Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΤΜΗΜΑ Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής

Μελέτη των ρυθμιστικών αλληλουχιών του lncRNA RECUR1 με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση

Study of the regulatory sequences of lncRNA RECUR1 by site directed mutagenesis

Καραγιάννης Απόστολος του Βασιλείου

Λάρισα 2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων:
Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη:
Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λιάκος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

.....0

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή 1

Περίληψη.....4

Abstract 5

1. Εισαγωγή 6

1.1 Γαστρικός καρκίνος 6

1.1.1 Επιδημιολογία γαστρικού καρκίνου 6

1.1.2 Ιστολογική και μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου 8

1.1.3 Μέθοδοι διάγνωσης γαστρικού καρκίνου 11

1.2 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA 12

1.2.1 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των lncRNA.....13

1.2.2 Μοριακές λειτουργίες των lncRNA.....14

1.2.3 Ρόλος των lncRNA στον καρκίνο 19

1.3 Ρυθμιστικά στοιχεία των lncRNA.....20

2. Σκοπός της εργασίας 23

3. Υλικά και μέθοδοι.....24

3.1 Ποσοτικές PCR για έλεγχο της έκφρασης του lncRNA RECUR1 και του RECUR1_target 24

3.2 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και κατασκευή πλασμιδιάκων φορέων.....24

3.2.1 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του υποκινητή του lncRNA RECUR1 24

3.2.2 Κλωνοποιήσεις των τμημάτων του υποκινητή του lncRNA RECUR1 μετά την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση 2 και 3 27

3.3 Απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target από γονιδιωματικό DNA.....31

3.3.1 PCR για απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target 31

3.3.2 Κλωνοποιήσεις των τμημάτων του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target 32

3.4 Πειράματα βιοφωταύγειας λουσιφεράσης για προσδιορισμό λειτουργικότητας των ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων RECUR1 και RECUR1_target.....35

3.5 Αφαίρεση τμήματος του υποκινητή του RECUR1 (knock out) από το γονιδίωμα γαστρικών καρκινικών κυττάρων, με την χρήση του συστήματος CRISPR-Cas9.....37

3.5.1 Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pX333 37

3.5.2 Δημιουργία knock-out κυτταρικής σειράς 41

3.5.3 Γονοτύπηση των knock-out κυτταρικών σειρών.....42

4. Αποτελέσματα 43

4.1 Ποσοτικές PCR για έλεγχο της έκφρασης του lncRNA RECUR1 και του RECUR1_target 43

4.2 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του υποκινητή του lncRNA RECUR1 και κατασκευή πλασμιδιάκων φορέων 45

4.3 Απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target από γονιδιωματικό DNA και κλωνοποίησή του 50
4.4 Πειράματα βιοφωταύγειας λουσιφεράσης για προσδιορισμό λειτουργικότητας των ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων RECUR1 και RECUR1_target 54
4.5 Αφαίρεση τμήματος του υποκινητή του RECUR1 (knock out) από το γονιδίωμα γαστρικών καρκινικών κυττάρων 58
5. Συζήτηση 60
6. Βιβλιογραφία 62

Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου είναι ένας από τους πιο θνησιγόνους τύπους καρκίνου, καθώς κατατάσσεται στην τρίτη θέση σχετικά με τη θνησιμότητα παγκοσμίως. Η υψηλή θνησιμότητα οφείλεται κυρίως στην μη έγκαιρη διάγνωσή του, επειδή μεγάλο ποσοστό των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) έχουν ποικίλους μοριακούς ρόλους και μέσω διαφόρων κυτταρικών μηχανισμών επηρεάζουν τόσο φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος του στομάχου. Τα μόρια αυτά λόγω της συχνά καρκινοειδικής έκφρασης που εμφανίζουν, αξιοποιούνται ως νέοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες της νόσου. Μεταλλάξεις στις ρυθμιστικές αλληλουχίες ογκογόνων lncRNA, που συνεπάγονται αλλαγές στην γονιδιακή τους έκφραση, μπορεί να αποτελούν αιτίες επαγωγής νεοπλασιών. Επομένως, ο χαρακτηρισμός τέτοιων ρυθμιστικών στοιχείων και των μεταλλάξεών τους στον καρκίνο, μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση της γενετικής προδιάθεσης της νόσου οδηγώντας και στην εύρεση νέων διαγνωστικών δεικτών. Αυτή η πτυχιακή εργασία εστιάζει στην μελέτη των ρυθμιστικών αλληλουχιών του lncRNA RECUR1, του οποίου η απορυθμισμένη έκφραση σχετίζεται με τον γαστρικό καρκίνο. Χαρακτηρίστηκαν δύο σημαντικές περιοχές στον υποκινητή του lncRNA RECUR1 και δείχθηκε ο ρόλος τους στην έκφρασή του. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι ρυθμιστικές αλληλουχίες ενός πιθανού γονιδίου στόχου του RECUR1. Τέλος, δημιουργήθηκε ένα εργαλείο για την τροποποίηση του υποκινητή του RECUR1 σε επίπεδο γονιδιώματος.

Abstract

Stomach cancer is one of the deadliest types of cancer, ranking third in terms of mortality worldwide. The high mortality is mainly due to its late diagnosis, because a significant percentage of patients are asymptomatic during the initial stages of the disease. Long non-coding RNAs (lncRNAs) have diverse molecular roles and through various cellular mechanisms affect both normal and pathological conditions, such as gastric cancer. These molecules, due to their often cancer-specific expression, are used as new diagnostic and prognostic biomarkers of the disease. Mutations in the regulatory sequences of oncogenic lncRNAs, resulting in changes in their gene expression, may be causes of induction of neoplasia. Therefore, the characterization of such regulatory elements and their mutations in cancer may help to assess the genetic predisposition of the disease, leading to the discovery of new diagnostic markers. This thesis focuses on the study of the regulatory sequences of the lncRNA RECUR1, whose deregulated expression is associated with gastric cancer. Two important regions in the lncRNA RECUR1 promoter were characterized and their role in its expression was shown. In addition, the regulatory sequences of a potential target gene of RECUR1 were studied. Finally, a tool was created to modify the RECUR1 promoter at the genome level.

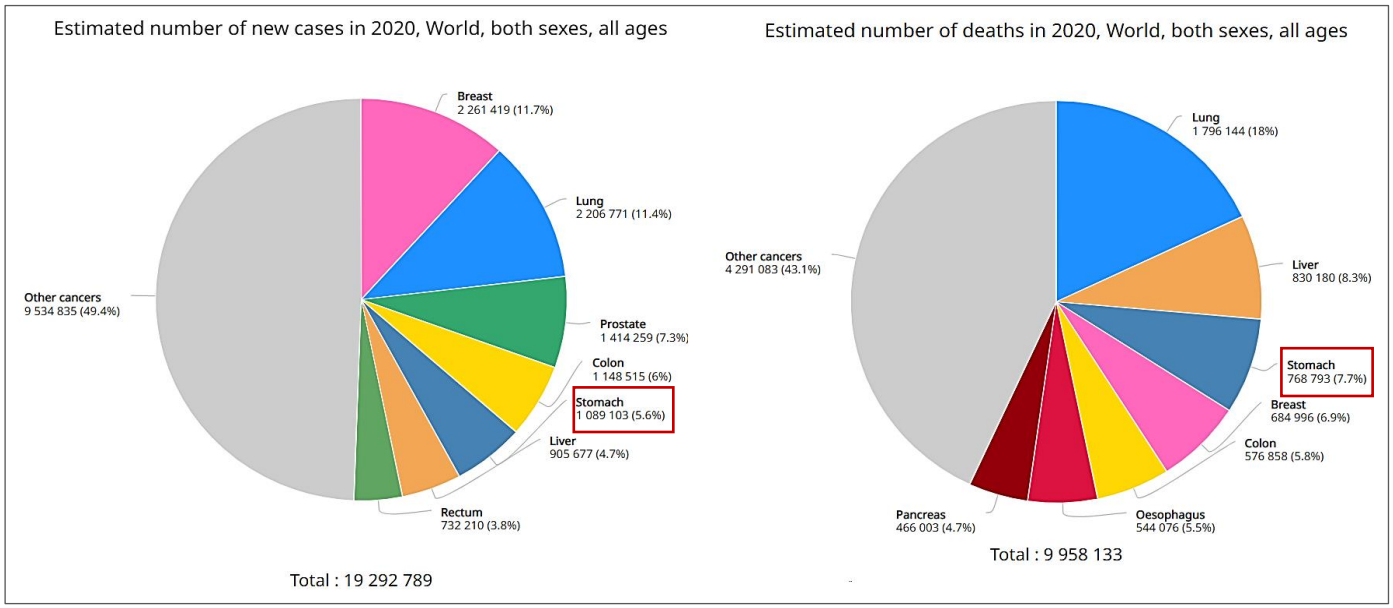
1. Εισαγωγή

1.1 Γαστρικός καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος, που ονομάζεται επίσης καρκίνος του στομάχου, ξεκινά όταν τα κύτταρα στο στομάχι αρχίζουν να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα. Οι καρκίνοι του στομάχου τείνουν να αναπτύσσονται αργά για πολλά χρόνια [1]. Πριν αναπτυχθεί ο καρκίνος, συχνά συμβαίνουν προκαρκινικές αλλαγές στην εσωτερική στοιβάδα του γαστρικού επιθηλίου. Αυτές οι πρώιμες αλλαγές σπάνια προκαλούν συμπτώματα, επομένως συχνά περνούν απαρατήρητες [1, 2].

1.1.1 Επιδημιολογία γαστρικού καρκίνου

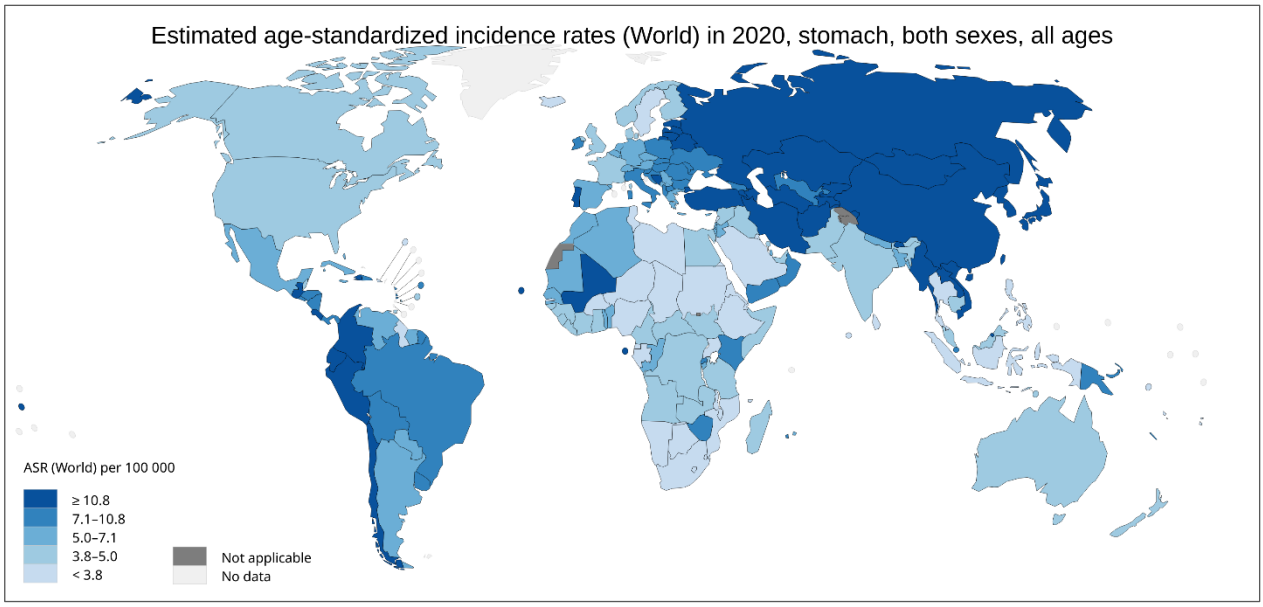
Ο καρκίνος του στομάχου είναι ένας σημαντικός τύπος καρκίνου παγκοσμίως, καθώς είναι υπεύθυνος για πάνω από ένα εκατομμύριο νέες περιπτώσεις το 2020 και υπολογίζεται ότι προκάλεσε 769.000 θανάτους, που ισοδυναμεί με έναν στους δεκατρείς θανάτους παγκοσμίως, κατατάσσοντας τον στην πέμπτη θέση όσο αναφορά την συχνότητα και στην τρίτη σχετικά με τη θνησιμότητα παγκοσμίως (Εικόνα 1) [3].



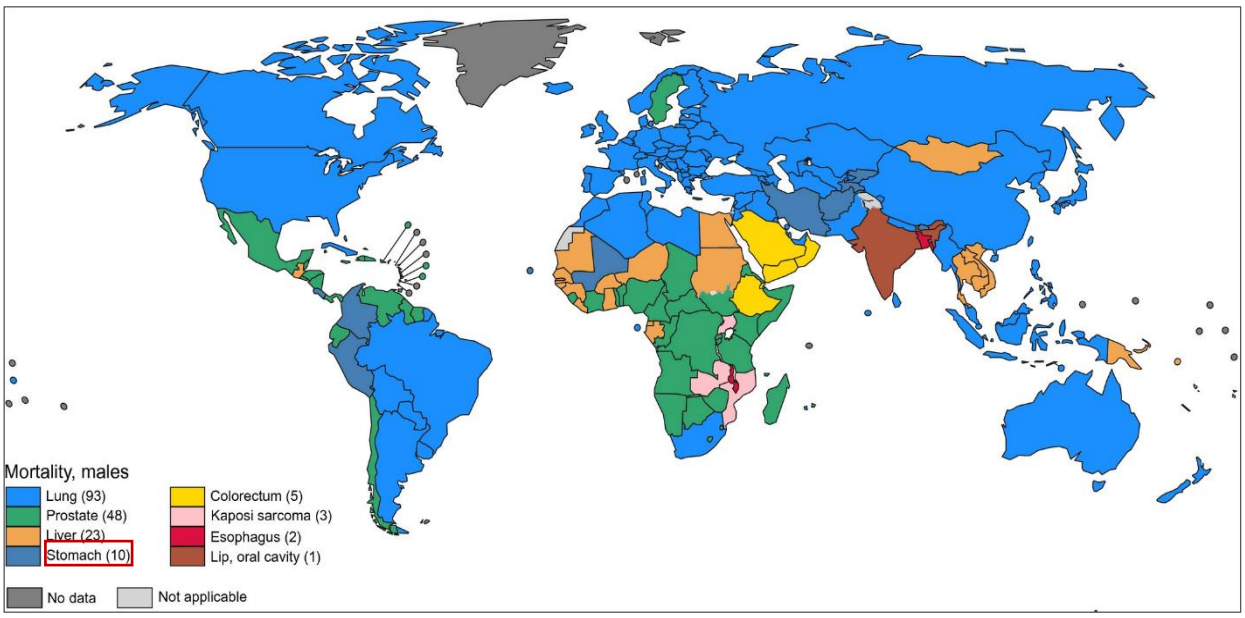
Εικόνα 1: Κατανομή κρουσμάτων και θανάτων για τους πιο συχνούς καρκίνους το 2020 και για τα δύο φύλα [4].

Η συχνότητα του γαστρικού καρκίνου ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανά περιοχή και πολιτισμό. Τα ποσοστά συχνότητας είναι υψηλότερα στην Ανατολική Ασία και στην Ανατολική Ευρώπη, ενώ τα ποσοστά στη Βόρεια Αμερική και τη Βόρεια Ευρώπη είναι γενικά χαμηλά και ισοδύναμα με αυτά που παρατηρούνται σε τις Αφρικανικές περιοχές (Εικόνα 2) [3, 4].

Ο καρκίνος του στομάχου είναι πιο διαδεδομένος στους άνδρες. Στις ανεπτυγμένες χώρες είναι 2,2 φορές πιο πιθανό να διαγνωστεί στους άνδρες παρά στις γυναίκες, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες, η αναλογία αυτή είναι 1,83. Σε πέντε χώρες παγκοσμίως, ο καρκίνος του στομάχου έχει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ όλων των καρκίνων για τους άνδρες [5], ενώ αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από την νόσο σε πολλές χώρες της Νότιας Κεντρικής Ασίας (Εικόνα 3) [3].



Εικόνα 2: Ο χάρτης δείχνει τα εκτιμώμενα, τυποποιημένα ως προς την ηλικία, ποσοστά συχνότητας παγκοσμίως για τον καρκίνο του στομάχου το 2020 και στα δύο φύλα, για όλες τις ηλικίες [4].

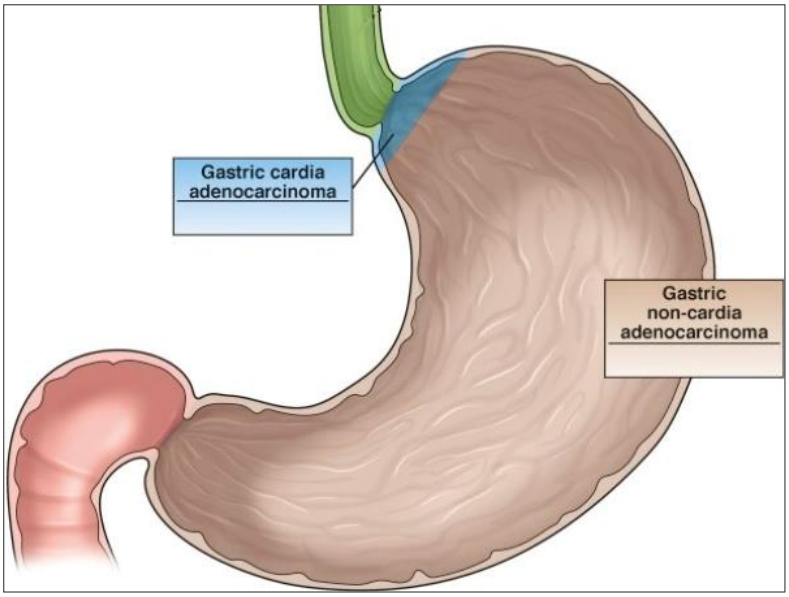


Εικόνα 3: Ο πιο κοινός τύπος καρκίνου με βάση την θνησιμότητα, ανά χώρα το 2020 μεταξύ ανδρών [3].

.

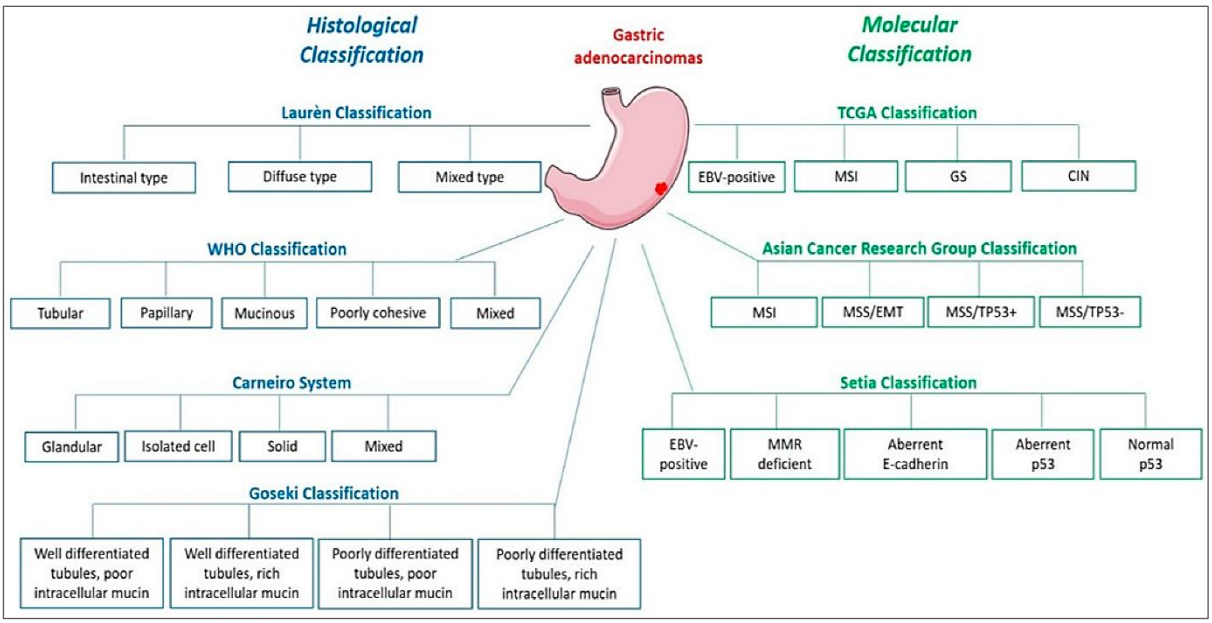
1.1.2 Ιστολογική και μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου

Περίπου το 90-95% των καρκίνων του στομάχου αφορούν γαστρικά αδενοκαρκινώματα, με το υπόλοιπο 5-10% να είναι λεμφώματα, λειομυοσαρκώματα, στρωματικοί όγκοι του γαστρεντερικού και νευροενδοκρινείς όγκοι [6]. Παρά το γεγονός ότι θεωρείται ως ενιαία οντότητα, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα περιλαμβάνει δύο ανατομικούς υπότυπους, τον καρδιακού και τον μη καρδιακού τύπο γαστρικού καρκίνου, καθένας από τους οποίους έχει μοναδικά κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 4) [7].



Εικόνα 4: Καρδιακού και μη καρδιακού τύπος γαστρικού καρκίνου (τροποποιημένη από [7]).

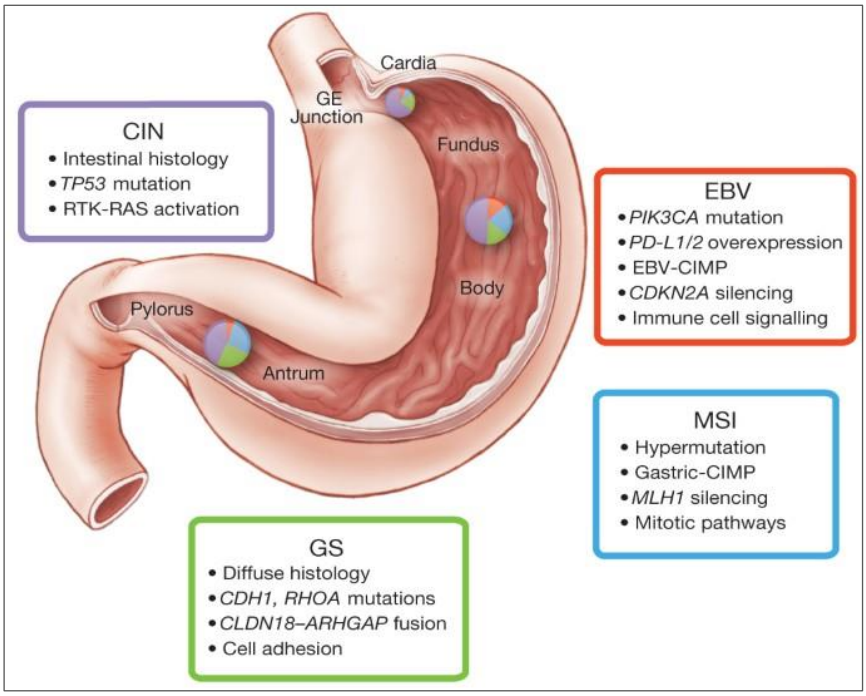
Η πολυπλοκότητα των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων εξηγεί τα ποικίλα ιστολογικά και μοριακά συστήματα ταξινόμησης που υπάρχουν (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ιστολογικές και μοριακές ταξινομήσεις γαστρικού αδενοκαρκινώματος [12].

Η προτιμώμενη και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ιστολογική κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου είναι η ταξινόμηση κατά Laurén. Η κατηγοριοποίηση αυτή διαιρεί τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα στον εντερικό, τον διάχυτο και τον μεικτό υπότυπο, σύμφωνα με τους ιστολογικούς τους φαινοτύπους [8, 9]. Οι γαστρικού όγκοι εντερικού υπότυπου σχηματίζουν δομές που μοιάζουν με αδένες, αναπτύσσονται σε ασθενείς που έχουν σοβαρή ατροφική γαστρίτιδα και συνδέονται έντονα με εντερική μεταπλασία. Από την άλλη πλευρά, ο καρκίνος του στομάχου διάχυτου υπότυπου σχετίζεται με διατάραξη της κυτταρικής συνοχής, κακή διαφοροποίηση, αντίσταση στη θεραπεία και κακή έκβαση [10]. Τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα μπορούν επίσης να ταξινομηθούν, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, σε σωληνοειδή, θηλώδη, βλεννώδη και τέλος σε κακώς συνεκτικά και μεικτά καρκινώματα [11]. Τα κακώς συνεκτικά καρκινώματα αντιστοιχούν στον διάχυτο υπότυπο της ταξινόμησης κατά Laurén, οι σωληνοειδείς, θηλώδεις και βλεννώδεις υπότυποι αντιστοιχούν στον εντερικό υπότυπο [12].

Τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα ποικίλλουν όχι μόνο ιστολογικά, αλλά και μοριακά. Λόγω των πολλών τους μοριακών διαφορών, η ερευνητική κοινοπραξία του The Cancer Genome Atlas (TCGA) πρότεινε μια νέα ταξινόμηση σε τέσσερις υπότυπους, με βάση τις αλλαγές σε ολόκληρο το γονιδίωμα: τους όγκους θετικούς σε EBV (Epstein-Barr virus), τους όγκους με αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI - microsatellite instable), τους γονιδιωματικά σταθερούς όγκους (GS - genomically stable) και τους χρωμοσωμικά ασταθείς όγκους (CIN - chromosomal instability) (Εικόνα 6) [13, 14].



Εικόνα 6: Μοριακός χαρακτηρισμός υπότυπων γαστρικών καρκινωμάτων [14].

Οι όγκοι που είναι θετικοί στον ιό Epstein-Barr (EBV) εντοπίζονται ως επί το πλείστον στον γαστρικό θόλο ή στο σώμα και χαρακτηρίζονται από απουσία εντερικής μεταπλασίας [15]. Αυτός ο υπότυπος χαρακτηρίζεται από υψηλό φορτίο EBV, υψηλή υπερμεθυλίωση του DNA σε περιοχές υποκινητών, επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* (phosphatidylinositol 3-kinase), μεταλλάξεις στα γονίδια *ARID1A* (AT-rich interactive domain-containing protein 1A) και *BCOR* (B-cell lymphoma 6 corepressor), υπερέκφραση του γονιδίου *PD-L1/2* (programmed death ligand-1/2) και ενίσχυση των γονιδίων *JAK2* (Janus-associated kinase 2) και *ERBB2* (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2) [10]. Αυτός ο μοριακός υπότυπος οφείλεται σε μόλυνση από τον EBV. Η πρώιμη είσοδος του ιού

σε ένα μόνο κύτταρο ξενιστή οδηγεί σε κλωνική επέκταση και ανάπτυξη καρκίνου. Εννέα καλά χαρακτηρισμένα ιικά γονίδια εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στον EBV-θετικό γαστρικό καρκίνο και μερικά από αυτά έχουν ογκογόνο δράση [16].

Οι όγκοι με αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI), βρέθηκαν σε ασθενείς με μεγαλύτερη ηλικία και έχουν προδιάθεση για εντοπισμό στο άντρο του στομάχου. Αυτός ο υπότυπος οφείλεται κυρίως στη μεθυλίωση υποκινητή, που μπορεί να οδηγήσει σε μεταγραφική σίγαση του γονιδίου επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων στο DNA, του *MLH1*, με αποτέλεσμα μια μορφή γονιδιωματικής αστάθειας, γνωστής ως μικροδορυφορική αστάθεια [13, 17]. Σε αυτόν τον υπότυπο παρατηρούνται αυξημένα μεταλλάξεων και σχετίζονται με λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, καθώς και με εντερική μεταπλασία. Επίσης, και ο μοριακός υπότυπος EBV και ο MSI συνδέονται συχνότερα με την ιστολογία του εντερικού υπότυπου [16].

Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (GS), έχουν χαμηλό μεταλλαξογόνο φορτίο και σωματικές αλλαγές αριθμού αντιγράφων. Συνήθως έχουν ιστολογία διάχυτου υπότυπου και είναι εμπλουτισμένοι σε σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων *CDH1* (Cadherin 1) και *RHOA* (Ras Homolog Family Member A) και αναδιατάξεις των γονιδίων *CLDN18* (Claudin 18)-*ARHGAP* (Rho GTPase-activating protein) [18]. Οι μεταλλάξεις στο *RHOA* και οι αναδιατάξεις στα *CLDN18-ARHGAP* έχουν ως αποτέλεσμα τα ανόμοια μοτίβα ανάπτυξης και την έλλειψη κυτταρικής συνοχής, που είναι χαρακτηριστικά των διάχυτων όγκων [10].

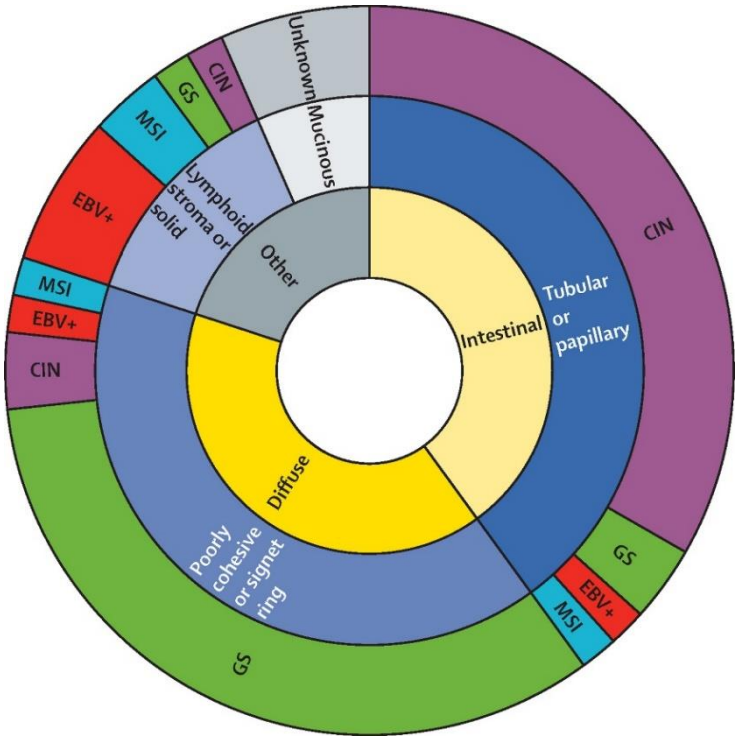
Οι χρωμοσωμικά ασταθείς όγκοι (CIN), βρίσκονται πιο συχνά στη γαστροοισοφαγική εντομή/καρδία και εμφανίζουν ιστολογία εντερικού υπότυπου. Χαρακτηρίζονται από έντονη ανευπλοειδία και ενεργοποίηση του μονοπατιού του υποδοχέα κινάση τυροσίνης-Ras (RTK/RAS) [16]. Ακόμη σε αυτούς εντοπίζεται ενίσχυση των γονιδίων *ERBB2* (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 ή HER2), *KRAS* (Kirsten rat sarcoma virus), *EGFR* (epidermal growth factor receptor), *ERBB3* (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3), *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor 2) και *MET* (mesenchymal epithelial transition factor receptor) [10, 19]. Επιπλέον, αυτός ο υπότυπος εμφανίζει υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *TP53* (Tumor protein 53) και ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν για ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως οι κυκλίνες E1, D1 (*CCNE1, CCND1*) και η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 6 (*CDK6*) [16].

Αν και η ομάδα του TCGA μπόρεσε να οριοθετήσει τέσσερις μοριακά διακριτούς υπότυπους γαστρικού καρκίνου, δεν σημειώθηκε κάποια σχετική διαφορά των υπότυπων ως προς την επιβίωση και την κλινική πρόγνωση. Έτσι η ερευνητική κοινοπραξία του Asian Cancer Research Group (ACRG), επεκτάθηκε στην ανάλυση του TCGA, πραγματοποιώντας πρόσθετες αναλύσεις έκφρασης και συσχέτισε τα αποτελέσματα, με κλινικά αποτελέσματα, τα οποία περιλάμβαναν την υποτροπή και την επιβίωση [10, 20]. Το ACRG πρότεινε επίσης μια ταξινόμηση τεσσάρων ομάδων, τους όγκους με υψηλή αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI-high - microsatellite instability-high), τους όγκους με σταθερούς μικροδορυφόρους και με φαινότυπο επιθυλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (MSS/EMT - microsatellite stable and epithelial to mesenchymal transition phenotype), τους όγκους με σταθερούς μικροδορυφόρους και παρουσία του TP53 (MSS/TP53+ - microsatellite stable and presence of TP53 signature) και τους όγκους με σταθερούς μικροδορυφόρους και απουσία του TP53 (MSS/TP53- - microsatellite stable and loss of TP53 signature) [12].

