης(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techdcaps/>)

2.2.4.1 PCR στο πλαίσιο της dCAPS

Με DNA εκμαγείο το γονίδιο των κυτταρικών σειρών ενισχύθηκαν όλοι οι υπό μελέτη υποκινητές και ενισχυτές του RECUR1 με παράλληλη εισαγωγή των κατάλληλων σημειακών πολυμορφισμών (με την χρήση των dCAPS εκκινητών). Οι απαιτούμενοι όγκοι και τα αντιδραστήρια της PCR αναφέρονται παρακάτω στους Πίνακες 8+9.

Πίνακας 8: Πειραματικές συνθήκες για PCR-dCAPS στους υποκινητές και ενισχυτές του RECUR1

Conditions	°C	Minutes
Initial denaturation	95	5:00
Denaturation	95	0:45
Annealing	60	0:45
Extension	72	0:40
Repeats	45 cycles	
Final Extension	72	3:00

Πίνακας 9: Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για PCR-dCAPS στους υποκινητές και ενισχυτές του RECUR1

Reagents	Volumes ($V_T = 50 \mu\text{L}$)
Buffer 10x	5 μL
dNTPs 10mM (Thermo Scientific)	1 μL
Εκκινητές για Υποκινητή Forward-Reverse (dCAP_prom) (10uM)	2 μL
Εκκινητές για Ενισχυτή Forward-Reverse (dCAP_enh) (10uM) (Eurofins Genomics)	2 μL
Ktag 5 u/μl (KAPA Biosystems)	0,5 μL
WFI	31,5 μL
Template (AGS, HFE, MKN45, KATOIII, NUGC4, LS ₄₇₄)	10 μL

2.2.4.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης

Στην συνέχεια στο 10% , $V_T=50$ μL , της ποσότητας των δειγμάτων που ενισχύθηκαν με PCR εφαρμόστηκε διαγνωστική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.0% w/v) έτσι ώστε να ελεγχθεί εάν ενισχύθηκαν επαρκώς τα υπό μελέτη δείγματα. Ακολούθησε, η γνωστή διαδικασία καθαρισμού των PCR προϊόντων όπως περιγράφεται από την NucleoSpin® Gel, PCR Clean up Gel Extraction Kit, Macherey-Nagel.

2.2.4.3 Διαγνωστικές πέψεις στα PCR προϊόντα των υποκινητών και ενισχυτών του RECUR1

Από τα 23 μL των PCR προϊόντων, που υπέστησαν την διαδικασία του καθαρισμού, τα 15 μL χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για τις διαγνωστικές πέψεις ενώ τα υπόλοιπα 8 μL θα παρέμειναν ανέπαφα από κάποια ενδοουκλεάση. Για τους υποκινητές του RECUR1 το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BshfI (HaeIII) το οποίο αναγνωρίζει και τελικά διασπά τον άγριο τύπο αλληλουχίας. Αντίθετα, για τους ενισχυτές του RECUR1 το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SphI το οποίο «κόβει» τον μεταλλαγμένο τύπο αλληλουχίας. Γενικά, όλα τα δείγματα, από όλες τις κυτταρικές σειρές, υπέστησαν πέψη στους 37 °C /2 hrs και οι απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων είναι οι παρακάτω:

- DNA εκμαγείο: 15 μL
- Enzyme Buffer 10x (EnzyQuest, EQ): 2 μL
- WFI: 2 μL

- Για υποκινητή, ένζυμο περιορισμού BshfI (EQ): 1 μL

- Για ενισχυτή, ένζυμο περιορισμού SphI (EQ): 1 μL

Σέ όλα τα δείγματα που δεν υπέστησαν πέψη, $V=8$ μL , έγινε επίσης προσθήκη 2 μL από Enzyme Buffer 10x (EnzyQuest, EQ) και 10 μL WFI έτσι ώστε όλα τα υπό μελέτη δείγματα να έχουν τελικό όγκο 20 μL .

2.2.4.4 Τελική Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης

Προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της γονοτύπησης σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 2% w/v.

2.2.5 Ποσοτική PCR μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης

Μετά την πολύτιμη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) ακολούθησε η ποσοτική PCR (quantitative PCR, qPCR) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταγραφικών παραγόντων GATA που προσδέονται στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1. Οι πειραματικές συνθήκες και οι όγκοι αντιδραστηρίων της qPCR αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω (Πίνακας 10 και Πίνακας 11). Για την διεξαγωγή της qPCR χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR και η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε από το λογισμικό Bio-Rad CFX manager και του προγράμματος MS Excel.

Πίνακας 10: Σύνολο αντιδραστηρίων για ChIP-qPCR

Reagents	V (μl)
KAPA SYBR Mix (2x)	10
Sample	4
WFI	2
Forward and Reverse RECUR1 enh	2

Πίνακας 11: Πειραματικές συνθήκες για ChIP-qPCR

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

2.2.6 Κλωνοποίηση δύο sgRNAs στον PX333 φορέα

2.2.6.1 Ενσωμάτωση του πρώτου sgRNA

Για την ενσωμάτωση του πρώτου sgRNA εφαρμόστηκε η πρώτη πέψη χρησιμοποιώντας ως ένζυμο περιορισμού το BbsI (NEB) το οποίο αφήνει κολλώδη άκρα (sticky ends). Τα αντιδραστήρια και οι απαιτούμενοι όγκοι για την ολοκλήρωση της πέψης, μετά από 2ώρες/37 °C, ήταν τα εξής:

- Template (PX333) 1,5 Γ/Λ : 0,45μL
- Buffer rCutsmart (NEB) 10x: 5μL
- BbsI (NEB): 2 μL
- WFI: 42,55μL

Στην συνέχεια, στο πλασμίδιο που είχε υποστεί την πρώτη πέψη εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.0% w/v. Ακολούθησε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με εκχύλιση από πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφεται στο NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel.

Επειδή τα sgRNAs παρελήφθησαν το καθένα σε δύο συμπληρωματικές μονόκλωνες αλληλουχίες (sense-antisense) έπρεπε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία του υβριδισμού τους. Για τον σκοπό αυτό, σε νερό που είχε ήδη θερμοκρασία βρασμού τοποθετείται ένα tube (το οποίο περιέχει 96μL annealing Buffer , 2μL sense ,2μL antisense) και εν συνεχεία αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου μιάμιση ώρα.

Αφού το επιθυμητό ένθεμα, sgRNA₁, ήταν πλέον δίκλωνο μπορούσε να ακολουθήσει η αντίδραση λιγάσης με τα παρακάτω αντιδραστήρια και τους απαιτούμενους όγκους:

- Insert (sgRNA FE): 10μL
- Vector PX333, 50ng: 2μL
- T4 ligase (Buffer NEB,10X): 2μL
- T4 ligase (MIN): 1μL
- WFI: 5μL

Ακολούθησε ο μετασχηματισμός XL1blue κυττάρων και απομόνωση των minipreps (όπως περιγράφεται παραπάνω, 2.2.6&2.2.7). Τέλος, πραγματοποιείται διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της για την εύρεση των

θετικών κλώνων δηλαδή των πλασμιδίων που έχουν ενσωματώσει επιτυχώς το sgRNA₁. Για την συγκεκριμένη διαγνωστική PCR οι πειραματικές συνθήκες και οι απαιτούμενοι όγκοι αναφέρονται στον **Πίνακας 12** και **Πίνακας 13**.

Πίνακας 12: Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την ενίσχυση των θετικών κλώνων με την sgRNA₁ αλληλουχία

Reagents	Volumes (V _T = 50 μL)
Buffer 10x	5μL
dNTPs 10mM (Thermo Scientific)	0,5 μL
Forward (sgRNA1_sense) (10uM)	1μL
Reverse (AIO_SEQ_F) (10uM)	1μL
Ktag 5 u/μl (KAPA Biosystems)	0,2μL
WFI	41,3μL
Template (<i>Minis home 30x diluted</i>)	1 μL

Πίνακας 13: Πειραματικές συνθήκες για την ενίσχυση των θετικών κλώνων με την sgRNA₁ αλληλουχία

Conditions	°C	Minutes
Initial denaturation	95	3:00
Denaturation	95	0:30
Annealing	60	0:15
Extension	72	0:50
Repeats	25 cycles	
Final Extension	72	5:00

2.2.6.2 Ενσωμάτωση του δεύτερου sgRNA

Αφού επιλέχτηκε το επιθυμητό πλασμίδιο στο οποίο είχε ήδη ενσωματωθεί το sgRNA₁ πραγματοποιήθηκε και δεύτερη πέψη με ένζυμο περιορισμού το BsaI (NEB). Η διαδικασία της κλωνοποίησης για το sgRNA₂ είναι παρόμοια με την ενσωμάτωση του sgRNA₁ (2.6.1) με τις μόνες διαφορές να εντοπίζονται στην επιλογή κυττάρων Stb13 για μετασχηματισμό τους με θερμικό σοκ και φυσικά στην επιλογή διαφορετικού εμπρόσθιου εκκινητή (Forward, sgRNA₂_sense) στην τελική διαγνωστική PCR (Πίνακας 12) για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας.

