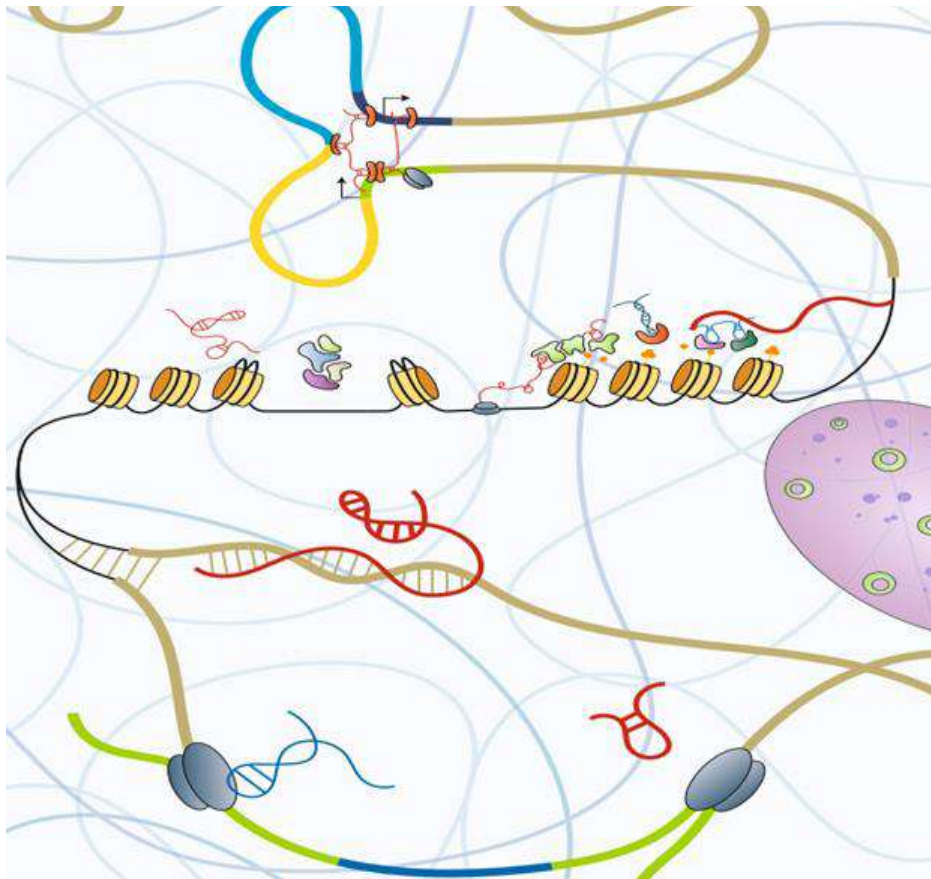


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής



«Χαρακτηρισμός μιας ρυθμιστικής αλληλουχίας ενισχυτή ενός lncRNA με CRISPR προσεγγίσεις και δοκιμασίες χημειοφωταύγειας στον καρκίνο»

“Characterization of a lncRNA’s enhancer regulatory sequence using CRISPR and chemiluminescence assays in cancer”

Μαρούλη Μαριάνθη του Δημητρίου

Λάρισα 2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων:

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

Μέλη τριμελούς :

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπελούκας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το έτος 2023.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Γιακουντή Αντώνη που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στην εργαστηριακή ομάδα, καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου που συνέβαλαν στην πτυχιακή αυτή και ιδιαίτερα τις συμφοιτήτριές μου Φιλίνα Σακκά, Χριστίνα Σπαχίου και Ιωάννα Γρηγοράς για την άριστη συνεργασία μας. Χρωστάω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Ελένη Ροντιόλα Μπεγκόλλι για τις πολύτιμες συμβουλές και την υποστήριξή της.

Από τις ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσε να λείπει η οικογένεια μου και κυρίως οι γονείς μου που με στηρίζουν και είναι δίπλα μου σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Περιεχόμενα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	1
Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Γαστρικός καρκίνος	7
1.2 Επιδημιολογία.....	7
1.3 Μοριακή Ταξινόμηση	9
1.4 Μέθοδοι διάγνωσης γαστρικού καρκίνου	11
1.5 Μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (LncRNA)	13
1.5.1 Μη-κωδικοποιητικά RNA	13
1.5.2 Χαρακτηρισμός των LncRNA	14
1.5.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός και λειτουργίες των LncRNA	15
1.5.4 LncRNAs στον καρκίνο.....	16
1.6 LncRNAs: Διαγνωστικοί και θεραπευτικοί στόχοι.....	19
1.6.1 Διάγνωση και πρόγνωση	19
1.6.2 Θεραπεία	20
1.7 Ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων	21
1.7.1 Υποκινητές και ενισχυτές	21
1.7.2 Topologically Associated Domains (TADs).....	22
1.7.3 LncRNA και TADs	24
1.7.4 Έκφραση των LncRNAs	25
2. Σκοπός	26
3. Υλικά & Μέθοδοι.....	27
3.1 Υλικά.....	27
3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς	27
3.1.2 Κυτταρικές σειρές.....	29
3.2 Μέθοδοι	29
3.2.1 Επιβεβαίωση προσανατολισμού του ενισχυτή του RECUR1 στον φορέα pGL4.10/AdML.....	29
3.2.2 Αντιδράσεις PCR και κλωνοποίηση των τριών τμημάτων της αλληλουχίας του ενισχυτή του RECUR1 στον φορέα pGL4.10/AdML.....	31
3.2.3 Δοκιμασίες λουσιφεράσης για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενισχυτή του RECUR1 και κάθε τμήματος της αλληλουχίας του ξεχωριστά	36

3.2.4. Knock-out του ενισχυτή του RECUR1 με την τεχνική CRISPR/Cas9 nickase.....	39
3.2.5 Δοκιμασία CFA.....	48
4. Αποτελέσματα	49
4.1 Δοκιμασίες Λουσιφεράσης	49
4.1.1 Επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης ενισχυτή	49
4.1.2 Δοκιμασίες λουσιφεράσης για ολόκληρη αλληλουχία του ενισχυτή αγρίου τύπου και SDM με 2 προσανατολισμούς	50
4.1.3 Κατάτμηση του ενισχυτή σε 3 τμήματα και κλωνοποίηση σε φορέα	52
4.1.4 Δοκιμασία λουσιφεράσης για καθένα από τα 3 τμήματα του ενισχυτή με δύο προσανατολισμούς.	56
4.2 Knock-out του ενισχυτή του RECUR1 με CRISPR/Cas9 nickase.....	58
4.2.1 Κλωνοποίηση των sgRNA1 & sgRNA2 σε πλασμιδιακό φορέα.....	59
4.2.2 Έλεγχος κλώνων για γενετική τροποποίηση	62
4.2.3 Μελέτη έκφρασης επιπέδων RNA	64
4.2.4 Διαδικασία σχηματισμού κλώνων (CFA).....	66
5. Συμπεράσματα - Συζήτηση.....	67
6. Βιβλιογραφία.....	70

Περίληψη

Ο καρκίνος του στομάχου, ή αλλιώς γαστρικός καρκίνος κατατάσσεται 5^{ος} στην συχνότητα εμφάνισης και αποτελεί έναν από τους πιο θνησιγόνους τύπους καρκίνου. Η νόσος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια ως προς τα μορφολογικά, ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά της, καθώς και ως προς την ηλικία εμφάνισης και στα δύο φύλα. Ένας από τους κύριους λόγους που καταλαμβάνει την 3^η θέση σχετικά με την θνησιμότητα είναι η διάγνωση ως επί το πλείστον σε προχωρημένα στάδια της νόσου, καθώς τα συμπτώματα δεν εμφανίζονται μέχρι η ασθένεια να είναι ήδη αρκετά προχωρημένη. Για τον λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η έρευνα με σκοπό την εύρεση μεθόδων για την εύκολη και έγκαιρη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) είναι μόρια RNA με μέγεθος πάνω από 200 νουκλεοτίδια και εμφανίζουν ιστο-ειδική και καρκινο-ειδική έκφραση, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά μόρια για νέους διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες. Η εξειδικευμένη έκφραση των lncRNA ελέγχεται από ρυθμιστικά στοιχεία όπως οι υποκινητές και οι ενισχυτές. Συγκεκριμένα, οι ενισχυτές ανάλογα με την διαμόρφωση της χρωματίνης μπορεί να παίξουν κομβικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης κάποιου ογκογόνου lncRNA και άρα στην ογκογένεση. Αυτή η πτυχιακή εστιάζει στην μελέτη της ρυθμιστικής αλληλουχίας του ενισχυτή του lncRNA RECUR1 που έχει συσχετιστεί με τον γαστρικό καρκίνο. Εξετάστηκε η ενεργότητα της αλληλουχίας του ενισχυτή με δοκιμασίες λουσιφεράσης και χαρακτηρίστηκε μία περιοχή του η οποία παρουσίασε αυξημένη ενεργότητα. Επιπλέον, για την μελέτη της ρυθμιστικής αξίας του ενισχυτή, πραγματοποιήθηκε απαλοιφή τμήματος της ρυθμιστικής αλληλουχίας αυτής σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα μέσω CRISPR/Cas9. Έπειτα, εξετάστηκε η επίπτωση της έλλειψης του ενισχυτή στα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 και ενός γονιδίου στόχου του. Τέλος, μελετήθηκε ο φαινότυπος της γαστρικής καρκινικής σειράς με και χωρίς την απαλοιφή του ενισχυτή.

Abstract

Stomach cancer, or gastric cancer, is ranked as the 5th most frequent type amongst all types of cancer and still remains one of the most lethal types. This neoplasm is characterized by significant heterogeneity due to its morphological, histological and molecular features as well as in terms of age of occurrence in both genders. One of the main reasons why gastric cancer is ranked as the 3rd type in mortality is diagnosis at late stages of the disease, as the symptoms usually do not occur until the disease is already quite advanced. For this reason, research aimed towards finding new methods for easy and early diagnosis is deemed necessary. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are a large group of RNA genes greater than 200 nucleotides, that show tissue-specific as well as cancer-specific expression. This makes them ideal molecules for new diagnostic and prognostic biomarkers. The specialized expression of lncRNAs is regulated by regulatory elements such as promoters and enhancers. In particular, enhancers depending on chromatin structure, can play a crucial role in the regulation of the expression of certain oncogenic lncRNAs and thus in oncogenesis. This thesis focuses on the study of the regulatory enhancer sequence of the lncRNA RECUR1, which has been associated with gastric cancer. The activity of this regulatory sequence was examined using luciferase assays and a specific region with increased activity was characterized. Additionally, in order to study the enhancer's regulative value, a fragment of the enhancer was knocked-out in gastric cancer cells, using CRISPR/Cas9. Subsequently, the impact of the enhancer's absence on the expression levels of both RECUR1 and its target gene was examined. Finally, the phenotype of the gastric cancerous cell line was observed with and without the deletion of the enhancer.

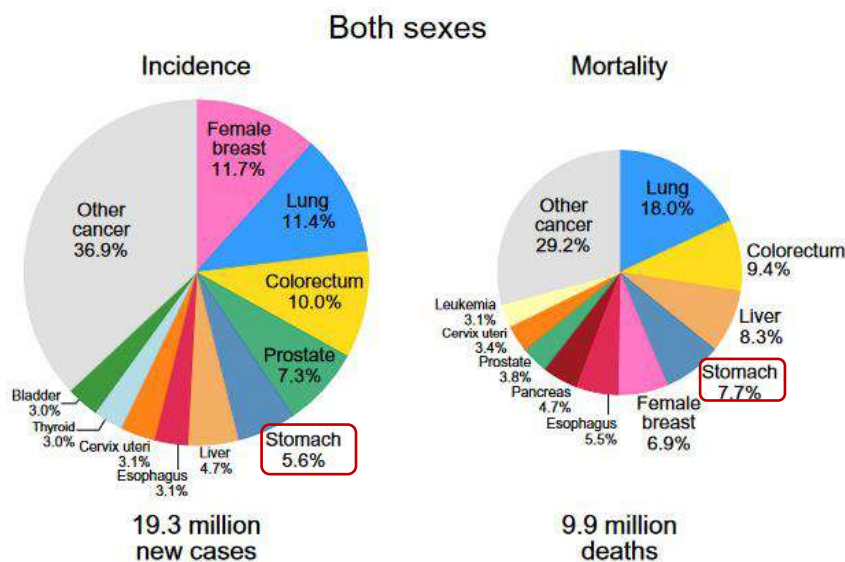
1. Εισαγωγή

1.1 Γαστρικός καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος, ή αλλιώς καρκίνος του στομάχου, αποτελεί ασθένεια κατά την οποία τα κύτταρα του στομάχου διαιρούνται ανεξέλεγκτα [1]. Αυτός ο τύπος καρκίνου αναπτύσσεται αργά και στις περισσότερες περιπτώσεις διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια της νόσου [2]. Γενικά χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση λόγω μετάστασης, τεράστια ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων του όγκου και αντίσταση σε χημειοθεραπείες [1, 3].

1.2 Επιδημιολογία

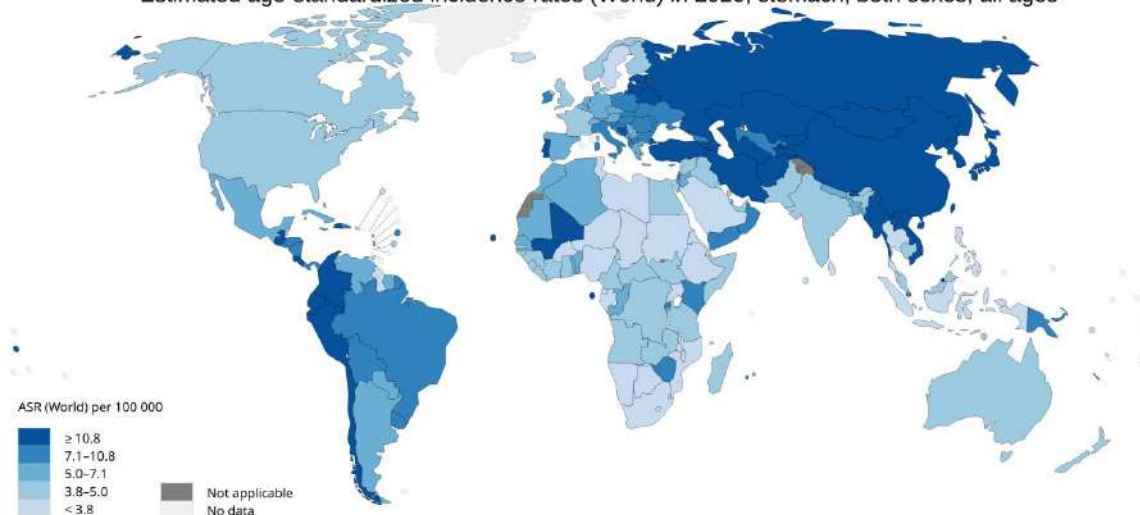
Ο γαστρικός καρκίνος παραμένει ένας από τους πιο σημαντικούς τύπους καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα, όντας υπεύθυνος για 769.000 θανάτους το 2020, αριθμός που ισοδυναμεί με 1 στους 13 θανάτους παγκοσμίως [4]. Καταλαμβάνει την 5^η θέση στην συχνότητα εμφάνισης και παράλληλα την 4^η θέση στην θνησιμότητα της νόσου (Εικόνα 1.1) [4].



Εικόνα 1.1: Κυκλικά διαγράμματα απεικόνισης της συχνότητας και της θνησιμότητας της νόσου και στα δύο φύλα [4].

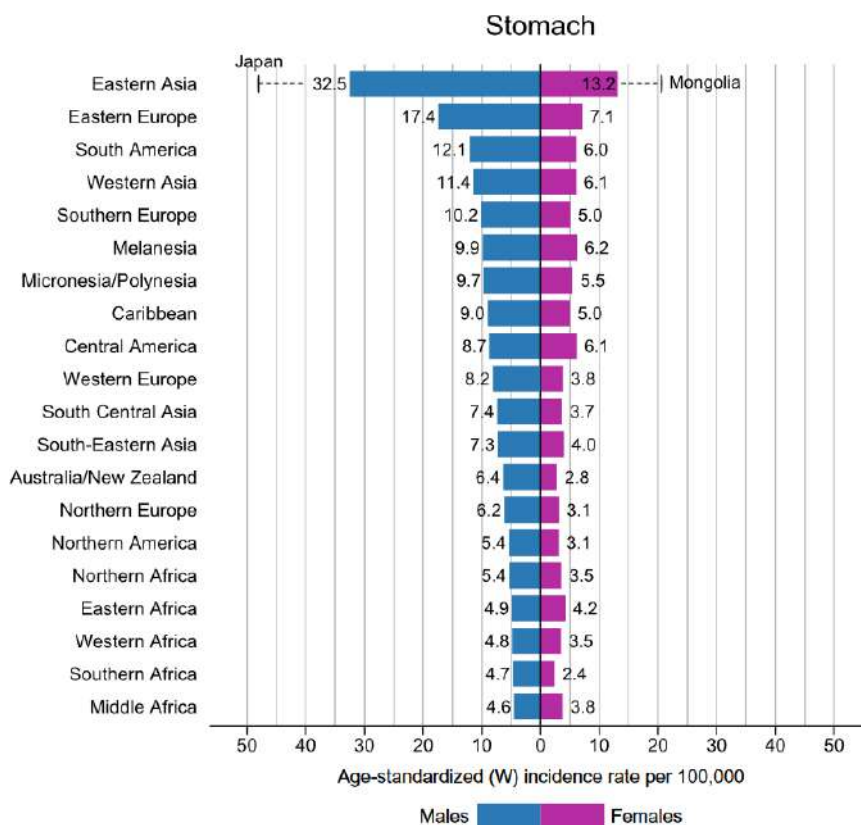
Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου ποικίλει ανάλογα με τον πληθυσμό, την χώρα, την ηλικία αλλά και το φύλο. Συγκεκριμένα, φαίνεται να εμφανίζεται συχνότερα σε περιοχές όπως η ανατολική Ασία, η ανατολική Ευρώπη και το δυτικό τμήμα της Νότιας Αμερικής, αφήνοντας χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης στην δυτική Ευρώπη, την Αφρική και την βόρεια Αμερική (Εικόνα 1.2) [4].