Επειδή οι δύο προηγούμενες μοριακές ταξινομήσεις χρησιμοποιούν προηγμένες μοριακές τεχνικές που δεν είναι εφικτές στην πράξη για μεμονωμένες θεραπευτικές αποφάσεις, η Setia και οι συνεργάτες [21], πρότειναν τεχνικές που είναι διαθέσιμες στη συνήθη διαγνωστική πρακτική, όπως ο *in situ* υβριδισμός και η ανοσοϊστοχημεία και με βάση αυτές εντόπισαν πέντε ομάδες γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων. Οι ομάδες είναι, όγκοι θετικοί για EBV (EBV-positive), όγκοι με έλλειψη

επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων (mismatch repair-deficient), όγκοι με αλλαγμένη έκφραση της E-καδερίνης (aberrant E-cadherin), όγκοι με αλλαγμένη έκφραση του p53 (aberrant p53) και όγκοι με φυσιολογική έκφραση του p53 (normal p53) [12].

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, οι μοριακές ταξινομήσεις επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό με τις μορφολογικές και ιστολογικές ταξινομήσεις [22].



Εικόνα 7: Γραφική απεικόνιση αλληλοκαλυπτόμενων ταξινομήσεων [22].

1.1.3 Μέθοδοι διάγνωσης γαστρικού καρκίνου

Η αρχική διάγνωση του γαστρικού καρκίνου συχνά καθυστερεί επειδή έως και το 80% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί κατά τα πρώιμα στάδια του καρκίνου του στομάχου [23]. Η δυσπεψία, η ανορεξία, η απώλεια βάρους και ο κοιλιακός πόνος είναι τα πιο τυπικά συμπτώματα που συνδέονται με τον καρκίνο του στομάχου. Ο εγγύς γαστρικός καρκίνος ή όγκοι κοντά στη γαστροοισοφαγική συμβολή μπορεί να προκαλέσουν δυσφαγία ή παλινδρόμηση. Οι αιμορραγικοί καρκίνοι μπορεί να προκαλέσουν αναιμία. Εάν υπάρχουν συμπτώματα κατά τη στιγμή της διάγνωσης, η ασθένεια είναι συχνά προχωρημένη και ανίατη [22].

Η πιο κοινή μέθοδος διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου είναι η ενδοσκοπική εξέταση, κατά την οποία εντοπίζεται η θέση του όγκου μέσα στο στομάχι και προσδιορίζεται η μορφολογία του, ενώ λαμβάνονται βιοψίες για ιστολογική επιβεβαίωση [22]. Αυτές οι επεμβατικές, ενδοσκοπικές εξετάσεις περιλαμβάνουν την οισοφαγο-γαστρο-δωδεκαδακτυλοσκόπηση (EGD), επίσης γνωστή ως ενδοσκόπηση ανώτερου πεπτικού ή γαστροσκόπηση και το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS). Με την γαστροσκόπηση γίνεται έλεγχος στο εσωτερικό του στόμαχου για ανωμαλίες, όπως όγκους, έλκη και φλεγμονές. Επίσης δίνει την δυνατότητα για συλλογή βιοψιών μη φυσιολογικού ιστού και ο ιστός αναλύεται στο εργαστήριο για να αναζητηθούν εστίες καρκίνου [24].

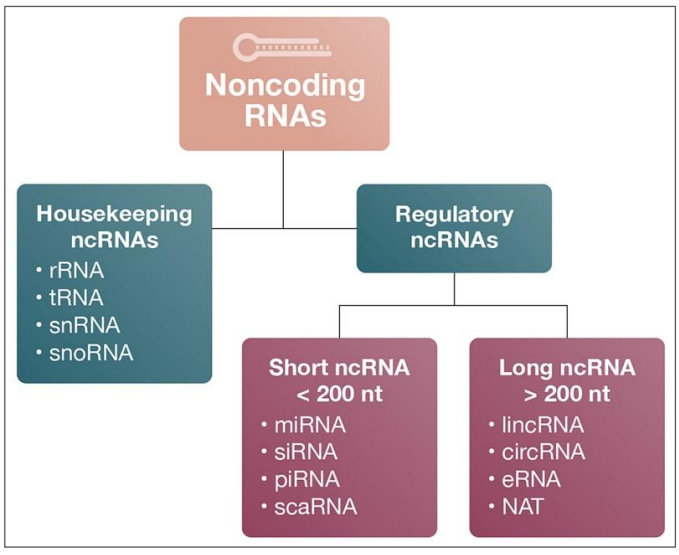
Επιπλέον, απεικονιστικές εξετάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση του καρκίνου του στομάχου. Αυτές περιλαμβάνουν την αξονική τομογραφία (CT), την μαγνητική τομογραφία (MRI), την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων/αξονική τομογραφία (PET/CT), το υπερηχογράφημα και τις εξετάσεις με ακτίνες Χ της γαστρεντερικής οδού (Upper gastrointestinal series) ή αλλιώς ακτινογραφία με χρήση βαρίου [24].

Ακόμη, χρησιμοποιούνται κάποιοι παραδοσιακοί καρκινικοί δείκτες στον ορό του αίματος, για την διάγνωση του γαστρικού καρκίνου, όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), τα υδατανθρακικά αντιγόνα 72-4 (CA 72-4), 19-9 (CA 19-9), 15-3 (CA 15-3) και 12-5 (CA 12-5) και τα πεψινογόνα. Όμως αυτοί οι δείκτες αν και μπορούν να βρεθούν σε αυξημένα επίπεδα στον γαστρικό καρκίνο, δεν προσφέρουν ευαισθησία, ούτε ειδικότητα και είναι συνήθως αυξημένοι στα τελευταία στάδια της νόσου [25].

Πλέον έχουν εμφανιστεί μια ποικιλία άλλων αναλύσεων βιοδεικτών με βάση το αίμα, που συχνά αναφέρονται ως υγρές βιοψίες. Αυτές είναι δείγματα αίματος ή άλλων βιολογικών υγρών που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση καρκινικών κυττάρων ή μορίων που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα [25]. Οι πιο συνηθισμένοι αναλύτες στις υγρές βιοψίες είναι, το DNA όγκου που κυκλοφορεί εκτός των κυττάρων (ctDNA - cell-free circulating tumour DNA), τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs - circulating tumour cells), δείκτες μεθυλίωσης, μόρια mRNA, miRNA, lncRNA εκτός των κυττάρων (cell-free mRNA, miRNA, lncRNA) και τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs - extracellular vesicles) [22, 25, 26].

1.2 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA

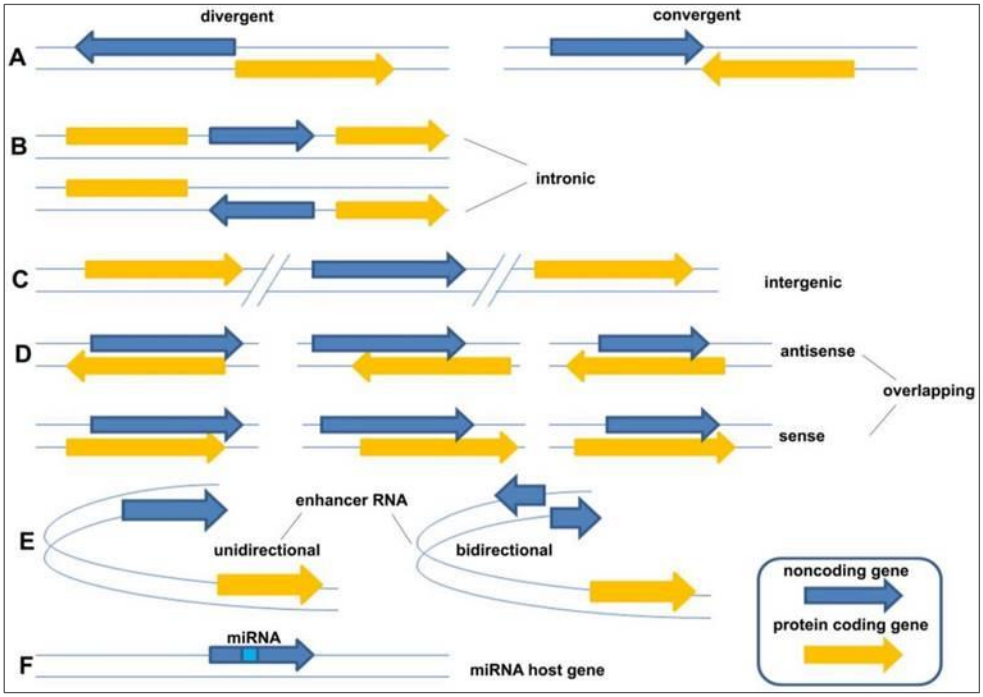
Η παραδοσιακή έννοια των γονιδίων και το τι αποτελεί μια λειτουργική περιοχή του γονιδιώματος έχουν τεθεί υπό αμφισβήτηση από την παρουσία των μη κωδικοποιητικών RNA (ncRNAs). Τα μετάγραφα που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αναφέρονται ως μη κωδικοποιητικά RNA [27]. Ενώ τα ncRNA σχετίζονται με το ότι δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, διαφέρουν σημαντικά στη βιογένεση, το μέγεθος και τη λειτουργία τους [28]. Τα ncRNA ταξινομούνται σε RNA που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία (housekeeping) και ρυθμιστικά RNA, με βάση τους αντίστοιχους ρόλους τους. Τα ρυθμιστικά ncRNA ταξινομούνται με βάση το μήκος νουκλεοτιδίων είτε ως μικρά ncRNA (< 200 nt) είτε ως μακρά ncRNA (> 200 nt) (Εικόνα 8) [29, 30].



Εικόνα 8: Ταξινόμηση των ncRNA [29].

1.2.1 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των lncRNA

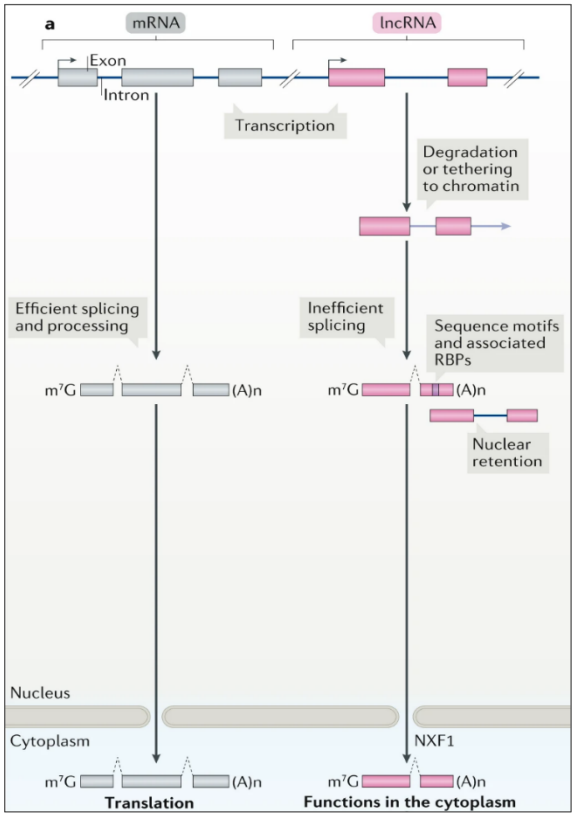
Ως μακρό μη κωδικοποιητικό RNA (lncRNA – long non coding RNA) ορίζεται ως ένα λειτουργικό RNA που δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνες, μήκους μεγαλύτερου από 200 nt, το οποίο αντιστοιχεί σε ένα κατώφλι στη βιοχημική κλασμάτωση, που αποκλείει όλες τις γνωστές κατηγορίες των μικρών RNA [31]. Εκτός από το μήκος του μεταγράφου, τα lncRNAs μπορούν να ταξινομηθούν, βάσει συσχέτισης με χαρακτηρισμένα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή συσχέτισης με άλλα στοιχεία DNA γνωστής λειτουργίας, με βάση την ομοιότητα με mRNA, την συσχέτιση με επαναλήψεις, μια βιοχημική οδό ή την σταθερότητα, τη διατήρηση της αλληλουχίας ή της δομής, τις βιολογικές καταστάσεις, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη λειτουργία [32]. Ένας βασικός τρόπος ταξινόμησης των lncRNA είναι με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα, που τα διαχωρίζει σε οκτώ κατηγορίες, στα αποκλίνοντα και συγκλίνοντα, τα ιντρονικά, τα μεσογονιδιακά, τα επικαλυπτόμενα νοηματικά και αντινοηματικά, τα RNA από ενισχυτές (μονής κατεύθυνσης ή αμφίδρομα) και τα γονίδια που περιέχουν miRNA (Εικόνα 9) [33].



Εικόνα 9: Ταξινόμηση των lncRNA με βάση την θέση τους στο γονιδίωμα [33].

Τα περισσότερα lncRNA μεταγράφονται από την πολυμεράση II του RNA (RNA Pol II). Τα μετάγραφά τους συχνά καλύπτονται από 7-μεθυλογουανοσίνη στα 5' άκρα τους, πολυαδενυλιώνονται στα 3' άκρα τους και ματίζονται παρόμοια με τα mRNA. Σε αντίθεση με τα mRNA, πολλά lncRNA υφίστανται αναποτελεσματική επεξεργασία και διατηρούνται στον πυρήνα, ενώ άλλα ματίζονται και εξάγονται στο κυτταρόπλασμα. Τα lncRNA που περιέχουν ένα ή λίγα εξόνια εξάγονται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 10) [34]. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη βιογένεση των lncRNA είναι ειδικοί για τον κυτταρικό τύπο και ελέγχονται από ειδικά σήματα. Υποβάλλονται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και δια-/ενδο-κυτταρική μεταφορά. Τα περισσότερα από αυτά έχουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και κυρίως πυρηνικό εντοπισμό, σε αντίθεση με τα mRNA. Μόλις μεταγραφούν, τα lncRNA αναδιπλώνονται σε μια θερμοδυναμικά σταθερή δευτεροταγή δομή [35]. Μάλιστα υπάρχει ισχυρή συσχέτιση της δομής των lncRNA με την λειτουργία τους [36]. Η αναδίπλωση των lncRNA ορίζει την κυτταρική αποικοδόμησή τους και τη λειτουργική τους ευελιξία, επιτρέποντας τον πυρηνικό εντοπισμό, τη σταθερότητα και την αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες [27].

Τα επίπεδα έκφρασης των lncRNA είναι εξαιρετικά ειδικά, σε χωροχρονικό, γενεαλογικό, ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο [27]. Τα lncRNA εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερο βαθμό εξειδίκευσης σε επίπεδο ιστού σε σύγκριση με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [37]. Η υψηλή ειδικότητα της έκφρασης των lncRNA υποστηρίζει τους σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους, που μπορούν να παίξουν σε διαφορετικά βιολογικά πλαίσια [27]. Η ακριβής ρυθμιστική τους αποτελεσματικότητα συνδέεται στενά με τα πρότυπα έκφρασης τους στους ιστούς, των οποίων η δυσλειτουργία συχνά επηρεάζει την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου [38].



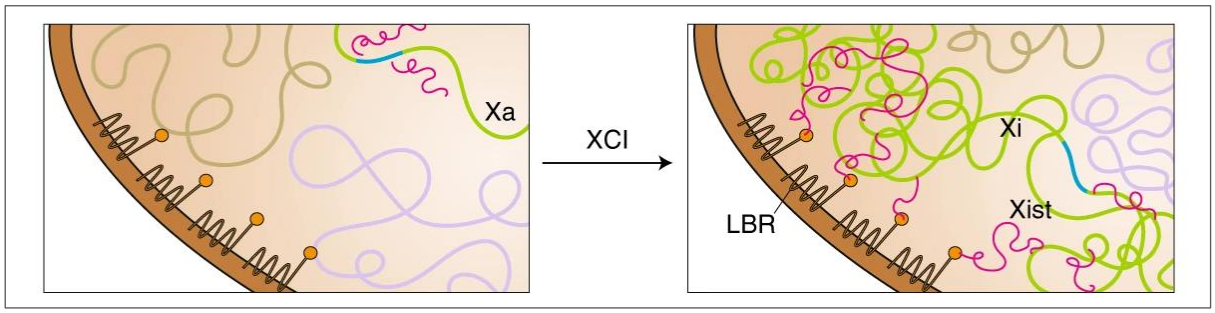
Εικόνα 10: Βιογένεση και κυτταρικές κατευθύνσεις των lncRNA [34].

1.2.2 Μοριακές λειτουργίες των lncRNA

Τα lncRNA παλαιότερα θεωρούνταν μεταγραφικός θόρυβος, αλλά πλέον αντιπροσωπεύουν ένα ξεχωριστό ρυθμιστικό στρώμα στη μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Όχι μόνο ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, αλλά τα lncRNA χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς για τη λειτουργία τους [27]. Κυρίως δρουν στον πυρήνα, όπου μπορούν να είναι σημαντικοί ρυθμιστές της πυρηνικής οργάνωσης και λειτουργίας. Όμως, ένας αριθμός lncRNA εξάγονται στο κυτταρόπλασμα, όπου ρυθμίζουν τη σταθερότητα του mRNA, τη μετάφραση και παρεμβαίνουν στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [39].

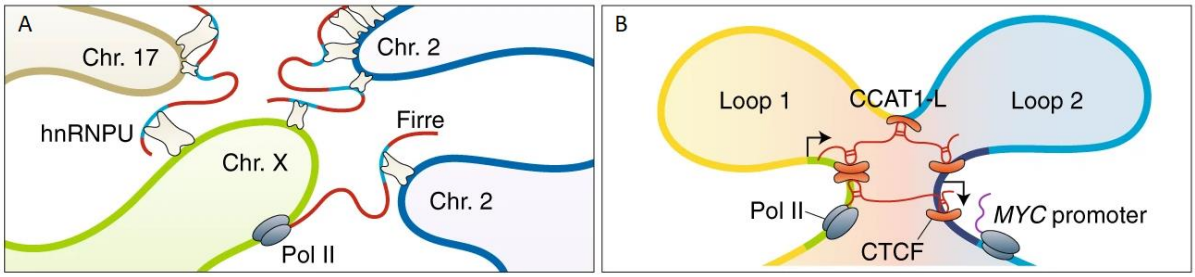
Λόγω της ικανότητάς τους να αλλάζουν την δομή της χρωματίνης, τα πυρηνικά εντοπιζόμενα lncRNA είναι σημαντικοί παράγοντες στον έλεγχο της μεταγραφής. Οι τροποποιήσεις των ιστονών, η μεθυλίωση του DNA και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης είναι κάποιες από τις λειτουργικές διαδικασίες, με τις οποίες τα lncRNA ελέγχουν τη δομή της χρωματίνης [27]. Η απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος είναι ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα της ρύθμισης της αρχιτεκτονικής των χρωμοσωμάτων από τα lncRNA [40]. Το lncRNA Xist (X inactive specific transcript) ρυθμίζει την αρχιτεκτονική του ανενεργού χρωμοσώματος Χ (Xi) κατά την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος Χ

(XCI) στρατολογώντας το Xi για να συσχετιστεί με τον υποδοχέα της λαμινίνης B (LBR) στο πυρηνικό έλασμα για να σιγήσει τη μεταγραφή του (Εικόνα 11) [39, 41].



Εικόνα 11: Ρύθμιση της αρχιτεκτονικής του χρωμοσώματος X από το lncRNA Xist [39].

Επίσης, τα lncRNA ρυθμίζουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης, μέσω της δημιουργίας δια- και ενδο-χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων. Το lncRNA FIRRE (functional intergenic repeating RNA element), μέσω των μοτίβων πρόσδεσης του με την πρωτεΐνη hnRNPU (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U), λειτουργεί ως ικρίωμα για τη ρύθμιση διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 12.A) [42]. Επιπλέον, το lncRNA CCAT1-L (colorectal cancer associated transcript 1, long isoform), μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα πρόσδεσης σε CCCTC (CTCF), ρυθμίζει ενδοχρωμοσωμικούς βρόχους μεταξύ ενισχυτών και υποκινητών (Εικόνα 12.B) [39, 43].

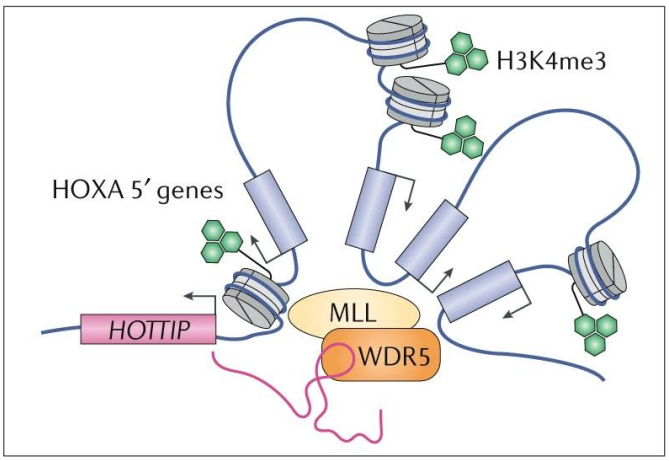


Εικόνα 12: Ρύθμιση των δια- και ενδο-χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων από τα lncRNA FIRRE (A) και CCAT1-L (B) [39].

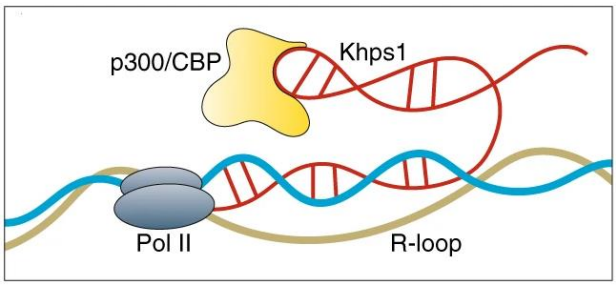
Πολλά lncRNA εντοπίζονται στη χρωματίνη, όπου μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες, διευκολύνοντας ή αναστέλλοντας τη σύνδεση και τη δραστηριότητά τους σε στοχευμένες περιοχές DNA. Τα lncRNA μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τροποποιητές χρωματίνης και να τους στρατολογήσουν σε υποκινητές γονιδίων προκειμένου να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν τη μεταγραφή τους [34]. Ρυθμίζουν την επιγενετική τροποποίηση, επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο ρυθμίζοντας την τροποποίηση των ιστόνων ή του DNA, κυρίως τη μεθυλίωση και την ακετυλίωση, είτε κατά μόνας, είτε λειτουργώντας ως ικρίωμα που αλληλεπιδρά με ένζυμα ή σύμπλοκα μεθυλίωσης και ακετυλίωσης [44]. Για παράδειγμα, το lncRNA HOTTIP (HOXA transcript at the distal tip) δρα *in cis* στα γονίδια στο 5' άκρο του συμπλέγματος γονιδίων HOXA, μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη WDR5 (WD repeat-containing protein 5), στοχεύοντας έτσι το σύμπλοκο WDR5-MLL (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia) στους υποκινητές των γονιδίων HOXA και προάγει την τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στην λυσίνη 4 (H3K4me3) (Εικόνα 13) [34, 45].

Ακόμη, τα lncRNA μπορούν να ρυθμίσουν άμεσα τη μεταγραφή σχηματίζοντας δομές R-βρόχου, που είναι δομές νουκλεϊκών οξέων τριπλής έλικας με RNA υβριδοποιημένο σε δίκλωνο DNA, για τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων (TFs). Ο τοπικός σχηματισμός R-βρόχων μπορεί να προσδένει το lncRNA και αυτό να στρατολογήσει συμπαράγοντες της μεταγραφής σε αντίστοιχες περιοχές του υποκινητή. Για παράδειγμα, το lncRNA Khps1 ενισχύει τη μεταγραφή από την

πολυμεράση του RNA II, σχηματίζοντας έναν R-βρόχο που αγκυροβολεί τον μεταγραφικό παράγοντα p300/CBP, που αλληλεπιδρά με το Khps1, στον υποκινητή SPHK1 (Εικόνα 14) [39, 46].

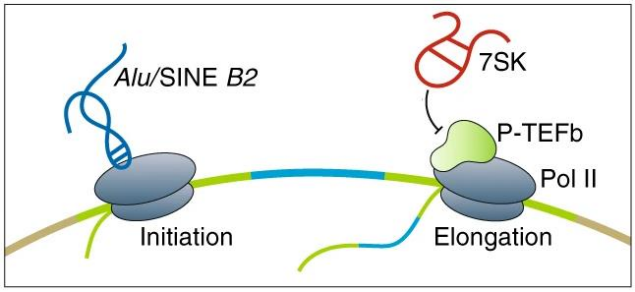


Εικόνα 13: Δράση του lncRNA HOTTIP στην μεθυλίωση ιστονών [34].



Εικόνα 14: Δημιουργία R-βρόχου από το lncRNA Khps1 [39].

Εκτός από την δημιουργία R-βρόχων, τα lncRNA μπορούν να ρυθμίζουν την μεταγραφή παρεμβαίνοντας στην ίδια την πολυμεράση ΙΙ του RNA. Το RNA *Alu*, ενσωματώνεται στα σύμπλοκα της πολυμεράσης ΙΙ σε υποκινητές και εμποδίζει την έναρξη της μεταγραφής. Επίσης, το RNA 7SK συνδέεται με τον παράγοντα επιμήκυνσης μεταγραφής b (P-TEFb) και καταστέλλει τη δραστηριότητα κινάσης του, η οποία απαιτείται για την επιμήκυνση του RNA από την πολυμεράση ΙΙ (Εικόνα 15) [39, 47].

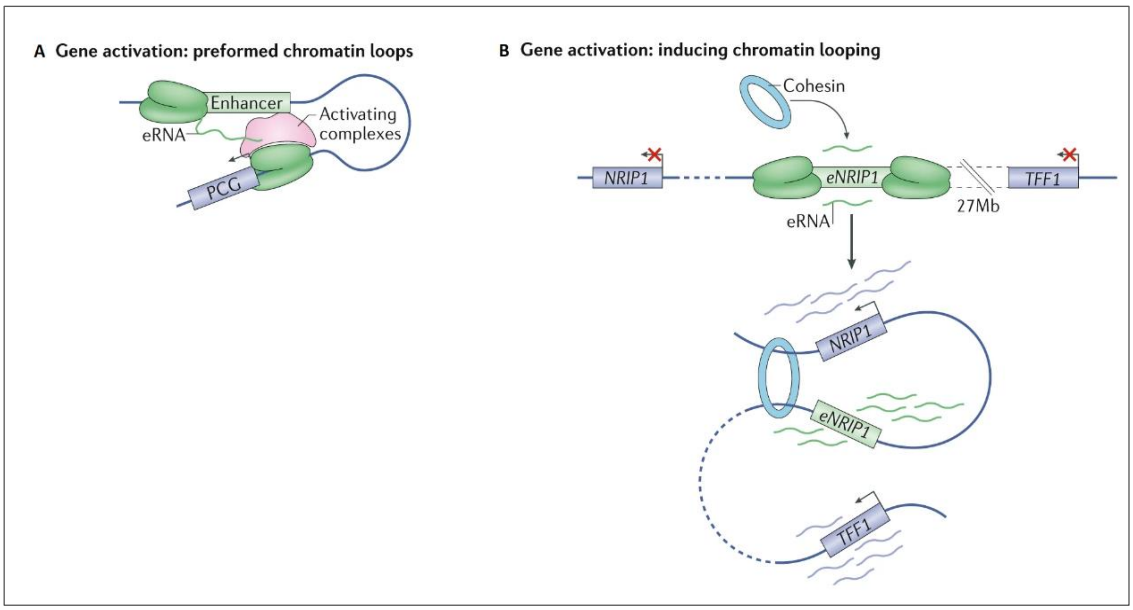


Εικόνα 15: Παρεμβολή των lncRNA στην μεταγραφή από την Pol II τόσο στο στάδιο έναρξης όσο και της επιμήκυνσης (τροποποιημένη από [39]).

Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο τα πυρηνικά lncRNA ρυθμίζουν την μεταγραφή, είναι τα lncRNA που μεταγράφονται από ενισχυτές. Οι ενεργοί ενισχυτές μπορούν να μεταγραφούν σε δύο κύριους τύπους μη κωδικοποιητικών RNA, τα eRNAs και τα lncRNA που σχετίζονται με ενισχυτές (elncRNAs) [48]. Αυτού του είδους τα lncRNA, μπορούν να προάγουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (PCGs) που βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση με τους ενισχυτές τους, μέσω προσχηματισμένων βρόχων χρωματίνης, επιτρέποντας τη στρατολόγηση συμπλεγμάτων που ενεργοποιούν τη χρωματίνη στους υποκινητές των γονιδίων (Εικόνα 16.Α) [34]. Επίσης, ορισμένα eRNA και elncRNA ρυθμίζουν απομακρυσμένα γονίδια προάγοντας άμεσα τον σχηματισμό βρόχων χρωματίνης μέσω της στρατολόγησης παραγόντων δημιουργίας βρόχων, όπως η cohesin (Εικόνα 16.Β) [34].

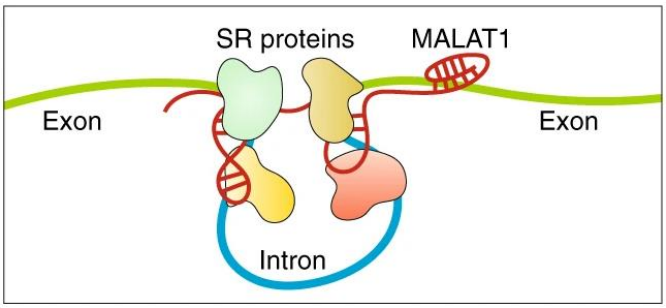
Εντός του πυρήνα τα lncRNA, εκτός από την ρύθμιση της μεταγραφής, έχουν κομβικό ρόλο στην δομική και λειτουργική οργάνωση της χρωματίνης. Στον πυρήνα δημιουργούνται, δυναμικά σύμπλοκα RNA-πρωτεΐνης χωρίς μεμβράνη, που εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, και ονομάζονται πυρηνικά σωμάτια (NBs - nuclear bodies) ή πυρηνικά συμπυκνώματα (nuclear condensates). Λόγω της δυνατότητάς τους να λειτουργούν ως ικριώματα ή λόγω των ρυθμιστικών

τους ικανοτήτων, αρκετά υψηλά εκφραζόμενα lncRNA, που ονομάζονται «αρχιτεκτονικά RNA», είναι απαραίτητα για τη συναρμολόγηση και τη λειτουργία διαφορετικών πυρηνικών συμπυκνωμάτων [34, 39].



Εικόνα 16: Ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων από τα eRNA και elncRNA (τροποποιημένη από [34]).

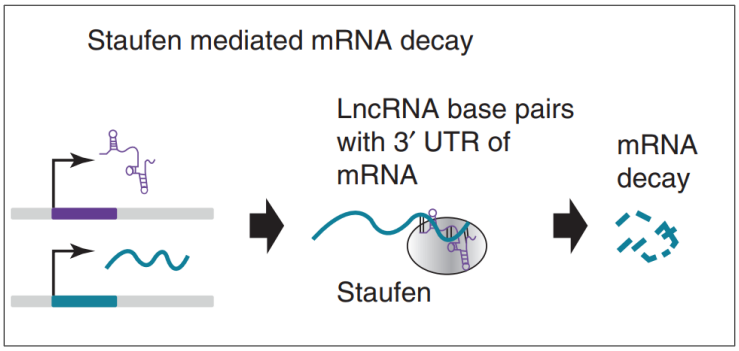
Εκτός από τους ρόλους τους στη ρύθμιση της μεταγραφής και την πυρηνική οργάνωση, τα lncRNA ελέγχουν επίσης και τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Το lncRNA MALAT1 (Metastasis-associated lung carcinoma transcript 1) αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες SR, που εμπλέκονται στο μάτισμα και μεταβάλλει τη φωσφορυλίωση τους για να προκαλέσει το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA (Εικόνα 17) [39, 49].



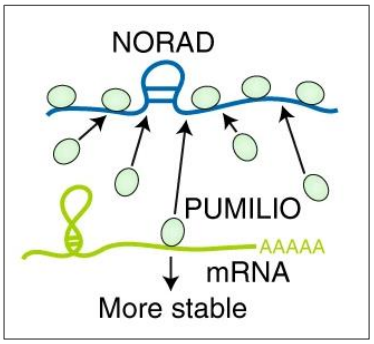
Εικόνα 17: Επίδραση του lncRNA MALAT1 στο μάτισμα του mRNA [39].