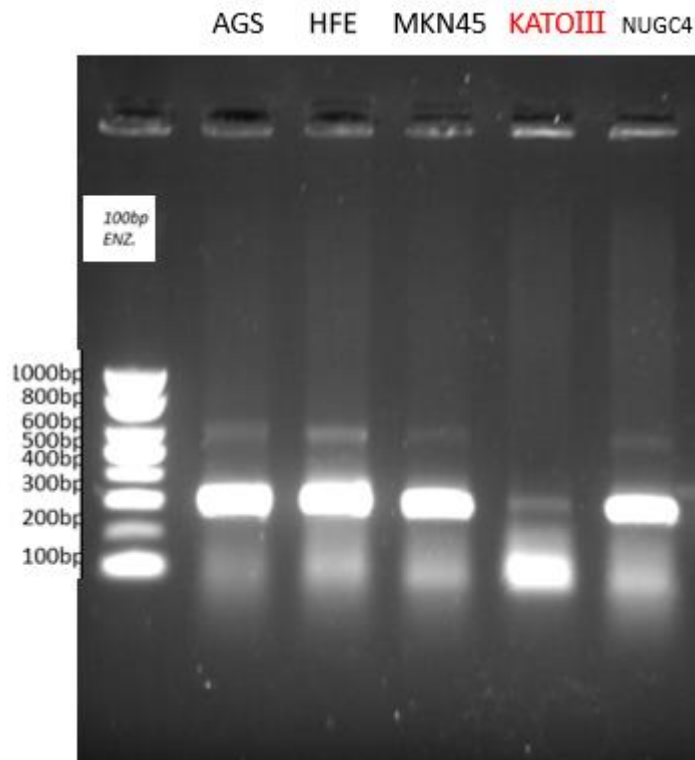
2.2.6.3 Αλληλούχηση κατά Sanger

Μετά την επιβεβαίωση από την ηλεκτοφόρηση σε πηκτική αгарόζης, 1% w/v, ότι είχε επιτευχθεί η ενσωμάτωση και των δύο sgRNAs στον PX333 φορέα, πραγματοποιήθηκε ο τελικός μετασχηματισμός με θερμικό σοκ σε DH5a κύτταρα (ενότητα 2.2.6). Στην πορεία το επιθυμητό πλασμίδιο απομονώθηκε με commercial minipreps,kit με την διαδικασία που περιγράφεται στο NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel. Τέλος για την εύρεση της ακριβής αλληλουχίας των δύο sgRNA, τα κλωνοποιημένα πλασμίδια, 100ng/μL, στάλθηκαν στην εταιρεία CeMIA SA για την υλοποίηση της αλληλούχησης κατά Sanger.

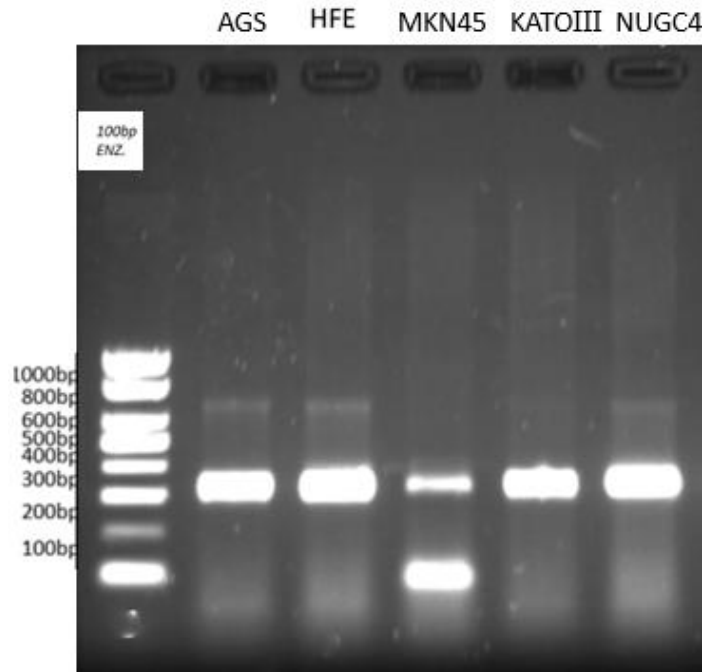
3.Αποτελέσματα

3.1 Γονοτύπηση στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1 με τη μέθοδο Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (dCAPS)

Έχοντας ως εκμαγείο το γονιδίωμα όλων των κυτταρικών σειρών (AGS, HFE, MKN45, KATOIII, NUGC4) με την χρήση των κατάλληλων dCAP-εκκινητών ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες-στόχοι δηλαδή ο υποκινητής και ένας πιθανός ενισχυτής του RECUR1. Για την επαλήθευση της επαρκούς ενίσχυσης, το 10% των προϊόντων των PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% w/v (**Εικόνα 13** και **Εικόνα 14**). Όσον αφορά, τον RECUR1 υποκινητή ενισχύθηκε σε επιθυμητό επίπεδο και μοριακό βάρος (~300bp) σε όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός από το KATOIII που δεν εμφάνισε στην ηλεκτροφόρηση το επιδιωκόμενο θραύσμα (**Εικόνα 13**). Η ενίσχυση του RECUR1 ενισχυτή έδωσε αξιόπιστα αποτελέσματα και όλα τα PCR-προϊόντα κρίθηκαν έτοιμα προς την διενέργεια πέψης.



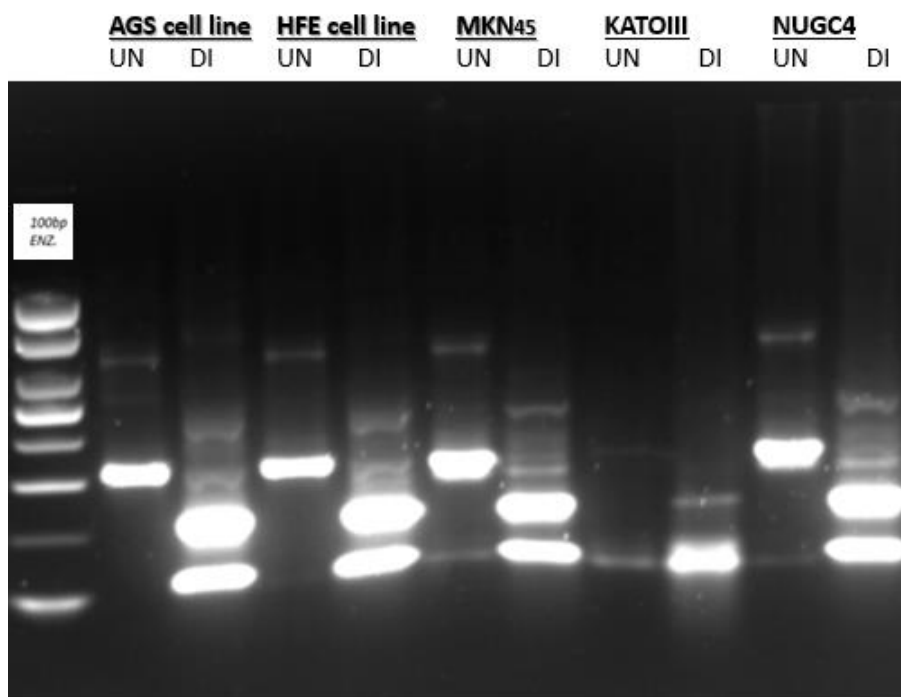
Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αгарόζης για την επαλήθευση της ορθής γονοτύπησης των RECUR1 υποκινητών σε όλες τις κυτταρικές σειρές Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp (EnzyQuest).



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αγαρόζης για την επαλήθευση της ορθής γονοτύπησης των RECUR1 ενισχυτών σε όλες τις κυτταρικές σειρές Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp (EnzyQuest).

3.1.1 Γονοτύπηση στον υποκινητή του RECUR1

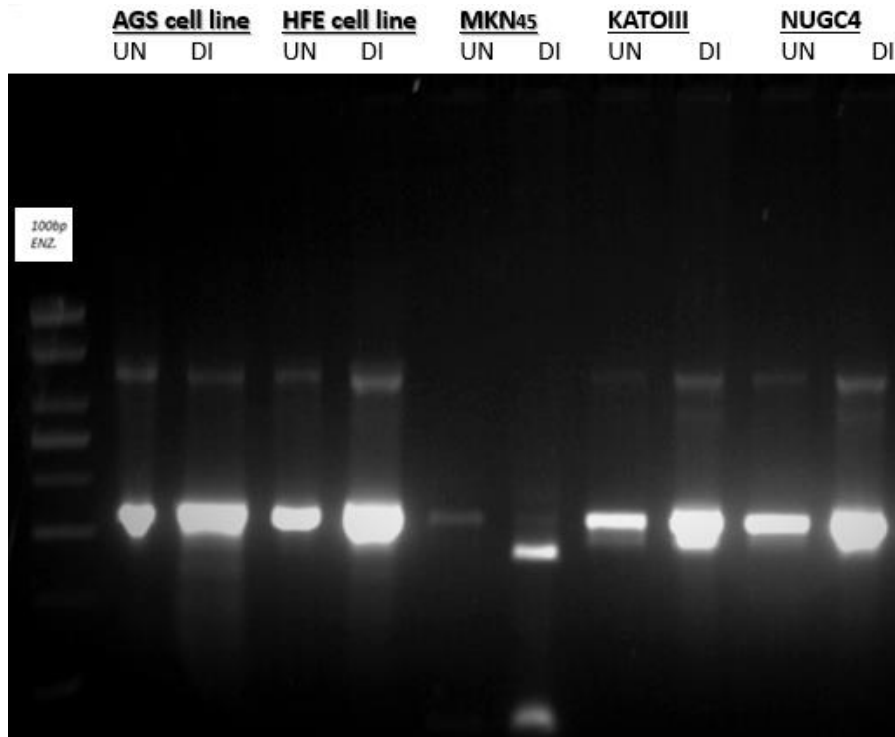
Το ένζυμο πέψης που χρησιμοποιήθηκε στον υποκινητή του RECUR1 ήταν το HaeIII το οποίο αναγνωρίζει ως πλαίσιο τον άγριο τύπο αλληλουχίας του RECUR1 υποκινητή. Μετά την εφαρμογή της πέψης όλα τα δείγματα (που είτε είχαν υποστεί πέψη είτε δεν είχαν περιοριστεί) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v (**Εικόνα 15**). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ανέδειξαν ότι όλες οι μελετώμενες κυτταρικές σειρές, πέρα από το KATOIII που εξαρχής δεν ενισχύθηκε επαρκώς, διαθέτουν τον άγριο τύπο αλληλουχίας στον υποκινητή του RECUR1.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση 2% w/v πηκτής αгарόζης σε PCR-προϊόντα που δεν έχουν υποστεί πέψη (UN) και σε PCR-προϊόντα που εφαρμόστηκε διαγνωστική πέψη με το ένζυμο BshfI (DI). Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp (EnzyQuest).