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, stomach, both sexes, all ages



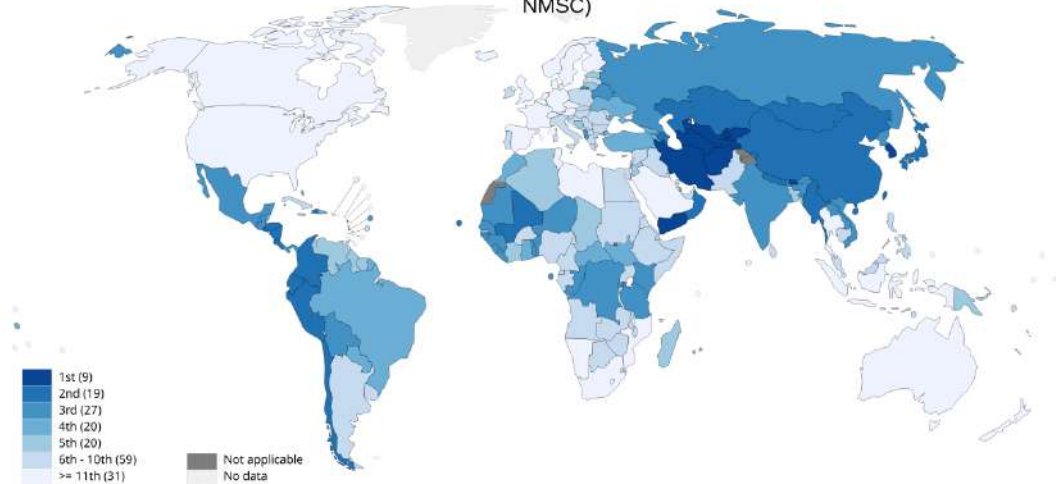
Εικόνα 1.2: Παγκόσμιος χάρτης απεικόνισης της συχνότητας του γαστρικού καρκίνου και στα δύο φύλα, σε όλες τις ηλικίες κόσμο (Retrieved from: <https://gco.iarc.fr/today>).

Παράλληλα οι άνδρες διαγιγνώσκονται με γαστρικό καρκίνο 2 φορές συχνότερα απ' ότι γυναίκες (Εικόνα 1.3), ενώ σε 9 χώρες της κεντρικής Ασίας, η ασθένεια κατατάσσεται πρώτη ως βασική αιτία θανάτου για εκείνους (Εικόνα 1.4) [4].



Εικόνα 1.3: Ιστόγραμμα συχνότητας εμφάνισης γαστρικού καρκίνου σε άνδρες και γυναίκες ανά τον κόσμο (Retrieved from: <https://gco.iarc.fr/today>.)

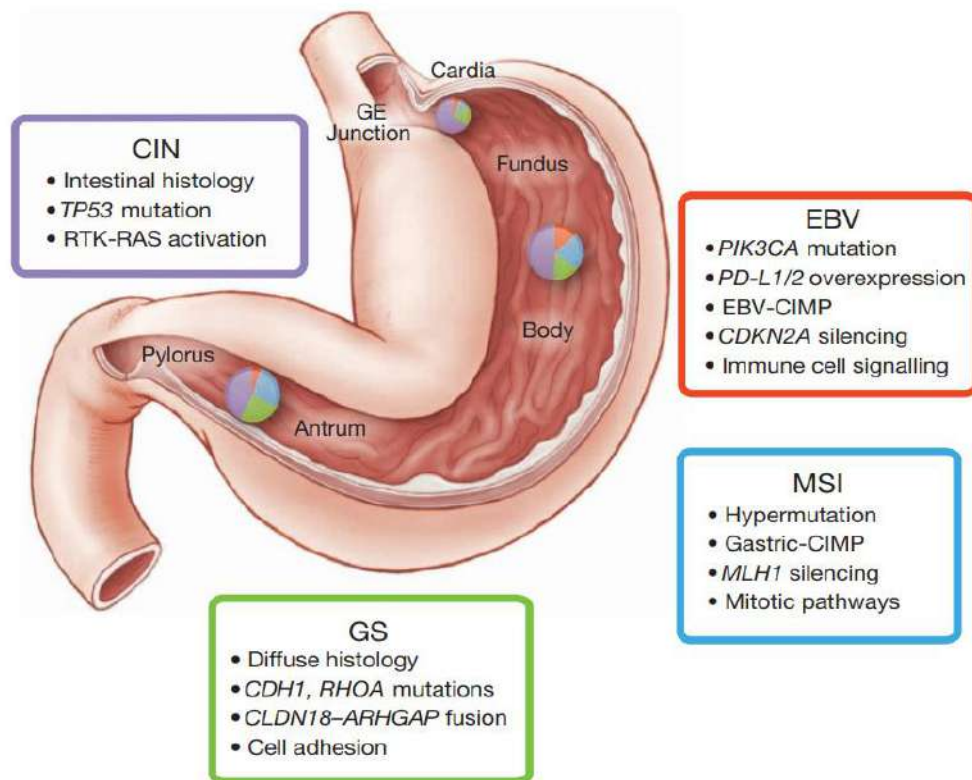
Ranking (Stomach), estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, males, all ages (excl. NMSC)



Εικόνα 1.4: Παγκόσμιος χάρτης απεικόνισης της συχνότητας εμφάνισης γαστρικού καρκίνου σε άνδρες και ταξινόμηση των χωρών με βάση τη συχνότητα αυτή κόσμο (Retrieved from: <https://gco.iarc.fr/today.>)

1.3 Μοριακή Ταξινόμηση

Δεδομένης της πολυπλοκότητας του γαστρικού καρκίνου και του αυξημένου αριθμού θανάτων που έχουν καταγραφεί, χρήζει τεράστιας σημασίας η εύρεση νέων θεραπειών. Προκειμένου οι θεραπείες αυτές να είναι στοχευμένες είναι σημαντικό η νόσος να έχει χαρακτηριστεί και μοριακά πέρα από ιστολογικά, ώστε να κατανοηθεί η μοριακή παθογένεια της. Η πιο γνωστή μοριακή ταξινόμηση έχει πραγματοποιηθεί από την ερευνητική κοινοπραξία Cancer Genome Atlas (TCGA). Αυτή διαχώρισε τον γαστρικό καρκίνο σε τέσσερις υποτύπους: τους θετικούς στον ιό Epstein-Barr (EBV) όγκους, τους όγκους με αστάθεια μικροδορυφόρων (MSI), τους γονιδιωματικά σταθερούς όγκους (GS) και τους όγκους με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) [5] (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Μοριακή ταξινόμηση γαστρικού καρκίνου με βάση το Cancer Genome Atlas (TCGA) και χαρακτηριστικές μοριακές τροποποιήσεις κάθε τύπου [5].

Το χαρακτηριστικό των θετικών όγκων στον EBV είναι η εκτενής μεθυλίωση του DNA όπως προαναφέρθηκε, η οποία πραγματοποιείται μέσω miRNA [6]. Μάλιστα οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν περισσότερη μεθυλίωση του DNA από οποιονδήποτε άλλο καρκίνο σύμφωνα με το TCGA. Συγκεκριμένα, οι όγκοι αυτής της υποκατηγορίας χαρακτηρίζονται από την υπερμεθυλωμένη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του αναστολέα κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (*CDKN2A*), από μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) και υπερέκφραση του προσδέτη *PD-L1/2* (programmed death ligand-1/2) [5]. Με την υπερέκφραση του τελευταίου ο όγκος αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα *PD-1* (programmed cell death protein 1) στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων επιστρατεύοντας τα και διαφεύγοντας έτσι της ανοσολογικής απόκρισης [6].

Όγκοι με αστάθεια μικροδορυφόρων (*MSI*) διαγιγνώσκονται σε μεγαλύτερες ηλικίες (≈ 72 ετών) και χαρακτηρίζονται από υπερμεθυλίωση υποκινητών με κύριο αυτόν του γονιδίου *MLH1*, το οποίο κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA [5, 7]. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου αυτού, οδηγεί στην καταστολή της έκφρασής του. Έτσι, το σύστημα επιδιόρθωσης εσφαλμένης αντιστοίχισης βάσεων (*MMR*) υπολειτουργεί και οδηγεί στον φαινότυπο αστάθειας μικροδορυφόρων, δηλαδή μικρών επαναλαμβανόμενων περιοχών του DNA [8]. Οι περιοχές αυτές είναι επιρρεπείς σε μεταλλάξεις όπως

ελλείψεις ή προσθήκες αζωτούχων βάσεων κατά την αντιγραφή λόγω του φαινομένου της ολίσθησης της πολυμεράσης. Επιπλέον οι όγκοι αυτοί έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις σε γονίδια υπεύθυνα για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και για τη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας [7].

Οι γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (GS) διαγιγνώσκονται συχνά σε σχετικά νεότερες ηλικίες (~59 ετών) και συνδέονται με ιστολογική διάχυση. Εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο RHOA (Ras homolog family member A), στο γονίδιο CDH1 (cadherin-1), καθώς και ανακατατάξεις στα γονίδια CLDN18-ARHGAP6 (claudin 18-Rho GTPase Activating Protein 6) ή/και ογκογόνες μεταλλάξεις σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για GTPases που ανήκουν στην οικογένεια Ras. Παράλληλα, παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση των μονοπατιών κυτταρικής προσκόλλησης και αγγειογένεσης [5].

Τέλος, οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια φανερώνουν γενικά ιστολογία που ομοιάζει με γαστρικό καρκίνο εντερικού τύπου και ανευπλοειδίες, δηλαδή έλλειψη ή προσθήκη ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων αυτών που οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων που ελέγχουν τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την μίτωση [5, 9]. Επίσης παρατηρούνται μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 και γονιδιωματική ενίσχυση σε περιοχές που κωδικοποιούν για υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) [10, 11].

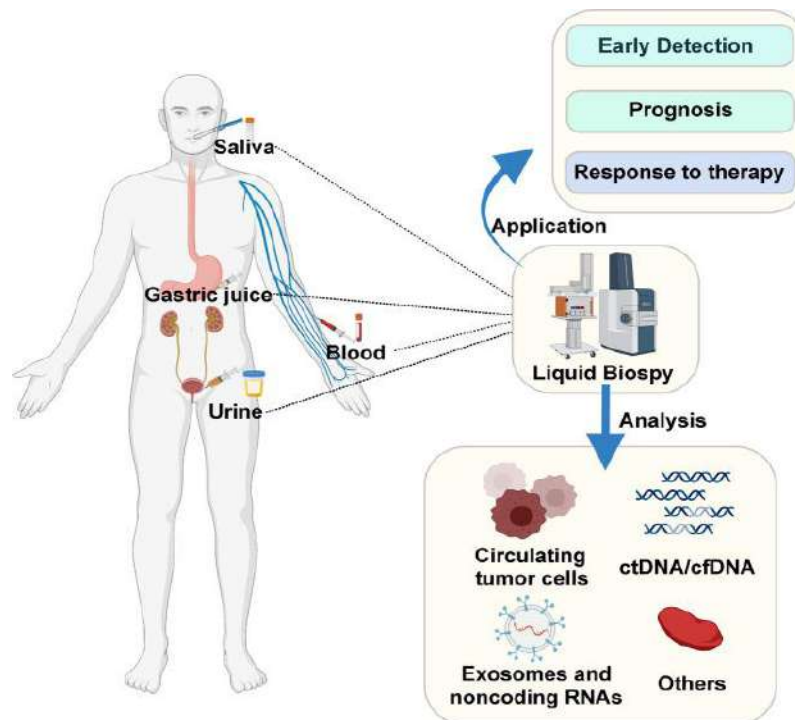
Πέρα από τις μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν ως χαρακτηριστικές για κάθε καρκινικό υπότυπο υπάρχουν και άλλες που γενικότερα προδιαθέτουν για το συγκεκριμένο είδος καρκίνου. Κάποιες από αυτές είναι: μεταλλάξεις ενίσχυσης στα γονίδια HER2, FGFR2, και MET [11]. Επιπλέον οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη APC είναι οι δεύτερες που εντοπίζονται συχνότερα στον γαστρικό καρκίνο μετά τις μεταλλάξεις στο p53. Η APC διαθέτει επικράτειες πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην σηματοδότηση Wnt αλλά και στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού [9].

1.4 Μέθοδοι διάγνωσης γαστρικού καρκίνου

Έως και σήμερα οι ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τη διάγνωση της νόσου αφορούν επεμβατικού τύπου μεθόδους για τον ασθενή. Αυτό συνεπάγεται πως δεν υπάρχει εξέταση ρουτίνας η οποία να μπορεί να διαγνώσει τον γαστρικό καρκίνο. Επιπροσθέτως, οι περισσότεροι ασθενείς αντιλαμβάνονται τη νόσο σε προχωρημένο στάδιο που συνοδεύεται από γενικά συμπτώματα, όπως είναι η απώλεια βάρους και όρεξης, η δυσπεψία καθώς και ο πόνος στην κοιλιακή χώρα. Σε περίπτωση αιμορραγικών καρκίνων ένα πρόσθετο σύμπτωμα είναι και η αναιμία [12, 13].

Η πιο κοινή μέθοδος κλινικής διάγνωσης είναι η ενδοσκόπηση, κατά την οποία σε περίπτωση ανίχνευσης λεπτών αλλαγών του γαστρικού βλεννογόνου απαιτούνται περαιτέρω προηγμένες ενδοσκοπικές τεχνικές. Κάποιες από αυτές είναι η μεγεθυντική ενδοσκόπηση, η χρωμοενδοσκόπηση (CE) και η ενδοσκόπηση υψηλής ανάλυσης (HR)[14]. Κατά την ανίχνευση οποιασδήποτε κακοήθειας είναι απαραίτητη και η ιστολογική ταξινόμηση του όγκου, η οποία πραγματοποιείται μέσω βιοψίας, δηλαδή λήψη ιστού/κυττάρων. Επιπλέον η σταδιοποίηση της νόσου γίνεται με αξονική τομογραφία (CT), μαγνητική τομογραφία (MRI), ή και τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET)[12].

Ο πιο κοινός ιστολογικά τύπος γαστρικού καρκίνου είναι το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (GAC), του οποίου η θέση, το σχήμα, το μέγεθος και η ακαμψία προσδιορίζονται με ενδοσκοπική εξέταση, ενώ το βάθος της διήθησης του όγκου προσδιορίζεται με ενδοσκοπική εξέταση και αξονική τομογραφία (CT) [13]. Είναι, λοιπόν, γεγονός πως η βαρύτητα της ασθένειας σε συνδυασμό με την καθυστερημένη διάγνωση συμβάλουν τόσο στην επιθετικότητα της νόσου όσο και στα αυξημένα ποσοστά θνητότητας [14]. Επομένως είναι αναγκαία η εύρεση νέων μεθόδων διάγνωσης αλλά και πρόγνωσης του γαστρικού καρκίνου, με σκοπό την πιο άμεση δράση για την καταπολέμηση της συγκεκριμένης νεοπλασίας. Στις μέρες μας γίνονται προσπάθειες εύρεσης βιοχημικών/μοριακών καρκινικών βιοδεικτών. Αυτοί μπορούν να επιτρέψουν διάγνωση ή εμφάνιση προδιάθεσης καρκίνου, ενώ παράλληλα υπόσχονται ελαχιστοποίηση της επεμβατικότητας. Τέτοιοι καρκινικοί βιοδείκτες είναι οι CEA, CA 72-4, CA 19-9, CA 15-3 και CA 12-5, όμως παρά τα υψηλά τους επίπεδα στον γαστρικό καρκίνο, δεν είναι αρκετά ευαίσθητοι ούτε ειδικοί. Παράλληλα, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων τους κυρίως στα όψιμα στάδια της νόσου [15].



Εικόνα 1.6: Λήψη υγρής Βιοψίας από σωματικά υγρά (αίμα, σάλιο, ούρα, γαστρικά υγρά) και ανίχνευση CTCs, ctDNA και non-coding RNA [16].

Η λήψη βιοδεικτών με απλή λήψη σωματικών υγρών από τον οργανισμό του ασθενούς ονομάζεται υγρή βιοψία και πρόκειται για μία πολλά υποσχόμενη, μη-επεμβατική τεχνική τόσο για την διάγνωση του γαστρικού καρκίνου όσο και για την πρόγνωση της πορείας της ασθένειας (Εικόνα 1.6). Τα κύρια μόρια που πρωταγωνιστούν είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), το κυκλοφορούν DNA του όγκου (ctDNA) καθώς επίσης και τα μη κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNA) [16].

1.5 Μακρά μη-κωδικοποιητικά RNA (LncRNA)

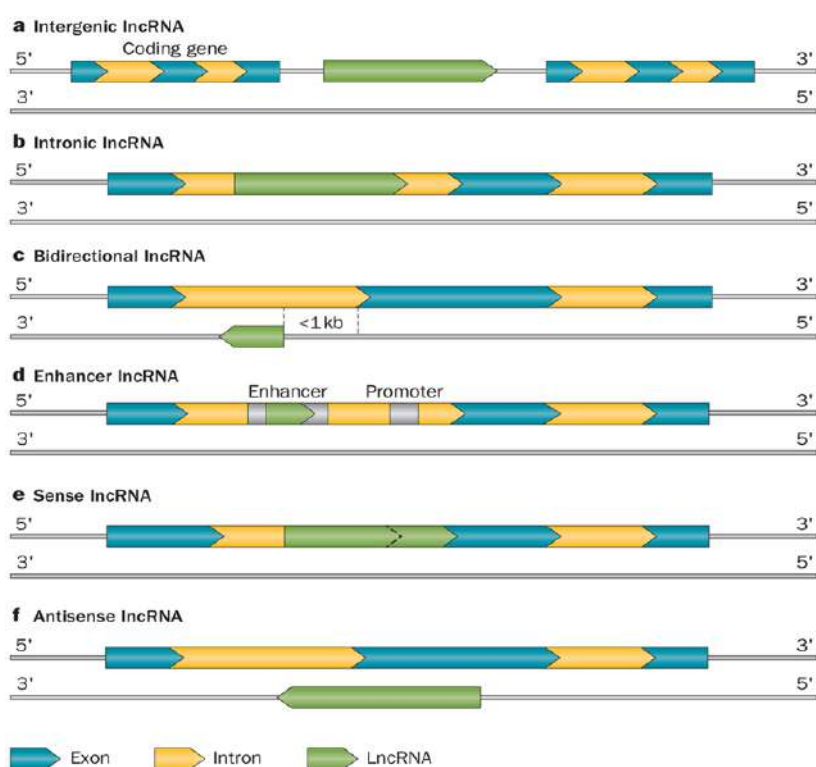
1.5.1 Μη-κωδικοποιητικά RNA

Τα τελευταία χρόνια με τη χρήση αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) και προηγμένων βιοπληροφορικών αναλύσεων έχει καταστεί γνωστό πως τα RNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αντιστοιχούν σε πολύ μικρό ποσοστό του ανθρώπινου γονιδιώματος (<3%) [17]. Αυτό δίνει τη σκυτάλη στα μη κωδικοποιητικά RNA τα οποία αναδύονται ως ενδιαφέροντα ρυθμιστικά μόρια, αποδεικνύοντας πως ο ρόλος των μεταγράφων υπερβαίνει αυτόν του απλού συνδετικού κρίκου μεταξύ DNA και πρωτεϊνών. Τα μη κωδικοποιητικά RNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το μέγεθος τους σε βραχεία ή μακρά. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν RNA μικρότερα από 200 νουκλεοτίδια, όπως για παράδειγμα miRNA ή siRNA. Αντίθετα στην τελευταία κατηγορία ανήκουν μετάγραφα με έκταση μεγαλύτερη από 200 νουκλεοτίδια, όπως είναι τα lncRNA [17]. Ο αριθμός αυτών των μακρών μη-κωδικοποιητικών RNA έχει αυξηθεί κατά πολύ καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης σε

αντίθεση με τα κωδικοποιητικά μετάγραφα και αντανακλά την πολυπλοκότητα του οργανισμού [18]. Τα lncRNA έχουν προταθεί ως εξειδικευμένοι μοριακοί, μη επεμβατικοί βιοδείκτες λόγω της ετερογένειας, της αυξημένης ιστοειδικής και κυτταροειδικής έκφρασης αλλά και της δομικής πολυπλοκότητας που παρουσιάζουν [18, 19].