Όσον αφορά την δράση τους στο κυτταρόπλασμα, τα lncRNA μπορούν να ρυθμίσουν τη σταθερότητα του mRNA στρατολογώντας πρωτεΐνες για την αποικοδόμησή του. Για παράδειγμα, τα lncRNA που περιέχουν στοιχεία *Alu,* μπορούν να ενεργοποιήσουν τη αποικοδόμηση του mRNA, που προκαλείται από την πρωτεΐνη Staufen 1 (STAU1) (SMD) [50]. Τα mRNA που περιέχουν στοιχεία *Alu* εντός 3'-UTRs τους, μπορούν να υβριδίσουν με συμπληρωματικά στοιχεία *Alu* στα lncRNA για να σχηματίσουν δίκλωνα RNA, μια δομή που αναγνωρίζεται από το STAU1 (Εικόνα 18) [27, 39].

Επιπλέον, τα lncRNA μπορούν να λειτουργήσουν ως μοριακά δολώματα για τις πρωτεΐνες που προσδένονται με το RNA (RBPs), που εμπλέκονται στη διάσπαση του mRNA. Για παράδειγμα, το lncRNA NORAD (noncoding RNA activated by DNA damage), δρα ως δόλωμα για τις πρωτεΐνες PUMILIO 1 και PUMILIO 2 (PUM1/2) στο κυτταρόπλασμα, για να περιορίσει τη διαθεσιμότητά τους για αποικοδόμηση των mRNA στόχων (Εικόνα 19) [39, 51].

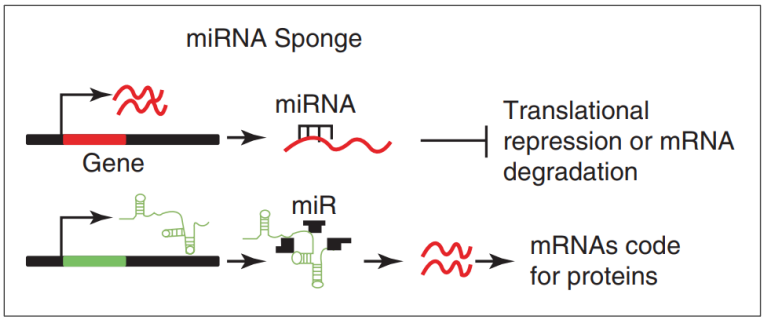


Εικόνα 18: Αποικοδόμηση mRNA που προκαλείται από την πρωτεΐνη Staufen 1 [27].



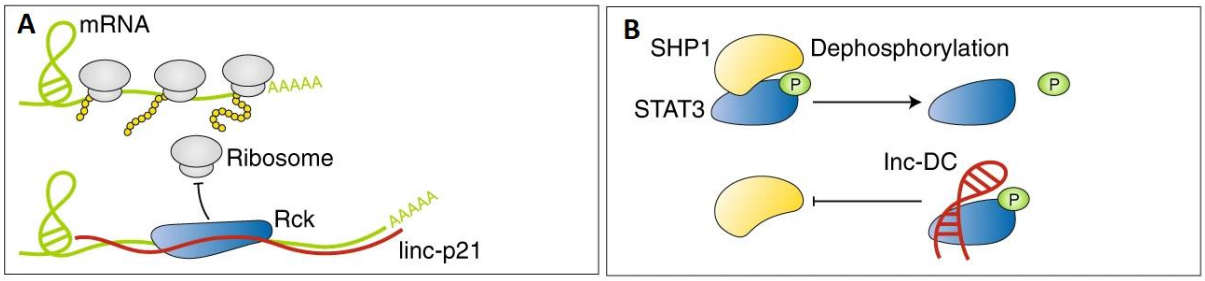
Εικόνα 19: Σταθεροποίηση των mRNA από το lncRNA NORAD μέσω απομάκρυνσης των PUM1/2 από τα mRNA [39].

Ορισμένα lncRNA που φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες με microRNA (miRNA) μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων. Δρουν ως ανταγωνιστικά ενδογενή RNA ή «σπόγγοι» των miRNA, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα των miRNA στα mRNA στόχους τους (Εικόνα 20) [27, 34, 52].



Εικόνα 20: Δράση των lncRNA ως «σπόγγοι» των miRNA [27].

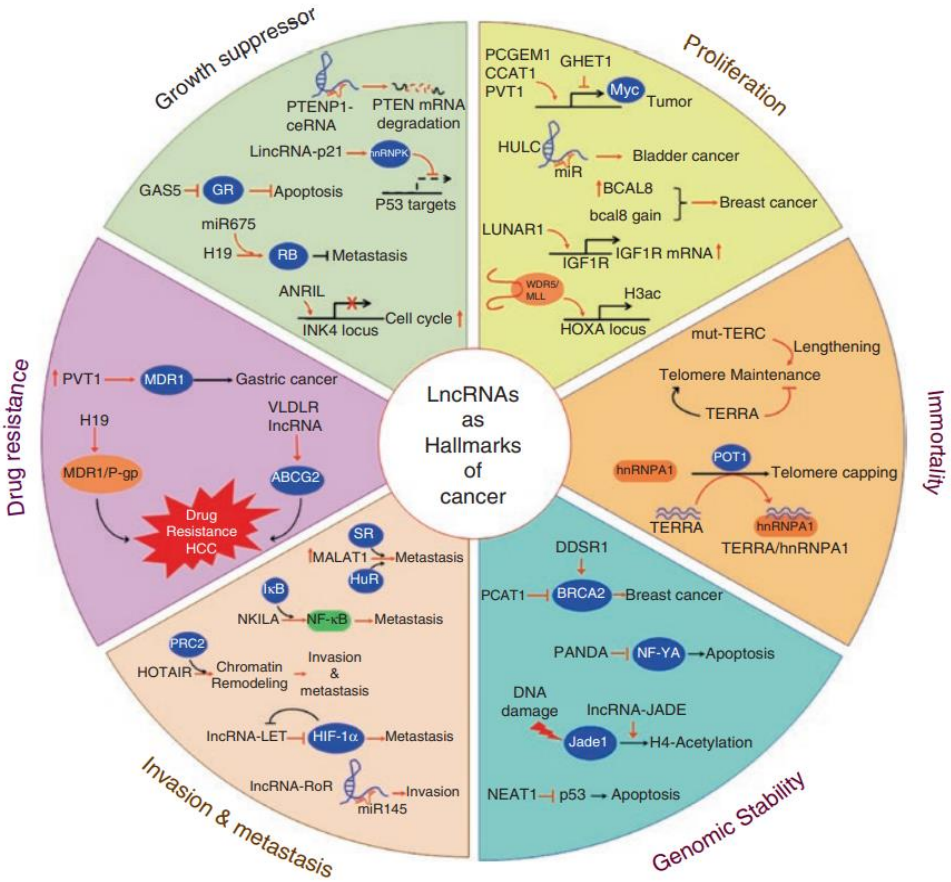
Τέλος, τα lncRNA έχουν ρόλο και στην ρύθμιση της μετάφρασης και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Το lincRNA-p21 συσχετίζεται με μόρια mRNA μέσω συμπληρωματικών βάσεων, για να καταστείλει τη μετάφρασή τους στρατολογώντας τον καταστολέα μετάφρασης Rck (Εικόνα 21.A) [44, 53]. Επιπλέον, ένα άλλο κυτταροπλασματικό lncRNA, το lnc-DC, ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση του STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), καθώς συνδέεται άμεσα με τον STAT3 και προάγει τη φωσφορυλίωση, αποτρέποντας τη δέσμευση της φωσφατάσης τυροσίνης SHP1 (Εικόνα 21.B) [39, 54].



Εικόνα 21: Ρόλος των lncRNA στην μετάφραση και στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (τροποποιημένη από [39]).

1.2.3 Ρόλος των lncRNA στον καρκίνο

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA, όπως φάνηκε από τους ποικίλους μοριακούς τους ρόλους, είναι κύρια στοιχεία του μεταγραφόματος και αναδύονται ως κεντρικός παίκτης που ελέγχει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς [27]. Πολλά lncRNA έχουν συσχετιστεί λειτουργικά με ανθρώπινες ασθένειες, ιδιαίτερα με τον καρκίνο [55]. Η απορρύθμιση των lncRNA ασκεί επιπτώσεις στις κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αντίσταση στην απόπτωση, η επαγωγή της αγγειογένεσης και η προώθηση της μετάστασης [56]. Στον καρκίνο, τα lncRNA ως ένα πολύ σημαντικό επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης, λειτουργούν τόσο ως ογκογονίδια όσο και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια [57]. Σύμφωνα με το Lnc2Cancer 3.0, το οποίο είναι μια βάση δεδομένων που παρέχει πειραματικά υποστηριζόμενες συσχετίσεις μεταξύ των lncRNA και του ανθρώπινου καρκίνου, υπάρχουν 2.659 ανθρώπινα lncRNA που συνδέονται με 216 υπότυπους καρκίνου [58]. Τα lncRNA εμπλέκονται στην απόκτηση κάθε ορόσημου των καρκινικών κυττάρων, από την εγγενή ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης, έως τη σχέση με το μικροπεριβάλλον του όγκου (Εικόνα 22) [27, 56, 59].



Εικόνα 22: Ορόσημα του καρκίνου και συσχετιζόμενα lncRNA [27].

Όσον αφορά τη σχέση των lncRNA με τον καρκίνο, ο γαστρικός καρκίνος δεν αποτελεί εξαίρεση. Πολλές μελέτες έχουν δείξει, ότι η έκτοπη έκφραση πολλών lncRNA, ρυθμίζει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του στομάχου, τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την εισβολή, τη μετανάστευση, τη μετάσταση και την ογκογονικότητα [60]. Σε μοριακό επίπεδο, στον γαστρικό καρκίνο τα lncRNA συμμετέχουν με τους περισσότερους από τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Και στον γαστρικό καρκίνο λοιπόν, τα lncRNA δρουν σε μια ποικιλία επιγενετικών μηχανισμών στρατολογώντας τροποποιητές χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένων των τροποποιήσεων ιστόνων, της μεθυλίωσης του DNA και της

αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [61]. Επίσης, τα lncRNA μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα mRNA και όχι μόνο μπορούν να ρυθμίσουν τη μετάφραση τους, αλλά και να λειτουργήσουν ως «σπόγγοι» των miRNA για να αποτρέψουν την καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ακόμη, στον καρκίνο τα lncRNA μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τις πρωτεΐνες, επηρεάζοντας την πρωτεϊνική δραστηριότητα, τον εντοπισμό ή ως δομικά συστατικά [59, 62]. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός από λανθασμένα εκφραζόμενα lncRNA, βρέθηκε ότι εμπλέκεται στην αντίσταση στα φάρμακα στον γαστρικό καρκίνο μέσω διαφόρων μηχανισμών [63].

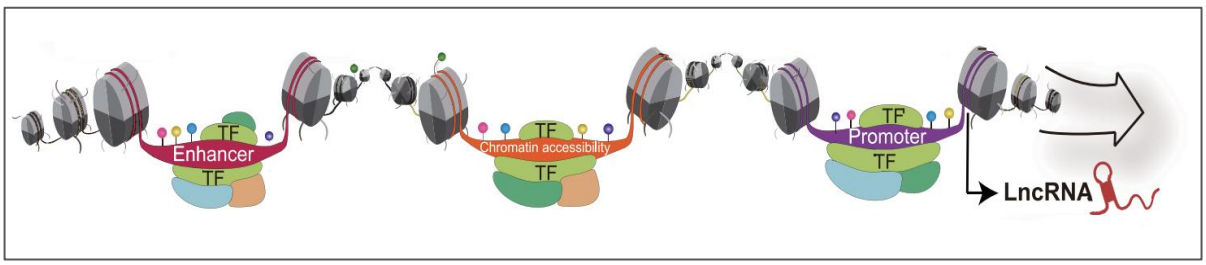
Όπως έχει αναφερθεί, τα lncRNA εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς τους ιστούς στους οποίους εκφράζονται, σε σύγκριση με τα mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και το χαρακτηριστικό τους αυτό τα καθιστά ελκυστικά στην αναζήτηση νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών του καρκίνου, ιδίως σε δείγματα σωματικών υγρών [64]. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι το lncRNA PCA3, το οποίο έχει εγκριθεί για κλινική χρήση ως ένας βιοδείκτης για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη. LncRNA ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί βιοδείκτες, έχουν αναφερθεί και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του ήπατος και του οισοφάγου [65].

Επειδή η πλειονότητα των ασθενών με γαστρικό καρκίνο διαγιγνώσκεται σε μη ιάσιμο τελικό στάδιο, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να εντοπιστούν αποτελεσματικοί βιοδείκτες για την πρώιμη νόσο. Τα lncRNA μπορούν να ανιχνευθούν σε μια εξαιρετικά σταθερή μορφή στο πλάσμα και επομένως θεωρούνται ως μη επεμβατικοί και πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου [59, 62]. Πολλά lncRNA στο πλάσμα έχουν αναγνωριστεί ως διαγνωστικοί βιοδείκτες του γαστρικού καρκίνου [66]. Για παράδειγμα τα lncRNA HOTAIR, H19 και B3GALT5-AS1, έχει βρεθεί ότι εντοπίζονται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα των ασθενών με γαστρικό καρκίνο σε σύγκριση με αυτό των υγιών ατόμων. Ακόμη, lncRNA σε εξωσώματα έχουν αναγνωριστεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου, λόγω της ενδοκυτταρικής προέλευσής τους και των υψηλών ποσοτήτων στο πλάσμα [67].

Τέλος, τα lncRNA παίζουν κρίσιμους ρόλους σε όλες σχεδόν τις πτυχές της εξέλιξης του γαστρικού καρκίνου, υποδηλώνοντας τη μεγάλη κλινική τους αξία ως προγνωστικοί στόχοι ή θεραπευτικοί παράγοντες σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο. Η στόχευση αυτών των lncRNA μπορεί να προσφέρει νέες πληροφορίες για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών [63, 67].

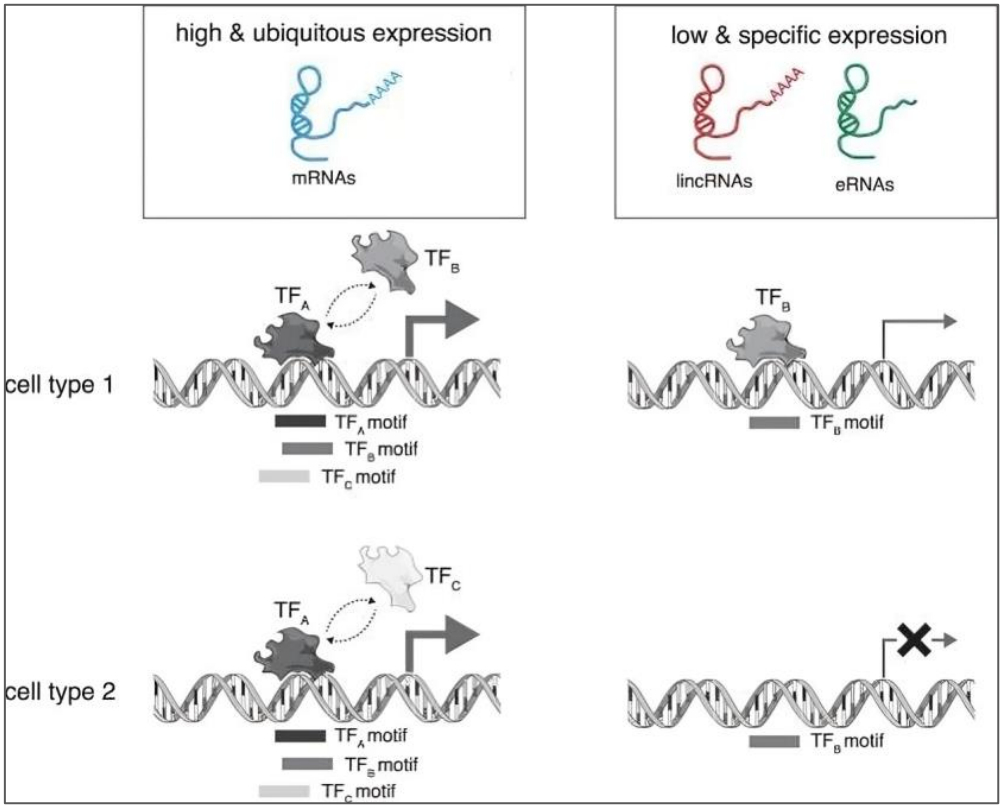
1.3 Ρυθμιστικά στοιχεία των lncRNA

Η έκφραση των lncRNA ρυθμίζεται από μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [68]. Όπως και στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, το κύριο ρυθμιστικό στοιχείο της μεταγραφής των lncRNA είναι οι υποκινητές. Όμως, εκτός από τους υποκινητές, τα lncRNA ρυθμίζονται συχνά από ενισχυτές, υπερενισχυτές και άλλες μεταγραφικές ρυθμιστικές περιοχές, όπως οι περιοχές προσβασιμότητας χρωματίνης (Εικόνα 23) [69].



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση μερικών από των ρυθμιστικών στοιχείων των lncRNA (τροποποιημένη από [69]).

Η αρχιτεκτονική του βασικού υποκινητή είναι το κύριο στοιχείο που καθορίζει τον βαθμό έκφρασης των lncRNA. Και τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και τα lncRNA, έχουν συντηρημένες αλληλουχίες υποκινητών, όμως στους υποκινητές των lncRNA εντοπίζονται λιγότερα επικαλυπτόμενα μοτίβα δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων [70]. Τα επικαλυπτόμενα μοτίβα δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές συνδέονται με υψηλή έκφραση και χαμηλή ειδικότητα των περισσότερων mRNA. Στους υποκινητές των γονιδίων που παράγουν mRNA, υπάρχουν περισσότερες επικαλυπτόμενες θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων και επομένως περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να συνδεθούν τόσο εντός ενός συγκεκριμένου τύπου κυττάρου όσο και μεταξύ των τύπων κυττάρων. Αντίθετα στους υποκινητές των γονιδίων που παράγουν lncRNA, υπάρχουν λιγότερα επικαλυπτόμενα μοτίβα και επομένως μόνο μερικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να συνδεθούν (Εικόνα 24) [71]. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να εξηγηθούν τα μικρότερα επίπεδα έκφρασης και η ιστοειδικότητα των περισσότερων lncRNA.

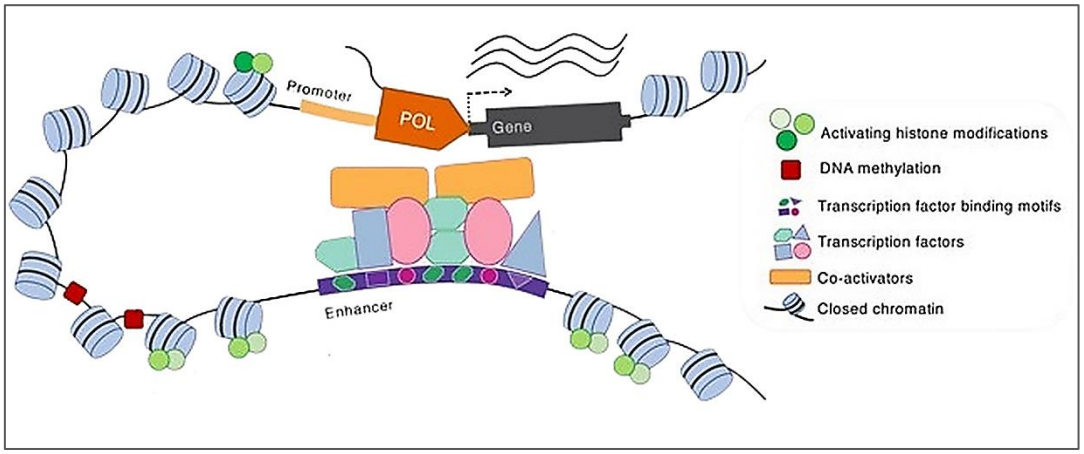


Εικόνα 24: Σύγκριση επικαλυπτόμενων μοτίβων δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων σε υποκινητές γονιδίων που παράγουν mRNA και lncRNA (τροποποιημένη από [71]).

Μία ακόμη διαφορά στους υποκινητές των γονιδίων που παράγουν lncRNA είναι, ότι μονο-, δι- και τρι-νουκλεοτιδικά μοτίβα πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη (A/T) είναι εμπλουτισμένα στους υποκινητές των γονιδίων των lncRNA, σε σχέση με τους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αντίθετα τα μονο-, δι- και τρι-νουκλεοτιδικά CpG μοτίβα υπερεκπροσωπούνται σε υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την παρατήρηση ότι οι πλούσιοι σε AT υποκινητές επιδεικνύουν χαμηλότερη έκφραση αλλά υψηλότερη εξειδίκευση σε επίπεδο ιστού, ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τους υποκινητές των lncRNA [72].

Το δεύτερο σημαντικό στοιχείο που επηρεάζει τη μεταγραφή των γονιδίων είναι οι ενισχυτές. Οι ενισχυτές είναι μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες στο γονιδίωμα που ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων στόχων που μεταγράφονται από την πολυμεράση II του RNA και μπορούν να δρουν

ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό, την απόσταση και τη θέση σε σχέση με το γονίδιο στόχο [73]. Κυρίως αποτελούνται από πυκνές ομάδες θέσεων δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων και δεσμεύονται από μεταγραφικούς παράγοντες ειδικούς για τον κυτταρικό τύπο, τροποποιητές χρωματίνης και πρωτεΐνες που καθορίζουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Το σύμπλεγμα του ενισχυτή σχηματίζει βρόγχους και έρχεται σε φυσική επαφή με τον υποκινητή στόχο και ενεργοποιεί τη μεταγραφή (Εικόνα 25) [74]. Πολλά lncRNA μπορούν επίσης να ρυθμιστούν από τέτοια στοιχεία ενισχυτών, τα οποία συμβάλλουν στη συνολική τους ιστοειδική έκφραση [70]. Επιπλέον, οι υπερενισχυτές είναι μια κατηγορία ρυθμιστικών περιοχών, όπου εντοπίζονται μεγάλες ομάδες ενισχυτών με ασυνήθιστα ισχυρό εμπλουτισμό για τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων, υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής και ισχυρότερη ειδικότητα κυτταρικού τύπου [75].



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση ενός ενισχυτή και ενός γονιδίου στόχου (τροποποιημένη από [74]).

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη των ρυθμιστικών αλληλουχιών ενός μακρού μη κωδικοποιητικού RNA, του οποίου η απορυθμισμένη έκφραση σχετίζεται με τον γαστρικό καρκίνο. Το lncRNA αυτό είναι το RECUR1 (Regulatory Cancer mUtation lncRna 1) και ο ογκογόνος ρόλος στον καρκίνο του στομάχου είχε χαρακτηριστεί στα πλαίσια άλλων πτυχιακών και μελετών του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογία και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Η βασική υπόθεση εργασίας είναι ότι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του RECUR1 επηρεάζουν την έκφραση του στον γαστρικό καρκίνο. Επομένως στα πλαίσια αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε κυρίως η τεχνική της τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, για την μελέτη της επίδρασης στοχευμένων μεταλλάξεων σε μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, στην λειτουργικότητα του υποκινητή του RECUR1. Παράλληλα έγινε έλεγχος της επίδρασης μεταλλάξεων και σε ένα άλλο πιθανό ρυθμιστικό στοιχείο του RECUR1, που αφορά αλληλουχία ενισχυτή. Επιπλέον, έγιναν δοκιμές για τον χαρακτηρισμό του υποκινητή ενός καθοδικού γονιδίου-στόχου του RECUR1, που κωδικοποιεί πρωτεΐνη (RECUR1_target). Τέλος, έγιναν προσπάθειες για την αφαίρεση τμήματος του υποκινητή του RECUR1 (knock out) από το γονιδίωμα γαστρικών καρκινικών κυττάρων, με την χρήση του συστήματος CRISPR-Cas9, για τον έλεγχο της επίδρασής του στα κύτταρα σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Ποσοτικές PCR για έλεγχο της έκφρασης του lncRNA RECUR1 και του RECUR1_target

Σε υπόστρωμα cDNA από δύο γενετικά τροποποιημένες γαστρικές κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκαν qPCRs, για τον έλεγχο της επίδρασης των αλλαγών των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6, στα επίπεδα έκφρασης του lncRNA RECUR1 και κατά συνέπεια του γονιδίου στόχου του (RECUR1_target). Για την ενίσχυση του RECUR1 χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύει μια περιοχή των εξονίων 2 και 3 του γονιδίου περίπου 100 ζευγών βάσεων (ζ.β.). Για την ενίσχυση του RECUR1_target χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύει μια περιοχή δύο εξονίων του γονιδίου περίπου 100 ζευγών βάσεων. Για κάθε δείγμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε στην PCR χρησιμοποιήθηκε 1 επανάληψη. Για την κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές έκφρασης δύο ιδιοσύστατα εκφραζόμενων γονιδίων, του GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) και του RPLP1 (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P1). Τα αντιδραστήρια των qPCR παρατηρούνται στον Πίνακα 1 και οι συνθήκες στον Πίνακα 2. Οι qPCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα CFX Connect Real-Time PCR Detection System της Bio-Rab. Τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων επεξεργάστηκαν με την χρήση των προγραμμάτων Bio-Rad CFX Manager και Microsoft Excel.

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για τις qPCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)	10 μL
Μίγμα εκκινητών F και R (10μM)	2 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	4 μL
Δείγμα cDNA	4 μL
	$V_{τελικός}$ = 20 μL

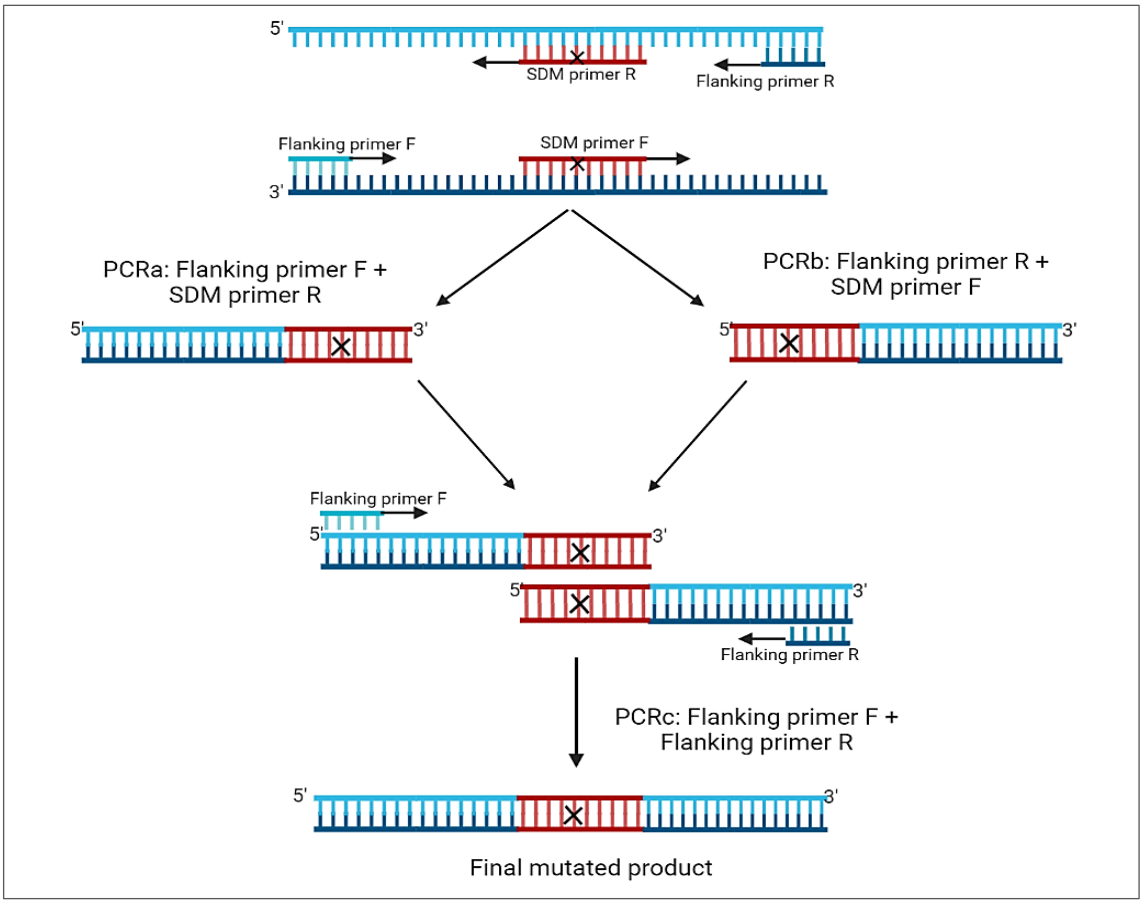
Πίνακας 2: Συνθήκες qPCR.

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
1	95	5:00
2	95	0:20
3	58	0:20
4	72	0:15
	+ Plate Read	
5	GOTO 2, 44 more times	
6	Melt Curve 55°C to 95°C, increment 0,5°C for 0:05min + Plate Read	
7	12	Forever
	END	

3.2 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και κατασκευή πλασμιδιάκων φορέων

3.2.1 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του υποκινητή του lncRNA RECUR1

Με σκοπό να γίνει ο έλεγχος της επίδρασης δύο ρυθμιστικών περιοχών του υποκινητή του RECUR1, στην μεταγραφή του γονιδίου, πραγματοποιήθηκαν στοχευμένες αλλαγές στις αλληλουχίες αυτών των δύο περιοχών, με την χρήση της τεχνικής της τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (SDM – Site Directed Mutagenesis). Στην μέθοδο SDM που χρησιμοποιήθηκε πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικά ζεύγη εκκινητών που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση (SDM) με την χρήση της PCR επικάλυψης-επέκτασης (overlap-extension PCR). (Δημιουργήθηκε με το BioRender.com)

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τοποκατευθυνόμενες μεταλλαξογενέσεις (SDM) στον υποκινητή του RECUR1 *in vitro*. Η SDM2 έγινε με σκοπό την τροποποίηση του μοτίβου πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA, που υπάρχει στον υποκινητή του RECUR1, από «5'-GATA-3'» σε «5'-GGCA-3'». Αυτό έγινε με την χρήση δύο ενδιάμεσων αλληλοκαλυπτόμενων εκκινητών, των RECUR1_prom_SDM_F2 και RECUR1_prom_SDM_R2, οι οποίοι είχαν συντεθεί έτσι ώστε στο σημείο όπου υπάρχει η αλληλουχία «5'-GATA-3'», να έχουν την αλληλουχία «5'-GGCA-3'». Η SDM3 έγινε με σκοπό την τροποποίηση του μοτίβου πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA και ταυτόχρονα την διατάραξη της αλληλουχίας στην περιοχή ενός SNP, που εντοπίζεται καθοδικά του μοτίβου GATA στον υποκινητή, με ένθεση ενός νουκλεοτιδίου θυμίνης (T). Αυτό έγινε με την χρήση δύο ενδιάμεσων αλληλοκαλυπτόμενων εκκινητών, των RECUR1_prom_SDM_F3 και RECUR1_prom_SDM_R3, οι οποίοι είχαν συντεθεί έτσι ώστε στο σημείο του υπάρχει η αλληλουχία «5'-GATA-3'», να έχουν την αλληλουχία «5'-GGCA-3'» και στην περιοχή του SNP έφεραν ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο T.

Οι δύο διαφορετικές μεταλλαξογενέσεις (SDM2 και 3), έγιναν με την πραγματοποίηση τριών PCR για την κάθε μία (PCR a, b και c). Αρχικά οι PCR a και b έγιναν για παρασκευή δύο προϊόντων περίπου 500 ζ.β. το καθένα, που έχουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις και ένα κομμάτι που αλληλεπικαλύπτεται. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τις PCR a και b ήταν πλασμιδιακό DNA, στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί ο αγρίου τύπου υποκινητής του RECUR1 981ζ.β. Οι PCR a και b έγιναν με την χρήση του ενζύμου πολυμεράση του DNA υψηλής πιστότητας της Kapa Biosystems

(KAPA HiFi DNA Polymerase). Στον Πίνακα 3 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR a και b και οι συνθήκες των αντιδράσεων στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για τις PCR a και b.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: πλασμίδιο με κλωνοποιημένο το RECUR1 prom WT (10ng/μL)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA HiFi Buffer with Mg (5x)	10 μL
Νουκλεοτίδια KAPA dNTP Mix (10mM)	1,5 μL
Εκκινητής ευθύς (F) (10μM)	1,5 μL
Εκκινητής ανάστροφος (R) (10μM)	1,5 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA HiFi (1 U/μL)	1 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	33,5 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 4: Συνθήκες των PCR a και b για SDM2 και 3.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00
Αποδιάταξη	98	0:30
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:15
Επέκταση	72	0:40
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 20 κύκλους.