3.1.2 Γονοτύπηση στον ενισχυτή του RECUR1

Το ένζυμο πέψης που χρησιμοποιήθηκε στον ενισχυτή του RECUR1 ήταν το SphI το οποίο αναγνωρίζει ως πλαίσιο ανάγνωσης τον μεταλλαγμένο τύπο αλληλουχίας του RECUR1 ενισχυτή. Μετά την εφαρμογή της πέψης όλα τα δείγματα (με και χωρίς την προσθήκη ενζύμου περιορισμού) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2% w/v (Εικόνα 16). Γενικά, τα δείγματα που τέμνονται από το ένζυμο πέψης αναμένεται να εμφανίσουν ένα θραύσμα με μοριακό βάρος περίπου 260bp ενώ σε αντίθετη περίπτωση το θραύσμα υπολογίζεται περίπου στις 300bp. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ανέδειξαν την ύπαρξη αλληλουχίας μεταλλαγμένου τύπου στην κυτταρική σειρά MKN₄₅. Ίσως ο συγκεκριμένος σημειακός πολυμορφισμός να επηρεάζει την ενεργότητα του RECUR1 ενισχυτή. Ωστόσο, αυτό αποτελεί μια απλή υπόθεση διότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να αποτελεί μια απλή μετάλλαξη συνεπιβάτη. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

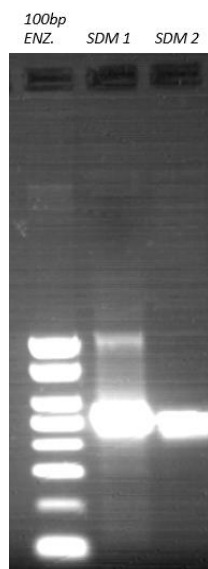


Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση 2% w/v πηκτής αгарόζης σε PCR-προϊόντα που δεν έχουν υποστεί πέψη (UN) και σε PCR-προϊόντα που εφαρμόστηκε διαγνωστική πέψη με το ένζυμο SphI (DI). Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν των 100 bp (EnzyQuest)

3.2 Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση

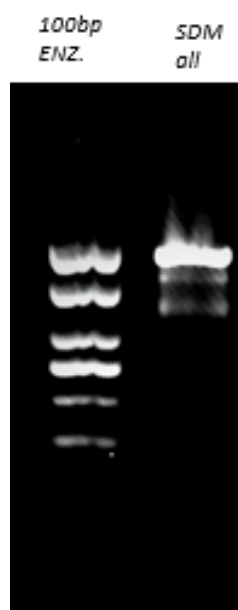
Η μέθοδος SDM εφαρμόστηκε στον υποκινητή του lncRNA:RECUR1 (που είχε ήδη κλωνοποιηθεί σε PGL4.10 φορέα) με σκοπό να προκύψουν δύο διαφορετικές και διακριτές σημειακές μεταλλάξεις σε σημεία ενδιαφέροντος στον υποκινητή του. Η μια μετάλλαξη καταστρέφει προβλεπόμενα μοτίβα πρόσδεσης πολλών μεταγραφικών παραγόντων ενώ η δεύτερη αντιστοιχεί σε μια παρακείμενη πολυμορφική θέση (SNP) πιθανής ρυθμιστικής αξίας για το RECUR1 μετάγραφο.

Αρχικά, για την δημιουργία των SNP ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκαν δύο PCR. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων PCR εμφάνισε τα δύο θραύσματα, SDM₁ και SDM₂, του υπό μελέτη υποκινητή. Τα δύο προϊόντα που προέκυψαν παρουσίασαν το επιθυμητό μοριακό βάρος ~500bp (**Εικόνα 8**)



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1% w/v των PCR₁ και PCR₂ προϊόντων με την μέθοδο SDM. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100bp-EnzyQuest και το μοριακό βάρος των θρασμαύτων~500bp.

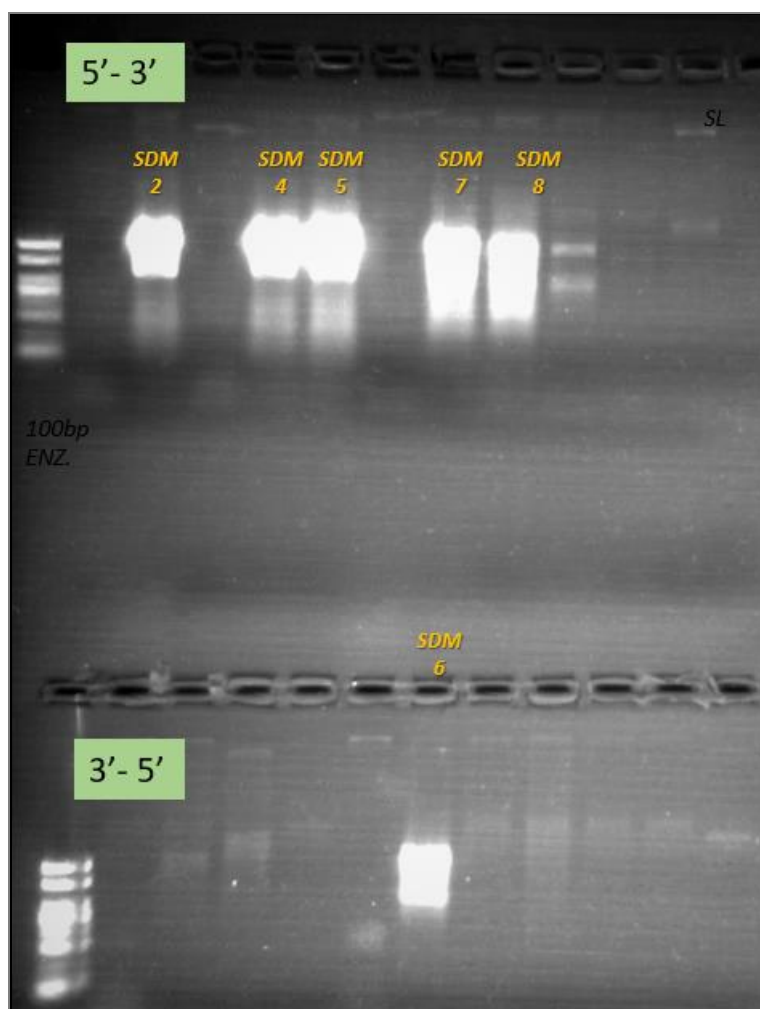
Μετά την απομόνωση των προϊόντων και την διαδικασία του καθαρισμού τους, τα 2 PCR τμήματα αναμίχθηκαν ισόποσα και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA εκμαγείο για την τελική PCR. Ο απώτερος στόχος ήταν η παραλαβή ολόκληρου του μεταλλαγμένου πλέον υποκινητή RECUR1. Προς επιβεβαίωση της ορθής παραλαβής ολόκληρου του υποκινητή, στο προϊόν της PCR εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1% w/v έτσι ώστε να απεικονιστεί το επιθυμητό μοριακό βάρος του υποκινητή RECUR1 που είναι περίπου 1000bp. Όπως διακρίνεται και από την **Εικόνα 9** η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος ήταν επιτυχημένη.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1% w/v των PCR προϊόντων με την μέθοδο SDM έτσι ώστε να ενισχυθεί ορθώς ο ολόκληρος μεταλλαγμένος υποκινητής. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100bp-EnzyQuest και το μοριακό βάρος των θρασμαύτων~1000bp.

3.2.1 Επιλογή της κατάλληλα μεταλλαγμένης αλληλουχίας υποκινητή RECUR1

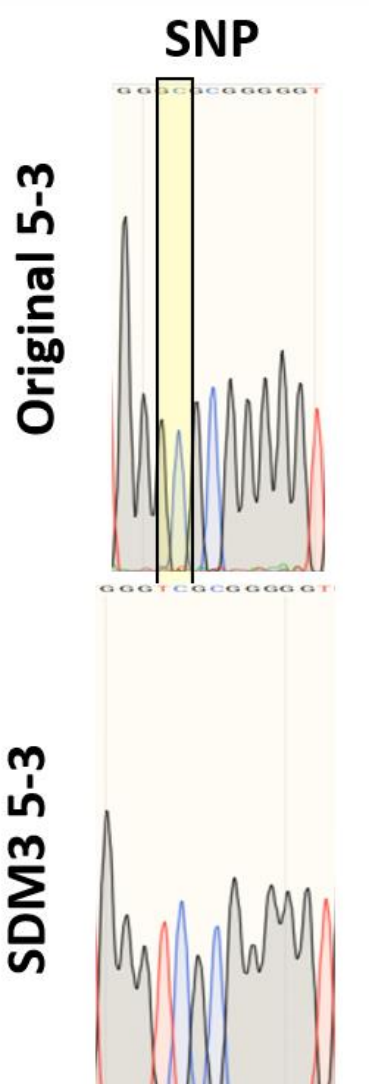
Μετά την ολοκλήρωση της SDM, και την παραλαβή ολόκληρου του μεταλλαγμένου υποκινητή, ξεκίνησε η διαδικασία κλωνοποίησης του (όπως περιγράφεται από 2.2.5 έως 2.2.9) σε ένα αποφωσφορυλιωμένο φορέα PGL4.10. Για την ταυτοποίηση του προσανατολισμού του υπό μελέτη υποκινητή πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές PCR-προσανατολισμού σε δέκα βακτηριακούς κλώνους. Μετά το πέρας των PCR, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v έτσι ώστε τελικά να επιλεχθούν δύο θετικοί κλώνοι (ένας με 5'-3' προσανατολισμό και ένας με 3-5'). Στην **Εικόνα 10** απεικονίζεται ευκρινώς η προαναφερόμενη ηλεκτροφόρηση και τα θραύσματα που επιλέχτηκαν ήταν το SDM₅ και το SDM₆