1.5.2 Χαρακτηρισμός των lncRNA

Η βιογένεση των lncRNA αλλά και τα βασικά τους χαρακτηριστικά ομοιάζουν με εκείνα των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθώς και αυτά μεταγράφονται από την RNA pol-II, διαθέτουν 5'-καλύπτρα and 3'-πολυΑ ουρά, ενώ πολλά από αυτά παρουσιάζουν μοτίβα εναλλακτικού ματίσματος [20, 21]. Τα lncRNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα (Εικόνα 1.7). Έτσι χωρίζονται σε: διαγονιδιακά lncRNA (Intergenic) τα οποία βρίσκονται μεταξύ δύο κωδικοποιητικών γονιδίων, ιντρονικά lncRNA (Intronic) τα οποία εντοπίζονται σε ιντρόνια κωδικοποιητικών γονιδίων, αμφίδρομα lncRNA (Bidirectional) που βρίσκονται στον αντίθετο κλώνο, γειτονικά σε κωδικοποιητικά γονίδια εντός απόστασης 1kb, lncRNA ενισχυτών (e-lncRNA) που είναι παρόντα σε περιοχές ενισχυτών γονιδίων και τέλος νοηματικά (Sense) ή αντινοηματικά (Antisense) lncRNA τα οποία επικαλύπτονται με ένα ή περισσότερα ιντρόνια και εξόνια στον ίδιο ή στον αντίστροφο κλώνο αντίστοιχα [17].



Nature Reviews | Cardiology

Εικόνα 1.7: Χαρακτηρισμός των lncRNAs ως Διαγονιδιακά (Intergenic), Ιντρονικά (Intronic), Αμφίδρομα (Bidirectional), Ενισχυτικά (e-lncRNA), Νοηματικά (Sense) και Αντινοηματικά (Antisense). [21]

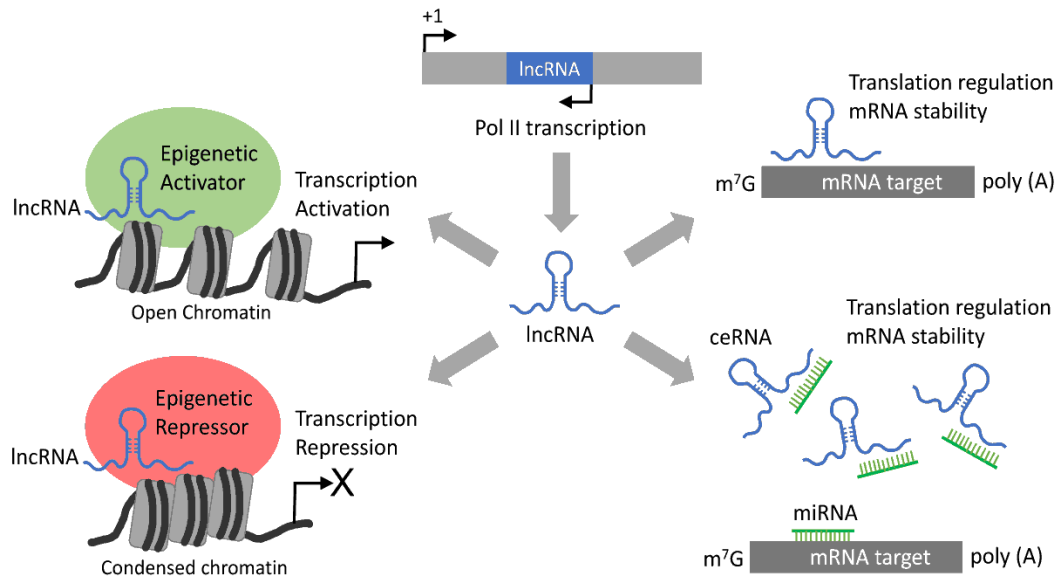
1.5.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός και λειτουργίες των lncRNA

Τα lncRNA ανιχνεύονται υποκυτταρικά στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρήνα. Μέσω της δευτεροταγούς τους δομής, τα lncRNA μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα νουκλεϊκά οξέα ή και πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας έτσι πλήθος κυτταρικών διεργασιών όπως η μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων, η κυτταρική διαίρεση, η διαφοροποίηση, η επιβίωση και η απόπτωση [22]. Έχει δειχθεί πως στο κυτταρόπλασμα παίζουν ρόλο στην σταθερότητα των κωδικοποιητικών μεταγράφων (mRNA). Έχουν την δυνατότητα να προσελκύουν συμπληρωματικά μικρά μη-κωδικοποιητικά RNA, όπως microRNA και να αλληλεπιδρούν με αυτά.

Παράλληλα δρουν ως ικριώματα και στρατολογούν πρωτεΐνες που αποικοδομούν mRNA-στόχους επιδρώντας άμεσα στην σταθερότητα τους και τον χρόνο ημιζωής τους στο κυτταρόπλασμα [23]. Επιπλέον έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν άμεσα με συμπληρωματικά μόρια mRNA, γεγονός που οδηγεί στην στρατολόγηση ριβο-δεσμευόμενων πρωτεϊνών (RNA-binding proteins, RBPs), οι οποίες είτε καταστέλλουν είτε εκκινούν την μετάφραση [23, 24]. Τα lncRNAs επίσης ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, καλύπτοντας τις περιοχές πρόσδεσης των ενζύμων που επιτελούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) στα κωδικοποιητικά μετάγραφα [25].

Παρ' όλα αυτά, η πλειονότητα των lncRNA παραμένει και δρα στην περιοχή του πυρήνα [26]. Εκεί τα lncRNA επιτελούν ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου μέσω αλληλεπιδράσεων με τη χρωματίνη ή με άλλες πρωτεΐνες όπως μεταγραφικούς παράγοντες και επιγενετικούς ρυθμιστές, αλλάζοντας έτσι τόσο τη δομή της χρωματίνης όσο και επακόλουθα την γονιδιακή έκφραση. Οι λειτουργίες αυτές είναι που αντανakλούν την πιθανή σημαντικότητά τους και τον ρόλο τους στην ασθένεια [20]. Ο τρόπος με τον οποίο δρουν μπορεί να χαρακτηριστεί ως *cis* όταν επιτελούν την δράση τους κοντά στην περιοχή που μεταγράφονται ή *trans* όταν η ρυθμιστική τους δράση εκδηλώνεται μακριά από τον γενετικό τους τόπο [20, 23]. Τα lncRNA διαθέτουν την ικανότητα να προσελκύουν και να στρατολογούν τροποποιητές της χρωματίνης με χαρακτηριστικό και πιο μελετημένο το παράδειγμα το μακρό μη-κωδικοποιητικό RNA X-inactive-specific transcript (Xist) [27]. Αυτό επιτελεί την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X (XCI) στα θηλυκά κατά την εμβρυογένεση, μία διαδικασία που περιλαμβάνει σχεδόν πλήρη σίγηση ολόκληρου του χρωμοσώματος μέσω ανασχηματισμού της τρισδιάστατης (3D) δομής του [23, 28]. Ένα μοντέλο που έχει προταθεί για την απενεργοποίηση αυτή θέλει το Xist να στρατολογεί άμεσα πρωτεΐνες του Polycomb repressive complex 2 (PRC2), το οποίο οδηγεί σε τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27me3) και εξάπλωση της σίγησης του χρωμοσώματος [27-29]. Εναλλακτικά, τα lncRNA μπορούν και να αποτρέπουν την στρατολόγηση τροποποιητών της χρωματίνης μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με αυτούς με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την αλληλεπίδραση

ιστονών και αναδιαμορφωτών της χρωματίνης [30]. Ένα άλλο παράδειγμα lncRNA που αλληλεπιδρά με σύμπλοκα πρωτεϊνών είναι το HOTAIR, το οποίο επίσης αλληλεπιδρά με το PRC2 και οδηγεί σε επιγενετική σίγηση της γενετικής περιοχής HOXD, μέσω μεθυλίωσης των ουρών των ιστονών [31].

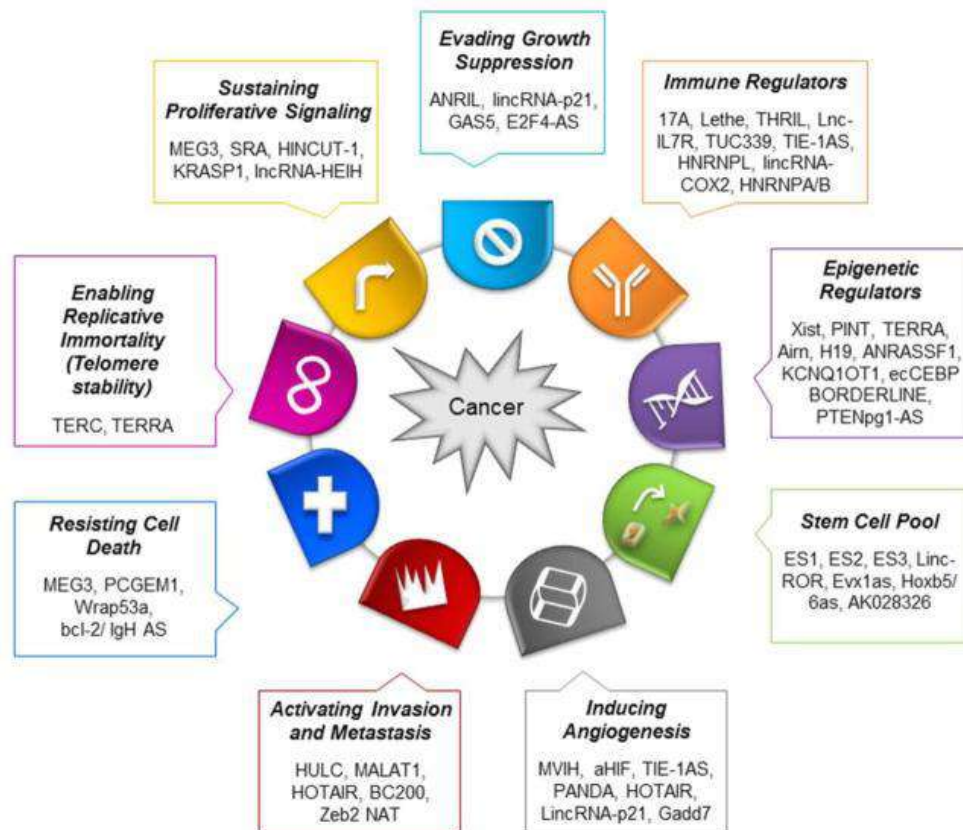


Εικόνα 1.8: Δράση των lncRNA ως επιγενετικοί ενεργοποιητές ή απενεργοποιητές και ως ρυθμιστές της μετάφρασης και της σταθερότητας των mRNA [32].

Ωστόσο η δράση κάποιων lncRNAs μπορεί να λάβει χώρα και στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το TUG1 το οποίο δρα στον πυρήνα ως μοριακό ικρίωμα που συνδέει το PRC2 με τον μεταγραφικό παράγοντα YY1, ενώ παράλληλα στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρά με miRNA[33].

1.5.4 lncRNAs στον καρκίνο

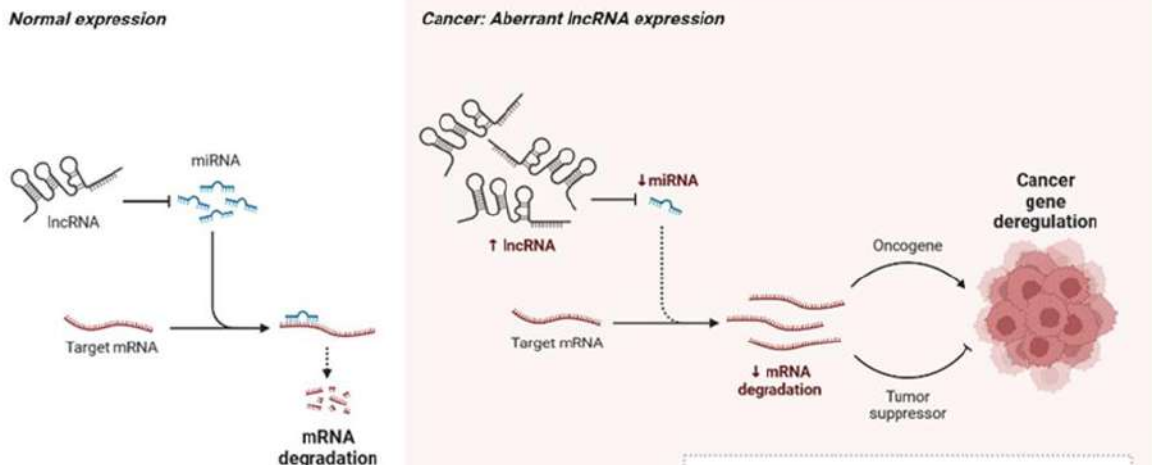
Είναι γνωστό πως η απορρυθμισμένη έκφραση κάποιων lncRNA αποτελεί μία κατάσταση άμεσα συνδεδεμένη με την μετάβαση φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά και έχει εντοπισθεί σε διαφόρους τύπους καρκίνου όπως σε καρκίνο του πνεύμονα, γαστρικό καρκίνο, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), γλοίωμα, καρκίνο του προστάτη και άλλους. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως ο πιθανός ρόλος των lncRNA στην ογκογένεση σχετίζεται με την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με DNA, RNA και πρωτεΐνες ρυθμίζοντας έτσι πολλά από τα ορόσημα του καρκίνου (Εικόνα 1.9) [17].



Εικόνα 1.9: Ορόσημα του καρκίνου και χαρακτηριστικά lncRNA που έχουν συσχετιστεί με την ρύθμιση αυτών [17].

Οι μοριακοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί των lncRNA που αναφέρθηκαν μπορούν να συμβάλλουν σε συγκεκριμένους ογκο-σχετιζόμενους φαινότυπους [17]. Για παράδειγμα, έκτοπη έκφραση των lncRNA που δρουν ως μοριακά δολώματα για miRNA οδηγεί σε αλλαγή των επιπέδων miRNA και συνεπώς επηρεάζει την επαγόμενη από miRNA μεταφραστική καταστολή των γονιδίων στόχων του miRNA (Εικόνα 1.10) [24]. Το TUG1 αλληλεπιδρά με το miR-145, προστατεύοντας έτσι από αποικοδόμηση τα μετάγραφα των γονιδίων SOX2 και MYC που είναι γνωστά για την διατήρηση της βλαστοκυτταρικότητας [34].

lncRNA-miRNA Gene Expression Regulation in Cancer



Εικόνα 1.10: Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης μέσω αλληλεπιδράσεων lncRNA-miRNA και επιπτώσεις της απορρύθμισης της έκφρασης των lncRNA στα mRNA και την συμπεριφορά του όγκου [Τροποποιημένη εικόνα από BioRender].

Επιπλέον τα lncRNA μπορούν να ελέγξουν την μεταγραφή των mRNA μέσω σχηματισμού R-βρόγχων (δομή νουκλεϊκών οξέων με 3 κλώνους όπου ένα μόριο RNA εμπλέκεται στην διπλή έλικα DNA). Για παράδειγμα το μακρό μη κωδικοποιητικό μετάγραφο TARID αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη GADD45A, η οποία οδηγεί σε ενεργή απομεθυλίωση του DNA. Το TARID μεταγράφεται αντίστροφα από το γονίδιο TCF21, έναν μεταγραφικό παράγοντα με ογκοκατασταλτική δράση. Είναι γνωστό πως το TARID οδηγεί την πρωτεΐνη GADD45A στον υποκινητή του TCF21 σχηματίζοντας ένα R-βρόγχο ενεργοποιώντας έτσι το γονίδιο αυτό. Έτσι, απορρύθμιση της έκφρασης του TARID, και πιο συγκεκριμένα μειωμένη έκφρασή του, οδηγεί σε επιγενετική σίγηση του TCF21 στον καρκίνο και μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά.[35-37].

Έχει αποδειχθεί πως πολλά lncRNA παρουσιάζουν έκτοπη υπερέκφραση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ένα από αυτά είναι το NEAT1, το οποίο έχει βρεθεί να υπερκεφράζεται σε επιθετικούς όγκους του προστάτη, όπου ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την διήθηση των κυττάρων, ενώ παράλληλα η σίγηση της έκφρασής του οδηγεί σε καταστολή των χαρακτηριστικών αυτών [38]. Το ANRIL έχει συνδεθεί άρρηκτα με επιτάχυνση της ασθένειας, κακή πρόγνωση και σύντμηση της διάρκειας επιβίωσης για τον ασθενή [39]. Στην ακριβώς αντίθετη πλευρά υπάρχουν lncRNA τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στον καρκίνο. Ένα από αυτά είναι το TP53TG1 το οποίο έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε όγκους του μαστού, του στομάχου και του παχέος εντέρου λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του [40]. Το αποτέλεσμα είναι ενισχυμένη αντίσταση σε χημειοθεραπείες και κακή πρόγνωση της νόσου [41]. Επιπλέον το MEG3 αποτελεί lncRNA με ογκοκατασταλτική δράση και φαίνεται να μειορρυθμίζεται σε πολλούς τύπους

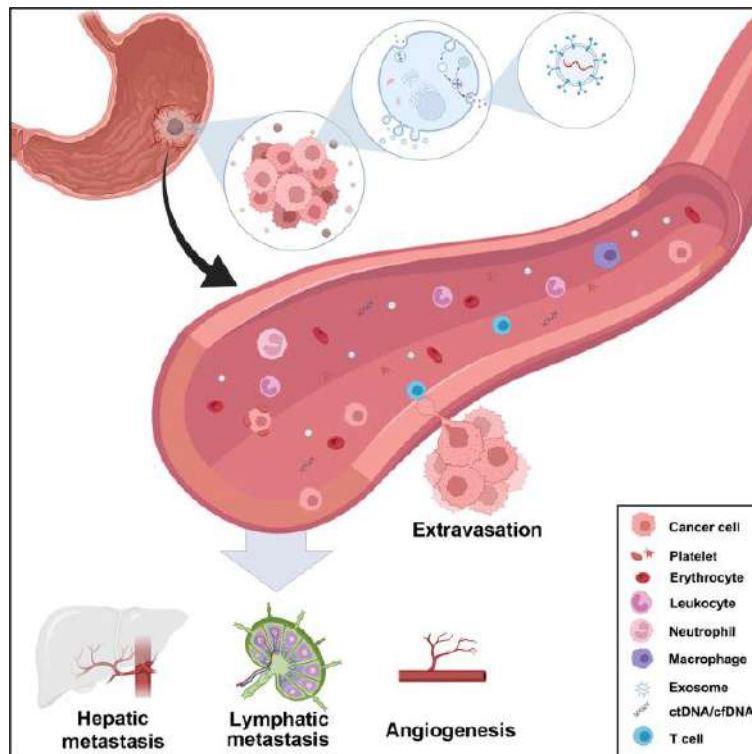
καρκίνου [42]. Η λειτουργία του σχετίζεται με αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης, καθώς και με ενίσχυση της απόπτωσης ενώ η καταστολή του οδηγεί σε υπερενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/ β -catenin και της σηματοδότησης AKT σε όγκους του πνεύμονα, του μαστού αλλά και του στομάχου [43].