Στην συνέχεια, τα δύο προϊόντα περίπου 500 ζ.β. από τις PCR a και b, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% και έπειτα απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν οι ειδικές ζώνες από την πηκτή με την χρήση του κιτ «NucleoSpin Gel and PCR Clean-up» της Macherey-Nagel και οι συγκεντρώσεις των προϊόντων DNA μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Quawell Q3000 UV, με την χρήση του λογισμικού Q3000 V4.2.1. Ένα τμήμα των προϊόντων (10%) χρησιμοποιήθηκε για την εμφάνιση των ζωνών του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, για την φωτογράφησή τους.

Για την παραγωγή ενός ενιαίου τμήματος ολόκληρου του υποκινητή του RECUR1 (981 ζ.β.) με τις κατευθυνόμενες μεταλλάξεις (SDM2 και 3), έγινε η τελική PCR-c. Στην PCR-c χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα τα προϊόντα των προηγούμενων PCR a και b, που αναμίχθηκαν σε ίσες αναλογίες. Στον Πίνακα 5 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν για την PCR-c, για τις SDM2 και 3 και οι συνθήκες της αντίδρασης στον Πίνακα 6.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για την PCR-c.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: Μίγμα των προϊόντων των PCR a και b για SDM2 (16,4ng/μL)	28 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA HiFi Buffer with Mg (5x)	10 μL
Νουκλεοτίδια KAPA dNTP Mix (10mM)	1,5 μL
Εκκινητής RECUR1_prom_F (10μM)	1,5 μL
Εκκινητής RECUR1_prom_R (10μM)	1,5 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA HiFi (1 U/μL)	1 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	6,5 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Για την PCR-c για SDM3:

- Υπόστρωμα DNA: Μίγμα των προϊόντων των PCR a και b για SDM3 (52ng/μL): 9,6μL
- WFI: 18,4μL για $V_{τελικό}$ = 50 μL

Πίνακας 6: Συνθήκες της PCR-c για SDM2 και 3.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00
Αποδιάταξη	98	0:30
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:15
Επέκταση	72	1:00
Τελική επέκταση	72	5:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους.

Στην συνέχεια, τα προϊόντα 981 και 982 ζ.β. από την PCR-c για τις SDM2 και 3 αντίστοιχα, ηλεκτροφορήθηκαν και απομονώθηκαν.

3.2.2 Κλωνοποιήσεις των τμημάτων του υποκινητή του lncRNA RECUR1 μετά την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση 2 και 3

Τα δύο ολόκληρα τμήματα του υποκινητή του RECUR1, που έφεραν στις επιθυμητές μεταλλάξεις ύστερα από τις τοποκατευθυνόμενες μεταλλαξογενέσεις 2 και 3, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς pGL4.10[*luc2*], ανοδικά του γονιδίου λουσιφεράσης (LUC2) που υπάρχει στον φορέα (Εικόνα 27). Στο φορέα αυτό είχε γίνει πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRV. Το ένζυμο αυτό κόβει το πλασμίδιο στην περιοχή πολυσυνδέτη (MCS), η οποία βρίσκεται πριν από το γονίδιο της λουσιφεράσης που δεν έχει υποκινητή. Επίσης είχε γίνει και αποφωσφορυλίωση του γραμμοποιημένου φορέα με την χρήση της φωσφατάσης rSAP (recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase).

Εικόνα 27: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pGL4.10[*luc2*].

Πριν την χρήση τους για διασύνδεση με τον φορέα pGL4.10, τα τμήματα του υποκινητή του RECUR1 ~980 ζ.β. από την PCR-c για τις SDM2 και 3 αντίστοιχα, φωσφορυλιώθηκαν στα 5’ άκρα τους με την χρήση του ενζύμου T4 κινάση πολυνουκλεοτιδίου (T4 PNK) της Takara. Στον Πίνακα 7 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν για την

φωσφορυλίωση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο υδατόλουτρο στους 37ºC για 30 λεπτά και ακολούθησε καθαρισμός των φωσφορυλιωμένων προϊόντων με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για την φωσφορυλίωση των προϊόντων της PCR-c.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: Προϊόν ενίσχυσης της PCR-c (υποκινητής RECUR1 με SDM2 και 3) (~200ng/μL)	10 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 PNK Buffer Takara (10x)	2 μL
Διάλυμα ATP Thermo Scientific (10mM)	1 μL
Κινάση T4 PNK Takara (10 U/μL)	1 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	6 μL
	$V_{τελικός}$ = 20 μL

Τα φωσφορυλιωμένα προϊόντα της PCR-c, που ήταν ο υποκινητής του RECUR1 με τις SDM2 και 3 και ο αποφωσφορυλιωμένος γραμμοποιημένος φορέας pGL4.10, χρησιμοποιήθηκαν για διασύνδεσή τους με αντίδραση λιγάσης. Το ένζυμο που αξιοποιήθηκε ήταν η T4 λιγάση του DNA της EnzyQuest. Στον Πίνακα 8 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση λιγάσης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 16ºC για 16 ώρες.

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για την αντίδραση λιγάσης του pGL4.10 με τον υποκινητή του RECUR1 με SDM2 και 3.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Ένθεμα: φωσφορυλιωμένα προϊόντα της PCR-c (υποκινητής του RECUR1 με SDM2 και 3) ~980 ζ.β. (~200ng/μL)	6,4 μL
Φορέας: αποφωσφορυλιωμένος γραμμοποιημένος pGL4.10 4242 ζ.β. (30,3ng/μL)	1,6 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA ligase Buffer NEB (10x)	1 μL
T4 λιγάση του DNA EnzyQuest (400 U/μL)	1 μL
	$V_{τελικός}$ = 10 μL

Μετά την διασύνδεση του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 και του φορέα pGL4.10 ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων με αυτά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Χρησιμοποιήθηκαν χημειοδεκτικά βακτήρια *Escherichia coli* στέλεχος DH5α με αποδοτικότητα 10^8. Η αναλογία βακτηρίων και προϊόντων της αντίδρασης λιγάσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10:1. Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων έγινε με θεσμικό σοκ στους 42ºC για 50 δευτερόλεπτα. Τα βακτήρια μετά τον μετασχηματισμό επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB agar (condalab) με αμπικιλλίνη (100μg/mL) και επωάστηκαν στους 37ºC ολονύκτια (~16 ώρες). Την επόμενη μέρα έγινε συλλογή αποικιών από τα τρυβλία με τα μετασχηματισμένα βακτήρια και μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό LB Broth (CONDA-pronadisa) με αμπικιλλίνη (100μg/mL), ώστε να προκύψουν υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων. Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37ºC στις 210 στροφές ολονύκτια (~16 ώρες).

Οι υγρές καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χωρίς την χρήση κάποιου εμπορικού κιτ, με αλκαλική λύση ακολουθούμενη από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

1) Προσθήκη ~2mL υγρής καλλιέργειας βακτηρίων σε σωληνάρια των 2mL κάτω από φλόγα.
2) Φυγοκέντρηση στις 11.000rpm για 2 λεπτά στους 4ºC.

3) Αφαίρεση υπερκειμένου με θρεπτικό.
4) Προσθήκη 100μL παγωμένου μείγματος του Διαλύματος Λύσης I με RNάση (RNase A) και ανάμιξη με vortex.
(Συστατικά Διαλύματος Λύσης I: 50mM Tris pH=8, 10mM EDTA pH=8, ddH_2O)
5) Προσθήκη 200μL Διαλύματος Λύσης II και ανάμιξη x5.
(Συστατικά Διαλύματος Λύσης II: 1% SDS, 0,2M NaOH, ddH_2O)
6) Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7) Προσθήκη 150μL παγωμένου Διαλύματος Λύσης III και ανάμιξη x5.
(Συστατικά Διαλύματος Λύσης III: 3M potassium acetate (KOAc) pH=6, glacial acetate/acetic acid, ddH_2O)
8) Επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
9) Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
10) Ανάκτηση ~450μL από το υπερκείμενο και τοποθέτηση σε νέα σωληνάρια των 1,5mL.
11) Προσθήκη 1mL αιθανόλης 100% και ανάμιξη x5.
12) Επώαση στους -80°C για 20 λεπτά.
13) Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20 λεπτά στους 4°C.
14) Απόρριψη υπερκειμένου.
15) Προσθήκη 600μL αιθανόλης 70%.
16) Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
17) Αφαίρεση υπερκειμένου και ξήρανση πελέτας στον αέρα για 15 λεπτά.
18) Επαναδιάλυση σε 100μL WFI και τοποθέτηση στους 65°C για 5 λεπτά. Ακολούθησε vortex και σύντομη φυγοκέντρηση (spin) για επαναδιάλυση της πελέτας, η οποία περιείχε τα απομονωμένα πλασμίδια.

Τα απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 υποβλήθηκαν σε PCR για να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή του ενθέματος, δηλαδή του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3, ανεξαρτήτως προσανατολισμού. Το υπόστρωμα DNA που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ήταν αραίωση 1:30 των απομονωμένων πλασμιδίων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι RECUR1_prom_F και RECUR1_prom_R που ενισχύουν ολόκληρο το τμήμα 981 ζ.β. του υποκινητή του RECUR1. Στον Πίνακα 9 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του ενθέματος και οι συνθήκες της αντίδρασης στον Πίνακα 10.

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια και αναλογίες τους στην PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 στους φορείς pGL4.10.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 με ένθεμα τον υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 (1:30 αραίωση)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5 μL
Νουκλεοτίδια Thermo Scientific dNTPs (10mM)	0,5 μL
Εκκινητής RECUR1_prom_F (10μM)	1 μL
Εκκινητής RECUR1_prom_R (10μM)	1 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA Taq (5 U/μL)	0,15 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	41,35 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Επειδή τόσο ο πλασμιδιακός φορέας όσο και το ένθεμα, που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση λιγάσης είχαν υποστεί κατεργασία με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν και τα δύο τυφλά άκρα, μετά την διασύνδεσή τους το ένθεμα έχει εισέλθει στον φορέα και με τους δύο προσανατολισμούς (5'-3' και 3'-5').

Πίνακας 10: Συνθήκες της PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 στους φορείς pGL4.10.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	1:00
Αποδιάταξη	95	0:20
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:10
Επέκταση	72	1:00
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 20 κύκλους.

Στην συνέχεια, στα πλασμίδια pGL4.10, για τα οποία επιβεβαιώθηκε η επιτυχημένη εισαγωγή του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3, πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμη PCR για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του ενθέματος. Για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής RECUR1_prom_R που υβριδίζει πάνω στο ένθεμα και ο εκκινητής RVprimer3 που υβριδίζει στον «σκελετό» του πλασμιδίου pGL4.10 ανοδικά της θέσης εισαγωγής του ενθέματος (Εικόνα 27). Για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 3'-5' χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής RECUR1_prom_F που υβριδίζει πάνω στο ένθεμα και ο εκκινητής RVprimer3. Στον Πίνακα 11 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι αναλογίες τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στις PCR προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' και οι συνθήκες των αντιδράσεων στον Πίνακα 12.

Πίνακας 11: Αντιδραστήρια και αναλογίες τους στην PCR για προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 στους φορείς pGL4.10.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 με ένθεμα τον υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 (1:30 αραίωση)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5 μL
Νουκλεοτίδια Thermo Scientific dNTPs (10mM)	0,5 μL
Εκκινητής RVprimer3 (10μM)	1 μL
Εκκινητής RECUR1_prom_R (για 5'-3') ή RECUR1_prom_F (για 3'-5') (10μM)	1 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA Taq (5 U/μL)	0,15 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	41,35 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 12: Συνθήκες της PCR για προσδιορισμό προσανατολισμού του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 στους φορείς pGL4.10.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	1:00
Αποδιάταξη	95	0:20
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:10
Επέκταση	72	1:20
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 20 κύκλους.

Τα πλασμίδια pGL4.10 που είχαν απομονωθεί από βακτήρια με αλκαλική λύση ακολουθούμενη από κατακρήμνιση με αιθανόλη και για τα οποία επιβεβαιώθηκε ο προσανατολισμός 5'-3' και 3'-5' του υποκινητή του RECUR1 με τις μεταλλαξογενέσεις SDM 2 και 3, χρησιμοποιήθηκαν για εκ νέου μετασχηματισμό βακτηρίων, ώστε να απομονωθούν με το εμπορικό κιτ «NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA» της Macherey-Nagel, για να είναι καθαρισμένα και σε επαρκή ποσότητα για την μετέπειτα χρήση τους στις δοκιμασίες λουσιφεράσης.

Όλα τα πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger με εκκινητή που υβριδίζει στον «σκελετό» του πλασμιδίου pGL4.10 ανοδικά της θέσης εισαγωγής του ενθέματος, για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων.

3.3 Απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target από γονιδιωματικό DNA

3.3.1 PCR για απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target

Οι αντιδράσεις PCR σε γονιδιωματικό DNA για την απομόνωση δύο διαφορετικών τμημάτων του πιθανού υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target (τμήματα 2 και 5), έγιναν αρχικά δοκιμαστικά με την χρήση του ενζύμου Taq πολυμεράση του DNA της Kapa Biosystems για τον έλεγχο τον εκκινητών και για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης και για την εύρεση του κατάλληλου υποστρώματος DNA. Έπειτα οι PCR αυτές έγιναν με την χρήση του ενζύμου πολυμεράση του DNA υψηλής πιστότητας της Kapa Biosystems (KAPA HiFi DNA Polymerase).

Η PCR για την ενίσχυση του τμήματος-2 516 ζ.β. από τους ενισχυτές RECUR1_target_prom_F2 και RECUR1_target_prom_R2, πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA (gDNA) απομονωμένο από την κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος AGS. Στον Πίνακα 13 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στην PCR και οι συνθήκες της αντίδρασης στον Πίνακα 14.

Πίνακας 13: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους στην PCR σε gDNA για ενίσχυση τμήματος του υποκινητή του RECUR1_target, με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: gDNA από AGS (158ng/μL)	6,33 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA HiFi Buffer (5x)	10 μL
Νουκλεοτίδια KAPA dNTP Mix (10mM)	1,5 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_F2 (10μM)	1,5 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_R2 (10μM)	1,5 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA HiFi (1 U/μL)	1 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	28,17 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 14: Συνθήκες της PCR σε gDNA για ενίσχυση τμήματος του υποκινητή του RECUR1_target, με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	98	5:00
Αποδιάταξη	98	1:00
Υβριδισμός εκκινητών	57	0:30
Επέκταση	72	0:50
Τελική επέκταση	72	5:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους.

Η PCR για την ενίσχυση του τμήματος-5 586 ζ.β. από τους ενισχυτές RECUR1_target_prom_F5 και RECUR1_target_prom_R5, πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA από την κυτταρική AGS. Στον Πίνακα 15 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στην και οι συνθήκες της αντίδρασης στον Πίνακα 16.

Στην συνέχεια, τα δύο προϊόντα 516 ζ.β. και 586 ζ.β. από τις δύο παραπάνω PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν

Πίνακας 15: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους στην PCR σε gDNA για ενίσχυση τμήματος του υποκινητή του RECUR1_target, με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: AGS gDNA (158ng/μL)	6,4 μL (1000ng)
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA HiFi Buffer (5x)	10 μL
Νουκλεοτίδια KAPA dNTP Mix (10mM)	1,5 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_F5 (10μM)	1,5 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_R5 (10μM)	1,5 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA HiFi (1 U/μL)	1 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	28,4 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 16: Συνθήκες της PCR σε gDNA για ενίσχυση τμήματος του υποκινητή του RECUR1_target, με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5

	Θερμοκρασία (^oC)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	98	5:00
Αποδιάταξη	98	1:00
Υβριδισμός εκκινητών	57	0:30
Επέκταση	72	0:50
Τελική επέκταση	72	5:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους.

3.3.2 Κλωνοποιήσεις των τμημάτων του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target

Τα δύο τμήματα (2 και 5) του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target, που ενισχύθηκαν από γονιδιωματικό DNA με τα ζεύγη εκκινητών RECUR1_target_prom_F2/R2 και RECUR1_target_prom_F5/R5, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς pGL4.10[*luc2*]. Πριν την χρήση τους για διασύνδεση με τον φορέα pGL4.10, τα δύο τμήματα του υποκινητή του RECUR1_target 516 ζ.β. και 586 ζ.β., φωσφορυλιώθηκαν στα 5' άκρα τους με την χρήση του ενζύμου T4 κινάση πολυνουκλεοτιδίου (T4 PNK) της Takara. Στην συνέχεια έγινε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, των φωσφορυλιωμένων προϊόντων των δύο PCR.

Τα φωσφορυλιωμένα προϊόντα των δύο PCR, που ήταν δύο τμήματα (2 και 5) του υποκινητή του RECUR1_target και ο αποφωσφορυλιωμένος γραμμοποιημένος φορέας pGL4.10, χρησιμοποιήθηκαν για διασύνδεσή τους με αντίδραση λιγάσης. Στους Πίνακες 17 και 18 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις λιγάσης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 16^oC για 16 ώρες. Ταυτόχρονα έγινε και μια αντίδραση αυτο-διασύνδεσης του φορέα pGL4.10 χωρίς ένθεμα, ως δείγμα ελέγχου.

Πίνακας 17: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για την αντίδραση λιγάσης του pGL4.10 με τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Ένθεμα: υποκινητής RECUR1_target με εκκινητές F2/R2 516 ζ.β. (400ng/μL)	5 μL
Φορέας: αποφωσφορυλιωμένος γραμμοποιημένος pGL4.10 4242 ζ.β. (30,3ng/μL)	1,6 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB T4 DNA ligase Buffer (10x)	1 μL
T4 λιγάση του DNA EnzyQuest (400 U/μL)	1 μL
WFI	1,4μL
	$V_{τελικός}$ = 10 μL

Πίνακας 18: Αντιδραστήρια και αναλογίες τους για την αντίδραση λιγάσης του pGL4.10 με τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Ένθεμα: υποκινητής RECUR1_target με εκκινητές F5/R5 586ζ.β.	7 μL
Φορέας: αποφωσφορυλιωμένος γραμμοποιημένος pGL4.10 4242 ζ.β. (30,3ng/μL)	1,5 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB T4 DNA ligase Buffer (10x)	1 μL
T4 λιγάση του DNA MinoTech (6 wu/μL)	0,5 μL
	$V_{τελικός}$ = 10 μL

Μετά την διασύνδεση των δύο τμημάτων του υποκινητή του RECUR1_target και του φορέα pGL4.10 ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων με αυτά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Από διαφορετικούς βακτηριακούς κλώνους απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA. Τα απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 με τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2, υποβλήθηκαν σε δύο PCR για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του ενθέματος. Για τον προσδιορισμό των δύο προσανατολισμών χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής RVprimer3 (που υβριδίζει στον σκελετό του πλασμιδίου ανοδικά του ενθέματος) και ο εκκινητής RECUR1_target_prom_R2 για τον προσανατολισμό 5'-3' και ο εκκινητής RECUR1_target_prom_F2 για τον προσανατολισμό 3'-5'. Στον Πίνακα 19 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στις PCR προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' και οι συνθήκες των αντιδράσεων στον Πίνακα 20.

Πίνακας 19: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους στην PCR για προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' του υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 με ένθεμα τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2 (1:30 αραίωση)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5 μL
Νουκλεοτίδια Thermo Scientific dNTPs (10mM)	0,5 μL
Εκκινητής RVprimer3 (F) (10μM)	1 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_R2 (για 5'-3') ή RECUR1_target_prom_F2) (για 3'-5') (10μM)	1 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA Taq (5 U/μL)	0,15 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	41,35 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 20: Συνθήκες στις PCR για προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' του υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	1:00
Αποδιάταξη	95	0:20
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:10
Επέκταση	72	0:45
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 20 κύκλους.

Τα απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 με τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5, υποβλήθηκαν αρχικά σε PCR για να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή του ενθέματος, ανεξαρτήτως προσανατολισμού. Το υπόστρωμα DNA που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ήταν αραίωση 1:30 των απομονωμένων πλασμιδίων. Οι εκκινητές

που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εκκινητές RECUR1_target_prom_F5 και RECUR1_target_prom_R5 που ενισχύουν το τμήμα-5 586 ζ.β. του υποκινητή του RECUR1_target. Στον Πίνακα 21 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του ενθέματος και οι συνθήκες της αντίδρασης στον Πίνακα 22.

Πίνακας 21: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους στην PCR για επιβεβαίωση εισαγωγής στον pGL4.10 του υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 με ένθεμα τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5 (1:30 αραίωση)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5 μL
Νουκλεοτίδια Thermo Scientific dNTPs (10mM)	0,5 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_F5 (10μM)	1 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_R5 (10μM)	1 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA Taq (5 U/μL)	0,15 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	41,35 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 22: Συνθήκες της PCR για επιβεβαίωση εισαγωγής στον pGL4.10 του υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	1:00
Αποδιάταξη	95	0:20
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:10
Επέκταση	72	0:40
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 20 κύκλους.

Στην συνέχεια στα πλασμίδια pGL4.10 με τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5, για τα οποία επιβεβαιώθηκε η επιτυχημένη εισαγωγή του ενθέματος, πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμη PCR για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του. Για τον προσδιορισμό των δύο προσανατολισμών χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής RVprimer3 και ο εκκινητής RECUR1_target_prom_R5 για τον προσανατολισμό 5'-3' και ο εκκινητής RECUR1_target_prom_F5 για τον προσανατολισμό 3'-5'. Στον Πίνακα 23 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στις PCR προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' και οι συνθήκες των αντιδράσεων στον Πίνακα 24.

Πίνακας 23: Αντιδραστήρια και αναλογίες τους στην PCR για προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' του υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: απομονωμένα πλασμίδια pGL4.10 με ένθεμα τον υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5 (1:30 αραίωση)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5 μL
Νουκλεοτίδια Thermo Scientific dNTPs (10mM)	0,5 μL
Εκκινητής RVprimer3 (10μM)	1 μL
Εκκινητής RECUR1_target_prom_R5 (για 5'-3') ή RECUR1_target_prom_F5 (για 3'-5') (10μM)	1 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA Taq (5 U/μL)	0,15 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	41,35 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 24: Συνθήκες στις PCR για προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' του υποκινητή του RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5.

	Θερμοκρασία (°C)	**Χρόνος (λεπτά)**
Αρχική αποδιάταξη	95	1:00
Αποδιάταξη	95	0:20
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:10
Επέκταση	72	0:45
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 20 κύκλους.

Τα πλασμίδια pGL4.10 που είχαν απομονωθεί από βακτήρια με αλκαλική λύση ακολουθούμενη από κατακρήμνιση με αιθανόλη και για τα οποία επιβεβαιώθηκε ο προσανατολισμός 5'-3' και 3'-5' των δύο τμήματα του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target, χρησιμοποιήθηκαν για εκ νέου μετασχηματισμό βακτηρίων, ώστε να απομονωθούν με εμπορικό κιτ για να είναι καθαρισμένα και σε επαρκή ποσότητα για την μετέπειτα χρήση τους στις δοκιμασίες λουσιφεράσης.

3.4 Πειράματα βιοφωταύγειας λουσιφεράσης για προσδιορισμό λειτουργικότητας των ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων RECUR1 και RECUR1_target

Τα πειράματα λουσιφεράσης λαμβάνουν χώρα σε τρεις διαδοχικές ημέρες, και αξιοποιούν δύο διαφορετικά ένζυμα λουσιφεράσης (Firefly και Renilla). Από πλασμίδιο pGL4.10[*luc2*] εκφράζεται η Firefly λουσιφεράση, υπό τον έλεγχο του υποκινητή που έχει κλωνοποιηθεί ανοδικά από το γονίδιό της. Το πλασμίδιο pCMV-Renilla Luc, περιέχει το γονίδιο Renilla λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV (Cytomegalovirus), δημιουργώντας έναν φορέα ιδιοσύστατης έκφρασης του γονιδίου. Αυτός ο φορέας χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τους φορείς pGL4.10 και λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου και κανονικοποίησης για να ληφθεί υπόψη η πειραματική παραλλακτικότητα.

Έγιναν τρία πειράματα λουσιφεράσης. Στο πρώτο πείραμα λουσιφεράσης έγινε ο έλεγχος της επίδρασης των τοποκατευθυνόμενων μεταλλαξογενέσεων (SDM), στην λειτουργικότητα του υποκινητή του γονιδίου του lncRNA RECUR1. Παράλληλα ελέγχθηκε και το τμήμα-2 του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target, που ενισχύθηκε από τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2. Ως κύριο δείγμα ελέγχου όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGL4.10 χωρίς ένθεμα (pGL4.10 empty), καθώς χωρίς υποκινητή από αυτό το πλασμίδιο δεν μπορεί να γίνει μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης και να παραχθεί σήμα φωτός.

Στο δεύτερο πείραμα λουσιφεράσης ουσιαστικά έγινε μία επανάληψη του πρώτου πειράματος σε διαφορετική κυτταρική σειρά, πάλι για τον έλεγχο της επίδρασης των τοποκατευθυνόμενων μεταλλαξογενέσεων στην λειτουργικότητα του υποκινητή του γονιδίου του lncRNA RECUR1. Παράλληλα ελέγχθηκε και το τμήμα-2 του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target, που ενισχύθηκε από τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2.

Στο τρίτο πείραμα λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια στα οποία είχε κλωνοποιηθεί ο ενισχυτής του RECUR1 και η μεταλλαγμένη παραλλαγή του, ώστε να γίνει έλεγχος του προσανατολισμού με τον οποίο είναι ενεργός ο ενισχυτής και της επίδραση της μετάλλαξης στην δραστικότητά του. Παράλληλα ελέγχθηκαν τα τμήματα 2 και 5 του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target, που ενισχύθηκαν από τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2 και RECUR1_target_prom_F5/R5 αντίστοιχα.

Αναλυτικότερα σχετικά με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε και στα τρία πειράματα, την πρώτη ημέρα έγινε η επίστρωση 80.000 κυττάρων της σειράς AGS ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος σε κάθε πηγάδι του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας 24 πηγαδιών (24-well plate), ώστε αυτά να αναπτυχθούν να είναι έτοιμα για την διαμόλυνση.

Την δεύτερη ημέρα πραγματοποιήθηκε η διαμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς λουσιφεράσης ώστε να γίνει η έκφραση της Firefly λουσιφεράσης από τον υποκινητή που έχει προστεθεί ανοδικά από το γονίδιό της στους φορείς pGL4.10. Για την διαδικασία αυτή παράχθηκαν δύο μίγματα. Το πρώτο μίγμα είναι αυτό που περιλαμβάνει το πλασμίδιο της λουσιφεράσης Renilla. Συγκεκριμένα περιέχει θρεπτικό υλικό Gibco Opti-MEM (1x) της ThermoScientific (62,5μL/πηγάδι) και το πλασμίδιο pCMV-Renilla Luc (20ng/πηγάδι). Το δεύτερο μίγμα περιλαμβάνει το αντιδραστήριο διαμόλυνσης P-PEI (polycation polyethylenimine). Συγκεκριμένα περιέχει θρεπτικό υλικό Gibco Opti-MEM (1x) της ThermoScientific (62,5μL/πηγάδι) και P-PEI (300ng/πηγάδι). Ο λόγος του P-PEI προς το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 3:1, δηλαδή 300ng P-PEI και 100ng πλασμιδιακού DNA (φορείς pGL4.10) σε κάθε πηγάδι. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1) Αφαίρεση προηγούμενου θρεπτικού μέσου από τα 24-well plates με τα κύτταρα AGS.
2) Προσθήκη σε κάθε πηγάδι 375μL καινούργιου θρεπτικού μέσου Gibco™ RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement (1x) της ThermoScientific.
3) Μεταφορά των πιάτων στον επωαστήρα στους 37^{o}C.
4) Προσθήκη 127μL από το Μίγμα 1 σε σωληνάρια των 1,5mL (όσες ήταν οι κατασκευές pGL4.10 που χρησιμοποιήθηκαν). Κάθε σωληνάριο αντιστοιχεί σε δύο πηγάδια, που είναι οι δύο επαναλήψεις της κάθε κατασκευής.
5) Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 2μL από το αντίστοιχο δείγμα DNA (100ng/μL), που ήταν οι κατασκευές σε pGL4.10.
6) Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7) Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 126μL από το Μίγμα 2 και ανάδευση 2-3 φορές.
8) Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9) Προσθήκη 125μL από το κάθε σωληνάριο στο αντίστοιχο πηγάδι στο πιάτο με την καλλιέργεια των κυττάρων AGS.
10) Τοποθέτηση του 24-well plate στον επωαστήρα στους 37^{o}C, με 5% CO_2 για ~20 ώρες.

Την τρίτη ημέρα έγινε η λύση των κυττάρων και η μέτρηση της βιοφωταύγειας. Με την λύση των κυττάρων γίνεται η απελευθέρωση από τα κύτταρα των ενζύμων Firefly και Renilla λουσιφεράσης που παράχθηκαν, ώστε με την χρήση των κατάλληλων υποστρωμάτων να παραχθεί βιοφωταύγεια. Η ποσότητα της βιοφωταύγειας θα είναι ανάλογη της ποσότητας του ενζύμου της λουσιφεράσης που παράχθηκε, η οποία εξαρτάται από την λειτουργικότητα του υποκινητή που έχουμε προσθέσει πριν από το γονίδιο της Firefly λουσιφεράσης. Συγκεκριμένα περίπου 20 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων AGS:

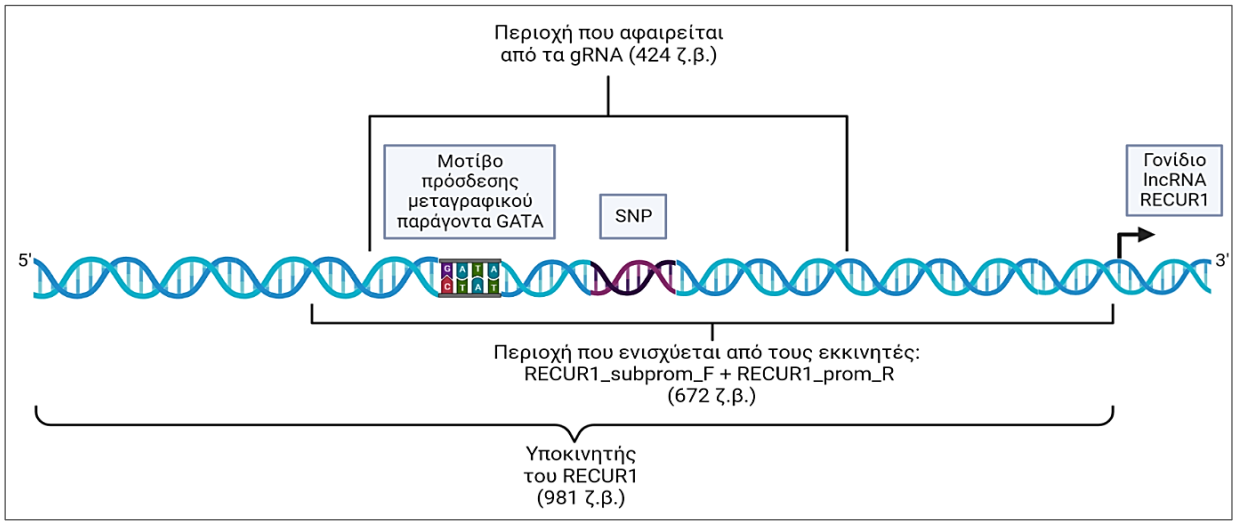
1) Αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από τα πηγάδια των πιάτων με αναρροφητήρα κενού.
2) Έγινε πλύση με 300μL 1x PBS (phosphate buffered saline) σε κάθε πηγάδι.
3) Προστέθηκαν 100μL 1x PLB (passive lysis buffer) σε κάθε πηγάδι.
4) Ανακίνηση των πιάτων για 30 λεπτά.
5) Μέτρηση βιοφωταύγειας λουσιφεράσης στο λουμινόμετρο Lumat3 (LB 9508) της Berthold Technologies, με την χρήση του λογισμικού Instrument Control and Evaluation (ICE). Για την μέτρηση σε σωληνάρια των 1,5mL προστέθηκαν 20μL από το εκχύλισμα των κυττάρων + 20μL από το υπόστρωμα της Firefly λουσιφεράσης την D-Luciferin και έγινε η πρώτη μέτρηση. Στην συνέχεια προστέθηκαν 20μL από το υπόστρωμα της Renilla λουσιφεράσης την Coelenterazine και έγινε η δεύτερη μέτρηση.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων βιοφωταύγειας λουσιφεράσης έγινε με το πρόγραμμα Microsoft Excel. Οι τιμές βιοφωταύγειας της Firefly λουσιφεράσης και της Renilla λουσιφεράσης για κάθε δείγμα διαιρέθηκαν (τιμή Firefly / τιμή Renilla). Επειδή κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε δείγμα. Επίσης υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των δύο τιμών των επαναλήψεων. Τέλος δημιουργήθηκαν ιστογράμματα για την γραφική απεικόνιση των τιμών.