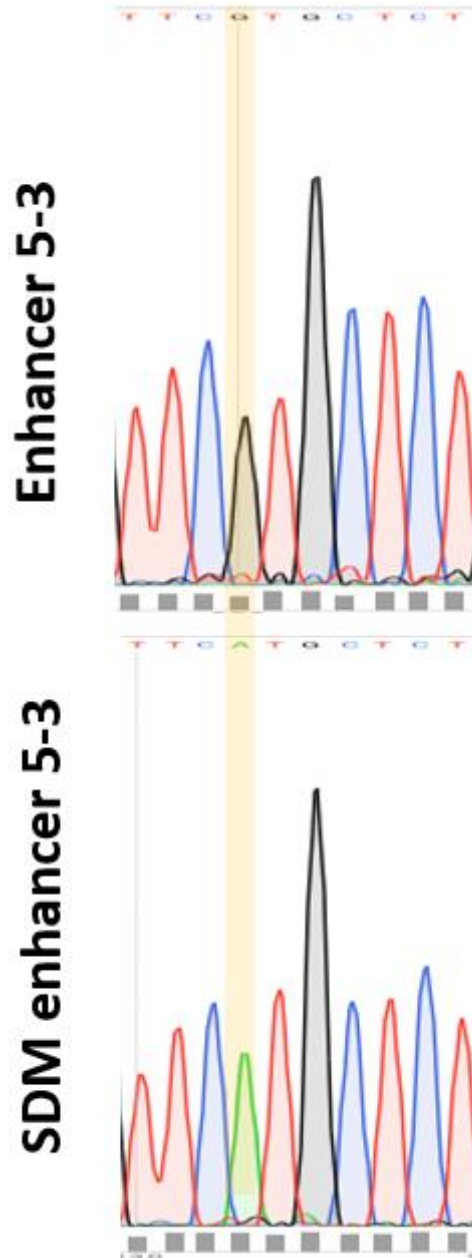
Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR-προσανατολισμού για την ενίσχυση του μεταλλαγμένου υποκινητή RECUR1 που ενσωματώθηκε στο PGL4.10 φορέα είτε με 5'-3' προσανατολισμό είτε με 3'-5' προσανατολισμό. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100bp-EnzyQuest και το SL (Self-Ligation) περιλαμβάνει τον φορέα χωρίς το ένθεμα.

3.2.2 Αλληλούχηση του μεταλλαγμένου υποκινητή & ενισχυτή RECUR1

Για την επαλήθευση της ορθής μεταλλαξογένεσης που πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1, στάλθηκαν για αλληλούχηση δείγματα των κλωνοποιημένων φορέων PGL4.10 και ADML. Στα δείγματα περιλαμβάνονταν και οι μεταλλαγμένοι ρυθμιστικοί στόχοι αλλά και αυτοί που δεν είχαν υποστεί κάποια μετάλλαξη. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης (**Εικόνα 11** και **Εικόνα 12**) ήταν θετικά και απέδειξαν την ορθή μετάλλαξη του υποκινητή του RECUR1 (G>T) και του ενισχυτή του RECUR1 (G>A).



Εικόνα 11: DNA αλληλούχηση του RECUR1 υποκινητή με προσανατολισμό 5'-3



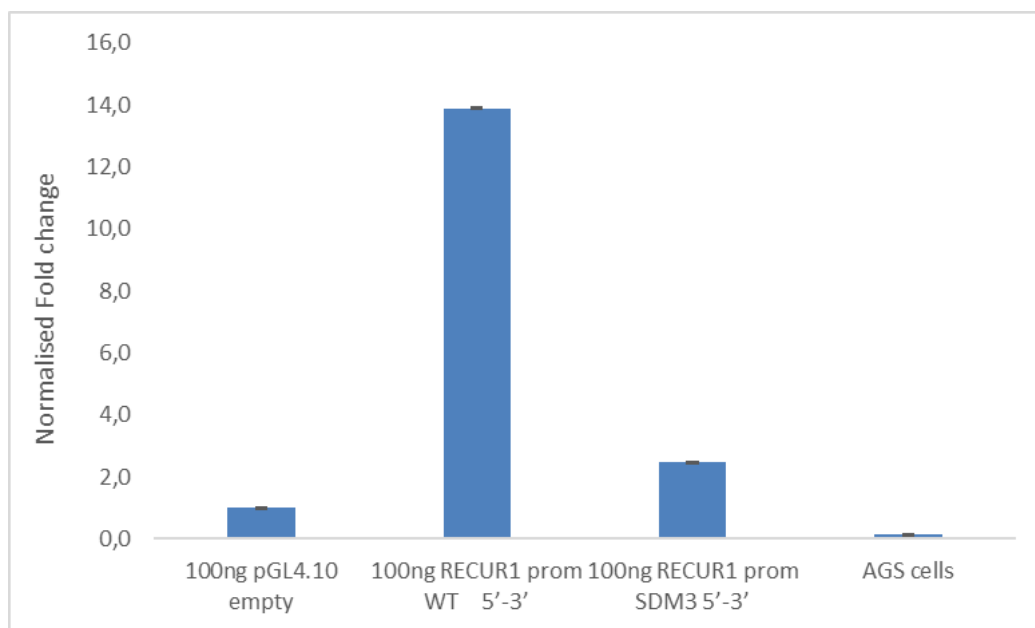
Εικόνα 12: DNA αλληλούχηση του RECUR1 ενισχυτή με προσανατολισμό 5'-3

3.2.3 Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης στον μεταλλαγμένο υποκινητή του RECUR1

Αφού είχε ολοκληρωθεί η κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου υποκινητή, που βρισκόταν δίπλα από το γονίδιο της λουσιφεράσης, στον φορέα PGL4.10 ακολούθησε η διαμόλυνση των πλασμιδίων σε AGS κυτταρικές σειρές. Η ενεργότητα του υποκινητή υπολογίζεται έμμεσα από το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης. Πιο αναλυτικά, ανάλογα την ποσότητα της λουσιφεράσης, που προκαλεί την οξείδωση του υποστρώματος λουσιφερίνης, εκπέμπεται ανάλογη

χημειοφωταύγεια. Επιπρόσθετα για την αποτελεσματικότερη ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιείται ως κανονικοποιητής το πλασμίδιο-Renilla το οποίο παρέχει σταθερή και μεγάλη ποσότητα βιοφωταύγειας που εξαρτάται μόνο από το ποσοστό επιτυχούς μετασχηματισμού των καρκινικών κυττάρων.

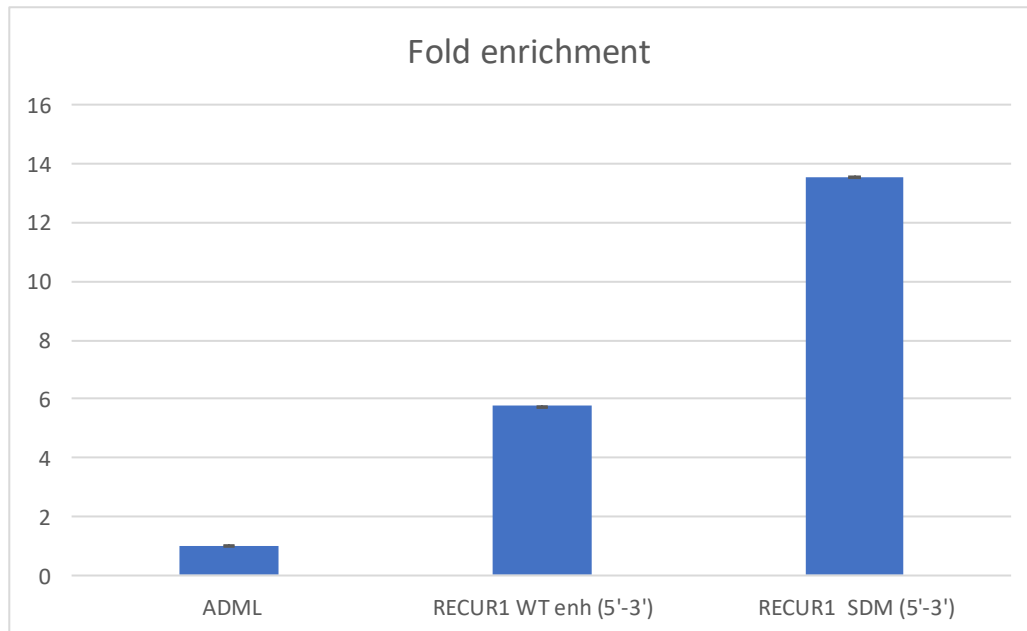
Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την μέτρηση δραστηριότητας της λουσιφεράσης στον μεταλλαγμένο υποκινητή RECUR1 υπέδειξαν μεγάλη καταστολή της έκφρασης του. Μάλιστα, συγκριτικά με τον άγριο τύπο του υποκινητή RECUR1, το SDM₃, δηλαδή ο υποκινητής που είχε υποστεί μεταλλαξογένεση, είχε περίπου 7 φορές χαμηλότερη ενεργότητα (**Γράφημα 1**)