1.6 lncRNAs: Διαγνωστικοί και θεραπευτικοί στόχοι

1.6.1 Διάγνωση και πρόγνωση

Έχει καταστεί σαφής η συμβολή των μακρών μη-κωδικοποιητικών RNA στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθώς και η αλληλεπίδρασή αυτών και των ρυθμιστικών τους στοιχείων με επιγενετικούς μηχανισμούς. Ταυτόχρονα αναδείχθηκε η συσχέτιση τους με την επιγενετική του καρκίνου αλλά και γενικότερα ο κομβικός τους ρόλος σε διάφορα ορόσημα της νόσου. Δεδομένης της σημαντικότητάς τους και σε συνδυασμό με κάποια από τα χαρακτηριστικά τους αξίζει να διερευνηθεί η αξία τους ως διαγνωστικοί και θεραπευτικοί δείκτες, καθώς εμπλέκονται στην έναρξη, την εξέλιξη αλλά και την εξάπλωση της ασθένειας [20].

Πρώτα απ' όλα έχει παρατηρηθεί διαφορετική έκφραση των lncRNA σε όγκους συγκριτικά με φυσιολογικούς ιστούς [44]. Γενικότερα σε πολλά καρκινικά μοντέλα έχει εντοπιστεί απελευθέρωση μικρών εξωκυτταρικών κυστιδίων (Extra-cellular vehicles, EVs), τα οποία περιέχουν διάφορα είδη μη κωδικοποιητικών RNA που σχετίζονται με όγκους, συμπεριλαμβανομένων και των lncRNA [16, 45]. Μια υποκατηγορία EV που ονομάζονται εξωσώματα (exosomes), εντοπίζονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και μπορούν να ανιχνευτούν στο αίμα, σε ούρα και σε άλλα σωματικά υγρά [16]. Τα εξωσώματα επιτρέπουν στα εγκλωπωμένα τους lncRNA να κυκλοφορούν προστατευμένα από αποικοδόμηση, υποδεικνύοντας έτσι τον ρόλο τους στην αγγειογένεση, στην μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, στην μετάσταση και στην διαφυγή από την ανοσοεπιτήρηση (Εικόνα 1.11)[16, 46].



Εικόνα 1.11: Εξωσώματα που εκκρίνονται από όγκους, περιλαμβάνουν non-coding RNA και συμβάλουν στην μετάσταση και την εξέλιξη της νόσου [16]

Σε συνδυασμό με την επιτακτική ανάγκη εύρεσης μη επεμβατικών και οικονομικά βιώσιμων τεχνικών διάγνωσης τα lncRNA αποτελούν εξαιρετικά μόρια στόχοι για διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου μέσω λήψης υγρής βιοψίας. Για παράδειγμα το μετάγραφο PCAT-1 που συσχετίζεται με καρκίνο του προστάτη μπορεί να ανιχνευθεί σε ούρα ασθενών[47]. Ταυτόχρονα, τα lncRNAs CAT104, LINC01234 και STXBP5-AS1 έχουν μεγάλη αξία ως προγνωστικοί δείκτες για την επιβίωση ασθενών με καρκίνο του μαστού [48].

1.6.2 Θεραπεία

Πέρα από βιοδείκτες, τα lncRNA εμφανίζουν ερευνητικό ενδιαφέρον και ως θεραπευτικοί στόχοι [49]. Η δευτεροταγής τους δομή και δομική τους πολυπλοκότητα τα καθιστά ικανά να σχηματίζουν σύμπλοκα και να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια, επομένως αποτελούν υποψήφια μόρια για φαρμακευτική παρέμβαση [50]. Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για στόχευση των lncRNA με σκοπό την ρύθμιση της έκφρασης και δράσης τους. Κάποιες από αυτές είναι η αναστολή της μεταγραφής τους, η αποσταθεροποίηση ή και αποικοδόμηση του μεταγράφου και η παρεμπόδιση των αλληλεπιδράσεων τους με πρωτεΐνες, μέσω αλληλεπίδρασης με μικρά συνθετικά μόρια που μπλοκάρουν τις θέσεις δέσμευσής τους σε αυτές [17].

Το ενδιαφέρον των μορίων αυτών ως στόχοι για θεραπεία υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι παρουσιάζουν μοτίβα ιστο-ειδικής έκφρασης προσφέροντας

έτσι ειδικότητα ως μέθοδοι θεραπείας με παράλληλη μείωση των πιθανοτήτων εκδήλωσης ανεπιθύμητων παρενεργειών συγκριτικά με ήδη εφαρμόσιμες μεθόδους θεραπείας που αφορούν κωδικοποιητικούς στόχους [17, 51]. Συμπληρωματικά, σε αντιπαράθεση με φαρμακευτικά μόρια και αντισώματα που χρησιμοποιούνται, δεν υπάρχουν αναφορές για αντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε θεραπεία με μη κωδικοποιητικά RNA [50]. Έτσι τα lncRNA αποτελούν πολλά υποσχόμενους στόχους τόσο για την διάγνωση και την πρόγνωση όσο και για την θεραπεία πολλών μορφών νεοπλασίας.

Είναι εμφανές πως τα lncRNA έχουν τεράστιο αντίκτυπο στην γονιδιακή έκφραση και έτσι αποτελούν βασικό παράγοντα που συμβάλει στην παθοφυσιολογία της νεοπλασίας. Επηρεάζουν κυτταρικές λειτουργίες οι οποίες όταν απορρυθμιστούν μπορεί να οδηγήσουν σε έκτοπη κυτταρική συμπεριφορά και μετέπειτα παθογένεια. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω του ενεργού ρόλου τους στην γονιδιακή ρύθμιση μέσω της συμμετοχής τους σε επιγενετικές τροποποιήσεις που οδηγούν σε αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Τα γεγονότα αυτά με τη σειρά τους σχετίζονται και εξαρτώνται άμεσα από τις πρωτογενείς αλληλουχίες DNA και πιο συγκεκριμένα τα ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων. Έχει βρεθεί πως τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα παρουσιάζουν ιστοειδικότητα και αποτελούν σημαντικά μόρια για την διαφοροποίηση μιας κυτταρικής γενεαλογίας [52]. Έτσι, εφόσον ρυθμίζουν εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες αξίζει να μελετηθούν τα ρυθμιστικά στοιχεία που καθορίζουν την έκφρασή τους.

1.7 Ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων

Πέρα από ιστοειδικά, τα lncRNA είναι και καρκινοειδικά και η δράση συγκεκριμένων lncRNA έχει συσχετιστεί με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου [53]. Όπως προαναφέρθηκε, παρατηρείται διαφορετική έκφραση των lncRNA σε όγκους σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς για αυτό και είναι επιτακτική η ανάγκη μελέτης των ρυθμιστικών στοιχείων που ελέγχουν την έκφραση τους αλλά και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των lncRNA με ρυθμιστικές αλληλουχίες που ελέγχουν την εκδήλωση του μηχανισμού δράσης τους σε συγκεκριμένες νεοπλασίες.

1.7.1 Υποκινητές και ενισχυτές

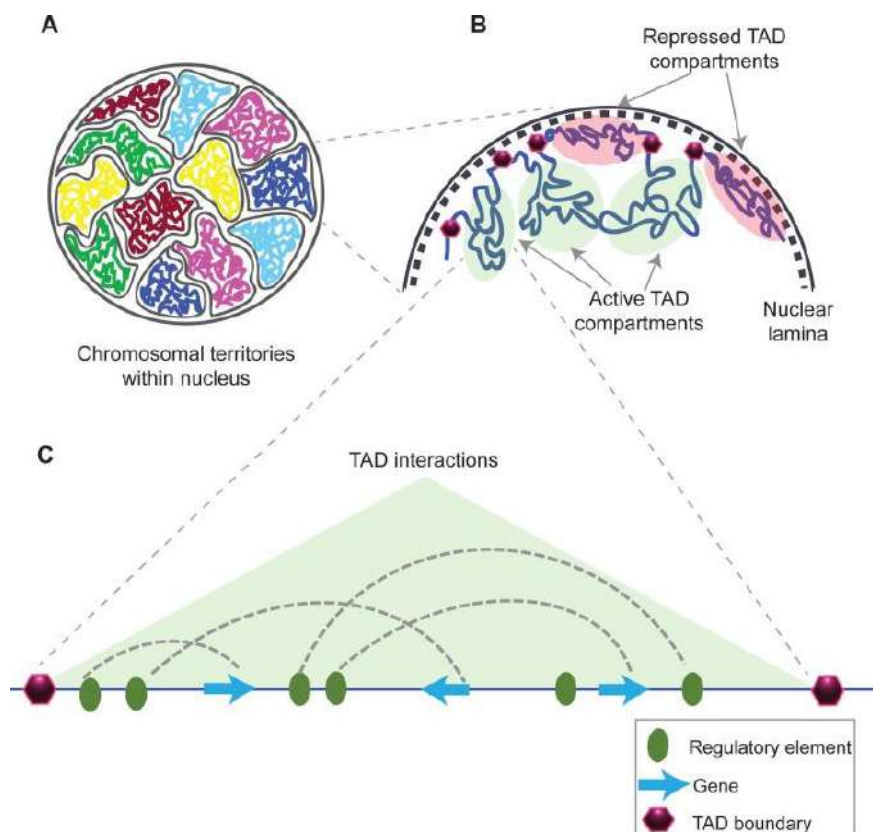
Η κατανόηση της οργάνωσης του γονιδιώματος και της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυώτες βασίζεται στον χαρακτηρισμό των ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων[54]. Πρώτα απ' όλα ανοδικά ενός γονιδίου και πιο συγκεκριμένα κοντά στο 5' άκρο του βρίσκεται ο υποκινητής, που αφορά την απαραίτητη αλληλουχία για την έκφραση του γονιδίου[55]. Αυτός περιλαμβάνει τον χώρο οργάνωσης του εναρκτήριου συμπλόκου μεταγραφής μέσω των αλληλουχιών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και άλλων πρωτεϊνικών συμπλόκων που καθιστούν εφικτή την προσέλκυση της RNA πολυμεράσης για την μεταγραφή του γονιδίου, είτε αυτό είναι κωδικοποιητικό είτε όχι. Πέρα από τους υποκινητές, στις

ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων συγκαταλέγονται και οι ενισχυτές. Οι ενισχυτές μπορούν να εντοπιστούν ανοδικά ή καθοδικά ενός γονιδίου και μάλιστα σε μεγάλη απόσταση από αυτό. Η λειτουργία τους επιτρέπει την στόχευση συγκεκριμένων υποκινητών και να δρουν ενισχυτικά εξειδικεύοντας την γονιδιακή έκφραση με ιστοειδικό τρόπο [54, 55].

1.7.2 Topologically Associated Domains (TADs)

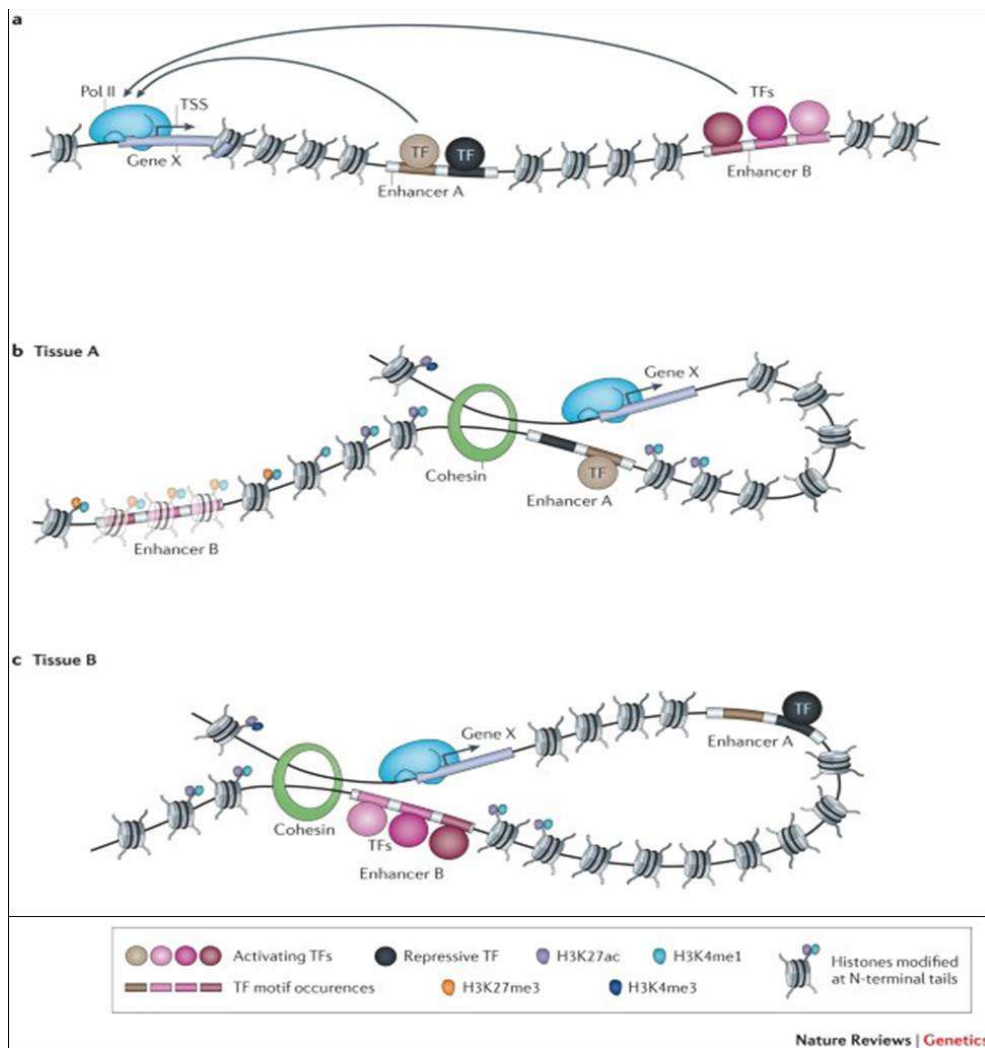
Οι ενισχυτές ρυθμίζουν τα γονίδια στόχους τους με τη βοήθεια ποικίλων πρωτεϊνών όπως οι κοχεσίνες, που συμβάλουν σε ανακατατάξεις της τρισδιάστατης δομής της χρωματίνης μέσω των οποίων γεφυρώνονται τα δύο ρυθμιστικά στοιχεία (υποκινητές-ενισχυτές) [56]. Οι δομές που δημιουργούνται ονομάζονται τοπολογικά συνδεδεμένες περιοχές (TADs) και έχουν αναγνωριστεί ως θεμελιώδεις μονάδες για την εξειδίκευση του μεταγραφώματος, μέσω καθορισμού της αρχιτεκτονικής του γονιδιώματος, οδηγώντας στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [57].

Στις περιοχές αυτές παρατηρούνται εντός των ορίων τους έντονες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αλληλουχιών, ενώ παράλληλα εκτός αυτών παρατηρείται αποκλεισμός της εκδήλωσης ρυθμιστικού δυναμικού από γειτονικές περιοχές [58] (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12: (Α) Δομή γονιδιώματος ενός ευκαρυωτικού πυρήνα. (Β) Υποδιαίρεση κάθε χρωμοσώματος σε TADs μεταγραφικά ενεργά ή ανενεργά όπως έχουν βρεθεί από Hi-C δεδομένα. (Γ) Αναπαράσταση ενός ενεργού TAD, των ορίων του και των ρυθμιστικών του στοιχείων [54].

Τα όρια των TADs ορίζονται από την ύπαρξη του μοτίβου πρόσδεσης της πρωτεΐνης-μονωτή CTCFs (CCCTC-binding factors) συνδυαστικά με τον σχηματισμό και αλληλεπίδραση με την χρωματίνη συμπλόκων κοχεσινών που ομοιάζουν με δακτυλίους, τα οποία “σκανάρουν” το DNA και σφραγίζουν τις χρωματινικές λούπες [59-61]. Αξίζει να αναφερθεί πως αυτές οι χρωματινικές λούπες αποτελούν δυναμικές δομές οι οποίες ανάλογα με την απώλεια των παραγόντων πρόσδεσης CTCF ή των κοχεσινών αποδομούνται και επανασχηματίζονται [60, 61]. Τα ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται στο ίδιο TAD έχουν την τάση, παρουσία των κατάλληλων πρωτεϊνικών συμπλόκων, όπως είναι αυτό του διαμεσολαβητή και ειδικών μεταγραφικών παραγόντων, να αλληλεπιδρούν [59]. Έτσι, ανάλογα με την χρωματινική λούπα που δημιουργείται προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί ενισχυτών-υποκινητών, αποδεικνύοντας πως ένας ενισχυτής μπορεί να έχει πάνω από ένα γονίδιο στόχο και αντίστοιχα ο υποκινητής ενός γονιδίου να αλληλεπιδρά με διαφορετικό ενισχυτή σε διαφορετικούς ιστούς (Εικόνα 1.13)[62].



Εικόνα 1.13: Δημιουργία διαφορετικής χρωματινικής λούπας στην ίδια γενωμική περιοχή αλλά σε κύτταρα διαφορετικών ιστών, με αποτέλεσμα διαφορετική ενίσχυση του ίδιου γονιδίου [62]

Η σημαντικότητα των TADs ενισχύεται από το γεγονός ότι οι δομές αυτές παρά τον δυναμικό τους σχηματισμό, παρουσιάζουν μια δομική επαναληψιμότητα μεταξύ ίδιων κυτταρικών τύπων [63, 64]. Επιπλέον, λόγω της συμβολής των TADs στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι γνωστό πως διατάραξη των ορίων τους έχει συσχετιστεί με ανθρώπινες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου [65].