Το δεύτερο και το τρίτο πείραμα λουσιφεράσης πραγματοποιήθηκαν με τις ίδιες διαδικασίες σε τρεις ημέρες. Η διαφορά του δεύτερου πειράματος ήταν ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση ήταν η ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνο του στομάχου (signet ring cell carcinoma cells) NUGC-4. Για το τρίτο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά AGS. Στο δεύτερο και το τρίτο πείραμα επιστρώθηκαν 250.000 κύτταρα σε κάθε πηγάδι του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας. Επίσης, άλλη μία διαφορά στο δεύτερο και τρίτο πείραμα ήταν η ποσότητα DNA και ο λόγος του P-PEI προς το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιήθηκε, που ήταν 4:1, δηλαδή 800ng P-PEI και 200ng πλασμιδιακού DNA (φορείς pGL4.10) σε κάθε πηγάδι.

3.5 Αφαίρεση τμήματος του υποκινητή του RECUR1 (knock out) από το γονιδίωμα γαστρικών καρκινικών κυττάρων, με την χρήση του συστήματος CRISPR-Cas9

Το τελευταίο πείραμα ήταν η αφαίρεση ενός τμήματος του υποκινητή του γονιδίου του lncRNA RECUR1, που περιέχει δύο σημαντικές ρυθμιστικές αλληλουχίες, από το γονιδίωμα των γαστρικών καρκινικών κυττάρων ASG, για τον έλεγχο της επίδρασής της στην έκφραση του RECUR1 και κατά συνέπεια του γονιδίου στόχου του (Εικόνα 28). Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκε ο κατάλληλος πλασμιδιακός φορέας με δύο μόρια RNA οδηγούς (single guide RNAs), έγινε ο μετασχηματισμός τον κυττάρων για την τροποποίηση του γονιδιώματός τους και ελέγχθηκε ο τρόπος για την γονοτύπηση τους. Τα δύο gRNA οδηγούν την Cas9 νουκλεάση, εκατέρωθεν αυτής της περιοχής, ώστε να δημιουργήσει δύο δίκλωνες ρίξεις στο DNA και να αφαιρεθεί ένα τμήμα 424 ζ.β. του υποκινητή.

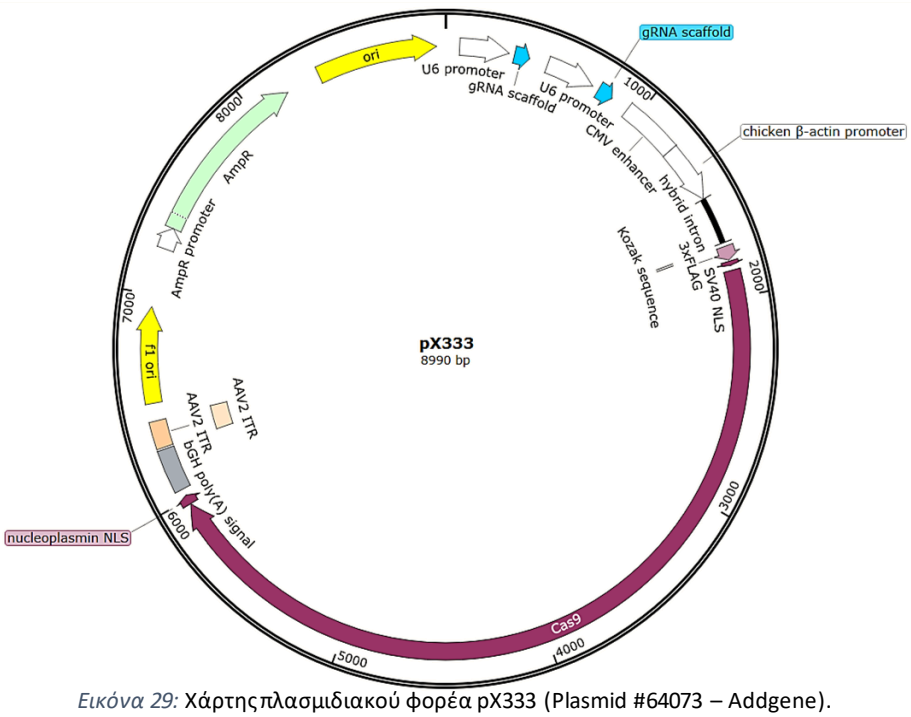


Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του υποκινητή του RECUR1 που αφαιρείται από τα δύο gRNA. (Δημιουργήθηκε με το BioRender.com)

3.5.1 Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pX333

Για να παραχθούν τα δύο sgRNA, συντέθηκαν οι δύο αλληλουχίες DNA από τις οποίες μπορούν να μεταγραφούν. Συντέθηκαν τέσσερεις μονόκλωνες αλληλουχίες DNA, δύο για κάθε sgRNA με σκοπό αυτές να υβριδοποιηθούν και ως δίκλωνες αλληλουχίες DNA να εισαχθούν στον φορέα

pX333, ο οποίος επιτρέπει την ταυτόχρονη έκφραση των δύο gRNA και της Cas9 στα κύτταρα στα οποία θα εισαχθεί (Εικόνα 29). Οι αλληλουχίες αυτές είχαν κατάλληλα προεξέχοντα άκρα ώστε να εισέλθουν στις κατάλληλες θέσεις στον φορέα μετά από την πέψη του με δύο ένζυμα περιορισμού.



Εικόνα 29: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pX333 (Plasmid #64073 – Addgene).

Αρχικά, έγινε η ανόπτηση (annealing) των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων DNA για σχηματισμό δίκλωνων μορίων DNA. Για το πρώτο sgRNA οι δύο αλληλουχίες ήταν η RECUR1_PM_KO_sgRNA1_F και η RECUR1_PM_KO_sgRNA1_R, ενώ για το δεύτερο gRNA ήταν η RECUR1_PM_KO_sgRNA2_F και η RECUR1_PM_KO_sgRNA2_R. Για κάθε ένα sgRNA ξεχωριστά σε σωληνάρια των 1,5mL προστέθηκαν 2μL από το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο (100μM) και 96μL από το annealing buffer. Έγινε βρασμός των σωληνάριων για 5 λεπτά και ακολούθησε σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας για 1 ώρα (μέχρι κάτω από 37°C). Το annealing buffer είχε την σύσταση: 100mM KoAc (Potassium Acetate), 30mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) και 2mM MgoAc (Magnesium Acetate).

Στην συνέχεια έγινε η πέψη του φορέα pX333 με το πρώτο ένζυμο περιορισμού, το BbsI. Το ένζυμο αυτό κόβει με τέτοιο τρόπο των φορέα ώστε να μένει με προεξέχοντα άκρα, συμπληρωματικά με αυτά της αλληλουχίας του πρώτου sgRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA1). Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την πέψη παρατηρούνται στον Πίνακα 25. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 5ώρες. Στις 3 ώρες προστέθηκαν 0,5μL ενζύμου στην αντίδραση.

Πίνακας 25: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για την πέψη του φορέα pX333 με το ένζυμο BbsI.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Φορέας pX333 (1,1γ/λ)	1,5 μL → 1,6μg
NEB rCutSmart Buffer (10x)	5 μL
NEB BbsI-HF restriction enzyme (20U/μL)	0,5 μL
WFI	43 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Τα προϊόντα την πέψης του φορέα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και αποκόπηκε η ζώνη με τον γραμμοποιημένο φορέα και ακολούθησε η απομόνωσή του από την πηκτή. Μετά την πέψη του φορέα pX333 με BbsI, έγινε η διασύνδεσή του με αντίδραση λιγάσης με τον πρώτο δίκλωνο

ολιγονουκλεοτίδιο (RECUR1_PM_KO_sgRNA1). Στον Πίνακα 26 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την αντίδραση λιγάσης. Έγινε επώαση στους 16°C για 16 ώρες. Ταυτόχρονα έγινε και αντίδραση αυτό-διασύνδεσης του pX333, χωρίς ένθεμα, ως δείγμα ελέγχου.

Πίνακας 26: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους στην αντίδραση διασύνδεσης του κομμένου με BbsI φορέα pX333, με το πρώτο sgRNA.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Ένθεμα: annealed RECUR1_PM_KO_sgRNA1	4 μL
Φορέας: digested pX333 with BbsI (51,5ng/μL)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB T4 DNA ligase Buffer (10x)	1 μL
T4 λιγάση του DNA EnzyQuest (400 U/μL)	0,5 μL
WFI	3,5μL
	$V_{τελικός}$ = 10 μL

Μετά την διασύνδεση του κομμένου με BbsI φορέα pX333, με το πρώτο sgRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA1) ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων με αυτά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και εν τέλει έγινε απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στην συνέχεια για έναν από τους κλώνους του pX333 που επιβεβαιώθηκε ότι φέρει το RECUR1_prom_KO_sgRNA1, έγινε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, ώστε να χρησιμοποιηθεί για την πέψη με το δεύτερο ένζυμο περιορισμού.

Το δεύτερο ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του φορέα pX333, ήταν το BsaI. Το ένζυμο αυτό κόβει με τέτοιο τρόπο των φορέα ώστε να μένει με προεξέχοντα άκρα, συμπληρωματικά με αυτά της αλληλουχίας του δεύτερου sgRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA2). Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την πέψη παρατηρούνται στον Πίνακα 27. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 5ώρες. Στις 3 ώρες προστέθηκε 1μL ενζύμου στην αντίδραση.

Πίνακας 27: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για την πέψη του φορέα pX333 με το ένζυμο BsaI.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Φορέας pX333 με RECUR1_prom_KO_sgRNA1	50μL
NEB rCutSmart Buffer (10x)	6 μL
NEB BsaI restriction enzyme (10U/μL)	2 μL
WFI	2 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

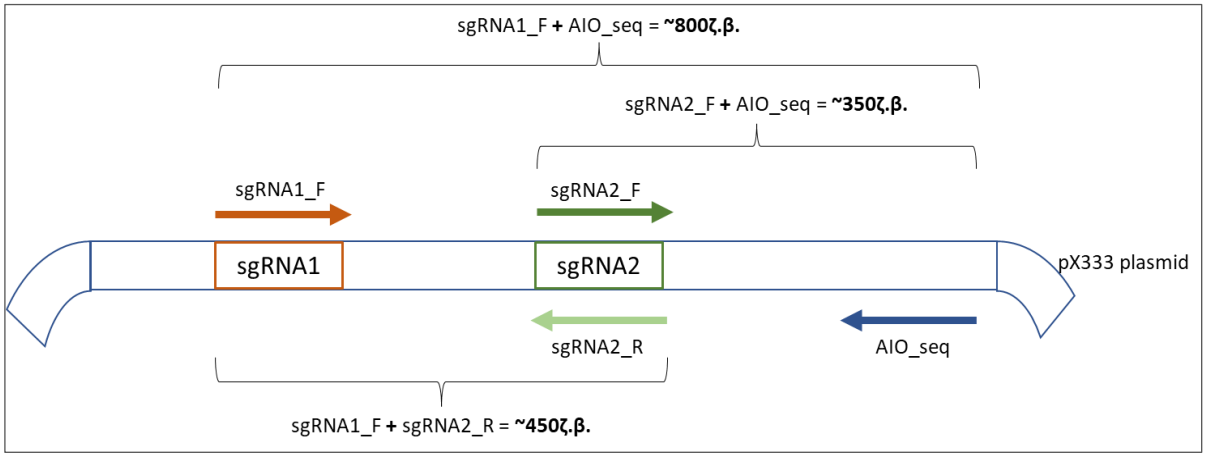
Τα προϊόντα την πέψης του φορέα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης, αποκόπηκε η ζώνη με τον γραμμοποιημένο φορέα και ακολούθησε η απομόνωσή του από την πηκτή. Μετά την πέψη του φορέα pX333 με το sgRNA1, με ένζυμο BsaI, έγινε η διασύνδεσή του με αντίδραση λιγάσης με τον δεύτερο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο (RECUR1_PM_KO_sgRNA2) που είναι προκύψει από τον υβριδισμό των δύο μονόκλωνων αλληλουχιών. Στον Πίνακα 28 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την αντίδραση λιγάσης. Έγινε επώαση στους 16°C για 16 ώρες.

Πίνακας 28: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους στην αντίδραση διασύνδεσης του κομμένου με BsaI φορέα pX333, με το δεύτερο sgRNA.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Ένθεμα: annealed RECUR1_PM_KO_sgRNA2	4 μL
Φορέας: digested pX333-sgRNA1 with BsaI (52,9ng/μL)	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB T4 DNA ligase Buffer (10x)	1 μL
T4 λιγάση του DNA EnzyQuest (400 U/μL)	0,5 μL
WFI	3,5μL
	$V_{τελικός}$ = 10 μL

Μετά την διασύνδεση του κομμένου με BsaI φορέα pX333, με το δεύτερο sgRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA2) ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων με αυτά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και εν τέλει έγινε απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Τα απομονωμένα πλασμίδια pX333 με το πρώτο sgRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA1), υποβλήθηκαν σε PCR για να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή του. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο εκκινητής RECUR1_PM_KO_sgRNA1_F που υβριδίζει πάνω στην αλληλουχία του sgRNA1 και ο AIO_seq που υβριδίζει πάνω στον «σκελετό» του πλασμιδίου και ενισχύουν ένα τμήμα ~800 ζ.β. του πλασμιδίου που περιλαμβάνει την αλληλουχία του sgRNA1 (Εικόνα 30). Τα απομονωμένα πλασμίδια pX333 και με τα δύο sgRNA, υποβλήθηκαν σε PCR για να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή του δεύτερου sgRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA2). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο εκκινητής RECUR1_PM_KO_sgRNA2_F που υβριδίζει πάνω στην αλληλουχία του sgRNA2 και ο AIO_seq και ενισχύουν ένα τμήμα ~350 ζ.β. του πλασμιδίου που περιλαμβάνει την αλληλουχία του sgRNA2 (Εικόνα 30). Τέλος, για να επιβεβαιωθεί η ταυτόχρονη ύπαρξη και των δύο gRNA στον φορέα pX333, έγινε μία ακόμη PCR, με τους δύο εκκινητές που υβριδίζουν στην αλληλουχία των δύο sgRNA, τον RECUR1_PM_KO_sgRNA1_F και τον RECUR1_PM_KO_sgRNA2_R, που ενισχύουν ένα τμήμα ~450 ζ.β. του πλασμιδίου που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες και των δύο gRNA (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση των εκκινητών και των τμημάτων που ενισχύονται από αυτούς, που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR για τον έλεγχο της ένθεσης των δύο sgRNA στον φορέα pX333.

Στον Πίνακα 29 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όπως χρησιμοποιήθηκαν στις τρεις PCR για τον έλεγχο της εισαγωγής των sgRNA στον φορέα pX333, όπου στους εκκινητές αντιστοιχούν οι εκκινητές που περιγράφηκαν για την κάθε PCR και φαίνονται στην Εικόνα 30. Οι συνθήκες των αντιδράσεων παρατηρούνται στον Πίνακα 30, όπου διαφέρει μόνο ο χρόνος επέκτασης κάθε τμήματος (στην PCR για το sgRNA1 → 0:40 λεπτά, για το sgRNA2 → 0:25 λεπτά και για τα δύο sgRNA → 0:30 λεπτά).

Πίνακας 29: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους στις τρεις PCR για τον έλεγχο της εισαγωγής των sgRNA στον φορέα pX333

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: πλασμίδια pX333	1 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5 μL
Νουκλεοτίδια Thermo Scientific dNTPs (10mM)	0,5 μL
Εκκινητής ευθύς (F) (10μM)	1 μL
Εκκινητής ανάστροφος (R) (10μM)	1 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA Taq (5 U/μL)	0,15 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	41,35 μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 30: Συνθήκες στις τρεις PCR για τον έλεγχο της εισαγωγής των sgRNA στον φορέα pX333.

	Θερμοκρασία (ºC)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	2:00
Αποδιάταξη	95	0:30
Υβριδισμός εκκινητών	60	0:15
Επέκταση	72	0:40 / 0:25 / 0:30
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 25 κύκλους.

Τα πλασμίδια pX333 που είχαν απομονωθεί από βακτήρια με αλκαλική λύση ακολουθούμενη από κατακρήμνιση με αιθανόλη και για τα οποία επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη και των δύο gRNA, χρησιμοποιήθηκαν για εκ νέου μετασχηματισμό βακτηρίων, ώστε να απομονωθούν με εμπορικό κιτ για να είναι καθαρισμένα και σε επαρκή ποσότητα για την μετέπειτα χρήση τους στον μετασχηματισμό καρκινικών κυττάρων.

3.5.2 Δημιουργία knock-out κυτταρικής σειράς

Ο φορέας pX333 με τα δύο gRNA για αφαίρεση τμήματος του υποκινητή του γονιδίου RECUR1 από το γονιδίωμα (Εικόνα 28), χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό της γαστρικής καρκινικής σειράς AGS. Επειδή, ο φορέας pX333 δεν φέρει κάποιο χαρακτηριστικό ώστε να μπορεί να γίνει η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA6TR. Ο φορέας αυτός περιέχει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό βλαστισιδίνη (blasticidin), που είναι ένα αντιβιοτικό επιλογής για κύτταρα θηλαστικών. Έτσι με ταυτόχρονο μετασχηματισμό των κυττάρων και με τους δύο φορείς μπορεί να γίνει η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων AGS έγινε με την χρήση του αντιδραστηρίου διαμόλυνσης λιποφεκταμίνη (Lipofectamin 2000) της Invitrogen. Ο λόγος λιποφεκταμίνης προς το DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2:1. Συγκεκριμένα, για την διαδικασία του μετασχηματισμού παρήχθησαν δύο μείγματα. Το μίγμα DNA περιείχε 1,8μg από τον φορέα pX333 με τα δύο gRNA, 0,2 μg από τον φορέα pcDNA6TR και 250μL θρεπτικό Gibco Opti-MEM (1x) της ThermoScientific. Το μίγμα λιποφεκταμίνης περιείχε 4μg Lipofectamin 2000 και 250μL θρεπτικό Gibco Opti-MEM (1x). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον μετασχηματισμό ήταν η εξής:

1. Επώαση του μίγματος λιποφεκταμίνης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Μεταφορά του μίγματος λιποφεκταμίνης στο μίγμα DNA και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να παραχθούν τα λιποσωμάτια με το DNA.
3. Ανάμιξη των 10^6 κυττάρων AGS με το συνολικό μίγμα διαμόλυνσης (DNA mix + Lipofectamin mix με $V_{mix,\,τελ}$ = 0,5mL).
4. Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με περιοδικές ανακινήσεις του σωληνάριου.
5. Προσθήκη 4mL θρεπτικού Gibco™ RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement (1x) της ThermoScientific, στο μείγμα κυττάρων με το μίγμα διαμόλυνσης, μέχρι τελικό όγκο 6mL.
6. Αυτά τα 6mL μοιράστηκαν σε 3 x 100mm (10cm) πιάτα κυτταροκαλλιεργειών ως εξής: 1º: 5mL (5.000μL), 2º: 0,8mL (800μL), 3º: 0,2mL (200μL).
7. Προσθήκη θρεπτικού RPMI 1640 στα πιάτα μέχρι τα 7mL: 1º: 2mL (2.000μL), 2º: 6,2mL (6.200μL), 3º: 6,8mL (6.800μL).
8. Αλλαγή θρεπτικού στα πιάτα, με κανονικό RPMI1 1640, μετά από 8 ώρες, ώστε να αφαιρεθεί η λιποφεκταμίνη που απέμεινε.

Οι αραιώσεις στο βήματα 6 και 7 έγιναν ώστε τα κύτταρα να αναπτυχθούν στα πιάτα κυτταροκαλλιεργειών απομακρυσμένα το ένα από το άλλο και να σχηματίσουν ξεχωριστούς κλώνους.

Την επόμενη ημέρα, έγινε αλλαγή του RPMI 1640 θρεπτικού μέσου στα πιάτα, με το μέσο επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων, που αποτελείται από κανονικό RPMI 1640 + αντιβιοτικό βλαστισιδίνη (10μg/mL). Μετά από τρεις ημέρες, έγινε αλλαγή του μέσου επιλογής με κανονικό RPMI 1640. Στην συνέχεια μετά από κάποιες ημέρες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων, έγινε συλλογή κλώνων κυττάρων και αυτοί μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστά πηγάδια πιάτων κυτταροκαλλιεργειών των 12 πηγαδιών. Αυτό έγινε ώστε να αυξηθούν ξεχωριστά οι κλώνοι των κυττάρων και να γίνει απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αυτούς, για να εκλεχθεί η επιτυχία της αφαίρεσης του τμήματος του υποκινητή του γονιδίου RECUR1 από το γονιδίωμα.

3.5.3 Γονοτύπηση των knock-out κυτταρικών σειρών

Εντοπίστηκαν και ελέγχθηκαν οι εκκινητές που θα επέτρεπαν την γονοτύπηση των κυττάρων με PCR, ώστε να ελεγχθεί αν αφαιρέθηκε το τμήμα του υποκινητή του RECUR1 από το γονιδίωμα. Οι εκκινητές είναι ο RECUR1_subprom_F και ο RECUR1_prom_R, οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 672 ζ.β. του υποκινητή του RECUR1 (Εικόνα 28). Το τμήμα που ενισχύεται από τους εκκινητές αυτούς περιλαμβάνει την περιοχή που αφαιρείται από τον υποκινητή με την δράση των δύο gRNA που είναι 424 ζ.β. Έγινε μία αντίδραση PCR με αυτούς του εκκινητές σε διάφορες απομονώσεις γονιδιωματικού DNA από κύτταρα στα οποία δεν είναι πραγματοποιηθεί το knock-out και είχαν τον αγρίου τύπου υποκινητή, για έλεγχο των εκκινητών και βελτιστοποίηση των συνθηκών. Στον Πίνακα 31 παρατηρούνται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την PCR και στον Πίνακα 32 οι συνθήκες τις αντίδρασης.

Πίνακας 31: Αντιδραστήρια και ποσότητές τους για την PCR γονοτύπησης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Υπόστρωμα DNA: γονιδιωματικό DNA	- μL (500ng)
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq A Buffer with Mg (10x)	5 μL
Νουκλεοτίδια ThermoScientific dNTPs (10mM)	0,5 μL
Εκκινητής RECUR1_subprom_Clon_F1 (10μM)	1 μL
Εκκινητής LINC00941_prom_R1 (10μM)	1 μL
Πολυμεράση του DNA KAPA Taq (5 U/μL)	0,15 μL
Ενέσιμο ύδωρ (WFI)	- μL
	$V_{τελικός}$ = 50 μL

Πίνακας 32: Συνθήκες για την PCR γονοτύπησης.

	Θερμοκρασία (ºC)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	5:00
Αποδιάταξη	95	1:00
Υβριδισμός εκκινητών	58	0:20
Επέκταση	72	0:45
Τελική επέκταση	72	5:00

Τα βήματα της Αποδιάταξης, του Υβριδισμού και της Επέκτασης επαναλήφθηκαν για 45 κύκλους.

4. Αποτελέσματα

4.1 Ποσοτικές PCR για έλεγχο της έκφρασης του lncRNA RECUR1 και του RECUR1_target

Αρχικά, για την επιβεβαίωση ρύθμισης του lncRNA RECUR1 από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4 και GATA6, πραγματοποιήθηκαν δύο ποσοτικές PCR (qPCR). Το υπόστρωμα συμπληρωματικού DNA (cDNA), στο οποίο έγιναν οι qPCR, προερχόταν από πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο σε προηγούμενο χρόνο. Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν την αλληλουχία DNA «5'-GATA-3'», μέσω δομών δακτύλου ψευδαργύρου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή [76]. Οι παράγοντες GATA4 και GATA6 είχε δειχθεί από προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου ότι συσχετίζονται με την έκφραση του lncRNA RECUR1.

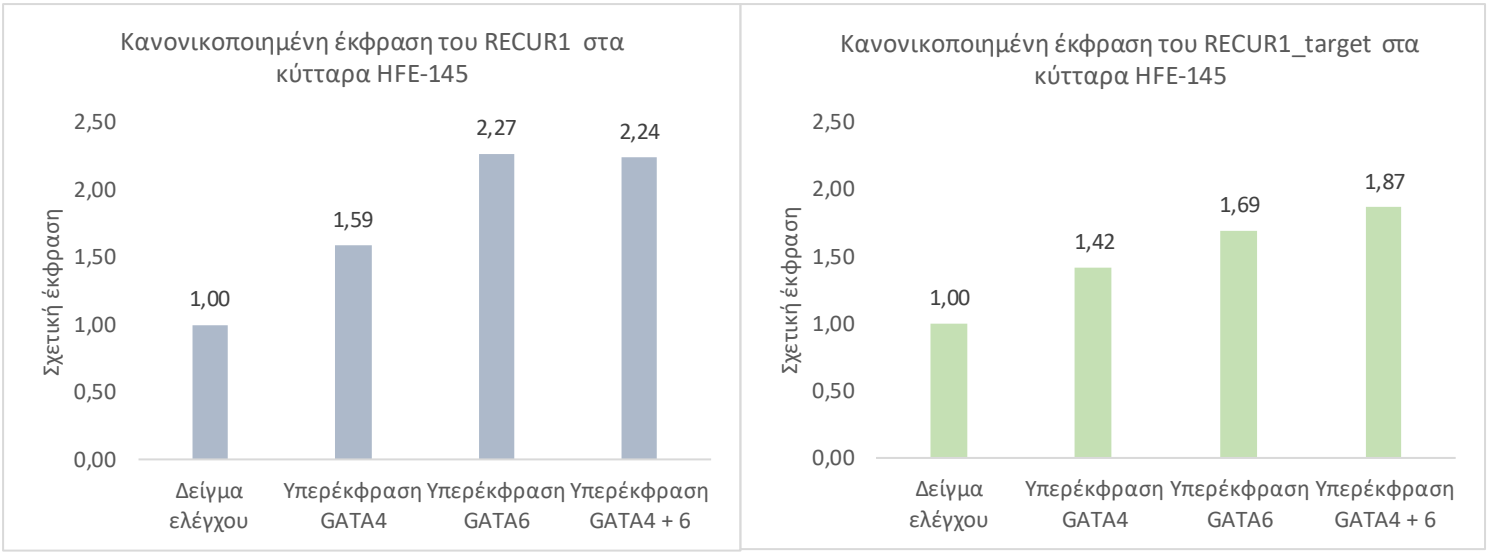
Το πρώτο πείραμα αφορούσε cDNA, που παράχθηκε από την κυτταρική σειρά HFE-145. Η HFE-145 είναι μια ανθρώπινη αθανατοποιημένη μη νεοπλασματική γαστρική επιθηλιακή κυτταρική σειρά, που έχει μορφολογικές και φαινοτυπικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στα πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου [77]. Τα κύτταρα HFE-145 τροποποιήθηκαν γενετικά ώστε να υπερεκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA4, GATA6 ξεχωριστά και σε συνδυασμό. Το δεύτερο πείραμα αφορούσε cDNA που παράχθηκε από την κυτταρική σειρά AGS. Η AGS είναι μια μετρίως διαφοροποιημένη υπερδιπλοειδής κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος [78]. Τα κύτταρα AGS τροποποιήθηκαν γενετικά ώστε να καταστέλλεται η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6.

Για την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων επιλέχθηκε η σειρά HFE-145, επειδή είναι μη νεοπλασματική και σε αυτή δεν αναμένεται να εκφράζεται το lncRNA RECUR1, που έχει πιθανή ογκογόνο δράση. Έτσι σε αυτή την σειρά, έγινε υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, για να ελεγχθεί αν παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του RECUR1. Για την καταστολή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων επιλέχθηκε η σειρά AGS, καθώς είναι γαστρική καρκινική σειρά και σε αυτή αναμένεται να εκφράζεται το lncRNA RECUR1. Επομένως, σε αυτή την σειρά που ήδη εκφράζεται το RECUR1, έγινε καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων, για να ελεγχθεί αν παρατηρείται αντίστοιχη μείωση της έκφρασής του.

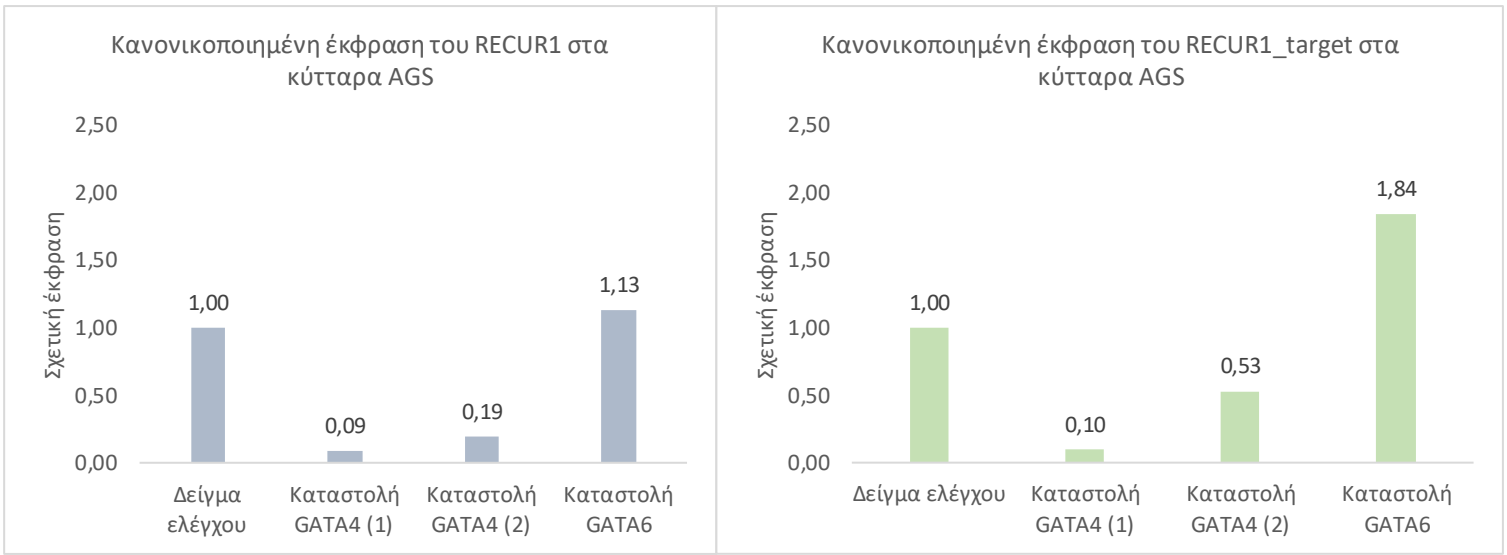
Τα αποτελέσματα της qPCR για έλεγχο της έκφρασης του RECUR1 και του γονιδίου στόχου του (RECUR1_target), από την σειρά HFE-145 στην οποία είχε γίνει υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6, φαίνονται στην Εικόνα 31. Στα διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα της σχετικής κανονικοποιημένης έκφραση, με βάση του δείγμα ελέγχου, που είναι η έκφραση σε κύτταρα τα οποία μετασχηματίστηκαν με άδειους φορείς. Όπως παρατηρείται τόσο κατά την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και 6 ξεχωριστά, όσο και σε συνδυασμό, η έκφραση του RECUR1 αυξάνεται. Αυτό υποδηλώνει την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του RECUR1 από τους μεταγραφικούς παράγοντες αυτούς. Αντίστοιχη αύξηση παρατηρείται και στο πιθανό γονίδιο στόχο του RECUR1, το RECUR1_target.

Τα αποτελέσματα της qPCR για έλεγχο της έκφρασης του RECUR1 και του RECUR1_target, από την κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού αδενοκαρκινώματος AGS, στην οποία είχε γίνει καταστολή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6, φαίνονται στην Εικόνα 32. Στα διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα της σχετικής κανονικοποιημένης έκφραση, με βάση του δείγμα ελέγχου, που είναι η έκφραση σε κύτταρα τα οποία μετασχηματίστηκαν με άδειους φορείς. Όπως παρατηρείται κατά την καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, έκφραση του RECUR1 μειώνεται κατά πολύ (μείωση κατά 80-90%). Οι αριθμοί (1) και (2)

υποδεικνύουν δύο διαφορετικούς φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την καταστολή. Αυτό υποδηλώνει πάλι την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του RECUR1 από τον μεταγραφικό παράγοντα αυτό. Αντίστοιχη μείωση παρατηρείται και στο RECUR1_target. Δεν παρατηρείται μείωση της έκφρασης και κατά την καταστολή του GATA6, διότι δεν είχε επιτευχθεί υψηλό ποσοστό καταστολής της έκφρασής του στο πείραμα αυτό.