Γράφημα 1: Αποτελέσματα της δραστηριότητας της λουσιφεράσης στον άγριο τύπο και μεταλλαγμένο υποκινητή RECUR1 (SDM₃). Ο προσανατολισμός έκφρασης των υποκινητών είναι 5'-3'. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ο PGL4.10 φορέας που δεν έχει υποστεί κλωνοποίηση

3.2.4 Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης στον μεταλλαγμένο ενισχυτή του RECUR1

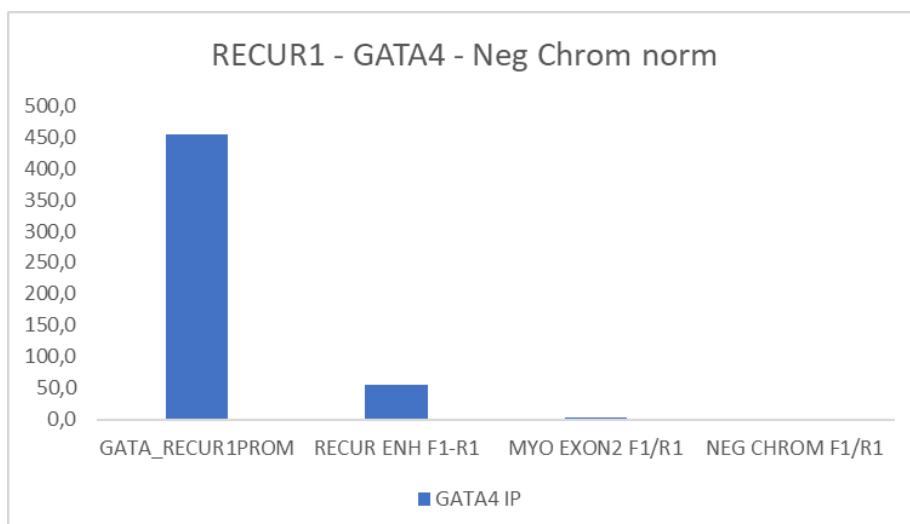
Όσον αφορά την μεταλλαξογένεση στον ενισχυτή του RECUR1, που κλωνοποιήθηκε σε ADML φορέα, η μέτρηση της βιοφωταύγειας του ανέδειξε διαφορετική ρύθμιση συγκριτικά με τον μεταλλαγμένο υποκινητή RECUR1. Χαρακτηριστικά, η εισαγωγή του εναλλακτικού αλληλομόρφου έναντι του SNP στον ενισχυτή του RECUR1 φαίνεται να αυξάνει την έκφραση του. Όπως απεικονίζεται στο **Γράφημα 2** ο μεταλλαγμένος ενισχυτής παρουσίασε παραπάνω από δύο φορές μεγαλύτερη ενεργότητα από τον άγριο τύπο ενισχυτή του RECUR1.



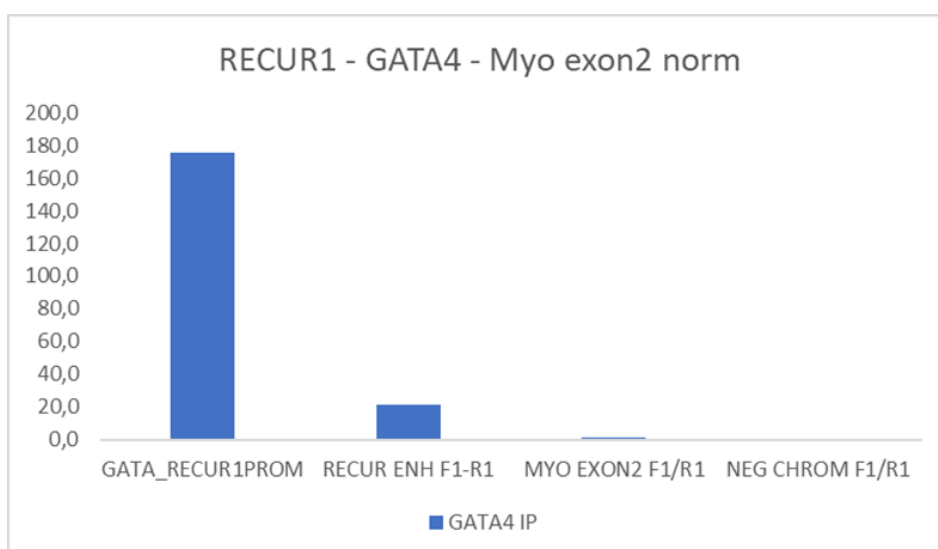
Γράφημα 2: Αποτελέσματα της δραστικότητας της λουσιφεράσης στον άγριο τύπο και μεταλλαγμένο ενισχυτή RECUR1 (SDM). Ο προσανατολισμός έκφρασης των ενισχυτών είναι 5'-3'. Ως αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιείται ο ADML φορέας που δεν έχει υποστεί κλωνοποίηση.

3.3 Μελέτη ποσοτικής PCR μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης

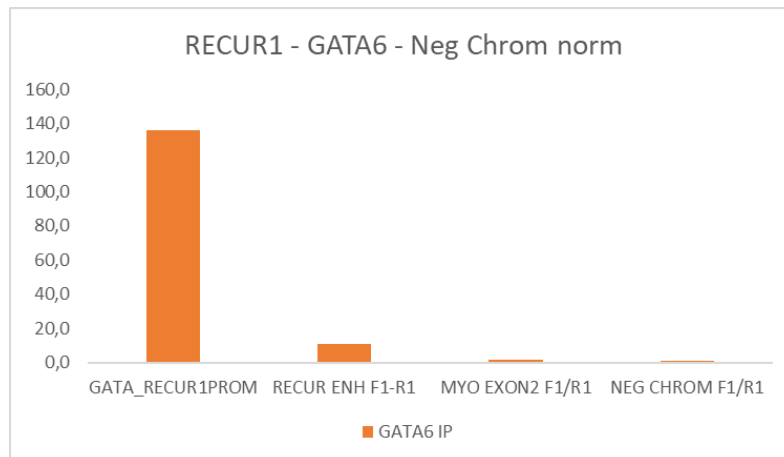
Τα αποτελέσματα της ChIP-qPCR απέδειξαν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA₄ και GATA₆ προσδένονται σε πολύ μεγάλη ποσότητα στον υποκινητή του RECUR1 αποτελώντας βασικούς ρυθμιστές για την μεταγραφή του. Αντίθετα, στον ενισχυτή του RECUR1 η πρόσδεση των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων είναι εμφανώς μικρότερη. Πιο αναλυτικά, ο GATA₄ μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται εννιά φορές λιγότερο και ο GATA₆ μεταγραφικός παράγοντας επτά φορές λιγότερο συγκριτικά με την πρόσδεση τους στον υποκινητή του RECUR1(**Γράφημα 3** έως **Γράφημα 6**). Ως μάρτυρες (controls) για την ανάλυση δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν η Neg chrom και η MYO exon2 οι οποίες αποτελούν περιοχές στην χρωματίνη που αποδεδειγμένα δεν αλληλοεπιδρούν με τους υπό μελέτη μεταγραφικούς παράγοντες.



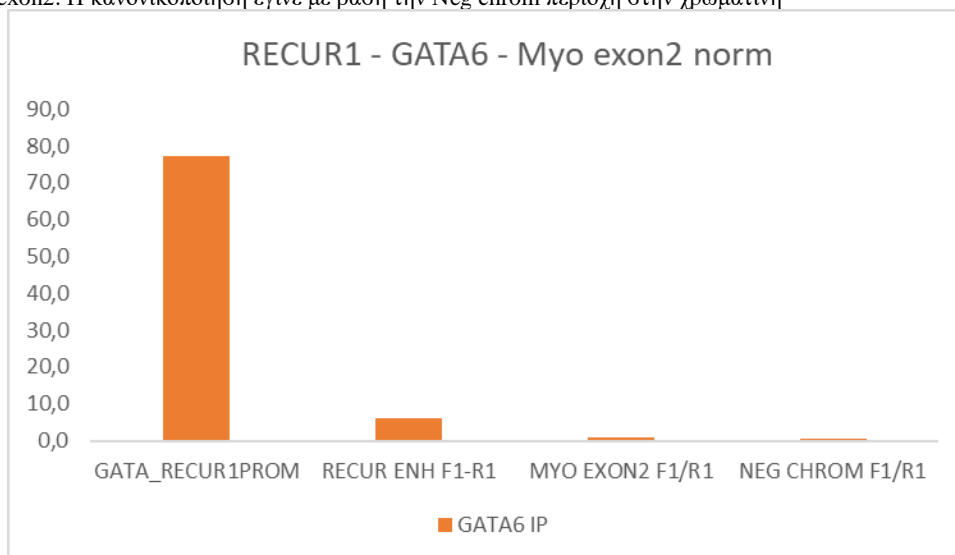
Γράφημα 3: Αποτελέσματα της chip-qPCR για τον GATA4 μεταγραφικό παράγοντα για την πρόσδεση του στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές NEG chrom και MYO exon2. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση την Neg chrom περιοχή στην χρωματίνη



Γράφημα 4: Αποτελέσματα της chip-qPCR για τον GATA4 μεταγραφικό παράγοντα για την πρόσδεση του στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές NEG chrom και MYO exon2. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση την Myo exon2 περιοχή στην χρωματίνη.