1.7.3 LncRNA και TADs

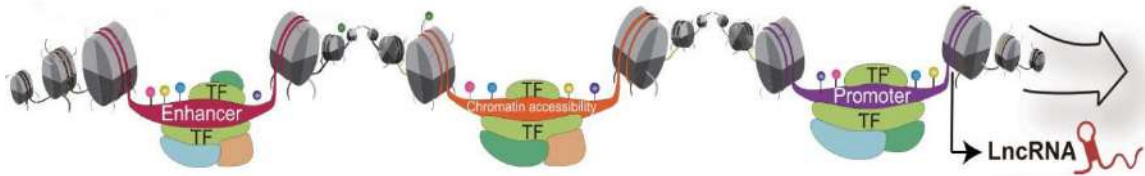
Η συμβολή των lncRNA στην δημιουργία αναδιπλώσεων της χρωματίνης και στις αλληλεπιδράσεις υποκινητών-ενισχυτών έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις και συχνά οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις [66]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μακρά μη-κωδικοποιητικά μετάγραφα PRNCR1 και PCGEM1, τα οποία έχει δειχθεί πως προσδένονται στον υποδοχέα ανδρογόνων. Αποτέλεσμα αυτού, είναι να αυξάνουν την συγγένεια πρόσδεσής του υποδοχέα επιλεκτικά σε συγκεκριμένους ενισχυτές και υποκινητές, σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη [67]. Τέτοια lncRNA συμβάλλουν στην 3D διαμόρφωση της χρωματίνης μέσω της αλληλεπίδρασής τους με πρωτεΐνες που προσδένονται σε RNA (RBPs)[68]. Οι RBPs εντοπίζονται στον πυρήνα, πλησίον περιοχών ευχρωματίνης και πιο συγκεκριμένα σε περιοχές υποκινητών και συμμετέχουν άμεσα στην ρύθμιση της μεταγραφής [69].

Η υπόθεση που θέλει τα lncRNA να σχετίζονται με την αρχιτεκτονική της χρωματίνης ενισχύεται ακόμη περισσότερο από τα enhancer lncRNAs (e-lncRNA), δηλαδή αυτά που μεταγράφονται από περιοχές ενισχυτών [70]. Αυτά αρχικά προσδένονται στο σύμπλοκο του διαμεσολαβητή (Mediator Complex) και έπειτα ακολουθεί στρατολόγηση της πρωτεΐνης NIPBL και της κοχεσίνης που σταθεροποιεί την χρωματινική λούπα [70]. Ο ρόλος των lncRNA στον μηχανισμό αυτό αποδεικνύεται με μία μελέτη στην οποία έγινε απαλοιφή της γονιδιωματικής περιοχής των SNAI1 και AURKA [70, 71]. Το αποτέλεσμα έδειξε μείωση της δημιουργίας χρωματινικών βρόγχων σε παρόμοιο βαθμό με έλλειψη των υπομονάδων του διαμεσολαβητή MED1 ή MED12 [71].

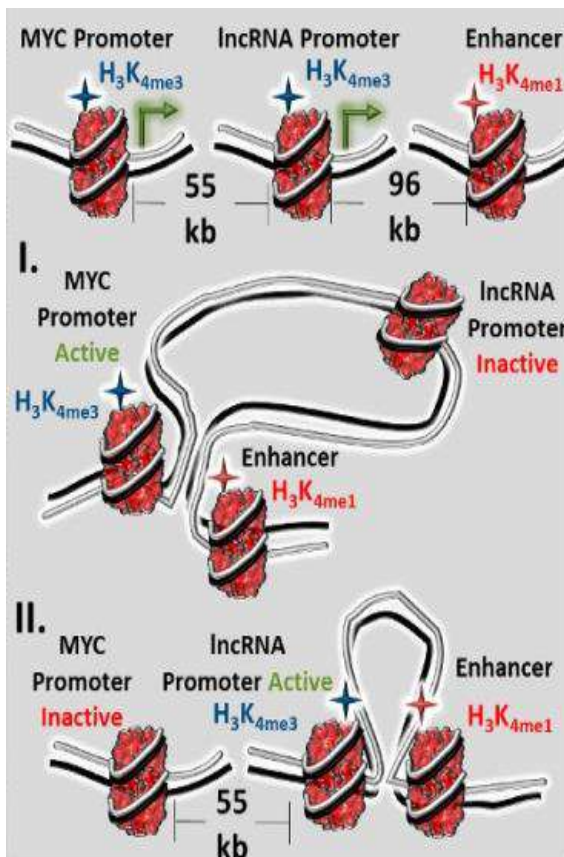
Παράλληλα και τα intergenic lncRNA (lincRNA) έχουν συσχετιστεί αντίστοιχα με φαινοτύπους ασθενειών (Trait-lincRNA). Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως εντοπίζονται σε περιοχές με TADs οι οποίες είναι μάλιστα πλούσιες σε στοιχεία ενισχυτών [64]. Συμπληρωματικά τα TR-lincRNA χαρακτηρίζονται από υψηλή συντήρηση στο ανθρώπινο γονιδίωμα, έχουν την ικανότητά να ρυθμίζουν την έκφραση των γειτονικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και να αλληλεπιδρούν με γονιδιωματικές περιοχές συσχετιζόμενες με ασθένειες και μάλιστα με διαφόρους τύπους καρκίνου [72].

1.7.4 Έκφραση των LncRNAs

Τα lncRNA, όπως και τα κωδικοποιητικά γονίδια, μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και πέρα από τους υποκινητές που είναι απαραίτητοι για την έκφρασή τους, ρυθμίζονται και τα ίδια από ιστοειδικούς ενισχυτές, super-ενισχυτές αλλά και περιοχές προσβασιμότητας της χρωματίνης (Εικόνα 1.14) [73].



Εικόνα 1.14: Η μεταγραφή ενός lncRNA ρυθμίζεται από τον υποκινητή του, από μεταγραφικούς παράγοντες, από ενισχυτές και περιοχές προσβασιμότητας της χρωματίνης (ACRs) [Altered from [73]]



Εικόνα 1.15: Εναλλακτικές αλληλεπιδράσεις ενός ενισχυτή με τον υποκινητή του lncRNA PVT1 ή τον υποκινητή του γονιδίου MYC.

Μάλιστα η αλληλεπίδραση του υποκινητή ενός lncRNA με έναν ενισχυτή στο πλαίσιο μίας χρωματινικής λούπας, μπορεί να δράσει ως ογκοκατασταλτικό φαινόμενο. Για παράδειγμα, ο υποκινητής του lncRNA PVT1 διαθέτει την ιδιότητα να περιορίζει την έκφραση του γονιδίου MYC στον καρκίνο του μαστού [74, 75]. Αυτό συμβαίνει μέσω ανταγωνισμού ανάμεσα στους υποκινητές των δύο γονιδίων για αλληλεπίδραση με έναν παραπλήσιο ενισχυτή (Εικόνα 1.15 [20]). Μάλιστα πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η παρεμπόδιση του υποκινητή του PVT1 μέσω CRISPRi, ενίσχυσε σημαντικά τα επίπεδα RNA του MYC και οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [76].

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της αλληλουχίας ενισχυτή ενός μακρού μη-κωδικοποιητικού RNA του οποίου η απορρυθμισμένη έκφραση έχει συσχετιστεί με τον γαστρικό καρκίνο. Το lncRNA αυτό, ονομάζεται RECUR1 και ο ρόλος του στον καρκίνο έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης στα πλαίσια προηγούμενων πτυχιακών εργασιών του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής. Δεδομένου ότι οι ενισχυτές παίζουν κομβικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση κωδικοποιητικών και μη γονιδίων, καθώς και ότι τα lncRNA αποτελούν ιστο-ειδικά και καρκινο-ειδικά μόρια, μελετήθηκε η συμβολή του ενισχυτή στην έκφρασή του RECUR1 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, με δοκιμασίες λουσιφεράσης ελέγχθηκε η ενεργότητα του ενισχυτή και διερευνήθηκε ποιο τμήμα της αλληλουχίας του έχει τη μέγιστη ενεργότητα στον καθορισμό της έκφρασης του lncRNA-στόχου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε απαλοιφή ενός τμήματος του ενισχυτή στο γονιδίωμα καρκινικών κυττάρων, με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9, και ελέγχθηκε η επίδραση της έλλειψής του στα επίπεδα έκφρασης του RECUR1. Συμπληρωματικά, εξετάστηκε εάν η απουσία του ενισχυτή έχει επίδραση σε ένα πιθανό κωδικοποιητικό γονίδιο-στόχο του lncRNA. Τέλος, παρατηρήθηκε ο φαινότυπος και η μορφολογία των κυττάρων μετά τη γενετική απαλοιφή του ενισχυτή.

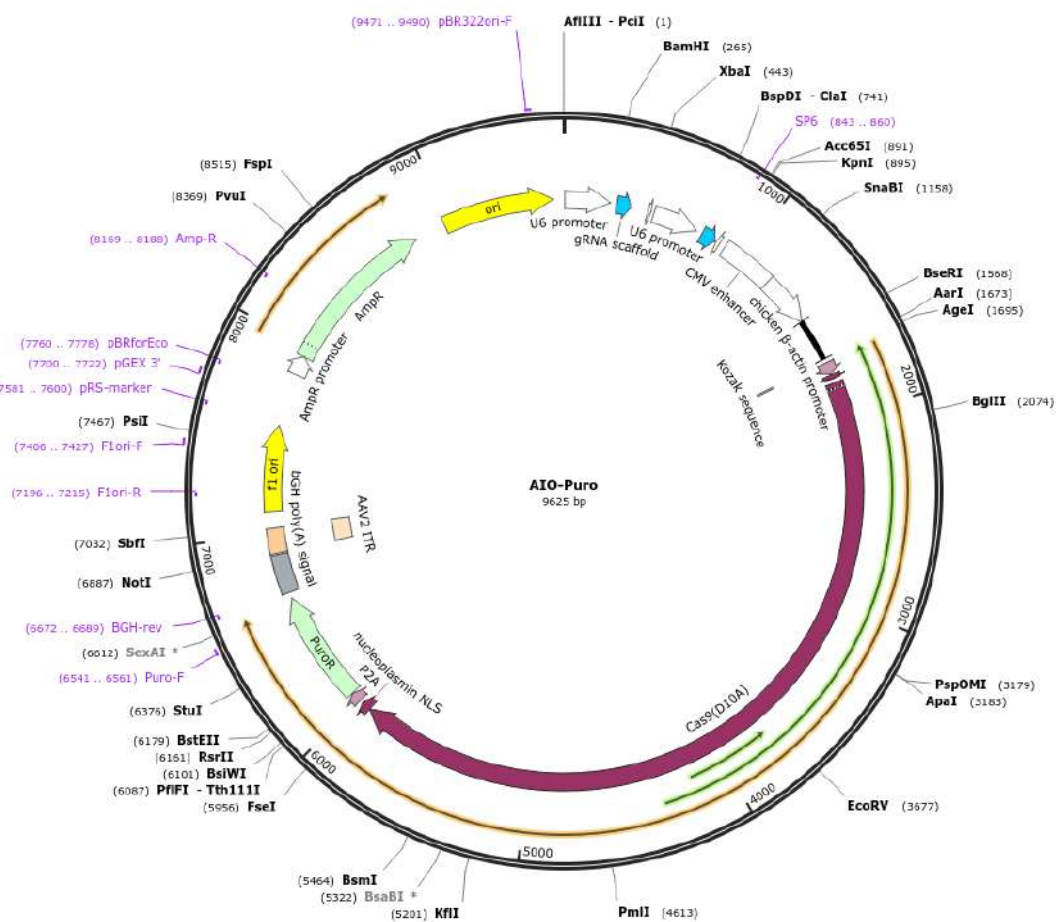
3. Υλικά & Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς

AIO-puro

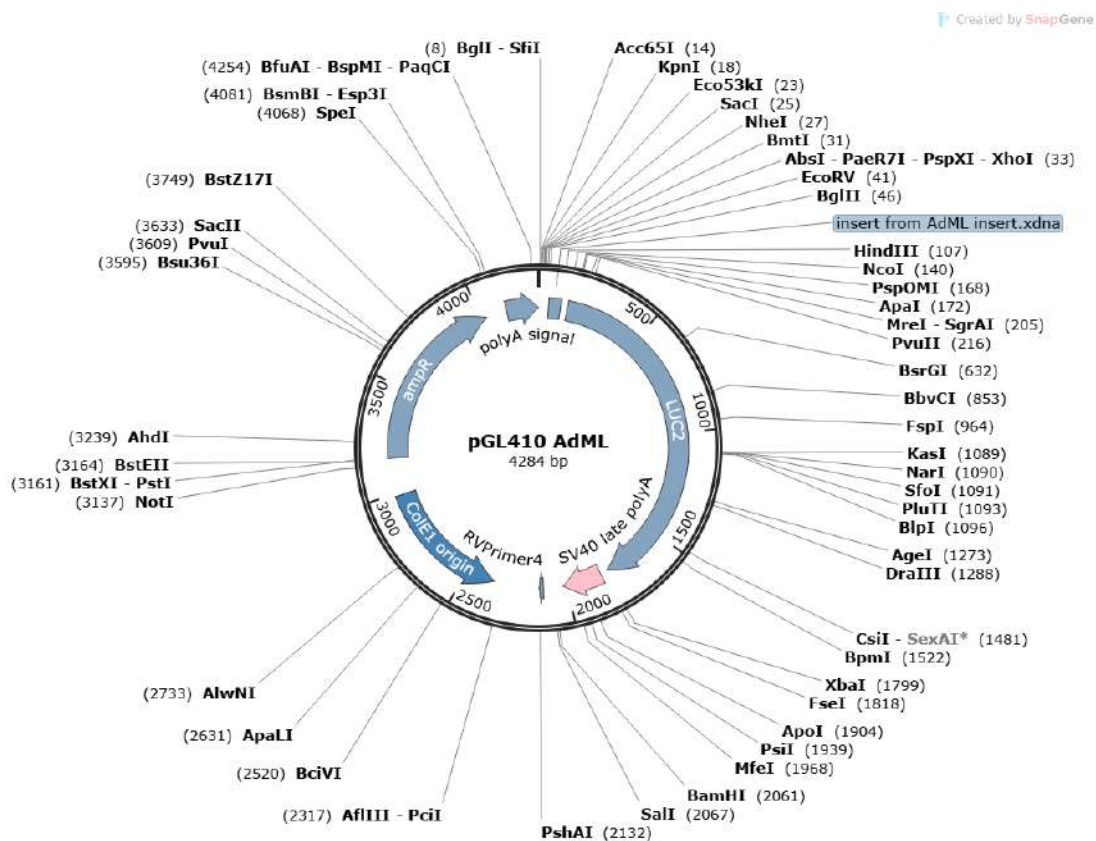
Ο πλασμιδιακός φορέας AIO-puro (All-in-One_Nickase-D10A) έχει μέγεθος 9625 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 3.1). Διαθέτει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Cas9 (D10A), μία Cas9 νικάση, υπό τον έλεγχο του υποκινητή Cbh. Επιπλέον, περιλαμβάνει δύο διαδοχικούς υποκινητές U6, καθοδικά από κάθε έναν από τους οποίους μπορεί να κλωνοποιηθεί ένα sgRNA (single guide RNA). Επίσης, το πλασμίδιο αυτό φέρει τον δείκτη ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη για την επιλογή των βακτηρίων που μετασχηματίζονται από αυτό, καθώς και γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη για την επιλογή των ευκαρυωτικών κυττάρων που διαμολύνονται επιτυχώς. Το σύστημα αυτό αποτελεί σύστημα παροδικής έκφρασης δύο sgRNA και της πρωτεΐνης Cas9 (D10A) σε ευκαρυωτικά κύτταρα.



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro (Addgene_74630) [77].

pGL4.10/AdML

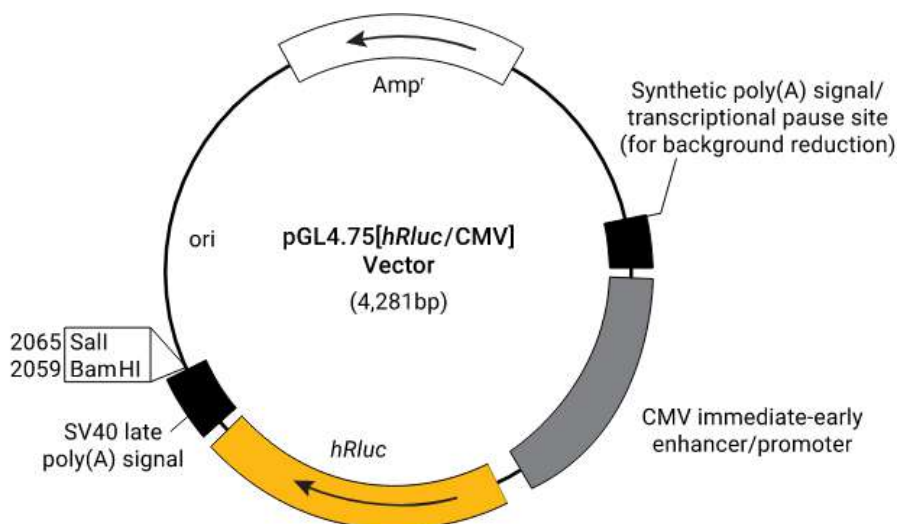
Ο πλασμιδιακός φορέας pGL4.10/AdML έχει προκύψει από εργαστηριακή τροποποίηση του pGL4.10 και διαθέτει έναν minimal promoter, ενώ φέρει και το γονίδιο αναφοράς luc2 (*Photinus pyralis*), ένα συνθετικό γονίδιο που έχει βελτιστοποιηθεί για έκφραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα, καθοδικά από μία θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (Εικόνα 3.2). Επιτρέπει την μελέτη ρυθμιστικών στοιχείων όπως υποκινητών και ενισχυτών.



Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pGL4.10/AdML.

pGL4.75

Ο πλασμιδιακός φορέας pGL4.75 με μέγεθος 4.281 ζεύγη βάσεων, φέρει το γονίδιο της Firefly Renilla (*hRluc*) υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CMV (Εικόνα 3.3). Ο φορέας αυτός χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση καθώς συνδιαμολώνεται σε κύτταρα μαζί με το πλασμίδιο της Firefly λουσιφεράσης, για να ληφθεί υπόψη η πειραματική παραλλακτικότητα.



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pGL4.75 (GenBank: AY738231.1).