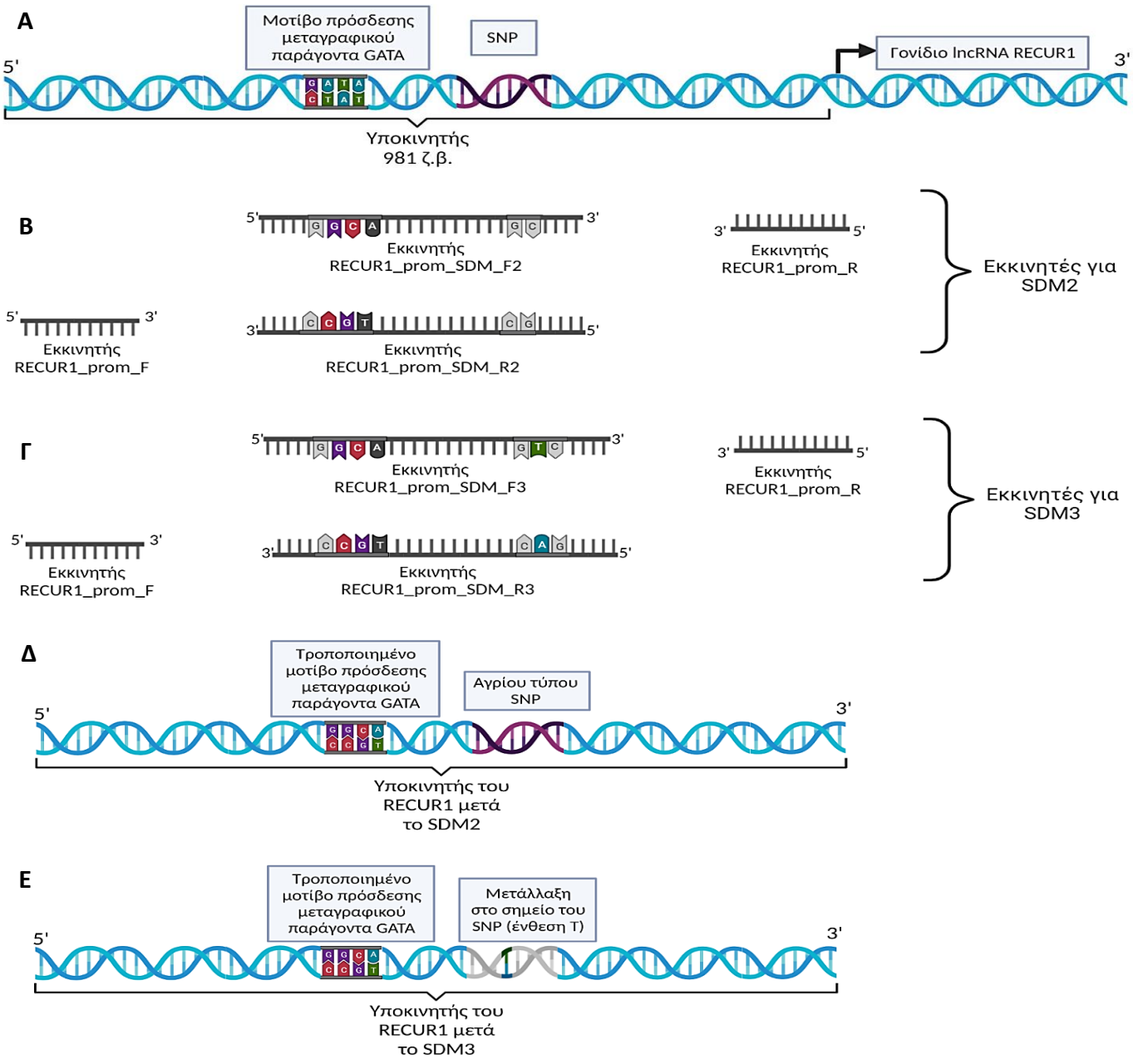
Εικόνα 31: Σχετική κανονικοποιημένη έκφραση του RECUR1 και του RECUR1_target στα κύτταρα HFE-145 στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6.



Εικόνα 32: Σχετική κανονικοποιημένη έκφραση του RECUR1 και του RECUR1_target στα κύτταρα AGS, στα οποία είχε γίνει καταστολή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA4 και GATA6.

4.2 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του υποκινητή του lncRNA RECUR1 και κατασκευή πλασμιδιάκων φορέων

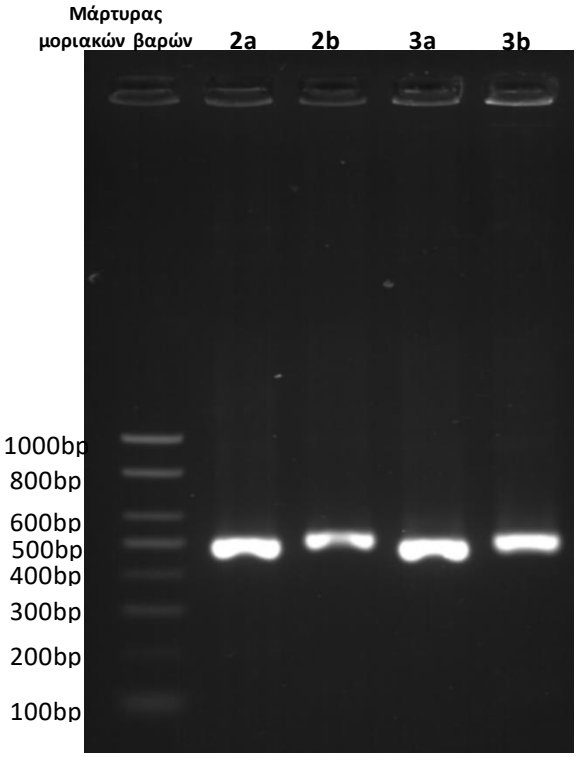
Έχοντας επιβεβαιώσει πειραματικά ότι η έκφραση των RECUR1 και RECUR1_target ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA, ακολούθησαν πειράματα τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης στα μοτίβα πρόσδεσης τους στον υποκινητή του RECUR1, καθώς και σε ένα SNP (πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου) που εδρεύει σε αυτόν και πιθανώς βρίσκεται σε ένα μοτίβο πρόσδεσης ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα (Εικόνα 33.Α).



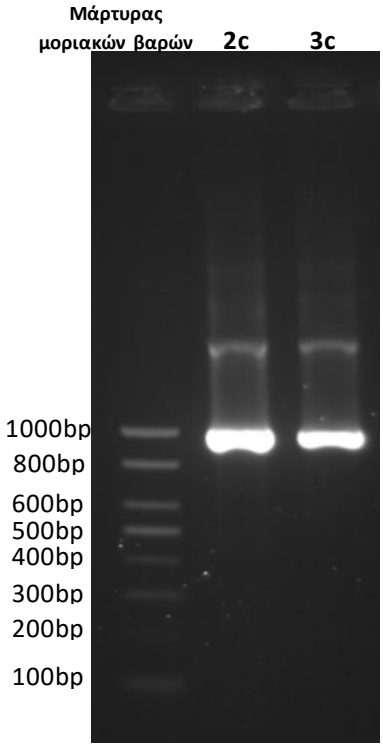
Εικόνα 33: **Α)** Σχηματική απεικόνιση του αγρίου τύπου υποκινητή του lncRNA RECUR1. Παρατηρούνται το μοτίβο πρόσδεσης μεταγραφικού παράγοντα GATA και η περιοχή στην οποία εντοπίζεται ένας πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP). **Β)** Ζεύγη εκκινητών με τις επιθυμητές αλλαγές, που χρησιμοποιήθηκαν για την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση 2 (SDM 2). **Γ)** Ζεύγη εκκινητών με τις επιθυμητές αλλαγές, που χρησιμοποιήθηκαν για την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση 3 (SDM 3). **Δ)** Σχηματική απεικόνιση του υποκινητή του RECR1 μετά την SDM2. Παρατηρείται η αλλαγή στο μοτίβο πρόσδεσης μεταγραφικού παράγοντα GATA από «5'-GATA-3'» σε «5'-GGCA-3'», ενώ δεν υπάρχει αλλαγή στην περιοχή του SNP. **Ε)** Σχηματική απεικόνιση του υποκινητή του RECR1 μετά την SDM3. Παρατηρείται η αλλαγή στο μοτίβο πρόσδεσης μεταγραφικού παράγοντα GATA από «5'-GATA-3'» σε «5'-GGCA-3'» και η μετάλλαξη στην περιοχή του SNP, που είναι μία ένθεση ενός νουκλεοτιδίου θυμίνης (Τ). (Δημιουργήθηκε με το BioRender.com)

Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τοποκατευθυνόμενες μεταλλαξογενέσεις στον υποκινητή του RECUR1. Στην SDM2 έγινε τροποποίηση του μοτίβου πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA, από «5'-G**AT**A-3'» σε «5'-G**GC**A-3'» (Εικόνα 33.Δ). Στην SDM3 έγινε τροποποίηση του μοτίβου πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA και ταυτόχρονα την διατάραξη της αλληλουχίας στην περιοχή του SNP (Εικόνα 33.Ε). Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου είχε γίνει μία άλλη τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση στον υποκινητή του RECUR1. Στην SDM1 περιλαμβάνονταν μόνο η διατάραξη της αλληλουχίας στην περιοχή του SNP και όχι η τροποποίηση του μοτίβου πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA.

Κατά τις δύο SDM (2 και 3), είχαν πραγματοποιηθεί τρεις αντιδράσεις PCR (a, b, c) για την δημιουργία των μεταλλάξεων στην αλληλουχία του υποκινητή του RECUR1. Στην Εικόνα 34 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των PCR a και b για τις SDM2 και SDM3, όπου παρατηρούνται τα αναμενόμενα προϊόντα περίπου 500 ζ.β. Στην Εικόνα 35 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR c για τις SDM2 και SDM3, όπου παρατηρούνται τα αναμενόμενα προϊόντα στις 981 ζ.β., που είναι και το συνολικό μήκος του υποκινητή.



Εικόνα 34: Εικόνα από πηκτή αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα των PCR a και b για τις SDM2 και SDM3. (2 ή 3 = SDM 2 ή 3 και a ή b = PCR a ή b)

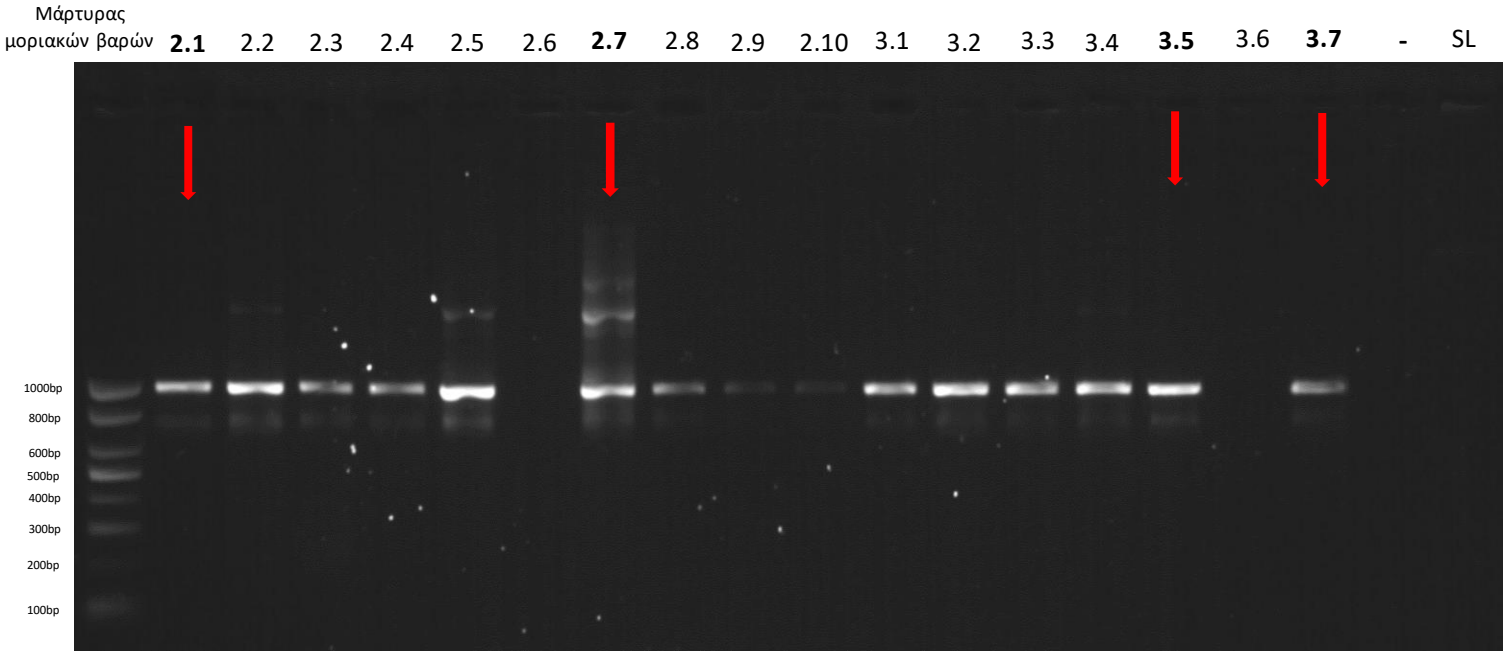


Εικόνα 35: Εικόνα από πηκτή αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR c για τις SDM2 και SDM3. (2 ή 3 = SDM 2 ή 3 και c = PCR c)

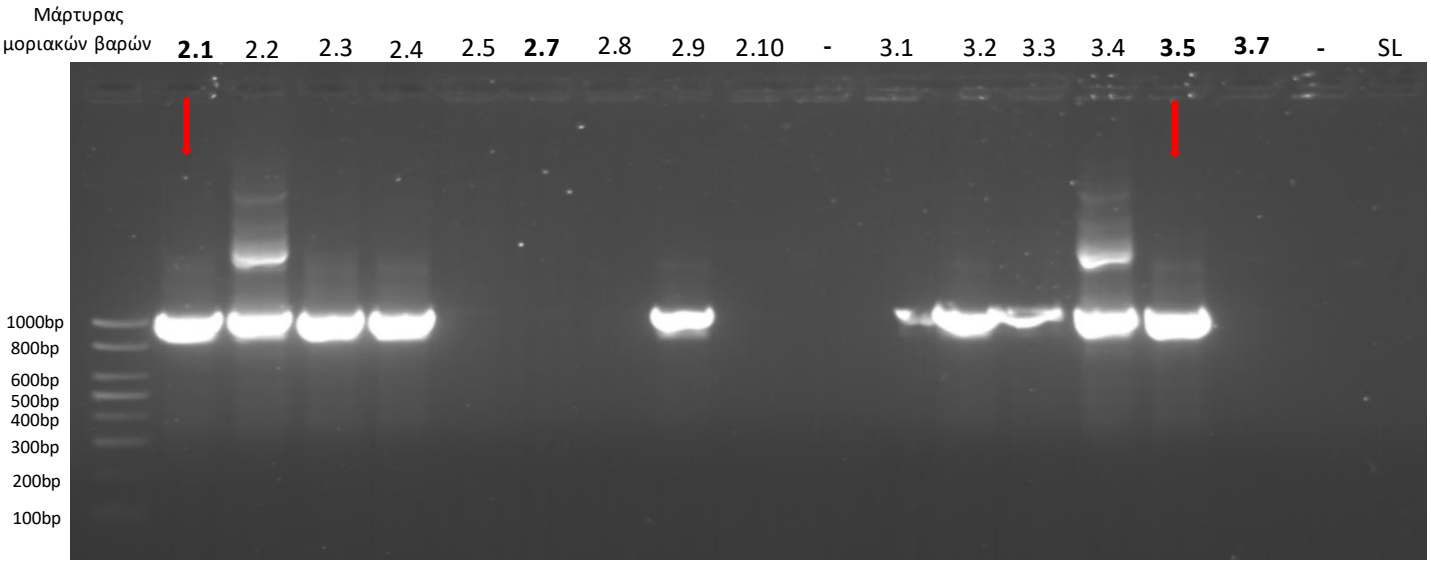
Κατά τις κλωνοποιήσεις στο φορέα pGL4.10, του μεταλλαγμένου υποκινητή του RECUR1 με τις SMD2 και SDM3, έγιναν τρεις διαγνωστικές PCR στα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τις βακτηριακές καλλιέργειες. Στην Εικόνα 36 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR σε πλασμίδια από 18 βακτηριακούς κλώνους, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3, ανεξαρτήτως προσανατολισμού στον φορέα pGL4.10. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες στις ~1000 ζ.β. (μήκος υποκινητή 981 ζ.β.), ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL) που είναι ο αυτο-διασυνδεδεμένος φορέας χωρίς το ένθεμα, δεν παρατηρείται κάποια ζώνη. Στην Εικόνα 37 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR σε πλασμίδια από 16 βακτηριακούς κλώνους, για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2

και 3. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες κοντά στα 1000 ζ.β. (μήκος υποκινητή 981 ζ.β. + τμήμα του σκελετού του φορέα), ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL) δεν παρατηρείται κάποια ζώνη. Στην Εικόνα 38 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR σε πλασμίδια από 10 βακτηριακούς κλώνους, για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 3'-5' του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες κοντά στα 1000 ζ.β. (μήκος υποκινητή 981 ζ.β. + τμήμα του σκελετού του φορέα), αλλά και κάποιες μη ειδικές ζώνες, ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL) δεν παρατηρείται κάποια ζώνη.

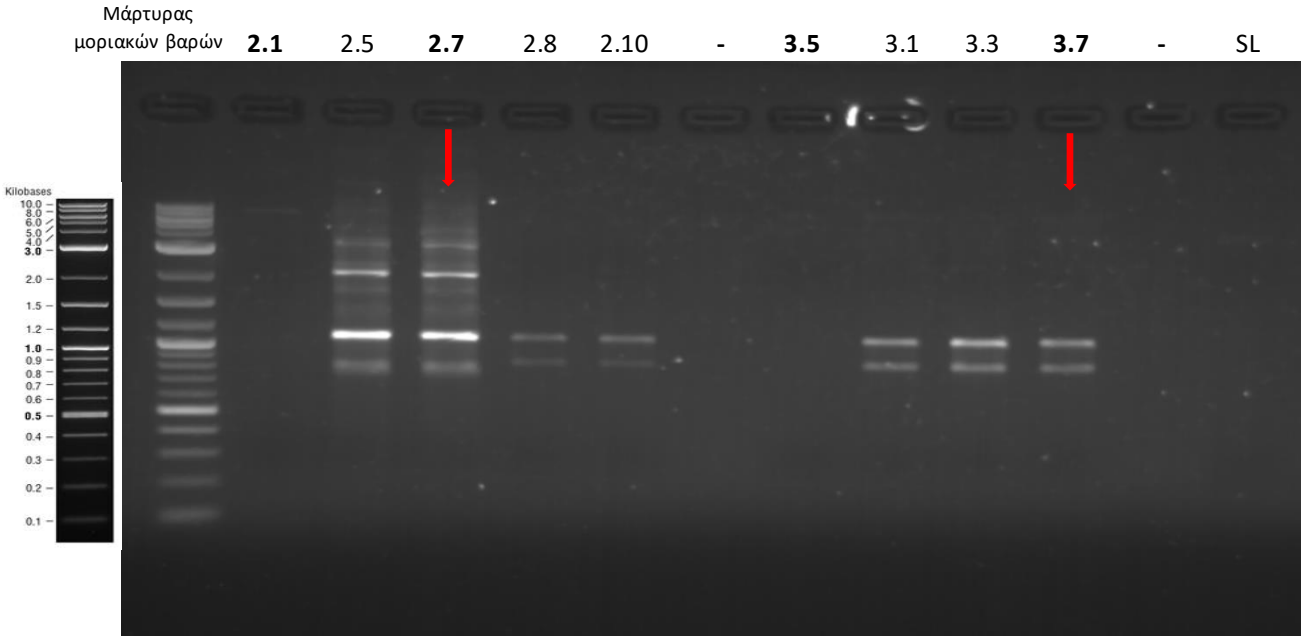
Και στις τρεις εικόνες (31-33) με κόκκινα βέλη επισημαίνονται οι κλώνοι 2.1, 2.7, 3.5 και 3.7, που επιλέχθηκαν για χρήση στα πειράματα λουσιφεράσης.



Εικόνα 36: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR σε πλασμίδια από 18 βακτηριακούς κλώνους, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3, ανεξαρτήτως προσανατολισμού στον φορέα pGL4.10 (2 ή 3 = SDM 2 ή 3 και ο αριθμός μετά υποδηλώνει τον βακτηριακό κλώνο από τον οποίο απομονώθηκε το κάθε πλασμίδιο).



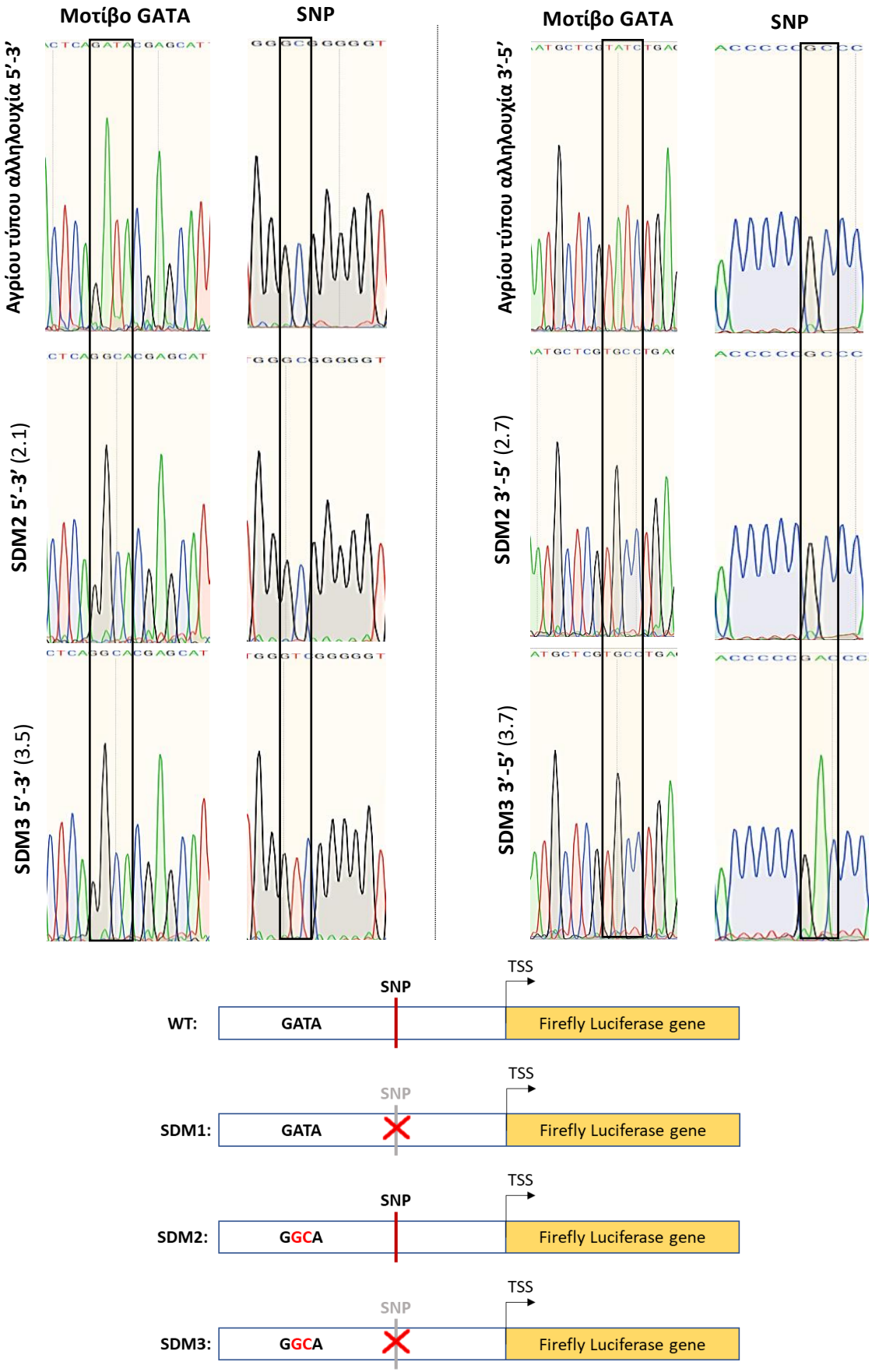
Εικόνα 37: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR σε πλασμίδια από 16 βακτηριακούς κλώνους, για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 (2 ή 3 = SDM 2 ή 3 και ο αριθμός μετά υποδηλώνει τον βακτηριακό κλώνο από τον οποίο απομονώθηκε το κάθε πλασμίδιο).



Εικόνα 38: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR σε πλασμίδια από 10 βακτηριακούς κλώνους, για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 3'-5' του υποκινητή του RECUR1 με τις SDM 2 και 3 (2 ή 3 = SDM 2 ή 3 και ο αριθμός μετά υποδηλώνει τον βακτηριακό κλώνο από τον οποίο απομονώθηκε το κάθε πλασμίδιο).

Τελικά, προέκυψαν δύο pGL4.10 πλασμίδια, ένα με ένθεμα τον υποκινητή του RECUR1 με την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση 2 (SDM2) (2.1 και 2.7) και ένα με ένθεμα τον υποκινητή του RECUR1 με την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση 3 (SDM3) (3.5 και 3.7). Για κάθε SDM απομονώθηκαν χωριστά δύο κλώνοι με προσανατολισμό 5'-3' (2.1 και 3.5) και 3'-5' (2.7 και 3.7).

Όπως είχε αναφερθεί, για να επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του υποκινητή του RECUR1, τα παραπάνω απομονωμένα πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχηση DNA κατά Sanger. Στην Εικόνα 39 φαίνονται τα χρωματογραφήματα από την αλληλούχηση των δύο υποκινητών με τις SDM2 και 3, σε σύγκριση με την αλληλουχία αγρίου τύπου του υποκινητή. Όπως παρατηρείται στις επιλεγμένες περιοχές πράγματι η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του υποκινητή ήταν επιτυχημένη. Στην SDM2 και με τους δύο προσανατολισμούς έγινε τροποποίηση μόνο του μοτίβου GATA από «5'-GATA-3'» σε «5'-GGCA-3'», ενώ στην SDM3 έγινε τροποποίηση του μοτίβου GATA αλλά ταυτόχρονα έγινε και ένθεση ενός νουκλεοτιδίου θυμίνης (T) στην περιοχή του SNP.

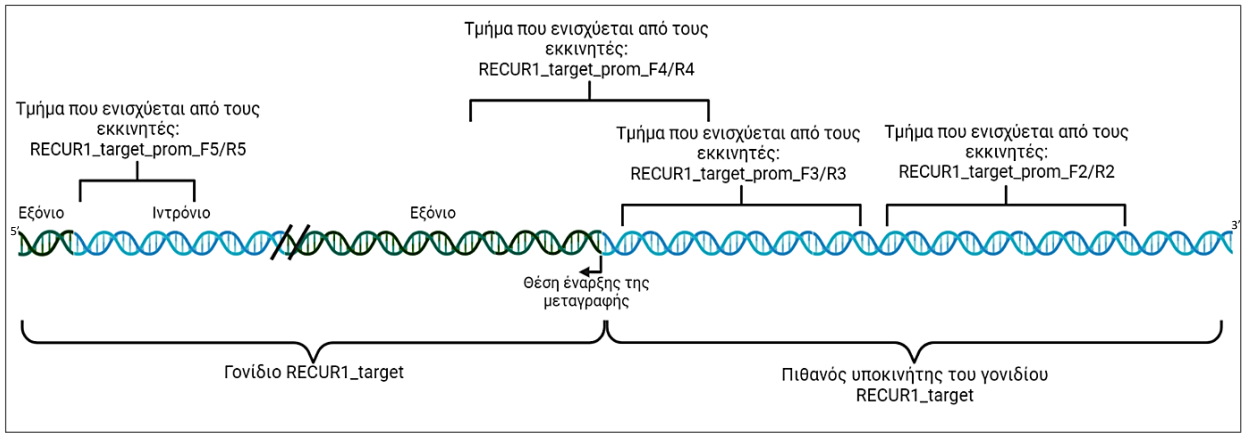


Εικόνα 39: Χρωματογραφήματα από την αλληλούχηση των τεσσάρων υποκινητών με τις SDM2 και 3, σε σύγκριση με την αγρίου τύπου αλληλουχία του υποκινητή του RECUR1. Κάτω από τα χρωματογραφήματα φαίνεται σχηματικά το αποτέλεσμα των τριών SMD στο μοτίβο GATA και στο SNP του υποκινητή του RECUR1.

4.3 Απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target από γονιδιωματικό DNA και κλωνοποίησή του

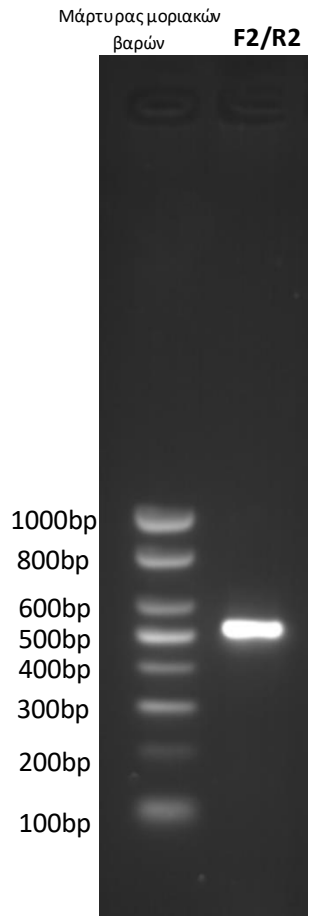
Το επόμενο βήμα μετά από την επιτυχή τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση ήταν η απομόνωση και η κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου-στόχου του RECUR1, σε πλασμιδιακό φορέα λουσιφεράσης. Για την απομόνωση από ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA, διαφορετικών τμημάτων ανοδικά και εσωτερικά του γονιδίου RECUR1_target, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα ζεύγη εκκινητών για την, όπως φαίνεται στην Εικόνα 40. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών που δοκιμάστηκε ήταν το RECUR1_target_prom_F2/R2 και ενισχύει μία περιοχή πριν από την θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου (τμήμα 2). Επιπλέον δοκιμάστηκαν και τα ζεύγη εκκινητών RECUR1_target_prom_F3/R3 και RECUR1_target_prom_F4/R4, που ενισχύουν περιοχές πιο κοντά στην θέση έναρξης της μεταγραφής και εντός του πρώτου εξονίου του γονιδίου. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε και το ζεύγος εκκινητών RECUR1_target_prom_F5/R5 που ενισχύει μία περιοχή εσωτερικά του γονιδίου σε ένα ιντρόνιό του (τμήμα 5). Αυτό το ζεύγος χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί εάν κάποια άλλη ισομορφή του γονιδίου είναι αυτή που μεταγράφεται από άλλο σημείο παραλείποντας τα πρώτα εξόνια.

Από τέσσερα αυτά ζεύγη εκκινητών μόνο τα τμήματα που προκύπτουν από τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2 και RECUR1_target_prom_F5/R5 απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς. Για τα τμήματα που προκύπτουν από τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F3/R3 και RECUR1_target_prom_F4/R4, δεν μπόρεσαν να απομονωθούν ή να κλωνοποιηθούν, λόγω προβλημάτων στις PCR σε γονιδιωματικό DNA, πιθανότατα λόγω των πολλών επαναλήψεων που εντοπίζονται στο γονιδίωμα σε αυτή την περιοχή ή λόγω προβλημάτων κατά την διαδικασία της κλωνοποίησής τους.