Γράφημα 5: Αποτελέσματα της chip-qPCR για τον GATA₆ μεταγραφικό παράγοντα για την πρόσδεση του στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές NEQ chrom και MYO exon2. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση την Neg chrom περιοχή στην χρωματίνη



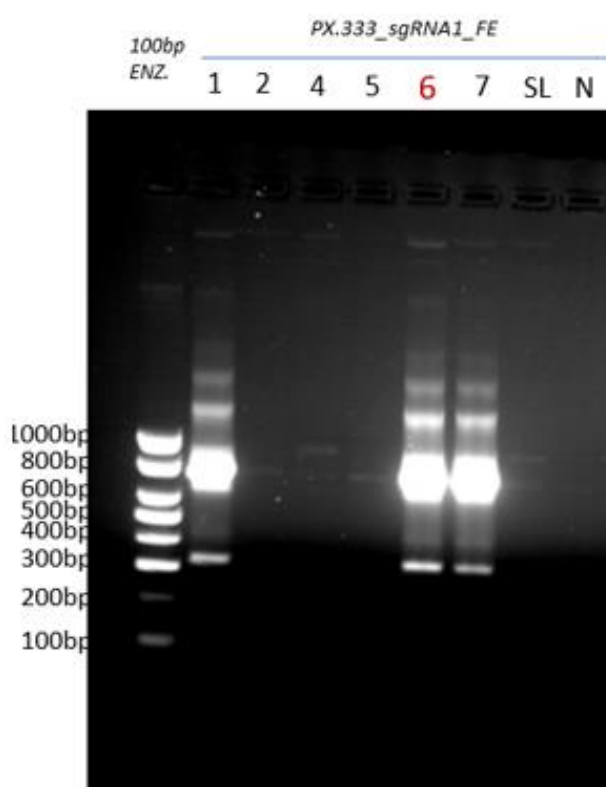
Γράφημα 6: Αποτελέσματα της ChIP-qPCR για τον GATA₆ μεταγραφικό παράγοντα για την πρόσδεση του στον υποκινητή και ενισχυτή του RECUR1. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές NEQ chrom και MYO exon2. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση την Myo exon2 περιοχή στην χρωματίνη

3.4 Ενσωμάτωση δύο sgRNAs στον PX333 φορέα

Ο απώτερος σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η επιτυχημένη κλωνοποίηση κατάλληλα επιλεγμένων sgRNAs στο PX333 φορέα, τα οποία θα καθοδηγήσουν, σε μελλοντικό πείραμα, την ενδονουκλεάση Cas9 στο γονίδιο του RECUR1. Τελικά θα προκληθεί δίκλωνο ρήγμα και αποκοπή (knockout) του πρώτου εξονίου του RECUR1 ώστε να μελετηθούν οι επιπτώσεις της απώλειας του στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η παρούσα εργασία εστιάστηκε στην δημιουργία του κατάλληλου PX333 φορέα για την μελλοντική υλοποίηση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9.

3.4.1 Διάγνωση της ορθής ενσωμάτωσης του sgRNA₁

Αρχικά, στον φορέα PX333 πραγματοποιήθηκε η πρώτη πέψη με ένζυμο περιορισμού το BbsI και ακολούθησε η διαδικασία της κλωνοποίησης για το sgRNA₁ (που στοχεύει το 5' άκρο του εξονίου) όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.6.1. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR, σε απομονωμένο πλασμιδιακό DNA επιλεγμένων κλώνων και τα προϊόντα της ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% w/v για την επιβεβαίωση της επιτυχημένης ενσωμάτωσης του sgRNA₁. Το επιθυμητό θραύσμα προβλέπεται να έχει μοριακό βάρος περίπου 350bp. Με βάση και την **Εικόνα 17** επιλέχτηκε ο έκτος κλώνος ως θετικός αναφορικά με την ενσωμάτωση του πρώτου sgRNA και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της δεύτερης πέψης για την ένθεση του επόμενου sgRNA που στοχεύει το 3' άκρο του εξονίου που πρόκειται να αποκοπεί.

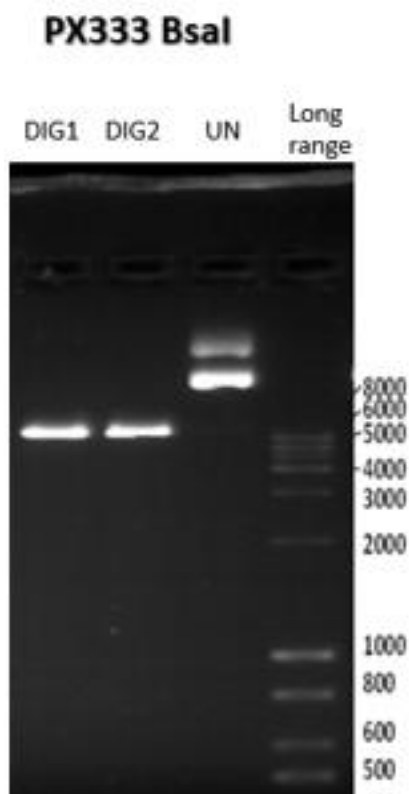


Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αгарόζης για την επιβεβαίωση της ορθής κλωνοποίησης του sgRNA₁ στον PX333 φορέα. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100bp (EnzyQuest). 1-7: ο αριθμός των mini-preps που ενισχύθηκαν με PCR. N: αρνητικός μάρτυρας που περιέχει άδειο φορέα. SL: αρνητικός μάρτυρας που περιλαμβάνει τον PX333 φορέα χωρίς το ένθεμα του sgRNA₁.

3.4.2 Διάγνωση της ορθής ενσωμάτωσης του sgRNA₂

Αφού επιλέχθηκε ο κατάλληλος κλώνος εφαρμόστηκε σε αυτόν τον φορέα δεύτερη πέψη με ένζυμο περιορισμού αυτή την φορά το BsaI. Για την εξακρίβωση της επιτυχημένης πέψης, το 10% του προϊόντος της διαγνωστικής πέψης

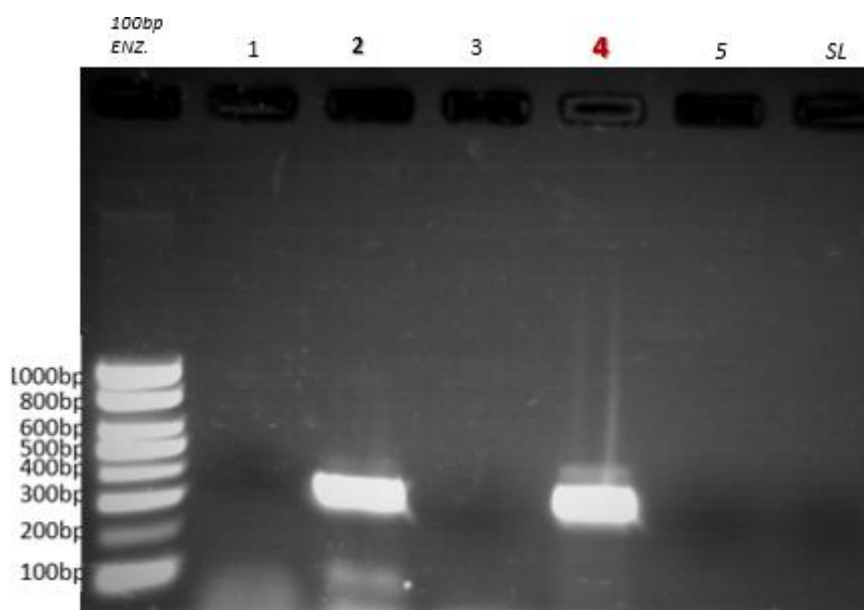
ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 1% w/v. Το πλασμίδιο που έχει υποστεί πέψη αναμένεται στην ηλεκτροφόρηση να εμφανίζεται ως ένα θραύσμα που αντιστοιχεί στην γραμμική μορφή του ενώ το πλασμίδιο που δεν έχει υποστεί πέψη απεικονίζεται με περισσότερες πιθανές διαμορφώσεις (όπως κυκλικό και υπερ-ελικωμένο). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 18** και η δεύτερη πέψη στον φορέα PX333 ήταν επιτυχημένη. Στην συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της κλωνοποίησης όπως περιγράφονται στην υποενότητα 2.2.6.2.



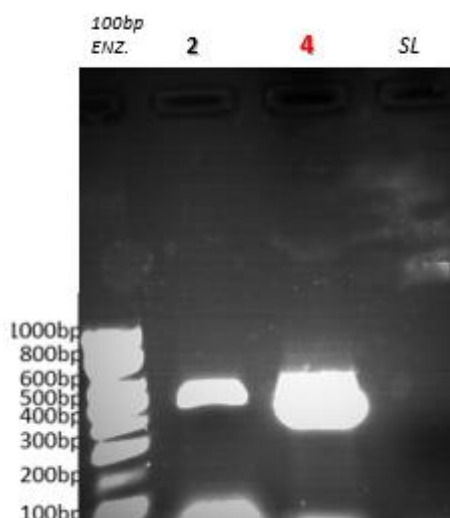
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση 1% πηκτής αгарόζης για την διάγνωση της επιτυχημένης πέψης του PX333 με χρήση του ενζύμου περιορισμού Bsal (NEB). Το ladder είναι long range EnzyQuest. DIG1-2: Τα δείγματα που υπέστησαν πέψη. UN: Τα δείγματα που δεν υπέστησαν πέψη

Προς επιβεβαίωση της ορθής κλωνοποίησης του sgRNA₂ εφαρμόστηκε διαγνωστική PCR, σε απομονωμένο πλασμιδιακό DNA από επιλεγμένους κλώνους και τα προϊόντα της ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% w/v. Το επιθυμητό θραύσμα επιδιώκεται να έχει μοριακό βάρος περίπου 350bp. Οπώς απεικονίζεται και στην παρακάτω **Εικόνα 19** επιτυχημένη κλωνοποίηση είχαν δύο συγκεκριμένα δείγματα (mini-preps PX333-2 και PX333-4) στα οποία δείγματα εφαρμόστηκε και μία επιπλέον PCR που θα ενίσχυε ολόκληρο το κλωνοποιημένο ένθεμα έτσι ώστε να διαπιστωθεί η τελική ενσωμάτωση και των δύο επιθυμητών sgRNAs (Εικόνα 20). Μετά την επιλογή του κατάλληλου φορέα ο οποίος ήταν ο PX333-clone 4, μετασχηματίστηκε, απομονώθηκε εκ νέου με την χρήση commercial kit και στάλθηκε

για αλληλούχηση κατά Sanger. Τέλος, οι αλληλουχίες των δύο sgRNAs επιβεβαιώθηκαν και σε νουκλεοτιδικό επίπεδο μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αгарόζης για την επιβεβαίωση της ορθής κλωνοποίησης του sgRNA₂ στον PX333 φορέα. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100bp (EnzyQuest). 1-5: ο αριθμός των mini-preps που ενισχύθηκαν με PCR. SL: αρνητικός μάρτυρας που περιλαμβάνει τον PX333 φορέα χωρίς το ένθεμα του sgRNA₂.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση 1% w/v πηκτής αгарόζης για την επιβεβαίωση της ορθής κλωνοποίησης του sgRNA₁ + sgRNA₂ στον PX333 φορέα. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100bp (EnzyQuest). 2,4: ο αριθμός των mini-preps που ενισχύθηκαν με PCR. SL: αρνητικός μάρτυρας που περιλαμβάνει τον PX333 φορέα χωρίς ολόκληρο το ένθεμα.