3.1.2 Κυτταρικές σειρές

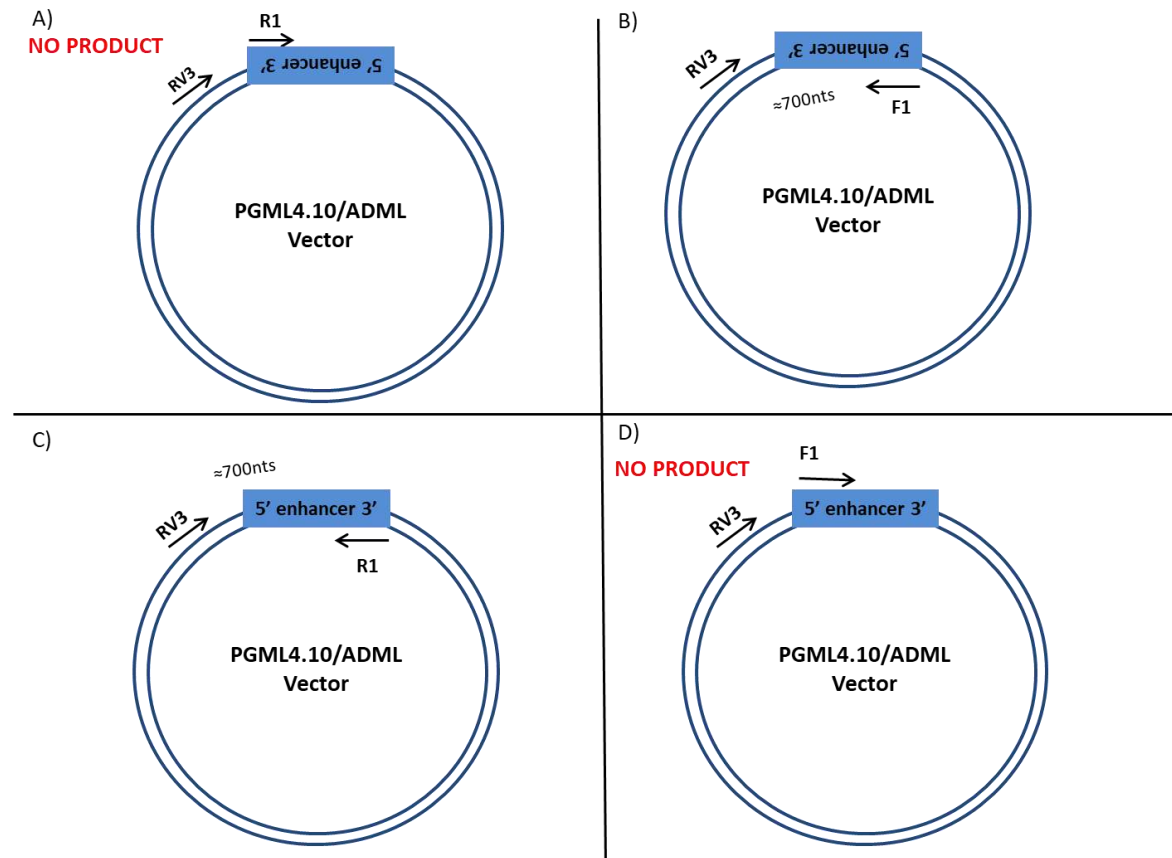
AGS: Κυτταρική σειρά από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα που εμφανίζει επιθηλιακό φαινότυπο.

NUGC4: Προέρχεται από μεταστατικό γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (signet ring cell adenocarcinoma)

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Επιβεβαίωση προσανατολισμού του ενισχυτή του RECUR1 στον φορέα pGL4.10/AdML

Η αλληλουχία του ενισχυτή του RECUR1 είχε κλωνοποιηθεί στο κατάλληλο πλασμίδιο PGL4.10/ADML σε παλιότερα πειράματα του εργαστηρίου τόσο στην αγρίου τύπου μορφή, όσο και μετά από μία τοποειδική μεταλλαξιγένεση (SDM). Έτσι πραγματοποιήθηκαν PCR για την επιβεβαίωση του προσανατολισμού ένθεσης της αλληλουχίας του ενισχυτή. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 διαφορετικές επιβεβαιωτικές PCR. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένας RV3 εκκινητής ο οποίος υβριδίζει πάνω στον φορέα (backbone primer) πριν από την θέση ένθεσης, ενώ ο δεύτερος εκκινητής ήταν στην πρώτη αντίδραση PCR ο εμπρόσθιος του ενισχυτή (F1) και στην δεύτερη ο οπίσθιος (R1). Στην περίπτωση που ο ενισχυτής έχει κλωνοποιηθεί με προσανατολισμό 3'-5' στην πρώτη αντίδραση θα παρατηρηθεί ενίσχυση τμήματος 700 ζευγών βάσεων, ενώ στην δεύτερη δεν θα παραχθεί προϊόν (Εικόνα 3.4.B,A). Αντίθετα, όταν ο ενισχυτής βρίσκεται στον φορέα με προσανατολισμό 5'-3' η αντίδραση με χρήση του εκκινητή R1 θα οδηγήσει σε προϊόν, ενώ με χρήση του εκκινητή F1 δεν μπορεί να ενισχυθεί προϊόν (Εικόνα 3.4.C,D).



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα PGL4.10/ADML μετά την ένθεση της αλληλουχίας του ενισχυτή και σχεδιασμός των επιβεβαιωτικών PCR για τον προσανατολισμό του. **A)** Ενισχυτής με προσανατολισμό 3'-5'. Με χρήση RV3 εκκινητή backbone και οπίσθιου εκκινητή του ενισχυτή (R1) δεν παράγεται προϊόν. **B)** Ενισχυτής με προσανατολισμό 3'-5'. Με χρήση RV3 εκκινητή backbone και εμπρόσθιου εκκινητή του ενισχυτή (F1) παράγεται προϊόν 700 ζευγών βάσεων. **C)** Ενισχυτής με προσανατολισμό 5'-3'. Με χρήση RV3 εκκινητή backbone και οπίσθιου εκκινητή του ενισχυτή (R1) παράγεται προϊόν 700 ζευγών βάσεων. **D)** Ενισχυτής με προσανατολισμό 5'-3'. Με χρήση RV3 εκκινητή backbone και εμπρόσθιου εκκινητή του ενισχυτή (F1) δεν παράγεται προϊόν.

Πραγματοποιήθηκαν PCR σε 6 διαφορετικά δείγματα καθώς και σε έναν αρνητικό μάρτυρα που αντιστοιχεί στον άδειο πλασμιδιακό φορέα PGL4.10/ADML χωρίς ένθεμα. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1.

<u>3'→5'</u>		<u>5'→3'</u>	
Αντιδραστήρια	Όγκοι	Αντιδραστήρια	Όγκοι
Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μL	Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μL
dNTPs (10mM)	0,5 μL	dNTPs 10mM	0,5 μL
Primer F1	1μL	Primer R1	1μL
Primer RV3	1μL	Primer RV3	1μL
Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μL	Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μL
WFI (water for injection)	41,35μL	WFI (water for injection)	41,35μL
Template (10ng/μl)	1μL	Template(10ng/μl)	1μL
	V _{τελικός} =50μl		V _{τελικός} =50μl

Πίνακας 1: Αντιδράσεις επιβεβαιωτικών PCR για τη διάγνωση του προσανατολισμού του κλωνοποιημένου ενισχυτή στον φορέα PGL4.10/ADML.

Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00
Αποδιάταξη	95	0:10
Υβριδοποίηση	60	0:10
Επιμήκυνση	72	0:50
Κύκλοι	20	
Τελική επιμήκυνση	72	2:00

Πίνακας 2: Βήματα και συνθήκες PCR για τη διάγνωση του προσανατολισμού κλωνοποιημένου ενισχυτή στον φορέα PGL4.10/ADML.

Στη συνέχεια προστέθηκε στα δείγματα loading dye(6X), φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση.

3.2.2 Αντιδράσεις PCR και κλωνοποίηση των τριών τμημάτων της αλληλουχίας του ενισχυτή του RECUR1 στον φορέα pGL4.10/AdML

3.2.2.1 Αντιδράσεις PCR για ενίσχυση των τμημάτων του ενισχυτή

Πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις PCR στον φορέα pGL4.10/AdML που περιλαμβάνει το ένθεμα της αλληλουχίας του ενισχυτή με 4 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Στην Εικόνα 3.5. φαίνεται πώς έγινε η κατάτμηση του ενισχυτή σε 3 τμήματα καθώς και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση κάθε τμήματος. Για την 4^η αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το πλασμίδιο pGL4.10/AdML με κλωνοποιημένο τον ενισχυτή με μία τοποειδική μεταλλαξίγνεση

(SDM: Side Directed Mutagenesis) και το τελευταίο ζευγάρι εκκινητών. Η μεταλλαξιγένεση αυτή εντοπίζεται στην μέση της αλληλουχίας του 3^{ου} τμήματος (Εικόνα 3.5.) και πρόκειται για εναλλαγή μεταξύ των αλληλομόρφων μίας σημειακής μετάλλαξης. Οι πειραματικές λεπτομέρειες της κατασκευής της αναφέρονται αναλυτικά σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία του εργαστηρίου.



Εικόνα 3.5: Σχηματική απεικόνιση της αλληλουχίας του ενισχυτή του RECUR1. Απεικονίζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση κάθε τμήματος, το μέγεθος κάθε προϊόντος καθώς και το SDM στη μέση του 3^{ου} τμήματος.

Στον Πίνακα 3 φαίνονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
HiFi Buffer (5X) (Kapa Biosystems)	10μl
dNTPs (10mM)	0,5μl
Polymerase HiFi Kapa Biosystems)	0,25μl
Forward Primer (10μM) RECUR1_enh_F1 (για το 1 ^ο τμήμα), REC_enh_subclone_F2 (για το 2 ^ο τμήμα), REC_enh_subclone_F3 (για το 3 ^ο τμήμα)	1μl
Reverse Primer (10μM) REC_enh_subclone_R1 (για το 1 ^ο τμήμα), REC_enh_subclone_R2 (για το 2 ^ο τμήμα), REC_enh_subclone_R3 (για το 3 ^ο τμήμα)	1μl
WFI (water for injection)	36,25μl
Template (10ng/μl)	1μl
V _{τελ}	50μl

Πίνακας 3: Αντιδράσεις PCR στον φορέα PGL4.10/ADML για ενίσχυση κάθε ενός από τα 3 τμήματα του ενισχυτή.

Στον Πίνακα 4 φαίνονται οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	2:00
Αποδιάταξη	98	0:40
Υβριδοποίηση	58	0:10
Επιμήκυνση	72	0:20
Κύκλοι	25	
Τελική επιμήκυνση	72	2:00

Πίνακας 4: Βήματα και συνθήκες PCR στον φορέα PGL4.10/ADML για την τμηματοποίηση του ενισχυτή.

Τα προϊόντα της ενίσχυσης από κάθε PCR φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% αφήνοντας ανάμεσά τους κενά πηγάδια και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση. Έπειτα οι ζώνες κόπηκαν εξασφαλίζοντας την ελάχιστη έκθεση σε UV ακτινοβολία και απομονώθηκε το DNA από την πηκτή με χρήση του kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel (5.2 DNA extraction from agarose gel). Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι συγκεντρώσεις DNA κάθε τμήματος μετά την απομόνωση και επαναδιάλυση σε 30μl ddH₂O, που μετρήθηκαν με το Quawell Q3000 UV.

	C (ng/μl)
Enh Τμήμα 1 F1-R1	42,3
Enh Τμήμα 2 F2-R2	49,1
Enh Τμήμα 3 F3-R3	38
Enh SDM Τμήμα 3 F3-R3	38,6

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις DNA μετά από απομόνωση με έκλυση πηκτής αγαρόζης.

3.2.2.2 Προετοιμασία τμημάτων ενισχυτή και αντίδραση λιγάσης.

Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η ένθεση κάθε τμήματος στον φορέα κλωνοποίησης φωσφορυλιώθηκαν τα 5' άκρα των αλληλουχιών με τη χρήση της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης T4 όπως φαίνεται στον Πίνακα 6. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επώαση στους 37°C σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
T4 PNK Buffer Takara (10x)	3,5μl
T4 polynucleotide kinase (PNK) Takara (10 U/μL)	1μl
ATP ThermoScientific (10mM)	1μl
WFI (water for injection)	2,5μl
Υπόστρωμα DNA: Προϊόν ενίσχυσης PCR	27μl
$V_{\text{TEΛ}}$	35μl

Πίνακας 6: Αντίδραση T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης για φωσφορυλίωση των 5' άκρων των τμημάτων του ενισχυτή.

Μετά την αντίδραση τα προϊόντα καθαρίστηκαν με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρημνίστηκαν με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκαν σε 20μl WFI. Στη συνέχεια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για αντίδραση λιγάσης με σκοπό να εισαχθούν στον φορέα rGL4.10/AdML, ο οποίος ήταν διαθέσιμος σε αποφωσφορυλιωμένη μορφή και κομμένος με το περιοριστικό ένζυμο ECORV. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν αυστηρά 50ng από τον φορέα κλωνοποίησης. Στον Πίνακα 7 φαίνονται τα αντιδραστήρια, οι ποσότητες αλλά και τα 4 διαφορετικά ενθέματα που χρησιμοποιήθηκαν. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μία αντίδραση λιγάσης χωρίς προσθήκη ενθέματος. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 16°C για 16 ώρες.

	Αντιδραστήρια	Όγκοι	
		Ligation	Control: Self ligation
	Φορέας: αποφωσφορυλιωμένος, γραμμοποιημένος με ECORV PGL4.10/ADML (87,9ng/μl)	0,57μl	0,57μl
	T4 DNA ligase MINO	0,5μl	0,5μl
	T4 DNA ligase Buffer NEB (10X)	1μl	1μl
	WFI (water for injection)	2,93μl	7,93μl
	Insert	5μl	-
	$V_{\text{TEΛ}}$	10μl	10μl

1. Enh Τμήμα 1
2. Enh Τμήμα 2
3. Enh Τμήμα 3
4. Enh SDM Τμήμα 3

←

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια και ποσότητες της αντίδρασης λιγάσης. Αριστερά φαίνονται τα 4 διαφορετικά ενθέματα που χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποίηση.

3.2.2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Μετά τον ανασυνδυασμό του πλασμιδιακού φορέα ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκαν χημειοδεκτικά βακτήρια *Escherichia coli* του στελέχους DH5α και η αναλογία βακτηρίων προς τα προϊόντα

λιγάσης ήταν 10:1. Πιο συγκεκριμένα για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50μl βακτηρίων και 5μl από την αντίδραση λιγάσης. Ο μετασχηματισμός έγινε με θερμικό σοκ ως εξής: 4°C για 20 λεπτά, 42°C για 50 δευτερόλεπτα και 4°C για 2 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 945μl θρεπτικού υλικού LB free ώστε να φτάσει το 1ml και η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C 160RPM για 50 λεπτά, ώστε τα βακτήρια να ανακάμψουν από το σοκ. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν 350μl από κάθε καλλιέργεια σε τρυβλίο LB agar με αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100μg/ml) και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα, στους 37°C για 16 ώρες. Ακολούθησε συλλογή αποικιών από κάθε τρυβλίο, ανάπτυξη κάθε αποικίας ξεχωριστά σε 3ml υγρό θρεπτικό υλικό LB με αμπικιλίνη (100μg/ml) και επώαση αυτών για 16 ώρες σε 37°C και 210 RPM.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με αλκαλική λύση σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- 1) Προσθήκη ~2mL υγρής καλλιέργειας βακτηρίων σε σωληνάρια τύπου erpendorf κάτω από φλόγα.
- 2) Φυγοκέντρηση στις 11.000rpm για 2 λεπτά στους 4°C.
- 3) Αφαίρεση υπερκειμένου.
- 4) Προσθήκη 100μL παγωμένου μείγματος του Διαλύματος Λύσης I με RNase A και ανάμιξη με vortex.
- 5) Προσθήκη 200μL Διαλύματος Λύσης II και ανάμιξη
- 6) Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Προσθήκη 150μL παγωμένου Διαλύματος Λύσης III και ανάμιξη
- 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.
- 11) Προσθήκη 1mL αιθανόλης 100%
- 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 στέγνωμα pellet για 15 λεπτά.
- 18) Επαναδιάλυση σε 100μL WFI και τοποθέτηση στους 65°C για 5 λεπτά για επαναδιάλυση.

3.2.2.4 Διαγνωστικές PCR

Πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές PCR στο απομονωμένο πλασμιδιακό DNA με σκοπό την επιβεβαίωση ότι η κλωνοποιήσεις ήταν επιτυχείς. Τα αντιδραστήρια, οι ποσότητες και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον [Πίνακα 8](#). Οι PCR παρείχαν όχι μόνο την επιβεβαίωση ένθεσης των τμημάτων του ενισχυτή στον φορέα αλλά και την πληροφορία του προσανατολισμού ένθεσης.

3'→5'		5'→3'	
Αντιδραστήρια	Όγκοι	Αντιδραστήρια	Όγκοι
Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μL	Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μL
dNTPs (10mM)	0,5 μL	dNTPs 10mM	0,5 μL
Forward Primer (10μM) RECUR1_enh_F1 (1° τμήμα), REC_enh_subclone_F2 (2° τμήμα), REC_enh_subclone_F3 (3° τμήμα)	1μL	Reverse Primer (10μM) REC_enh_subclone_R1 (1° τμήμα), REC_enh_subclone_R2 (2° τμήμα), REC_enh_subclone_R3 (3° τμήμα)	1μL
Primer RV3	1μL	Primer RV3	1μL
Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μL	Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μL
WFI (water for injection)	41,35μL	WFI (water for injection)	41,35μL
Template (10ng/μl)	1μL	Template(10ng/μl)	1μL
	V _{τελικός} =50μl		V _{τελικός} =50μl

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00
Αποδιάταξη	95	0:10
Υβριδοποίηση	60	0:10
Επιμήκυνση	72	0:20
Κύκλοι	20	
Τελική επιμήκυνση	72	2:00

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια, ποσότητες και συνθήκες των διαγνωστικών αντιδράσεων PCR. Αριστερά φαίνονται οι αντιδράσεις για διάγνωση ένθεσης με προσανατολισμό 3'-5' και δεξιά για 5'-3'.

Στη συνέχεια προστέθηκε στα δείγματα loading dye(6X), φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση. Η διαδικασία από την συλλογή αποικιών και μετά επαναλήφθηκε περίπου 5 φορές ώσπου να βρεθούν θετικές αποικίες για κάθε τμήμα του ενισχυτή και για κάθε προσανατολισμό αυτού. Οι θετικοί κλώνοι ανακαλλιεργήθηκαν και έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το NucleoSpin Plasmid mini kit for plasmid DNA της εταιρείας Macherey-Nagel.