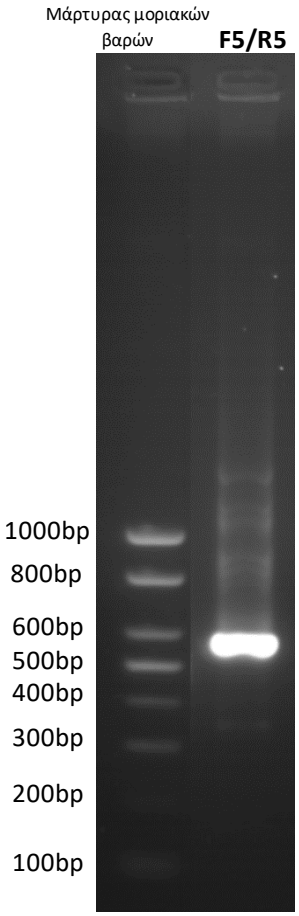


Εικόνα 40: Σχηματική αναπαράσταση του γενετικού τόπου του γονιδίου RECUR1_target και των περιοχών που ενισχύονται από τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του υποκινητή του. (Δημιουργήθηκε με το BioRender.com)

Στην Εικόνα 41 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR για την ενίσχυση του τμήματος-2 516 ζ.β. από τους ενισχυτές RECUR1_target_prom_F2 και RECUR1_target_prom_R2, όπου παρατηρείται το αναμενόμενο προϊόν περίπου στα 500 ζ.β. Στην Εικόνα 42 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR για την ενίσχυση του τμήματος-5 568 ζ.β. από τους ενισχυτές RECUR1_target_prom_F5 και RECUR1_target_prom_R5, όπου παρατηρείται το αναμενόμενο προϊόν περίπου στα 600 ζ.β.



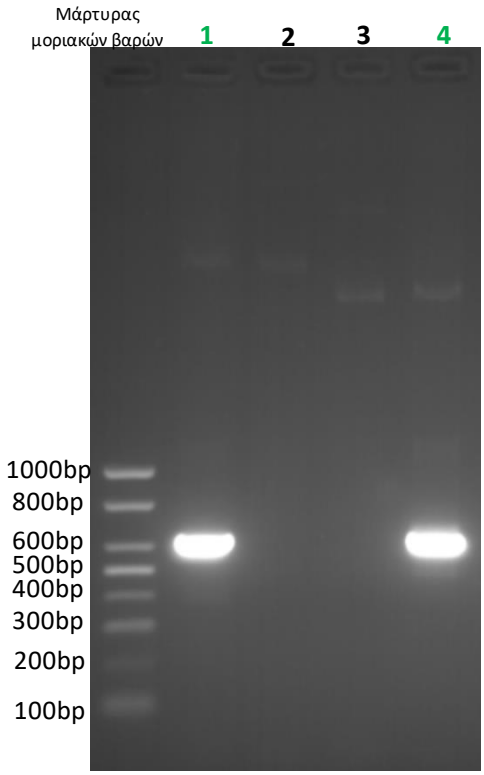
Εικόνα 41: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR για την ενίσχυση του τμήματος-2 516 ζ.β., του υποκινητή του RECUR1_target, από τους ενισχυτές RECUR1_target_prom_F2 και RECUR1_target_prom_R2.



Εικόνα 42: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR για την ενίσχυση του τμήματος-5 568 ζ.β., του υποκινητή του RECUR1_target, από τους ενισχυτές RECUR1_target_prom_F5 και RECUR1_target_prom_R5.

Κατά τις κλωνοποιήσεις στο φορέα pGL4.10, του τμήματος-2 του υποκινητή του RECUR1_target, έγιναν δύο διαγνωστικές PCR στα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τις βακτηριακές καλλιέργειες. Στην Εικόνα 43 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των PCR για προσδιορισμού του προσανατολισμού 5’-3’ και 3’-5’, μόνο των δύο κλώνων που επιλέχθηκαν τελικά για τις δοκιμασίες λουσιφεράσης. Στις δύο πρώτες θέσεις μετά τον μάρτυρα μοριακών βαρών, παρατηρούνται οι PCR και για τους δύο προσανατολισμούς στο φορέα που είχε το τμήμα-2 του υποκινητή του RECUR1_target και επιβεβαιώνεται ότι έχει προσανατολισμό 5’-3’, καθώς παρατηρείται ζώνη μόνο στην PCR για προσδιορισμό του 5’-3’ και όχι σε αυτή για προσδιορισμό του 3’-5’. Στις δύο τελευταίες θέσεις μετά τον μάρτυρα μοριακών βαρών, παρατηρούνται οι PCR και για τους δύο προσανατολισμούς στο φορέα που είχε το τμήμα-2 του υποκινητή του RECUR1_target και επιβεβαιώνεται ότι έχει προσανατολισμό 3’-5’, καθώς δεν παρατηρείται ζώνη στην PCR για προσδιορισμό του 5’-3’ και αλλά μόνο σε αυτή για προσδιορισμό του 3’-5’.

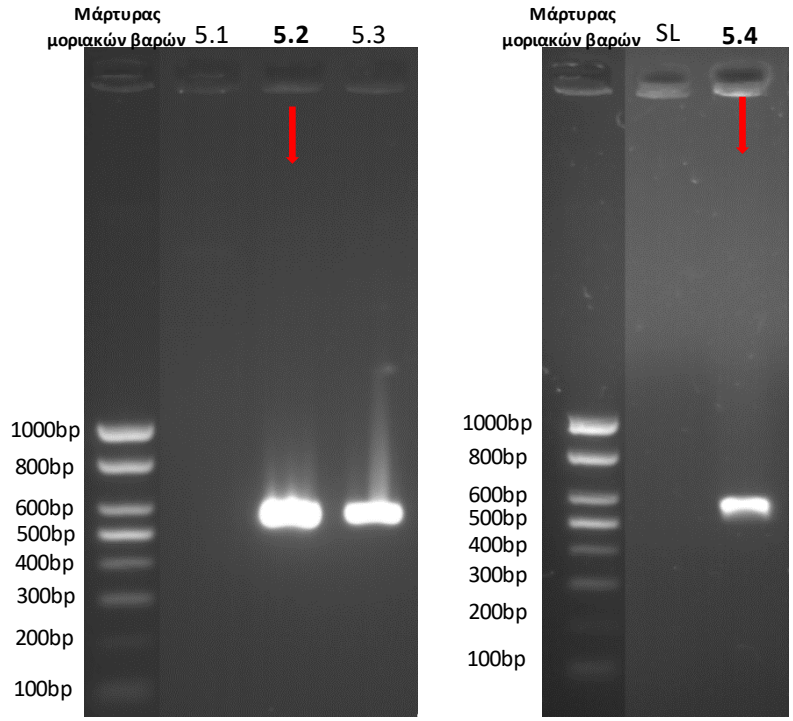
Κατά τις κλωνοποιήσεις στο φορέα pGL4.10, του τμήματος-5 του υποκινητή του RECUR1_target, έγιναν τρεις διαγνωστικές PCR στα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τις βακτηριακές καλλιέργειες. Στην Εικόνα 44 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR



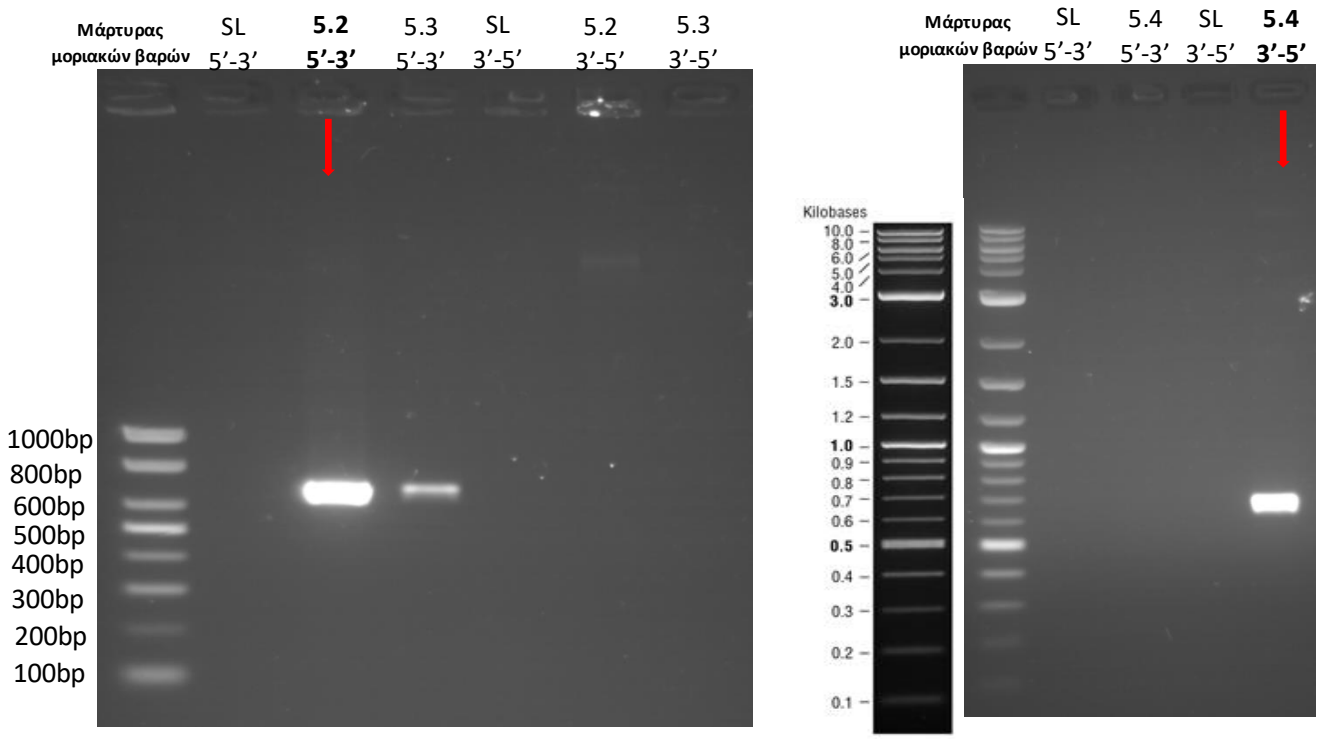
Εικόνα 43: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα των PCR για προσδιορισμού του προσανατολισμού 5'-3' και 3΄-5' του τμήματος-2 του υποκινητή του RECUR1_target στον φορέα pGL4.10, μόνο των δύο κλώνων που επιλέχθηκαν τελικά για τις δοκιμασίες λουσιφεράσης. (1): Υποκινητής με προσανατολισμό 5'-3' και έλεγχος για προσανατολισμό 5'-3'. (2): Υποκινητής με προσανατολισμό 5'-3' και έλεγχος για προσανατολισμό 3'-5'. (3): Υποκινητής με προσανατολισμό 3'-5' και έλεγχος για προσανατολισμό 5'-3'. (4): Υποκινητής με προσανατολισμό 3'-5' και έλεγχος για προσανατολισμό 3'-5'.

σε πλασμίδια από 5 βακτηριακούς κλώνους, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του τμήματος-5 του υποκινητή του RECUR1_target, ανεξαρτήτως προσανατολισμού στον φορέα pGL4.10. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες στις ~600 ζ.β. (μήκος τμήματος-5 586 ζ.β.), ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL) που είναι ο αυτο-διασυνδεδεμένος φορέας χωρίς το ένθεμα, δεν παρατηρείται κάποια ζώνη. Στην Εικόνα 45 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR σε πλασμίδια από 4 βακτηριακούς κλώνους, για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' του τμήματος-5 του υποκινητή του RECUR1_target. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες κοντά στα 700 ζ.β. (μήκος υποκινητή 586 ζ.β. + τμήμα του σκελετού του φορέα), ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL) δεν παρατηρείται κάποια ζώνη.

Τελικά, προέκυψαν τέσσερα πλασμίδια. Δύο πλασμίδια pGL4.10 με ένθεμα τμήμα του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F2/R2 με προσανατολισμό 5'-3' και 3'-5' και δύο πλασμίδια pGL4.10 με ένθεμα τμήμα του υποκινητή του γονιδίου RECUR1_target, ενισχυμένο με τους εκκινητές RECUR1_target_prom_F5/R5 με προσανατολισμό 5'-3' και 3'-5'.



Εικόνα 44: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR σε πλασμίδια από 5 βακτηριακούς κλώνους, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του τμήματος-5 του υποκινητή του RECUR1_target, ανεξαρτήτως προσανατολισμού στον φορέα pGL4.10. (5 = τμήμα 5 και ο αριθμός μετά υποδηλώνει τον βακτηριακό κλώνο από τον οποίο απομονώθηκε το κάθε πλασμίδιο)



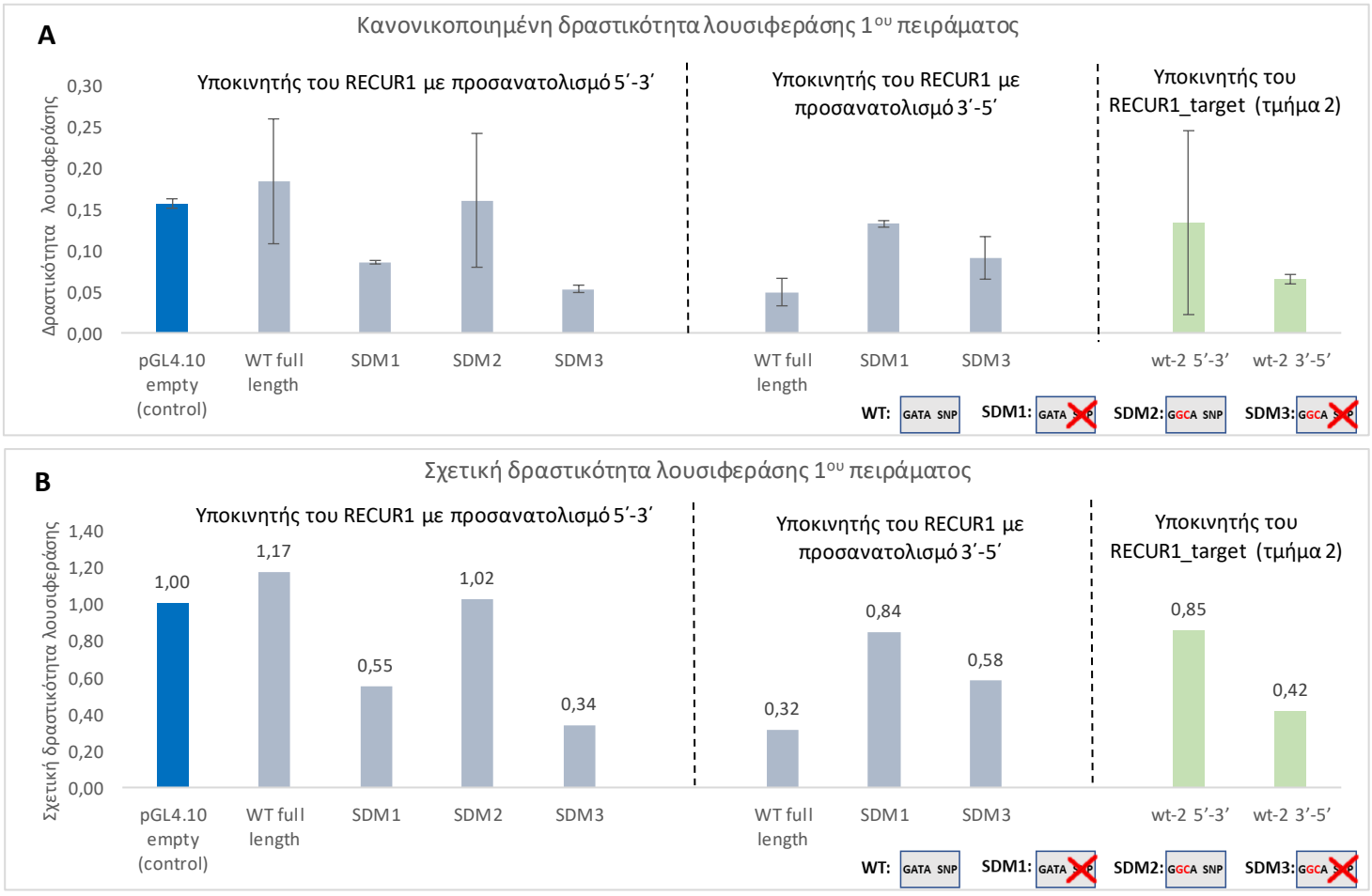
Εικόνα 45: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της της PCR σε πλασμίδια από 4 βακτηριακούς κλώνους, για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού 5'-3' και 3'-5' του τμήματος-5 του υποκινητή του RECUR1_target. (5 = τμήμα 5 και ο αριθμός μετά υποδηλώνει τον βακτηριακό κλώνο από τον οποίο απομονώθηκε το κάθε πλασμίδιο. 5'-3': έλεγχος για προσανατολισμό 5'-3'. 3'-5': έλεγχος για προσανατολισμό 3'-5').

Από του κλώνους που φαίνονται στις εικόνες 39 και 40 (επισημαίνονται με κόκκινα βέλη), επιλέχθηκαν οι κλώνοι **5.2** (με προσανατολισμό 5'-3') και **5.4** (με προσανατολισμό 3'-5') του τμήματος-5 του υποκινητή του RECUR1_target, για την χρήση τους στα πειράματα λουσιφεράσης.

4.4 Πειράματα βιοφωταύγειας λουσιφεράσης για προσδιορισμό λειτουργικότητας των ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων RECUR1 και RECUR1_target

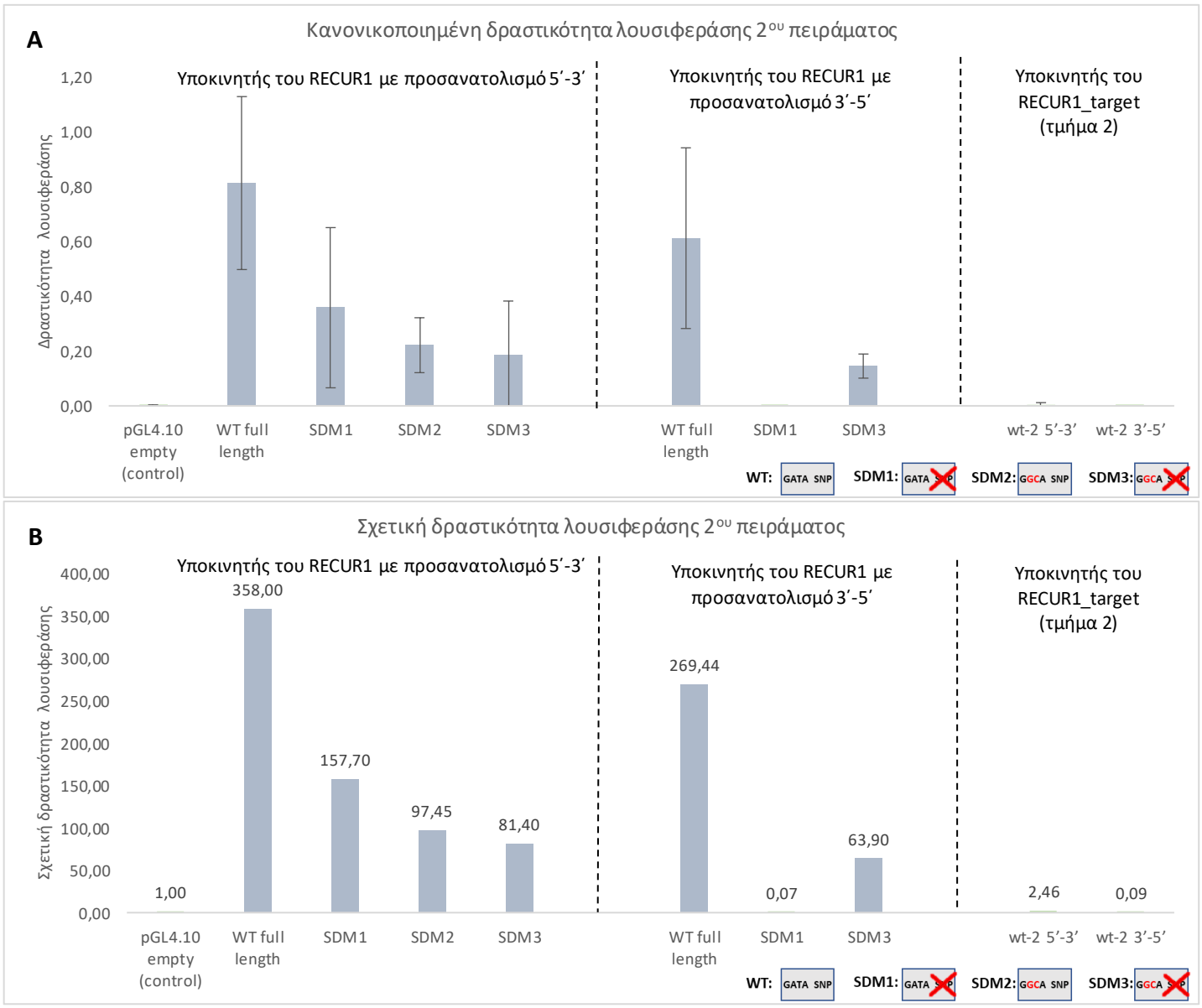
Έπειτα από την επιτυχή κλωνοποίηση των ρυθμιστικών αλληλουχιών σε πλασμιδιακούς φορείς λουσιφεράσης, ακολούθησαν δοκιμές βιοφωταύγειας ώστε να πραγματοποιηθεί πειραματικός συγκριτικός έλεγχος της λειτουργίας τους.

Στο πρώτο πείραμα λουσιφεράσης έγινε ο έλεγχος της επίδρασης των τοποκατευθυνόμενων μεταλλαξογενέσεων (SDM 1, 2 και 3), στην λειτουργικότητα του υποκινητή του γονιδίου του lncRNA RECUR1, στην κυτταρική σειρά AGS. Στην Εικόνα 46 φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού ως κανονικοποιημένες τιμές δραστικότητας λουσιφεράσης (46.A) και ως σχετικές τιμές με βάση την δραστικότητα που καταγράφηκε στο δείγμα ελέγχου (46.B). Οι γραμμές σφάλματος προέκυψαν από την τυπική απόκλιση των δύο επαναλήψεων για κάθε δείγμα. Στο πείραμα αυτό οι τιμές δραστικότητας λουσιφεράσης ήταν πολύ χαμηλές, πιθανόν λόγω του μη επαρκούς μετασχηματισμού των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς, γεγονός που παρατηρείται και στο ότι οι τιμές των δειγμάτων είναι παρόμοιες με αυτές του δείγματος ελέγχου (pGL4.10 empty). Παρόλα αυτά παρατηρώντας τις τιμές του υποκινητή του RECUR1 χωρίς τις μεταλλάξεις (WT full length 5'-3') και αυτές των υποκινητών με τις τρεις SDM (SDM1 5'-3', SDM2 5'-3' και SDM3 5'-3') φαίνεται κάποια επίδραση στην δραστικότητά του. Όμως επειδή οι τιμές των δειγμάτων δεν διαφέρουν πολύ από αυτές του δείγματος ελέγχου του πείραμα δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο.



Εικόνα 46: Αποτελέσματα δραστικότητας λουσιφεράσης 1ου πειράματος. (A): Διάγραμμα κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης με τις γραμμές σφάλματος. (B): Διάγραμμα κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς την αύξηση του σήματος από το δείγμα ελέγχου.

Στο δεύτερο πείραμα λουσιφεράσης είχε γίνει μία επανάληψη του πρώτου πειράματος σε διαφορετική κυτταρική σειρά στην NUGC-4, πάλι για τον έλεγχο της επίδρασης των τοποκατευθυνόμενων μεταλλαξογενέσεων (SDM) στην λειτουργικότητα του υποκινητή του γονιδίου του lncRNA RECUR1, με αλλαγές που βελτίωσαν σημαντικά την επιτυχία της γενετικής τροποποίησης. Στην Εικόνα 47 φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού ως κανονικοποιημένες τιμές δραστικότητας λουσιφεράσης (47.A) και ως σχετικές τιμές με βάση την δραστικότητα που καταγράφηκε στο δείγμα ελέγχου (47.B). Οι γραμμές σφάλματος προέκυψαν από την τυπική απόκλιση των δύο επαναλήψεων για κάθε δείγμα.

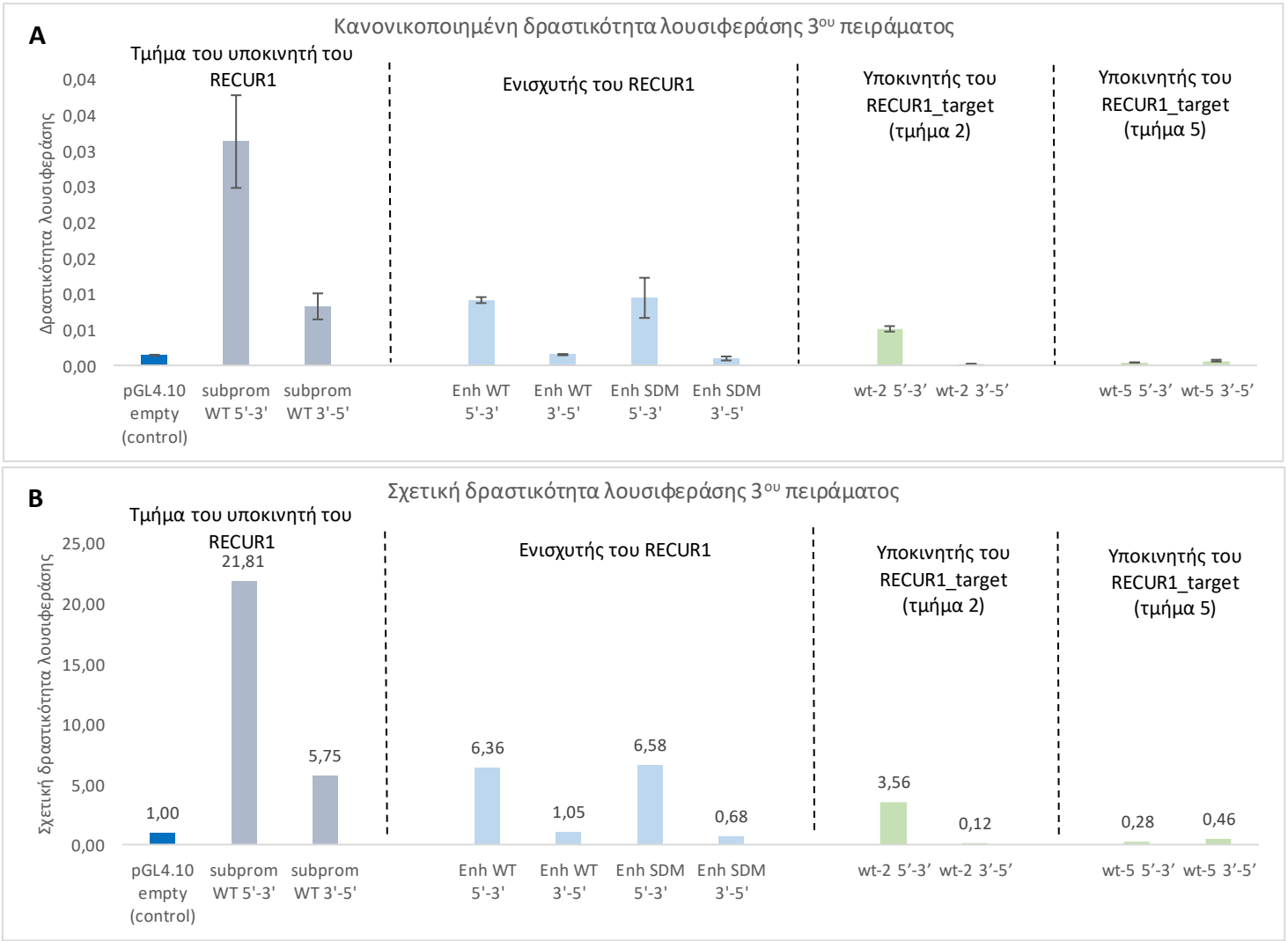


Εικόνα 47: Αποτελέσματα δραστικότητας λουσιφεράσης 2ου πειράματος. (A): Διάγραμμα κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης με τις γραμμές σφάλματος. (B): Διάγραμμα κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς την αύξηση του σήματος από το δείγμα ελέγχου.

Αρχικά, παρατηρώντας τις τιμές του αγρίου τύπου του υποκινητή του RECUR1 με τους προσανατολισμούς 5'-3' και 3'-5' (RECUR1 prom WT FL 5'-3' και RECUR1 prom WT FL 3'-5'), η τιμές είναι πολύ αυξημένες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (pGL4.10 empty) και έτσι καταλαβαίνουμε ότι αυτή η αλληλουχία που κλωνοποιήθηκε όντως έχει την ιδιότητα ενεργού υποκινητή. Η τιμή που παρατηρείται στον υποκινητή με τον προσανατολισμό 3'-5' δεν θα έπρεπε να είναι τόσο αυξημένη

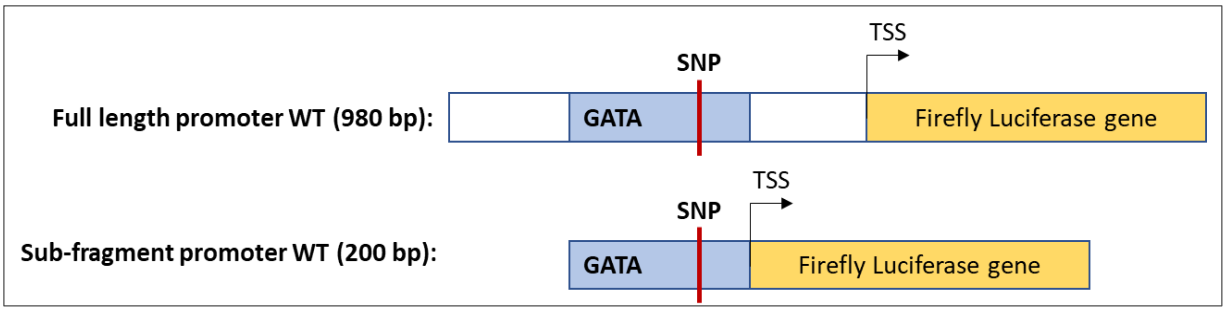
καθώς το γονίδιο μεταγράφεται με προσανατολισμό 5’-3’ και επομένως μόνο αυτός ο προσανατολισμός θα έπρεπε να είναι λειτουργικός, εφόσον βέβαια η αλληλουχία δρα μόνο ως υποκινητής και όχι και σαν ενισχυτής. Συγκρίνοντας τις τιμές του υποκινητή αγρίου τύπου με προσανατολισμό 5’-3’ (RECUR1 prom WT FL 5'-3') με τις τιμές του υποκινητή μετά τις τρεις τοποκατευθυνόμενες μεταλλαξογενέσεις με προσανατολισμό 5’-3’ (RECUR1 prom SDM1 5'-3', RECUR1 prom SDM2 5'-3' και RECUR1 prom SDM3 5'-3') διακρίνεται η μεγάλη επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στην λειτουργικότητα του υποκινητή. Μάλιστα μεγαλύτερη μείωση της λειτουργικότητας παρατηρείται στην SDM3 όπου είχε γίνει συνδυασμός των μεταλλάξεων και στο μοτίβο GATA και στην περιοχή του SNP. Τα αποτελέσματα αυτά μας υποδεικνύουν ότι οι δύο περιοχές αυτές είναι πολύ σημαντικές για την λειτουργία του υποκινητή ως ρυθμιστικό στοιχείο του lncRNA RECUR1.

Στο τρίτο πείραμα λουσιφεράσης είχε γίνει ο έλεγχος της δραστικότητας ενός πιθανού ενισχυτή του γονιδίου του lncRNA RECUR1 και της πιθανής επίδρασης των εναλλακτικών αλληλομόρφων μίας σημειακής μετάλλαξης στην δραστικότητά του. Στην Εικόνα 48 φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού ως κανονικοποιημένες τιμές δραστικότητας λουσιφεράσης (48.Α) και ως σχετικές τιμές με βάση την δραστικότητα που καταγράφηκε στο δείγμα ελέγχου (48.Β).



Εικόνα 48: Αποτελέσματα δραστικότητας λουσιφεράσης 3ου πειράματος. (Α): Διάγραμμα κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης με τις γραμμές σφάλματος. (Β): Διάγραμμα κανονικοποιημένων τιμών δραστικότητας λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς την αύξηση του σήματος από το δείγμα ελέγχου.

Επίσης είχε γίνει ο έλεγχος ενός μικρότερου τμήματος του αγρίου τύπου υποκινητή του RECUR1 (~200 bp, συγκριτικά με τις αρχικές ~980 bp), το οποίο όμως περιλαμβάνει τις δύο σημαντικές ρυθμιστικές περιοχές του (το μοτίβο GATA και την περιοχή του SNP) (Εικόνα 49). Παρατηρώντας τις τιμές από αυτό το δείγμα με τους δύο προσανατολισμούς (RECUR1 subprom WT 5'-3' και RECUR1 subprom WT 3'-5') στην Εικόνα 48, φαίνεται ότι πολύ μεγαλύτερο σήμα δίνει ο υποκινητής με το προσανατολισμό 5’-3’ επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι είναι με αυτόν τον προσανατολισμό λειτουργικός.



Εικόνα 49: Σχηματική αναπαράσταση του πλήρους μήκους και του τμήματος του υποκινητή του RECUR1, κλωνοποιημένα ανοδικά του γονιδίου λουσιφεράσης στους φορείς pGL4.10.