4. Συζήτηση

Η ενδεδειγμένη ανάλυση του γονιδιώματος έχει αποκαλύψει ότι τα SNPs που συσχετίζονται με τον καρκίνο παρευρίσκονται, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80%, σε μη κωδικές περιοχές. Όπως έχει προαναφερθεί τα SNPs αυτά σε πολλές περιπτώσεις βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές lncRNAs τα οποία διαδραματίζουν κομβικό ρόλο την ογκογένεση και στην εξέλιξη της νόσου [30, 33, 54]. Στην πορεία θα αναφερθούν εξειδικευμένα παραδείγματα μη μεταγραφόμενων και μη κωδικοποιητικών SNP στον καρκίνο.

Το γνωστό ογκογονίδιο TERT, που κωδικοποιεί την υπομονάδα της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης, μπορεί να ενεργοποιηθεί μεταγραφικά από δύο διακριτές σημειακές μεταλλάξεις στον υποκινητή του. Αυτές οι σωματικές μεταλλάξεις (C>T) δημιουργούν συγγένεια πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα ETS ο οποίος αυξάνει σημαντικά την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του TERT. Το αποτέλεσμα των συγκεκριμένων μεταλλάξεων οδηγεί στην διατήρηση του μήκους των τελομερών ανεξαρτήτως του συνόλου των κυτταρικών διαιρέσεων. Μάλιστα, με τις αναφερόμενες μεταλλάξεις-οδηγούς τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν την απόπτωση και πετυχαίνουν να αποκτήσουν χαρακτηριστικά αθανатоποίησης. Αρχικά, οι παραπάνω υποκαταστάσεις είχαν ανιχνευτεί στο μελάνωμα που ήταν παρόν έως και στο 71% όλων των περιπτώσεων. Σήμερα, οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT αποτελούν μια από τις πιο συνηθισμένες αλλοιώσεις στον καρκίνο και έχουν χαρακτηριστεί σε περισσότερους από 50 τύπους [26, 55-58].

Το GCLET (Gastric Cancer Low-Expressed Transcript) είναι ένα lncRNA που η υψηλή έκφραση του συνδέεται με την επιβίωση των ασθενών. Αντίστοιχα, η απουσία του GCLET έχει συσχετιστεί με τη εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου και την κακή πρόγνωση για τον ασθενή. Μια σημειακή μετάλλαξη (rs3850997, T > G στο 16p13, στο τρίτο εσόνιο του γενετικού τόπου GCLET) ευνοεί την συχνότερη σύνδεση του CTCF ο οποίος αναστέλλει την μεταγραφή του GCLET. Πιο αναλυτικά, ο CTCF που λειτουργεί ως μονωτής αποτρέπει τον σχηματισμό βρόχου χρωματίνης που περιέχει τον υποκινητή του GCLET καταστέλλοντας τελικά την έκφραση του [59-62].

Επιπρόσθετα με βάση το κλινικό προφίλ 505 ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) αναδείχθηκε μια σημαντική σημειακή μετάλλαξη, rs13230517, που εντοπίζεται στον υποκινητή του lncRNA RP11-3N2.1. Το RP11-3N2.1 αποδείχθηκε ότι ρυθμίζεται καθοδικά και ότι οι ασθενείς με γονότυπο GA/AA είχαν χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου σε σύγκριση με τον γονότυπο AT/TT [59]

Το PVT1 (Plasmacytoma variant translocation 1) ήταν το πρώτο lncRNA που αναγνωρίστηκε στους καρκίνους που προκαλούνται λόγω χρωμοσωμικών μετατοπίσεων όπως το λέμφωμα Burkitt. Οι επαναλαμβανόμενες δομικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου του PVT1, διαταράσσει την μεταγραφή του lncRNA καθώς και τις ρυθμιστικές του λειτουργίες, δηλαδή το γονίδιο στόχο που ρυθμίζει. Παράλληλα, ο γενετικός τόπος του PVT1, 8q24, αποτελεί μία από τις πιο συχνά ενισχυόμενες περιοχές στον καρκίνο του μαστού. Το PVT1 φαίνεται να λειτουργεί ογκοεπαγωγικά σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη MYC, ωστόσο η ρυθμιστική του λειτουργία στον καρκίνο παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής. Είναι γνωστό ότι η έκφραση του γονιδίου MYC προάγει τον κυτταρικό ανταγωνισμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η υπερέκφραση του MYC βρίσκεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% σε όλους του τύπους καρκίνου. Αξιοσημείωτο και φαινομενικά παράδοξο γεγονός είναι ότι ο υποκινητής του PVT1 εμφανίζει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες παρόλο την ογκοεπαγωγική λειτουργία του PVT1. Πιο αναλυτικά, ο υποκινητής του PVT1 και ο υποκινητής του MYC, απέχουν γραμμικά 58kb, βρίσκονται σε κοινό TAD. Τέσσερις συγκεκριμένοι ενισχυτές (822E, 866E, 912E, and 919E) που βρίσκονται στον γενετικό τόπο του PVT1 αλληλεπιδρούν πιο συχνά με τον υποκινητή του PVT1 σε σύγκριση με τον υποκινητή του MYC[63]. Συμπερασματικά, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι ο υποκινητής του PVT1 έχει κάποιο βαθμό ανεξαρτησίας από το μετάγραφο του και δρά ως ένα νέο είδος μονωτή περιορίζοντας σημαντικά την έκφραση του MYC. Ωστόσο κυρίως λόγω δομικών παραλλαγών μπορούν να αναδιαμορφωθούν οι βρόχοι χρωματίνης επιτρέποντας στους παραπάνω ενισχυτές να «καλωδιώνονται» πιο συχνά με τον υποκινητή MYC. Μάλιστα, έχουν αναφερθεί ποικίλες σημειακές μεταλλάξεις καθώς και διαγραφές βάσεων στον υποκινητή του PVT1 (hotspot) κυρίως στον καρκίνο του μαστού και στα κακοήγη λεμφώματα [63-67].

Συγκεκριμένα SNP (rs11672691, rs887391) στον υποκινητή του lncRNA PCAT19-short ευθύνονται για την αδυναμία δέσμευσης σημαντικών μεταγραφικών

παραγόντων (NKX3.1,YY1) που ευνοούν την έκφραση του. Πιο αναλυτικά, ο μεταγραφικός παράγοντας NKX3.1 έχει κρίσιμη λειτουργία στην ανάπτυξη του προστάτη συμβάλλοντας στην καταστολή του όγκου. Μάλιστα, το γονίδιο του NKX3.1 συνήθως διαγράφεται σε πολλές περιπτώσεις του προαναφερόμενου καρκίνου. Οι παραπάνω σημειακές μεταλλάξεις έχουν διττό χαρακτήρα και δεν επηρεάζουν μόνο την έκφραση του PCAT19-short. Αυτά τα SNP αποδυναμώνουν την λειτουργία του υποκινητή και την ίδια ρυθμιστική περιοχή την ενδυναμώνουν έτσι ώστε να λειτουργεί ως ενισχυτής για την υποβοήθηση της έκφρασης μιας άλλης ισομορφής. Η νέα ισομορφή που παράγεται ονομάζεται PCAT19-long και έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τις πυρηνικές πρωτεΐνες HNRNPAB προκαλώντας την αυξημένη έκφραση γονιδίων που ευθύνονται για τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και για την επιθετικότητα της νόσου. Ενώ, στον καρκίνο του ήπατος οι HNRNPAB καθορίζουν την μεταδιαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, EMT, στον καρκίνο του προστάτη η λειτουργία τους δεν είναι ακόμα πλήρως διακριτή. Οφείλει να σημειωθεί ότι η παραπάνω δι-λειτουργικότητα ,δηλαδή η μετατροπή του υποκινητή σε ενισχυτή , ίσως δεν προκαλείται αποκλειστικά από τα SNPs αλλά και από την έλλειψη των μεταγραφικών παραγόντων καθώς και από την τοπική δομή της χρωματίνης. Τέλος, η συνέργεια άγνωστων προς το παρόν μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να ευνοούν την «τροποποίηση» του υποκινητή σε ενισχυτή[68-73].