3.2.3 Δοκιμασίες λουσιφεράσης για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενισχυτή του RECUR1 και κάθε τμήματος της αλληλουχίας του ξεχωριστά

3.2.3.1 Προσδιορισμός ενεργότητας ολόκληρης της αλληλουχίας του ενισχυτή του RECUR1

Έχοντας διαθέσιμη την αλληλουχία του ενισχυτή κλωνοποιημένη στον κατάλληλο φορέα και με τους δύο προσανατολισμούς πραγματοποιήθηκαν πειράματα χημειοφωταύγειας. Έγινε διαμόλυνση των 2 καρκινικών κυτταρικών σειρών: AGS και NUGC4 με κάθε construct ξεχωριστά σε ένα πιάτο καλλιέργειας με 24 πηγάδια όπως φαίνεται στον Πίνακα 9.

AGS enhancer 5'-3'	AGS enhancer 5'-3'	AGS enhancer 3'-5'	AGS enhancer 3'-5'	AGS SDM enhancer 5'-3'	AGS SDM enhancer 5'-3'
AGS SDM enhancer 3'-5'	AGS SDM enhancer 3'-5'	AGS pGL4.10 ADML empty	AGS pGL4.10 ADML empty	AGS only cells	AGS only cells
NUGC4 enhancer 5'-3'	NUGC4 enhancer 5'-3'	NUGC4 enhancer 3'-5'	NUGC4 enhancer 3'-5'	NUGC4 SDM enhancer 5'-3'	NUGC4 SDM enhancer 5'-3'
NUGC4 SDM enhancer 3'-5'	NUGC4 SDM enhancer 3'-5'	NUGC4 pGL4.10 ADML empty	NUGC4 pGL4.10 ADML empty	NUGC4 only cells	NUGC4 only cells

Πίνακας 9: 24-well plate κυτταροκαλλιέργειας της 1^{ης} δοκιμασίας λουσιφεράσης. Φαίνονται οι κυτταρικές σειρές που διαμολύνθηκαν και τα πλασμίδια που εισήχθησαν στα κύτταρα.

Το πρωτόκολλο απαιτεί τρεις μέρες. Την 1^η μέρα επιστρώθηκαν τα κύτταρα στα πηγάδια του πιάτου καλλιέργειας. Για την κυτταρική σειρά AGS στρώθηκαν 210.000 κύτταρα ανά πηγάδι ενώ για την σειρά NUGC4 250.000 κύτταρα ανά πηγάδι. Την 2^η μέρα πραγματοποιήθηκε η διαμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς στους οποίους έχει εισαχθεί η αλληλουχία της οποίας διερευνάται η ενεργότητα. Πιο συγκεκριμένα, φτιάχτηκαν 2 μίγματα. Το πρώτο μίγμα περιλαμβάνει το πλασμίδιο της CMV-Renilla (20ng/well) και θρεπτικό υλικό Gibco Opti-MEM medium (1x) της εταιρείας ThermoScientific (62μl/well). Το δεύτερο μίγμα περιλαμβάνει τον λιποφιλικό παράγοντα P-PEI Transfection Reagent (800ng/well) και Gibco Opti-MEM medium (1x) (62μl/well). Αξίζει να αναφερθεί πως η αναλογία λιποφιλικού παράγοντα/πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 4:1. Συνολικά έγινε διαμόλυνση με 4 διαφορετικές κατασκευές: την αλληλουχία του ενισχυτή με προσανατολισμό 5'-3' και 3'-5' και την αλληλουχία του ενισχυτή με SDM με προσανατολισμό επίσης 5'-3' και 3'-5'. Παράλληλα έγινε διαμόλυνση και με έναν άδειο φορέα PGL4.10/ADML χωρίς ένθεμα (PGL4.10/ADML empty) ως αρνητικό δείγμα ελέγχου του πειράματος, ενώ χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας κυττάρων στα οποία δεν έγινε διαμόλυνση με καμία κατασκευή (only cells). Κάθε πλασμιδιακή κατασκευή διαμολύνθηκε σε 2 πηγάδια κυττάρων (duplicates) για να υπάρχουν 2 επαναλήψεις του πειράματος.

Την 3^η μέρα, μετά από επώαση στους 37°C για 20 ώρες, τα κύτταρα λύονται με αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, πλύση με διάλυμα PBS 1x (phosphate buffered saline) 300μl ανά πηγάδι και προσθήκη 100μl PLB (passive lysis buffer) σε κάθε πηγάδι. Κατά την λύση απελευθερώνεται από τα κύτταρα η Renilla και Firefly λουσιφεράση που έχουν παραχθεί. Ακολούθησε ανακίνηση για 30 λεπτά, προσθήκη των υποστρωμάτων και μέτρηση. Πιο συγκεκριμένα 20μl από το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού τοποθετήθηκε σε 1,5ml tube, προστέθηκαν 20μl D-Luciferin, το

υπόστρωμα της Firefly λουσιφεράσης και πραγματοποιήθηκε η πρώτη μέτρηση. Στην συνέχεια προστέθηκαν 20μL από την Coelenterazine, το υπόστρωμα της Renilla λουσιφεράσης και έγινε η δεύτερη μέτρηση. Οι μετρήσεις έγιναν με χρήση του λουμινόμετρου Lumat3 (LB 9508) της Berthold Technologies και του λογισμικού Instrument Control and Evaluation (ICE).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Microsoft Excel. Διαιρέθηκαν οι τιμές χημειοφωταύγειας της Firefly λουσιφεράσης με αυτές της Renilla και κρατήθηκε ο μέσος όρος από τις 2 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση ιστογραμμάτων και πραγματοποιήθηκε t-test για έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας.

Η 2^η δοκιμασία λουσιφεράσης που πραγματοποιήθηκε αφορούσε επανάληψη του πειράματος στην κυτταρική σειρά NUGC4 για βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Οι τροποποιήσεις που έγιναν αποσκοπούσαν στην καλύτερη διαμόλυνση των συγκεκριμένων κυττάρων. Στον Πίνακα 10 φαίνεται το πιάτο καλλιέργειας με 24 θέσεις που χρησιμοποιήθηκε και ο σχεδιασμός του πειράματος. Εδώ αντί για 2 επαναλήψεις (duplicates) έγιναν 4 από κάθε πλασμιδιακή κατασκευή.

NUGC4 enhancer 5'-3'	NUGC4 enhancer 5'-3'	NUGC4 enhancer 5'-3'	NUGC4 enhancer 5'-3'	NUGC4 enhancer 3'-5'	NUGC4 enhancer 3'-5'
NUGC4 enhancer 3'-5'	NUGC4 enhancer 3'-5'	NUGC4 SNP enhancer 5'-3'	NUGC4 SNP enhancer 5'-3'	NUGC4 SNP enhancer 5'-3'	NUGC4 SNP enhancer 5'-3'
NUGC4 SDM enhancer 3'-5'	NUGC4 SDM enhancer 3'-5'	NUGC4 SDM enhancer 3'-5'	NUGC4 SDM enhancer 3'-5'	NUGC4 Pgl4.10 ADML empty	NUGC4 Pgl4.10 ADML empty
NUGC4 Pgl4.10 ADML empty	NUGC4 Pgl4.10 ADML empty	NUGC4 only cells	NUGC4 only cells	NUGC4 only cells	NUGC4 only cells

Πίνακας 10: 24-well plate κυτταροκαλλιέργειας της 2^{ης} δοκιμασίας λουσιφεράσης. Φαίνονται οι κυτταρικές σειρές που διαμολύνθηκαν και τα πλασμίδια που εισήχθησαν στα κύτταρα.

3.2.3.2 Προσδιορισμός ενεργότητας των τμημάτων του ενισχυτή του RECUR1.

Το πείραμα αυτό αποτέλεσε την 3^η δοκιμασία λουσιφεράσης για την διερεύνηση της ενεργότητας κάθε τμήματος του ενισχυτή. Διαμολύνθηκαν και οι 2 κυτταρικές σειρές με τα 3 διαφορετικά τμήματα του ενισχυτή, το 3^ο τμήμα με το SDM και με έναν άδειο φορέα PGL4.10/ADML ως αρνητικό μάρτυρα. Όλα τα τμήματα εξετάστηκαν για την ενεργότητα τους και ως προς τον προσανατολισμό τους (5'-3', 3'-5'). Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παραπάνω

πειράματα, με τις συνθήκες που βελτιστοποιήθηκαν για κάθε κυτταρική σειρά. Τα πιάτα καλλιέργειών φαίνονται στον Πίνακα 11.

LUCIFERASE ASSAY AGS 24well plate					
AGS RECUR1 enh sub1 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub1 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub1 3'-5'	AGS RECUR1 enh sub1 3'-5'	AGS RECUR1 enh sub2 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub2 5'-3'
AGS RECUR1 enh sub2 3'-5'	AGS RECUR1 enh sub2 3'-5'	AGS RECUR1 enh sub3 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub3 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub3 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub3 3'-5'
AGS RECUR1 enh sub3 3'-5'	AGS RECUR1 enh sub3 SDM 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub3 SDM 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub3 SDM 5'-3'	AGS RECUR1 enh sub3 SDM 3'-5'	AGS RECUR1 enh sub3 SDM 3'-5'
AGS RECUR1 enh full length 5'-3'	AGS RECUR1 enh full length 5'-3'	AGS RECUR1 enh SDM full length 5'-3'	AGS RECUR1 enh SDM full length 5'-3'	AGS Pgl4.10 ADML empty	AGS Pgl4.10 ADML empty

LUCIFERASE ASSAY NUGC4 24well plate					
NUGC4 RECUR1 enh sub1 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub1 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub1 3'-5'	NUGC4 RECUR1 enh sub1 3'-5'	NUGC4 RECUR1 enh sub2 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub2 5'-3'
NUGC4 RECUR1 enh sub2 3'-5'	NUGC4 RECUR1 enh sub2 3'-5'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 3'-5'
NUGC4 RECUR1 enh sub3 3'-5'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 SDM 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 SDM 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 SDM 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 SDM 3'-5'	NUGC4 RECUR1 enh sub3 SDM 3'-5'
NUGC4 RECUR1 enh full length 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh full length 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh SDM full length 5'-3'	NUGC4 RECUR1 enh SDM full length 5'-3'	NUGC4 Pgl4.10 ADML empty	NUGC4 Pgl4.10 ADML empty

Πίνακας 11: 24-well plate κυτταροκαλλιέργειας της 3^{ης} δοκιμασίας λουσιφεράσης. Φαίνονται οι κυτταρικές σειρές που διαμολύνθηκαν και τα πλασμίδια που εισήχθησαν στα κύτταρα. Το πρώτο πιάτο αφορά την κυτταρική σειρά AGS, ενώ το δεύτερο την κυτταρική σειρά NUGC4.

3.2.4. Knock-out του ενισχυτή του RECUR1 με την τεχνική CRISPR/Cas9 nickase

3.2.4.1 Κλωνοποίηση sgRNA1 στον φορέα AIO-puro και διαγνωστική PCR

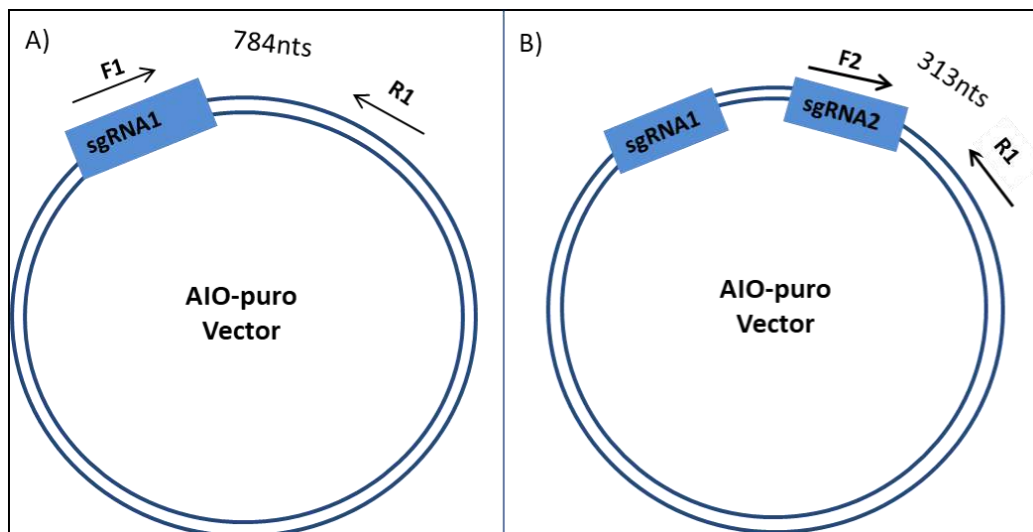
Αρχικά πραγματοποιήθηκε annealing sgRNA1 αλληλουχιών με σκοπό τον υβριδισμό των αλυσίδων και τη δημιουργία του sgRNA μήκους 21 ζευγών βάσεων. Τα άκρα ήταν σχεδιασμένα έτσι ώστε να είναι μονόκλωνα και συμβατά με τα άκρα του φορέα AIO-puro μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BbsI. Στην αντίδραση της υβριδοποίησης προστέθηκαν σε ένα erpendorf 2μl από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο και 96μl Annealing Buffer με τελικό όγκο 100μl. Τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο και έμειναν σε θερμοκρασία βρασμού για 5 λεπτά.

Η αλληλουχία αυτή εισήχθη στον φορέα AIO-puro μέσω αντίδρασης λιγάσης όπως φαίνεται στον Πίνακα 12. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μία αντίδραση λιγάσης χωρίς προσθήκη του ενθέματος.

Αντιδραστήρια	Όγκοι	
	Ligation	Control: Self ligation
Vector: AIO-puro BbSI digested, 30ng/μl	1,666μl	1,666μl
T4 DNA ligase MINO	0,5μl	0,5μl
T4 DNA ligase Buffer (10X) NEB	1μl	1μl
WFI (water for injection)	2,833μl	6,833μl
Insert: sgRNA1	4μl	-
$V_{\text{τελ}}$	10μl	10μl

Πίνακας 12: Αντιδραστήρια και ποσότητες της αντίδρασης λιγάσης για κλωνοποίηση του sgRNA1.

Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *Escherichia coli* του στελέχους DH5α με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (3.2.2.3), βακτηριακή καλλιέργεια σε τρυβλίο, συλλογή 5 αποικιών, υγρή καλλιέργεια και τέλος απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση. Για την διαγνωστική PCR, χρησιμοποιήθηκε ένας εμπρόσθιος εκκινητής ο οποίος υβριδίζει στην αλληλουχία του sgRNA1 και ένας οπίσθιος εκκινητής, που υβριδίζει με την σειρά του στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro. Στην [Εικόνα 3.6.A](#) φαίνεται το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης.



Εικόνα 3.6: **A)** Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα All-in-one puromycin(AIO-puro) μετά την ένθεση του sgRNA1. **B)** Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro μετά την ένθεση του sgRNA1 και του sgRNA2.

Πέρα από τα 5 δείγματα προς εξέταση χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο αρνητικά control για εντοπισμό πιθανών τεχνικών σφαλμάτων στην πειραματική διαδικασία. Το πρώτο ήταν το self ligation και το δεύτερο ένας άκοπος φορέας AIO-puro στα οποία δεν αναμένεται παρουσία ζώνης στην πηκτή μετά την ηλεκτροφόρηση.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μl
dNTPs (10mM)	0,5μl
Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μl
Primer sgRNA1_F (10μM)	1μl
AIO_seqF(10μM)	1μl
WFI (water for injection)	41,35
sample	1μl
$V_{\text{τελ}}$	50μl

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00
Αποδιάταξη	95	0:30
Υβριδοποίηση	60	0:10
Επιμήκυνση	72	0:50
Κύκλοι	25	
Τελική επιμήκυνση	72	5:00

Πίνακας 13: Αντιδραστήρια ποσότητες και συνθήκες των διαγνωστικής αντίδρασης PCR για την ένθεση του sgRNA1.

3.2.4.2 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα, κλωνοποίηση του sgRNA2 και διαγνωστικές PCR

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που απομονώθηκε και είχε λάβει το ένθεμα του πρώτου sgRNA, καθαρίστηκε με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρημνίστηκε στους -80°C με 100% αιθανόλη και ακολούθησαν πλύσεις με 70% αιθανόλη. Έπειτα για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ένθεση του sgRNA2 στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα, το πλασμίδιο AIO-puro που περιείχε ήδη το sgRNA1 γραμμοποιήθηκε. Η γραμμοποίηση του έγινε με το περιοριστικό ένζυμο BsaI σύμφωνα με την αντίδραση που φαίνεται στον Πίνακα 14.

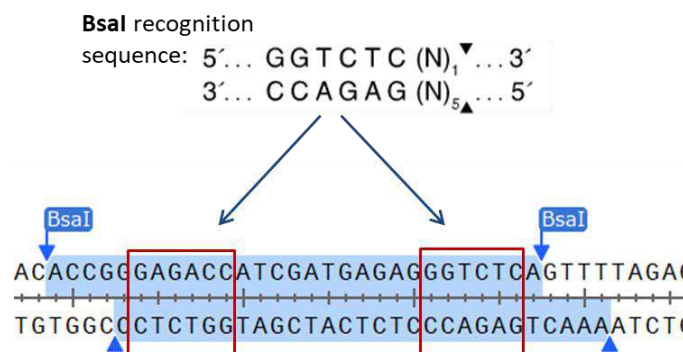
Αντιδραστήρια	Όγκοι
Vector:AIO-puro with sgRNA1	15μl
CutSmart Buffer 10X (NEB)	5μl
BsaI (NEB)	2μl
WFI (water for injection)	28μl
$V_{\text{τελ}}$	50μl

Πίνακας 14: Αντίδραση πέψης του φορέα AIO-puro που περιέχει sgRNA1, με το ένζυμο BsaI.

Πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις πέψης οι οποίες στη συνέχεια ενώθηκαν σε ένα σωληνάκι και το 10% κάθε αντίδρασης, δηλαδή 5μl από κάθε αντίδραση, φορτώθηκε σε πηκτή αгарόζης 1% και ηλεκτροφορήθηκε για να διαπιστωθεί η επιτυχία της πέψης. Το υπόλοιπο της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε και το DNA απομονώθηκε από την πηκτή με χρήση του kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel (5.2 DNA extraction from agarose gel). Αξίζει επίσης να αναφερθεί

πως το ένζυμο BsaI αναγνωρίζει την αλληλουχία που φαίνεται στην [Εικόνα 3.7](#) και κόβει λίγα νουκλεοτίδια αργότερα. Τα μονόκλωνα άκρα του γραμμοποιημένου φορέα είναι συμβατά με τα άκρα του sgRNA2 που είχε μήκος 21 ζεύγη βάσεων και δημιουργήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και το sgRNA2.

Vector: AIO-puro BsaI digested



Εικόνα 3.7: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζει και κόβει το περιοριστικό ένζυμο BsaI πάνω στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro.