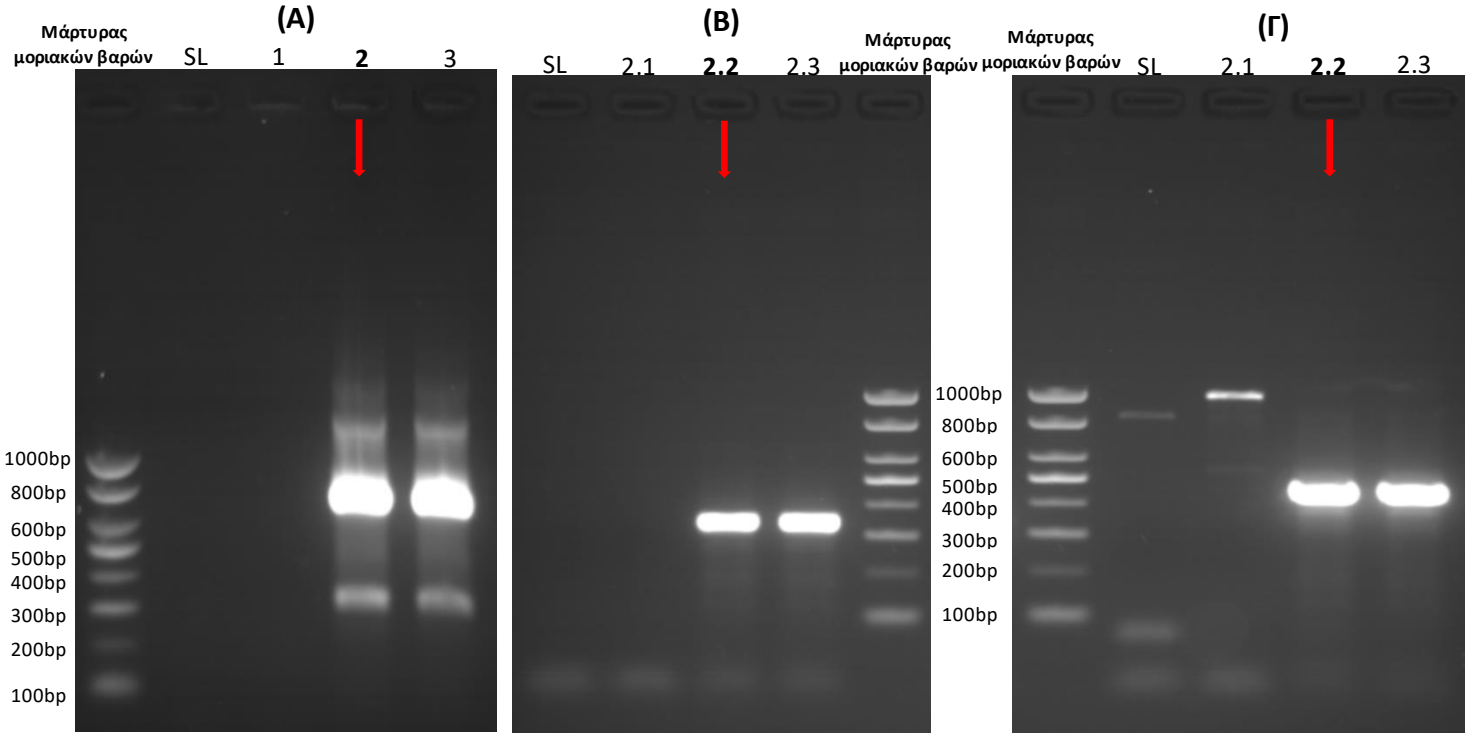
Σχετικά με τον ενισχυτή του RECUR1, συγκρίνοντας τις τιμές για την αγρίου τύπου αλληλουχία του με τους δύο προσανατολισμούς (Enh WT 5'-3' και Enh WT 3'-5') παρατηρούμε ότι μεγαλύτερο σήμα δίνει ο ενισχυτής με προσανατολισμό 5’-3’, υποδεικνύοντας ότι είναι λειτουργικός με αυτόν τον προσανατολισμό. Όμως, όταν γίνεται σύγκριση του αγρίου τύπου ενισχυτή με προσανατολισμό 5'-3' (Enh WT 5'-3') με τον ενισχυτή που έχει την μετάλλαξη (Enh SDM 5'-3'), δεν παρατηρείται κάποια διαφορά και επομένως είτε ο ενισχυτής δεν είναι ενεργός είτε η μετάλλαξη αυτή δεν επηρεάζει την λειτουργία του στις *in vitro* συνθήκες του πειράματος.

Όσον αφορά τα τμήματα 2 και 5 του υποκινητή του γονιδίου στόχου του RECUR1, του RECUR1_target, στο πειράματα 1 οι τιμές που λήφθηκαν για το τμήμα 2 (RECUR1 target prom wt-2) και με τους δύο προσανατολισμούς ήταν σχεδόν μηδενικές. Όμως στα πειράματα 2 και 3 για το τμήμα 2, ανιχνεύθηκε δραστικότητα λουσιφεράσης μόνο όταν ο υποκινητής ήταν σε προσανατολισμό 5'-3' (RECUR1 target prom wt-2 5’-3’) και όχι με τον 3’-5’ (RECUR1 target prom wt-2 3’-5’). Αυτή η παρατήρηση όμως είναι αντίθετη με το γεγονός ότι το γονίδιο μεταγράφεται με προσανατολισμό 3’-5’ με βάση τον γονιδιωματικό φυλλομετρητή UCSC. Για να διερευνηθεί η πιθανότητα κάποιου λάθους μεταξύ των δειγμάτων, ελέγχθηκε ο προσανατολισμός τους και με PCR προσανατολισμού και με αλληλούχηση και επιβεβαιώθηκε ότι ο προσανατολισμός τους ήταν ο σωστός. Επομένως, ίσως η περιοχή αυτή ρυθμίζει την έκφραση κάποιου άλλου γονιδίου με προσανατολισμό 5’-3’ που δεν έχει χαρακτηριστεί ή η συγκεκριμένη αλληλουχία δεν είναι ισχυρά ενεργή στις *in vitro* συνθήκες του πειράματος. Ακόμη, το τμήμα 5 του πιθανού υποκινητή του RECUR1_target, που βρίσκεται εσωτερικά σε ένα ιντρόνιο του γονιδίου, δεν έδωσε κάποιο σήμα με κανέναν από τους δύο προσανατολισμούς (RECUR1 target prom wt-5 5’-3’ και RECUR1 target prom wt-5 3’-5’), στο πείραμα 3 όπου και ελέγχθηκε, επομένως δεν αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο υποκινητή.

4.5 Αφαίρεση τμήματος του υποκινητή του RECUR1 (knock out) από το γονιδίωμα γαστρικών καρκινικών κυττάρων

Έχοντας επιβεβαιώσει την ρυθμιστική δράση της αλληλουχίας υποκινητή του RECUR1 που περιέχει τόσο το μοτίβο πρόσδεσης GATA όσο και το υπό μελέτη SNP, ακολούθησε σχεδιασμός και πειραματικοί χειρισμοί με σκοπό την εκτομή αυτής της αλληλουχίας σε καρκινικά κύτταρα AGS με χρήση του συστήματος CRISPR-Cas9.

Κατά τις κλωνοποιήσεις στο φορέα pX333, των δύο sgRNA αλληλουχιών που στοχεύουν εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου του υποκινητή του γονιδίου RECUR1, έγιναν τρεις διαγνωστικές PCR στα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τις βακτηριακές καλλιέργειες. Στην Εικόνα 50Α φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR σε πλασμίδια από 4 βακτηριακούς κλώνους, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του πρώτου gRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA1), στον φορέα pX333. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες στις ~800 ζ.β., ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL) που είναι ο αυτο-διασυνδεδεμένος φορέας χωρίς το ένθεμα, δεν παρατηρείται κάποια ζώνη. Στην Εικόνα 50Β φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR σε πλασμίδια από 4 βακτηριακούς κλώνους, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του δεύτερου gRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA2), στον φορέα pX333. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες στις ~350 ζ.β., ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL), δεν παρατηρείται κάποια ζώνη. Στην Εικόνα 50Γ φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της PCR σε πλασμίδια από 4 βακτηριακούς κλώνους, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής ταυτόχρονα και των δύο gRNA, στον φορέα pX333. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες στις ~450 ζ.β., ενώ στο αρνητικό δείγμα ελέγχου (SL), δεν παρατηρείται κάποια ζώνη.

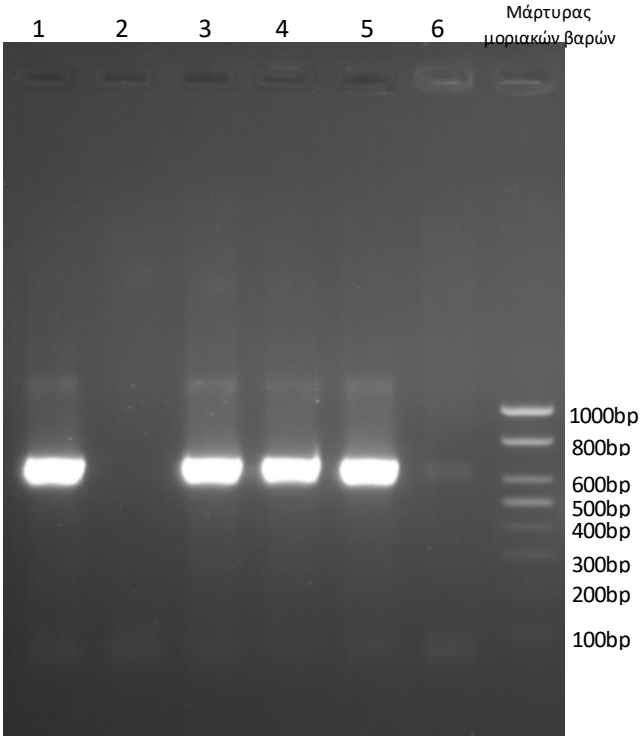


Εικόνα 50: Εικόνες πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα των PCR: Α) για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του πρώτου gRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA1), Β) για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του δεύτερου gRNA (RECUR1_PM_KO_sgRNA2) και Γ) για την επιβεβαίωση της εισαγωγής ταυτόχρονα και των δύο gRNA, στον φορέα pX333. (Οι αριθμοί πάνω από τα πηγάδια υποδηλώνουν τον βακτηριακό κλώνο από τον οποίο απομονώθηκε το κάθε πλασμίδιο).

Από του κλώνους που φαίνονται στις παραπάνω φωτογραφίες, επιλέχθηκε ο κλώνος 2.2 (επισημαίνεται με κόκκινο βέλος), για την χρήση στο πείραμα μετασχηματισμού των AGS καρκινικών κυττάρων, για την αποκοπή ενός τμήματος του υποκινητή του γονιδίου RECUR1 από το γονιδίωμά τους.

Όσον αφορά τον μετασχηματισμό των AGS κυττάρων, αυτός αποδείχτηκε εξαιρετικά επιτυχής με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολλών ανθεκτικών κλώνων. Ωστόσο, οι κλώνοι των κυττάρων έτσι όπως αναπτύσσονταν στα πιάτα κυτταροκαλλιεργειών ήταν πάρα πολύ πυκνοί και μικροί σε μέγεθος, γεγονός που επιτάχυνε την διαδικασία συλλογής μικρών κλώνων ώστε να εξασφαλιστεί η μονοκλωνικότητα τους. Επίσης μετά την μεταφορά κάποιων σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων σε ξεχωριστά πηγάδια πιάτων κυτταροκαλλιεργειών, αυτοί δεν αναπτύσσονταν ή αναπτύσσονταν πολύ αργά και το πείραμα δεν συνεχίστηκε. Έγινε μία ακόμη επανάληψη του πειράματος με την δημιουργία μεγαλύτερων αραιώσεων των κυττάρων για την πιο εύκολη συλλογή των κλώνων αλλά και πάλι υπήρξε μεγάλο πλήθος ανθεκτικών κλώνων με αντίστοιχες δυσκολίες ως προς την συνέχιση του πειράματος. Μελλοντικά θα γίνει και άλλη επανάληψη του πειράματος με τροποποιημένες συνθήκες μετασχηματισμού.

Στα πλαίσια της γονοτύπησης των knock-out κυτταρικών σειρών, έγινε μία δοκιμαστική αντίδραση PCR σε διάφορες απομονώσεις γονιδιωματικού DNA από κύτταρα που είχαν τον αγρίου τύπου υποκινητή, για έλεγχο των εκκινητών και βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης. Στην Εικόνα 51 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτής της PCR σε γονιδιωματικό DNA από 6 διαφορετικές απομονώσεις. Παρατηρούνται οι ειδικές ζώνες στις 672 ζ.β., όπως και αναμένεται αφού δεν έχει κοπεί το τμήμα του υποκινητή σε αυτά τα υποστρώματα. Σε δύο δείγματα δεν παρατηρούνται ζώνες και αυτό οφείλεται είτε στο ότι το απομονωμένο γονιδιωματικό DNA ήταν κακής ποιότητας, είτε στο ότι σε αυτά τα δείγματα υπάρχουν μεταλλάξεις στα σημεία πρόσδεσης των εκκινητών και δεν μπορεί να γίνει ο υβριδισμός τους.



Εικόνα 51: Εικόνα πηκτής αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα των PCR για έλεγχο των εκκινητών γονοτύπησης.

5. Συζήτηση

Παρά το γεγονός ότι δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, τα lncRNA είναι λειτουργικά μόρια. Ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων έχει περιγράψει πολλές λειτουργίες τους σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα [79]. Σχεδόν κάθε βήμα στην διαδικασία της έκφρασης των γονιδίων, από τη μεταγραφή έως το μάτισμα του mRNA, την αποικοδόμηση του RNA και τη μετάφραση, μπορεί να επηρεαστεί από τα lncRNA [80]. Η απορρύθμιση των lncRNA έχει συσχετιστεί με διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Όσον αφορά τον ρόλο τους στον καρκίνο, τα lncRNA επηρεάζουν σύνολα γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην επιβίωση και την απόπτωση, στην ανοσοαπόκριση ή στην διατήρηση της πολυδυναμίας, μεταξύ άλλων λειτουργιών που προωθούν τον μετασχηματισμένο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων [81, 82]. Έχει αποδειχθεί ότι τα lncRNA διαθέτουν ισχυρή συσχέτιση και με τον καρκίνου του στομάχου και έχουν καίριο ρόλο στην εμφάνιση, την εξέλιξη, τη μετάσταση και την αντοχή στη θεραπεία, σε αυτό τον τύπο καρκίνου [83].

Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος, όπως οι υποκινητές και οι ενισχυτές, μπορεί να οδηγήσουν σε μεταγραφική αυξορρύθμιση ή μειορρύθμιση. Οι μεταλλάξεις σε ρυθμιστικά στοιχεία, αν επηρεάζουν την έκφραση ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μπορεί να αποτελούν αιτίες που προκαλούν ογκογένεση [84]. Σε πολλούς τύπους καρκίνου η λειτουργικότητα υποκινητών μεταβάλλεται από μεταλλάξεις, οδηγώντας σε αλλαγή βασικών τους ρυθμιστικών μοτίβων που αυξάνουν ή μειώνουν την δραστικότητά τους. Ακόμη, παρουσία μεταλλάξεων μπορεί να οδηγήσει σε έκτοπη δραστικότητα ενισχυτών με αποτέλεσμα την μεταπλαστική διαφοροποίηση που σχετίζεται με κακοήθεια [85].

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν οι ρυθμιστικές αλληλουχίες ενός lncRNA το οποίο θεωρείται ότι έχει ρόλο στον καρκίνο του στομάχου και ενός πιθανού γονιδίου στόχου του. Αρχικά, μέσω ποσοτικών PCR επιβεβαιώθηκε ότι η υπερέκφραση ή η καταστολή των GATA4 και 6 μεταγραφικών επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του lncRNA RECUR1, οδηγώντας στην υπόθεση ότι αυτοί οι παράγοντες ρυθμίζουν την έκφρασή του. Αντίστοιχη αύξηση ή μείωση παρατηρήθηκε και στο πιθανό γονίδιο στόχο του RECUR1, το RECUR1_target, που σημαίνει ότι λογικά η αύξηση και μείωση της έκφρασης του RECUR1, αυξορρυθμίζει και μειορρυθμίζει αντίστοιχα το γονίδιο αυτό, επειδή το RECUR1 ελέγχει την έκφρασή του.

Επίσης, με την μέθοδο της τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (SDM) προκλήθηκαν μεταλλάξεις σε δύο ρυθμιστικές αλληλουχίες εντός του υποκινητή του γονιδίου του lncRNA RECUR1. Η μία περιοχή είναι ένα μοτίβο πρόσδεσης GATA μεταγραφικών παραγόντων και η άλλη μία περιοχή όπου εντοπίζεται ένα SNP που σχετίζεται με την ασθένεια και πιθανώς επηρεάζει ένα μοτίβο πρόσδεσης ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα. Συγκεκριμένα, έγινε αλλαγή στο μοτίβο GATA από «5'-G**AT**A-3'» σε «5'-G**GC**A-3'» και παράλληλα διαταράχθηκε η αλληλουχία του γειτονικού SNP. Στην συνέχεια, έγινε έλεγχος της επίδρασης των αλλαγών αυτών με πειράματα λουσιφεράσης. Φάνηκε ότι και οι δύο αυτές τροποποιήσεις επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την λειτουργία του υποκινητή. Όταν έγιναν οι μεταλλάξεις αυτές τόσο ξεχωριστά όσο και σε συνδυασμό το σήμα λουσιφεράσης μειωνόταν κατά πολύ σε σχέση με την αρχική αλληλουχία του υποκινητή, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο τους ως ρυθμιστικά μοτίβα του υποκινητή.

Ακόμη, έγιναν προσπάθειες για τον χαρακτηρισμό του υποκινητή ενός γονιδίου που αποτελεί πιθανό στόχο του lncRNA RECUR1. Κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς μόνο δύο τμήματα αλληλουχιών εντός του υποκινητή του γονιδίου αυτού. Με βάση την δραστικότητά τους, όπως αυτή δείχθηκε από τα

πειράματα λουσιφεράσης, δεν μπόρεσε να βγει κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το αν αυτές οι περιοχές είναι στοιχεία υποκινητή καθώς, το ένα τμήμα δεν έδωσε κάποιο σήμα, ενώ το άλλο που θεωρούνταν ως ο υποκινητής του γονιδίου έδινε σήμα αλλά με τον αντίθετο προσανατολισμό σε σχέση με αυτόν που μεταγράφεται το γονίδιο. Ίσως ο έλεγχος της λειτουργικότητας άλλων δύο γειτονικών αλληλουχιών στην ίδια περιοχή μπορεί να βοηθήσει στην διερεύνηση του υποκινητή του γονιδίου αυτού ή εναλλακτικά οι συγκεκριμένες αλληλουχίες που ελέγχθηκαν δεν εμφανίζουν ισχυρή ενεργότητα *in vitro* και απαιτούν *in vivo* προσεγγίσεις για την μελέτη τους.

Τέλος, κατασκευάστηκε ένα εργαλείο για την δημιουργία knock out κυτταρικών σειρών με το σύστημα CRISPR-Cas9. Αυτό το εργαλείο δημιουργήθηκε με σκοπό την αφαίρεση ενός τμήματος του υποκινητή του RECUR1, που περιλαμβάνει τις δύο ρυθμιστικές περιοχές που χαρακτηρίστηκαν με την SDM. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν δύο αλληλουχίες που παράγουν δύο gRNA στον φορέα pX333, που στοχεύουν ένα τμήμα ~500 βάσεων που περιλαμβάνει τόσο το μοτίβο GATA όσο και το SNP. Με την κατασκευή αυτή έγιναν δύο προσπάθειες μετασχηματισμού καρκινικών κυττάρων ώστε να γίνει η αφαίρεση του τμήματος αυτού από το γονιδίωμά τους και να ελεγχθεί στην συνέχεια η επίδρασή της στην έκφραση του RECUR1 και του γονιδίου στόχου του. Και στις δύο περιπτώσεις προέκυψαν πολλοί ανθεκτικοί στην διαλογή με αντιβιοτικό κλώνοι, που φανερώνουν πετυχημένη γενετική τροποποίηση. Όμως και στις δύο προσπάθειες δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση γενετικού υλικού και ο έλεγχος της επιτυχούς τροποποίησης, διότι οι κλώνοι των κυττάρων που προέκυψαν μετά από τον μετασχηματισμό δεν αναπτύσσονταν ή αναπτύσσονταν πολύ αργά. Αυτό βέβαια μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας του μετασχηματισμού ή να είναι κάποιο φαινοτυπικό αποτέλεσμα που προκαλεί η αφαίρεση αυτού του τμήματος. Δηλαδή η εκτομή του υποκινητή και κατ' επέκταση η αποσιώπηση του RECUR1 μπορεί να είναι θνησιγόνος για τα καρκινικά κύτταρα. Περισσότερες προσπάθειες και βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού ίσως βοηθήσουν στην μελέτη αυτής της επίδρασης. Παρόλο που η δημιουργία των knock-out κυτταρικών σειρών δεν συνεχίστηκε, ελέγχθηκαν οι εκκινητές που θα επέτρεπαν την γονοτύπηση των κυττάρων με PCR και δείχθηκε ότι λειτουργούν επιτυχώς.

6. Βιβλιογραφία

1. American Cancer Society. *What Is Stomach Cancer? | Types of Stomach (Gastric) Cancer*. 2021 [cited 2022 10/07/2022]; Available from: https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/what-is-stomach-cancer.html.
2. Gullo, I., et al., *Precancerous lesions of the stomach, gastric cancer and hereditary gastric cancer syndromes.* Pathologica, 2020. **112**(3): p. 166-185.
3. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
4. Ferlay, J., et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. 2020; Available from: https://gco.iarc.fr/today.
5. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention.* Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
6. Balakrishnan, M., et al., *Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World.* Curr Gastroenterol Rep, 2017. **19**(8): p. 36.
7. Moss, S.F., *The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer.* Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(2): p. 183-191.
8. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology.* J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
9. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology.* Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
10. Sanjeevaiah, A., et al., *Gastric Cancer: Recent Molecular Classification Advances, Racial Disparity, and Management Implications.* J Oncol Pract, 2018. **14**(4): p. 217-224.
11. Lin, X., et al., *Molecular classification and prediction in gastric cancer.* Comput Struct Biotechnol J, 2015. **13**: p. 448-58.
12. Seeneevassen, L., et al., *Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
13. Toni, G., et al., *Molecular classification of gastric cancer.* World Cancer Research Journal, 2020. **7**(e1472).
14. Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer.* Lancet, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
15. Sun, K., et al., *EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives.* Front Oncol, 2020. **10**: p. 583463.
16. Wang, Q., G. Liu, and C. Hu, *Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma.* Gastroenterology Res, 2019. **12**(6): p. 275-282.
17. Ratti, M., et al., *Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches.* Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(22): p. 4151-4162.
18. Katona, B.W. and A.K. Rustgi, *Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions.* Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(2): p. 211-217.
19. Maleki, S.S. and C. Rocken, *Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology.* Neoplasia, 2017. **19**(5): p. 412-420.
20. Nshizirungu, J.P., et al., *Reproduction of the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Asian Cancer Research Group (ACRG) Gastric Cancer Molecular Classifications and Their Association with Clinicopathological Characteristics and Overall Survival in Moroccan Patients.* Dis Markers, 2021. **2021**: p. 9980410.
21. Setia, N., et al., *A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer.* Mod Pathol, 2016. **29**(7): p. 772-84.
22. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer.* Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
23. Layke, J.C. and P.P. Lopez, *Gastric cancer: diagnosis and treatment options.* Am Fam Physician, 2004. **69**(5): p. 1133-40.

24. Markman, M. *Diagnosing stomach cancer*. 2022 JUNE 27, 2022 [cited 2022 30/07/2022]; Available from: https://www.cancercenter.com/cancer-types/stomach-cancer/diagnosis-and-detection.
25. Leja, M. and A. Line, *Early detection of gastric cancer beyond endoscopy - new methods.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2021. **50-51**: p. 101731.
26. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis.* World J Gastroenterol, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
27. Rao, M.R.S., *Long Non Coding RNA Biology*. 2017, Springer Singapore. p. 323.
28. Delpu, Y., et al., *Chapter 12 - Noncoding RNAs: Clinical and Therapeutic Applications*. Drug Discovery in Cancer Epigenetics. 2016, Boston: Academic Press.
29. Bio-Rad Laboratories. *Coding and Non-Coding RNA*. n.d. 05/08/2022]; Available from: https://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/coding-non-coding-rna?ID=Q1070M70KWE7.
30. Palazzo, A.F. and E.S. Lee, *Non-coding RNA: what is functional and what is junk?* Front Genet, 2015. **6**: p. 2.
31. Mercer, T.R., M.E. Dinger, and J.S. Mattick, *Long non-coding RNAs: insights into functions.* Nat Rev Genet, 2009. **10**(3): p. 155-9.
32. St Laurent, G., C. Wahlestedt, and P. Kapranov, *The Landscape of long noncoding RNA classification.* Trends Genet, 2015. **31**(5): p. 239-51.
33. Wu, T. and Y. Du, *LncRNAs: From Basic Research to Medical Application.* Int J Biol Sci, 2017. **13**(3): p. 295-307.
34. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 96-118.
35. Aliperti, V., J. Skonieczna, and A. Cerase, *Long Non-Coding RNA (lncRNA) Roles in Cell Biology, Neurodevelopment and Neurological Disorders.* Noncoding RNA, 2021. **7**(2).
36. Mattick, J.S., *The State of Long Non-Coding RNA Biology.* Noncoding RNA, 2018. **4**(3).
37. Ward, M., et al., *Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs.* J Hum Transcr, 2015. **1**(1): p. 2-9.
38. Lv, D., et al., *LncSpA: LncRNA Spatial Atlas of Expression across Normal and Cancer Tissues.* Cancer Res, 2020. **80**(10): p. 2067-2071.
39. Yao, R.W., Y. Wang, and L.L. Chen, *Cellular functions of long noncoding RNAs.* Nat Cell Biol, 2019. **21**(5): p. 542-551.
40. Froberg, J.E., L. Yang, and J.T. Lee, *Guided by RNAs: X-inactivation as a model for lncRNA function.* J Mol Biol, 2013. **425**(19): p. 3698-706.
41. Chen, C.K., et al., *Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing.* Science, 2016. **354**(6311): p. 468-472.
42. Lu, Y., et al., *The NF-kappaB-Responsive Long Noncoding RNA FIRRE Regulates Posttranscriptional Regulation of Inflammatory Gene Expression through Interacting with hnRNPU.* J Immunol, 2017. **199**(10): p. 3571-3582.
43. Xiang, J.F., et al., *Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus.* Cell Res, 2014. **24**(5): p. 513-31.
44. Zhang, X., et al., *Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
45. Pradeepa, M.M., et al., *Psip1/p52 regulates posterior Hoxa genes through activation of lncRNA Hottip.* PLoS Genet, 2017. **13**(4): p. e1006677.
46. Blank-Giwojna, A., A. Postepska-Igielska, and I. Grummt, *lncRNA KHPS1 Activates a Poised Enhancer by Triplex-Dependent Recruitment of Epigenomic Regulators.* Cell Rep, 2019. **26**(11): p. 2904-2915 e4.
47. Fort, V., G. Khelifi, and S.M.I. Hussein, *Long non-coding RNAs and transposable elements: A functional relationship.* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2021. **1868**(1): p. 118837.

48. Arnold, P.R., A.D. Wells, and X.C. Li, *Diversity and Emerging Roles of Enhancer RNA in Regulation of Gene Expression and Cell Fate.* Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 377.
49. Arun, G., D. Aggarwal, and D.L. Spector, *MALAT1 Long Non-Coding RNA: Functional Implications.* Noncoding RNA, 2020. **6**(2).
50. Park, E. and L.E. Maquat, *Staufen-mediated mRNA decay.* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(4): p. 423-35.
51. Ziv, O., et al., *Structural features within the NORAD long noncoding RNA underlie efficient repression of Pumilio activity.* 2021: p. 2021.11.19.469243.
52. Paraskevopoulou, M.D. and A.G. Hatzigeorgiou, *Analyzing MiRNA-LncRNA Interactions.* Methods Mol Biol, 2016. **1402**: p. 271-286.
53. Yoon, J.H., et al., *LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation.* Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 648-55.
54. Wang, P., et al., *The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation.* Science, 2014. **344**(6181): p. 310-3.
55. Fang, Y. and M.J. Fullwood, *Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer.* Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(1): p. 42-54.
56. Gutschner, T. and S. Diederichs, *The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view.* RNA Biol, 2012. **9**(6): p. 703-19.
57. Sahu, A., U. Singhal, and A.M. Chinnaiyan, *Long noncoding RNAs in cancer: from function to translation.* Trends Cancer, 2015. **1**(2): p. 93-109.
58. Gao, Y., et al., *Lnc2Cancer 3.0: an updated resource for experimentally supported lncRNA/circRNA cancer associations and web tools based on RNA-seq and scRNA-seq data.* Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D1251-D1258.
59. Tan, H., et al., *Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications.* Theranostics, 2020. **10**(19): p. 8880-8902.
60. Hao, N.B., et al., *The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer.* Oncotarget, 2017. **8**(46): p. 81572-81582.
61. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential.* Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
62. Gao, Y., et al., *Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application.* World J Gastroenterol, 2020. **26**(24): p. 3401-3412.
63. Liu, Y., et al., *Long Non-Coding RNA in Gastric Cancer: Mechanisms and Clinical Implications for Drug Resistance.* Front Oncol, 2022. **12**: p. 841411.
64. Reis, E.M. and S. Verjovski-Almeida, *Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics.* Front Genet, 2012. **3**: p. 32.
65. Qian, Y., L. Shi, and Z. Luo, *Long Non-coding RNAs in Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy.* Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 612393.
66. Yuan, L., et al., *Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance.* Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 96.
67. Liu, Y., et al., *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer.* Mol Ther Oncolytics, 2021. **23**: p. 458-476.
68. Khorkova, O., J. Hsiao, and C. Wahlestedt, *Basic biology and therapeutic implications of lncRNA.* Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 15-24.
69. Li, Y., et al., *TRlnc: a comprehensive database for human transcriptional regulatory information of lncRNAs.* Brief Bioinform, 2021. **22**(2): p. 1929-1939.
70. Ali, T. and P. Grote, *Beyond the RNA-dependent function of LncRNA genes.* Elife, 2020. **9**.
71. Mattioli, K., et al., *High-throughput functional analysis of lncRNA core promoters elucidates rules governing tissue specificity.* Genome Res, 2019. **29**(3): p. 344-355.
72. Alam, T., et al., *Promoter analysis reveals globally differential regulation of human long non-coding RNA and protein-coding genes.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109443.

73. Panigrahi, A. and B.W. O'Malley, *Mechanisms of enhancer action: the known and the unknown.* Genome Biol, 2021. **22**(1): p. 108.
74. Gasperini, M., J.M. Tome, and J. Shendure, *Towards a comprehensive catalogue of validated and target-linked human enhancers.* Nat Rev Genet, 2020. **21**(5): p. 292-310.
75. Pott, S. and J.D. Lieb, *What are super-enhancers?* Nat Genet, 2015. **47**(1): p. 8-12.
76. Gao, J., Y.H. Chen, and L.C. Peterson, *GATA family transcriptional factors: emerging suspects in hematologic disorders.* Exp Hematol Oncol, 2015. **4**: p. 28.
77. Marlink, K.L., et al., *Effects of Helicobacter pylori on intracellular Ca2+ signaling in normal human gastric mucous epithelial cells.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(1): p. G163-76.
78. Lu, S., et al., *Expression of alpha-fetoprotein in gastric cancer AGS cells contributes to invasion and metastasis by influencing anoikis sensitivity.* Oncol Rep, 2016. **35**(5): p. 2984-90.
79. Marchese, F.P., I. Raimondi, and M. Huarte, *The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function.* Genome Biol, 2017. **18**(1): p. 206.
80. Wapinski, O. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNAs and human disease.* Trends Cell Biol, 2011. **21**(6): p. 354-61.
81. Huarte, M., *The emerging role of lncRNAs in cancer.* Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1253-61.
82. Jiang, M.C., et al., *Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities.* Am J Cancer Res, 2019. **9**(7): p. 1354-1366.
83. Li, Y., et al., *The Multifaceted Role of Long Non-Coding RNA in Gastric Cancer: Current Status and Future Perspectives.* Int J Biol Sci, 2021. **17**(11): p. 2737-2755.
84. Diederichs, S., et al., *The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations.* EMBO Mol Med, 2016. **8**(5): p. 442-57.
85. 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).