5. Βιβλιογραφία

1. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. The Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
2. Hartgrink, H.H., et al., *Gastric cancer*. The Lancet, 2009. **374**(9688): p. 477-490.
3. Catalano, V., et al., *Gastric cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **71**(2): p. 127-64.
4. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
5. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
6. Correa, P. and M.B. Piazuelo, *The gastric precancerous cascade*. J Dig Dis, 2012. **13**(1): p. 2-9.
7. Naseem, M., et al., *Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer*. Cancer Treat Rev, 2018. **66**: p. 15-22.
8. Roukos, D.H., *Assessing both genetic variation (SNPs/CNVs) and gene-environment interactions may lead to personalized gastric cancer prevention*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. **9**(1): p. 1-6.
9. Chia, N.Y. and P. Tan, *Molecular classification of gastric cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(5): p. 763-9.
10. Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer*. The Lancet, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
11. Gravalos, C. and A. Jimeno, *HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target*. Ann Oncol, 2008. **19**(9): p. 1523-9.
12. Gigeck, C.O., et al., *Genetic variants in gastric cancer: Risks and clinical implications*. Exp Mol Pathol, 2017. **103**(1): p. 101-111.
13. Blair, V.R., et al., *Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines*. The Lancet Oncology, 2020. **21**(8): p. e386-e397.
14. Pharoah, P.D., et al., *Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families*. Gastroenterology, 2001. **121**(6): p. 1348-53.
15. Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros, *Wnt signaling in cancer*. Oncogene, 2017. **36**(11): p. 1461-1473.
16. La Fleur, L., et al., *Mutation patterns in a population-based non-small cell lung cancer cohort and prognostic impact of concomitant mutations in KRAS and TP53 or STK11*. Lung Cancer, 2019. **130**: p. 50-58.
17. Mocellin, S., et al., *Genetic variation and gastric cancer risk: a field synopsis and meta-analysis*. Gut, 2015. **64**(8): p. 1209-19.
18. Yuan, L.J., et al., *Polymorphisms of tumor-related genes IL-10, PSCA, MTRR and NOC3L are associated with the risk of gastric cancer in the Chinese Han population*. Cancer Epidemiol, 2012. **36**(6): p. e366-72.
19. Park, B., et al., *Genome-Wide Association of Genetic Variation in the PSCA Gene with Gastric Cancer Susceptibility in a Korean Population*. Cancer Res Treat, 2019. **51**(2): p. 748-757.
20. Bourdon, J.C., *p53 and its isoforms in cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**(3): p. 277-82.
21. Alam, S., et al., 2018.

22. Verma, R. and P.C. Sharma, *Identification of stage-specific differentially expressed genes and SNPs in gastric cancer employing RNA-Seq based transcriptome profiling*. Genomics, 2022. **114**(1): p. 61-71.
23. Zhang, Z., M. Shen, and G. Zhou, *Upregulation of CDCA5 promotes gastric cancer malignant progression via influencing cyclin E1*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **496**(2): p. 482-489.
24. Kwon, M.J., et al., *Claudin-4 overexpression is associated with epigenetic derepression in gastric carcinoma*. Lab Invest, 2011. **91**(11): p. 1652-67.
25. Zhu, H., et al., *Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31431.
26. Elliott, K. and E. Larsson, *Non-coding driver mutations in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2021. **21**(8): p. 500-509.
27. McFarland, C.D., et al., *Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. 2910-5.
28. Yang, G., X. Lu, and L. Yuan, *LncRNA: a link between RNA and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(11): p. 1097-109.
29. Chu, C., et al., *Systematic discovery of Xist RNA binding proteins*. Cell, 2015. **161**(2): p. 404-16.
30. Schmitt, A.M. and H.Y. Chang, *Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways*. Cancer Cell, 2016. **29**(4): p. 452-463.
31. Xu, F. and J. Zhang, *Long non-coding RNA HOTAIR functions as miRNA sponge to promote the epithelial to mesenchymal transition in esophageal cancer*. Biomed Pharmacother, 2017. **90**: p. 888-896.
32. Miao, Y.R., et al., *LncRNASNP2: an updated database of functional SNPs and mutations in human and mouse lncRNAs*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D276-D280.
33. 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.
34. Fu, S., et al., *Regulatory Networks of LncRNA MALAT-1 in Cancer*. Cancer Manag Res, 2020. **12**: p. 10181-10198.
35. Wang, H., et al., *Landscape of SNPs-mediated lncRNA structural variations and their implication in human complex diseases*. Brief Bioinform, 2018.
36. Gao, P. and G.H. Wei, *Genomic Insight into the Role of lncRNA in Cancer Susceptibility*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
37. Kajino, T., et al., *Divergent lncRNA MYMLR regulates MYC by eliciting DNA looping and promoter-enhancer interaction*. EMBO J, 2019. **38**(17): p. e98441.
38. Zhang, Z., et al., *Transcriptional landscape and clinical utility of enhancer RNAs for eRNA-targeted therapy in cancer*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4562.
39. Lee, J.H., F. Xiong, and W. Li, *Enhancer RNAs in cancer: regulation, mechanisms and therapeutic potential*. RNA Biol, 2020. **17**(11): p. 1550-1559.
40. Gil, N. and I. Ulitsky, *Production of Spliced Long Noncoding RNAs Specifies Regions with Increased Enhancer Activity*. Cell Syst, 2018. **7**(5): p. 537-547 e3.
41. Yang, M., et al., *LncRNAfunc: a knowledgebase of lncRNA function in human cancer*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(D1): p. D1295-D1306.

42. Shorstova, T., W.D. Foulkes, and M. Witcher, *Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents*. Br J Cancer, 2021. **124**(9): p. 1478-1490.
43. Shlyueva, D., G. Stampfel, and A. Stark, *Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(4): p. 272-86.
44. Grubert, F., et al., *Genetic Control of Chromatin States in Humans Involves Local and Distal Chromosomal Interactions*. Cell, 2015. **162**(5): p. 1051-65.
45. Zhang, K., et al., *A single-cell atlas of chromatin accessibility in the human genome*. Cell, 2021. **184**(24): p. 5985-6001 e19.
46. Graule, J., et al., *CDX2 in colorectal cancer is an independent prognostic factor and regulated by promoter methylation and histone deacetylation in tumors of the serrated pathway*. Clin Epigenetics, 2018. **10**(1): p. 120.
47. Bae, J.M., et al., *Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(5): p. 1457-67.
48. Tomasello, G., et al., *Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. Clin Colorectal Cancer, 2018. **17**(2): p. 97-103.
49. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
50. Farabella, I., et al., *Three-dimensional genome organization via triplex-forming RNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2021. **28**(11): p. 945-954.
51. Mattick, J.S., R.J. Taft, and G.J. Faulkner, *A global view of genomic information--moving beyond the gene and the master regulator*. Trends Genet, 2010. **26**(1): p. 21-8.
52. Zhao, W., J. Luo, and S. Jiao, *Comprehensive characterization of cancer subtype associated long non-coding RNAs and their clinical implications*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 6591.
53. Bonetti, A. and P. Carninci, *From bench to bedside: The long journey of long non-coding RNAs*. Current Opinion in Systems Biology, 2017. **3**: p. 119-124.
54. Cheetham, S.W., et al., *Long noncoding RNAs and the genetics of cancer*. Br J Cancer, 2013. **108**(12): p. 2419-25.
55. Rheinbay, E., et al., *Analyses of non-coding somatic drivers in 2,658 cancer whole genomes*. Nature, 2020. **578**(7793): p. 102-111.
56. Fredriksson, N.J., et al., *Recurrent promoter mutations in melanoma are defined by an extended context-specific mutational signature*. PLoS Genet, 2017. **13**(5): p. e1006773.
57. Bell, R.J., et al., *Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality*. Mol Cancer Res, 2016. **14**(4): p. 315-23.
58. Killela, P.J., et al., *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. 6021-6.
59. Lange, M., R. Begolli, and A. Giakountis, *Non-Coding Variants in Cancer: Mechanistic Insights and Clinical Potential for Personalized Medicine*. Noncoding RNA, 2021. **7**(3).
60. Kaiser, V.B., M.S. Taylor, and C.A. Semple, *Mutational Biases Drive Elevated Rates of Substitution at Regulatory Sites across Cancer Types*. PLoS Genet, 2016. **12**(8): p. e1006207.

61. Poulos, R.C., et al., *Functional Mutations Form at CTCF-Cohesin Binding Sites in Melanoma Due to Uneven Nucleotide Excision Repair across the Motif*. Cell Rep, 2016. **17**(11): p. 2865-2872.
62. Guo, Y.A., et al., *Mutation hotspots at CTCF binding sites coupled to chromosomal instability in gastrointestinal cancers*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1520.
63. Cho, S.W., et al., *Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element*. Cell, 2018. **173**(6): p. 1398-1412 e22.
64. Tseng, Y.Y., et al., *PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase*. Nature, 2014. **512**(7512): p. 82-6.
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. Tseng, Y.Y. and A. Bagchi, *The PVT1-MYC duet in cancer*. Mol Cell Oncol, 2015. **2**(2): p. e974467.
67. Cui, M., et al., *Long non-coding RNA PVT1 and cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **471**(1): p. 10-4.
68. Hua, J.T., et al., *Risk SNP-Mediated Promoter-Enhancer Switching Drives Prostate Cancer through lncRNA PCAT19*. Cell, 2018. **174**(3): p. 564-575 e18.
69. <Metastatic prostate cancer (PCa).pdf>.
70. <Role of YY1 in the pathogenesis of prostate cancer and.pdf>.
71. Shui, I.M., et al., *Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium*. Eur Urol, 2014. **65**(6): p. 1069-75.
72. Zhou, Z.J., et al., *HNRNPAB induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating SNAIL*. Cancer Res, 2014. **74**(10): p. 2750-62.
73. Pomerantz, M.M., et al., *Association of prostate cancer risk Loci with disease aggressiveness and prostate cancer-specific mortality*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(5): p. 719-28.