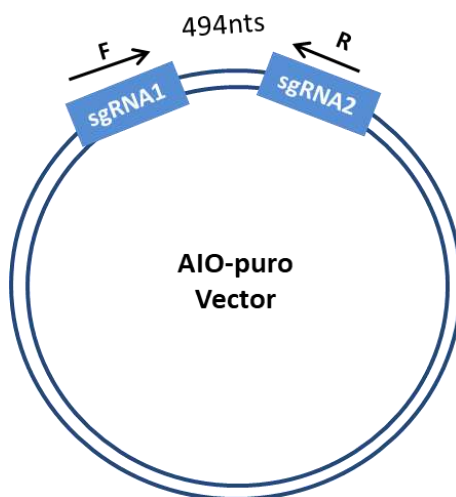
Ακολούθησε κλωνοποίηση του sgRNA2, όπως ακριβώς έγινε και για το sgRNA1. Μετά την ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας συλλέχθηκαν 3 αποικίες εκ των οποίων καμία δεν ήταν θετική και έγινε επαναληπτική συλλογή 5 αποικιών. Οι διαγνωστικές PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον [Πίνακα 15](#) με εκκινήτες που φαίνονται στην [Εικόνα 3.6.B](#)

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μl
dNTPs (10mM)	0,5μl
Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μl
Primer sgRNA2_F (10μM)	1μl
AIO_seqF(10μM)	1μl
WFI (water for injection)	41,35
sample	1μl
V _{τελ}	50μl

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00
Αποδιάταξη	95	0:30
Υβριδοποίηση	60	0:10
Επιμήκυνση	72	0:20
Κύκλοι	25	
Τελική επιμήκυνση	72	5:00

Πίνακας 15: Αντιδραστήρια ποσότητες και συνθήκες των διαγνωστικής αντίδρασης PCR για την ένθεση του sgRNA2.

Στην μία θετική για το sgRNA2 αποικία που βρέθηκε, πραγματοποιήθηκε και μία διπλή επιβεβαιωτική αντίδραση PCR για την επιβεβαίωση ένθεσης και των δύο sgRNA ταυτόχρονα. Αυτό έγινε με χρήση εκκινητών που υβριδίζουν πάνω στα δύο sgRNA (Πίνακας 16). Χρησιμοποιήθηκαν ένας εμπρόσθιος και ένας οπίσθιος εκκινητής που υβριδίζουν στο sgRNA1 και στο sgRNA2 αντίστοιχα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα All-in-one puromycin (AIO-puro) μετά την ένθεση και των δύο sgRNA. PCR με εμπρόσθιο και οπίσθιο εκκινητή που υβριδίζουν στο sgRNA1 και στο sgRNA2 αντίστοιχα και αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης 494 νουκλεοτίδια.

Στο πήκτωμα αγαρόζης εκτός από το δείγμα προς εξέταση φορτώθηκαν και τέσσερα διαφορετικά αρνητικά control με διαφορετική πειραματική σημασία. Αυτά ήταν: ένα self ligation, ο φορέας σε άκοπη μορφή και δύο mini preparation τα οποία περιείχαν το sgRNA1 αλλά ήταν αρνητικά στο sgRNA2.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μl
dNTPs (10mM)	0,5μl
Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μl
Primer sgRNA1_F (10μM)	1μl
Primer sgRNA2_R (10μM)	1μl
WFI (water for injection)	41,35
sample	1μl
$V_{\text{τελ}}$	50μl

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00
Αποδιάταξη	95	0:30
Υβριδοποίηση	60	0:10
Επιμήκυνση	72	0:33
Κύκλοι	25	
Τελική επιμήκυνση	72	2:00

Πίνακας 16: Διπλή επιβεβαιωτική αντίδραση PCR για την ένθεση και των δύο sgRNA.

Η καλλιέργεια που ήταν θετική και για τα δύο sgRNA ανακαλλιιεργήθηκε και έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το NucleoSpin Plasmid mini kit for plasmid DNA της εταιρείας Macherey-Nagel.

3.2.4.3 Γραμμοποίηση του φορέα και διαμόλυνση κυττάρων AGS

Προκειμένου να γίνει διαμόλυνση των κυττάρων AGS με την πλασμιδιακή κατασκευή AIO-puro με τα δύο sgRNA ενσωματωμένα, απαιτείται γραμμοποιημένος φορέας. Η πέψη έγινε με το ένζυμο PvuI που κόβει στη θέση του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη το οποίο ήταν απαραίτητο για την επιλογή μετασηματισμένων βακτηρίων και πλέον δεν χρειάζεται (Πίνακας 17). Έπειτα ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο, πλύσεις με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 18μl WFI.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
AIOpuro_REC1_enhancer, sg1+sg2 (C=554,8ng/μl)	5,5μl
CutSmart Buffer 10X (NEB)	5μl
PvuI (NEB)	1,2μl
WFI (water for injection)	38,3μl
$V_{\text{τελ}}$	50μl

Πίνακας 17: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού φορέα AIO-puro για την διαμόλυνση καρκινικής κυτταρικής σειράς.

Ακολούθησε η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων AGS, τα οποία διαμολύνθηκαν σε εναιώρημα όλη τη νύχτα στους 37°C. Έπειτα για την επιλογή των κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί προστέθηκε το αντιβιοτικό πουρομυκίνη, το οποίο έμεινε για 4 ημέρες, και μετά την αφαίρεσή του τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό για περίπου 3 εβδομάδες.

3.2.4.4 Γονοτύπηση

Μετά την διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων, που οδήγησε στην δημιουργία μοναδιαία μετασηματισμένων κλώνων, ακολούθησε απομόνωση γονιδιωματικού DNA με σκοπό την γονοτύπηση. Συνολικά απομονώθηκε γονιδιωματικό υλικό από 35 κυτταρικούς κλώνους. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το παρακάτω πρωτόκολλο.

- 1) Φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 4°C, 3.000 RPM
- 2) Απόρριψη θρεπτικού υλικού
- 3) Επαναδιάλυση ιζήματος σε 400μl Διαλύματος λύσης, προσθήκη 4μl Πρωτεϊνάσης K και επώαση σε υδατόλουτρο στους 55°C για 16 ώρες
- 4) Προσθήκη 400μl Ισοπροπανόλης
- 5) Ανάκτηση συμπυκνωμένου γονιδιωματικού DNA

- 6) Στέγνωμα για 30 λεπτά
- 7) Επαναδιάλυση σε Elution Buffer, 5 λεπτά στους 6°C

Οι κλώνοι αυτοί ελέγχθηκαν για την επιτυχή αφαίρεση του τμήματος του ενισχυτή του RECUR1 από τα κύτταρα AGS με το σύστημα του πλασμιδιακού φορέα AIO-puro. Πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές PCR με εκκινητές που υβριδίζουν και πλαισιώνουν την περιοχή της αλληλουχίας εκτομής (Πίνακας 18).

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Taq Buffer Kapa Biosystems (10x)	5μL
dNTPs 10mM	0,5 μL
RECUR1_enh F2	1μL
RECUR1_enh R1	1μL
Taq polymerase Kapa Biosystems (5U/μl)	0,15μL
WFI (water for injection)	37,35μL
Template	5μL
	V _{τελικός} =50μl

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	5:00
Αποδιάταξη	95	0:45
Υβριδοποίηση	60	0:20
Επιμήκυνση	72	0:15
Κύκλοι	40	
Τελική επιμήκυνση	72	5:00

Πίνακας 18: Αντιδραστήρια ποσότητες και συνθήκες των διαγνωστικής PCR για γονοτύπηση κυτταρικών κλώνων AGS μετά από knockout με CRISPR/Cas9.

3.2.4.5 Απομόνωση RNA, κατεργασία με DNάση, σύνθεση cDNA

Οι κλώνοι που εμφάνισαν ενδιαφέρον πρότυπο γονιδιωματικού DNA επιλέχθηκαν για απομόνωση RNA. Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1mL τριζόλης (Trizol reagent, MRC) στο 6-well πιάτο που αναπτύσσονται οι κυτταρικοί κλώνοι, αναμονή για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, συλλογή των δειγμάτων σε σωληνάρια (tubes) τύπου erpendorf και μεταφορά σε πάγο. Έπειτα, προστέθηκαν 200μL χλωροφόρμιο και δημιουργήθηκαν 2 φάσεις: μία οργανική και μία υδατική. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C σε 13.000 RPM. Στη συνέχεια έγινε συλλογή της πάνω (υδατικής) φάσης, η οποία περιέχει το RNA, και καθαρισμός με ισοπροπανόλη. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 500μL ισοπροπανόλη και 1μL γλυκογόνο (20mg/mL), επώαση για 10 λεπτά σε πάγο και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4°C σε 13.000 RPM. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500μL 70% παγωμένης αιθανόλης και έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4°C

σε 13.000 RPM. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε WFI με θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Για την σίγουρη απομάκρυνση μορίων DNA από τα δείγματα RNA πραγματοποιήθηκε αντίδραση DNάσης. Η αντίδραση φαίνεται στον Πίνακα 19 και έγινε με επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Buffer 10X, Thermo	3μl
DNAase (1u/μL), Thermo	1μl
RNAase out (40 u/μL), Invitrogen	0,5μl
WFI (water for injection)	0,5μl
Sample RNA	25μl
$V_{\text{τελ}}$	30μl

Πίνακας 19: Αντιδραστήρια και ποσότητες της αντίδρασης DNάσης.

Ακολούθησαν βήματα καθαρισμού με προσθήκη 40μl οξικού νατρίου 3M/pH 5.2, 330μl WFI, 400μl Φαινόλη/Χλωροφόρμιο και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C στα 13.000RPM. Έγινε συλλογή της υδατικής φάσης, προσθήκη 1ml 100%παγωμένης αιθανόλης και επώαση στους -80°C για 1 ώρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4°C στα 13.000RPM, απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη 500μl 70% παγωμένης αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε WFI με θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Το τελευταίο βήμα πριν την πραγματοποίηση της qPCR είναι η αντίδραση σύνθεσης cDNA όπου το RNA θα μεταγραφεί αντίστροφα σε DNA. Για την αντίδραση αυτή δημιουργήθηκαν δύο μίγματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 20. Πρώτα προστίθενται στο δείγμα RNA 2μl από το μίγμα 1 και ακολουθεί επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και έπειτα προστίθεται το μίγμα 2 και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 2 ώρες. Τέλος, προστίθενται 380μl WFI.

Αντιδραστήρια (MIX 1)	Όγκοι	Αντιδραστήρια (MIX 2)	Όγκοι
Random Hexamers (Takara)	1μl	First Strand Buffer (5X) Invitrogen	4μl
dNTPs	1μl	M-MLV (200u/μL), Invitrogen	1μl
		RNAase out (40 u/μL), Invitrogen	0,5
		DTT 0.1 M (500u/μL), Invitrogen	2μl
		WFI (water for injection)	0,5μl
		Sample RNA (1000ng)	10μl
		$V_{\text{τελ}}$	20μl

Πίνακας 20: Αντιδραστήρια και ποσότητες της αντίδρασης cDNA.

3.2.4.6 qPCR

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR πραγματοποιείται με σκοπό τον προσδιορισμό των επιπέδων RNA. Στην προκειμένη περίπτωση αναμένεται να φανεί μείωση της έκφρασης του RECUR1 μετά από knock-out του πιθανού ενισχυτή του. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 21.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Syber mix (Kapa)	10μl
Primers F1/R1	2μl
WFI (water for injection)	4μl
Template	4μl
$V_{\text{τελ}}$	20μl

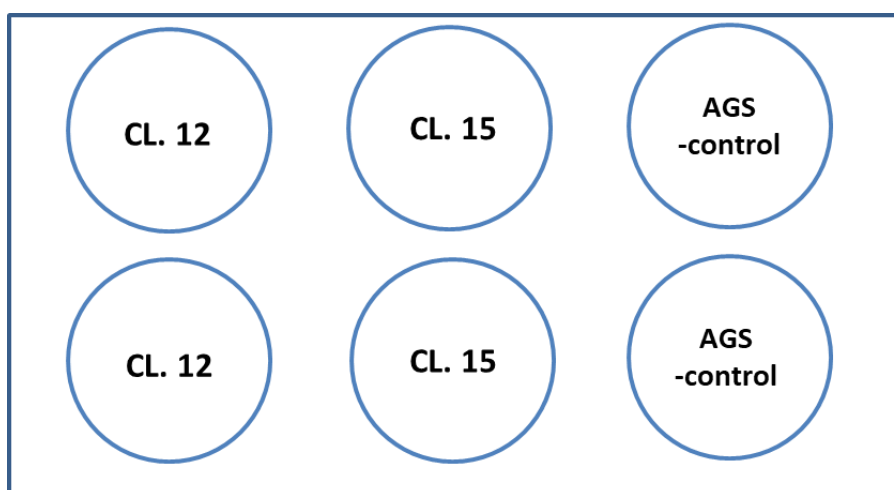
	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	5:00
Αποδιάταξη	95	0:20
Υβριδοποίηση	58	2:00
Επιμήκυνση	72	0:15
Κύκλοι	45	

Πίνακας 21: Αντιδραστήρια, ποσότητες και συνθήκες της αντίδρασης qPCR.

Πραγματοποιήθηκαν αρχικά δύο qPCR με εκκινητές που στοχεύουν σε 2 διαφορετικά σημεία του lncRNA, μία ακόμη qPCR με εκκινητές που στοχεύουν στο ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH με σκοπό την κανονικοποίηση των τιμών. Τέλος, αφού διαπιστώθηκε ικανοποιητική σίγηση πραγματοποιήθηκε μία τελευταία qPCR με εκκινητές που στοχεύουν σε ένα πιθανό γονίδιο στόχο του RECUR1. Χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα και το λογισμικό πρόγραμμα CFX manager της εταιρείας BioRad.

3.2.5 Δοκιμασία CFA

Για τους κυτταρικούς κλώνους AGS στους οποίους επιβεβαιώθηκαν επίπεδα σίγησης του lncRNA διεξήχθη δοκιμασία σχηματισμού αποικιών, με σκοπό την παρατήρηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων. Αξίζει να αναφερθεί πως οι 2 αυτοί κλώνοι στάλθηκαν και για αλληλούχηση. Κατά τη διαδικασία αυτή αρχικά στρώθηκαν 500 κύτταρα ανά πηγάδι σε duplicates όπως φαίνεται στην [Εικόνα 3.9](#), έχοντας ως αρνητικό μάρτυρα κύτταρα AGS που δεν είχαν τροποποιηθεί γενετικά. Την 4^η και την 6^η μέρα τραβήχτηκαν φωτογραφίες κάτω από το μικροσκόπιο και την 9^η μέρα τα κύτταρα βάφτηκαν με Methylene-Blue.



Εικόνα 3.9: Σχηματική απεικόνιση του 6-well πιάτου καλλιέργειας για την δοκιμασία CFA.

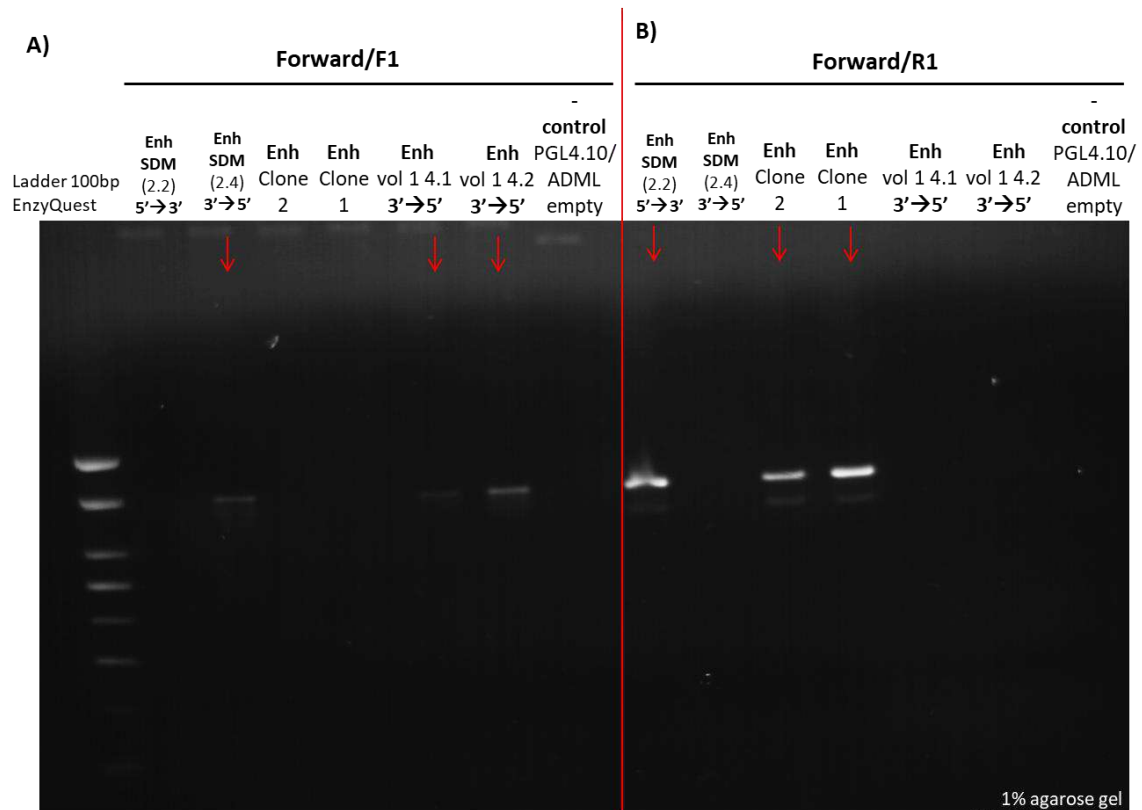
4. Αποτελέσματα

4.1 Δοκιμασίες Λουσιφεράσης

Με τις δοκιμασίες λουσιφεράσης κατέστη εφικτή και εύκολη η μελέτη της ενεργότητας του ενισχυτή του RECUR1 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Αρχικά διερευνήθηκε η ενεργότητά του τόσο με βάση τον προσανατολισμό ένθεσης της αλληλουχίας του στον πλασμιδιακό φορέα pGL4.10/AdML, όσο και μετά από μία τοποειδική μεταλλαξιγένεση (SDM: Site Directed Mutagenesis), που αντιστοιχεί σε εναλλαγή μεταξύ των αλληλομόρφων μιας σημειακής μετάλλαξης εντός της αλληλουχίας του ενισχυτή και περιγράφεται λεπτομερώς σε προηγούμενη πτυχιακή του εργαστηρίου. Έπειτα, η μελέτη συνεχίστηκε με κατάτμηση της αλληλουχίας του ενισχυτή σε τρία διαφορετικά τμήματα, με σκοπό την ανεξάρτητη εξέτασή τους.

4.1.1 Επιβεβαίωση προσανατολισμού ένθεσης ενισχυτή

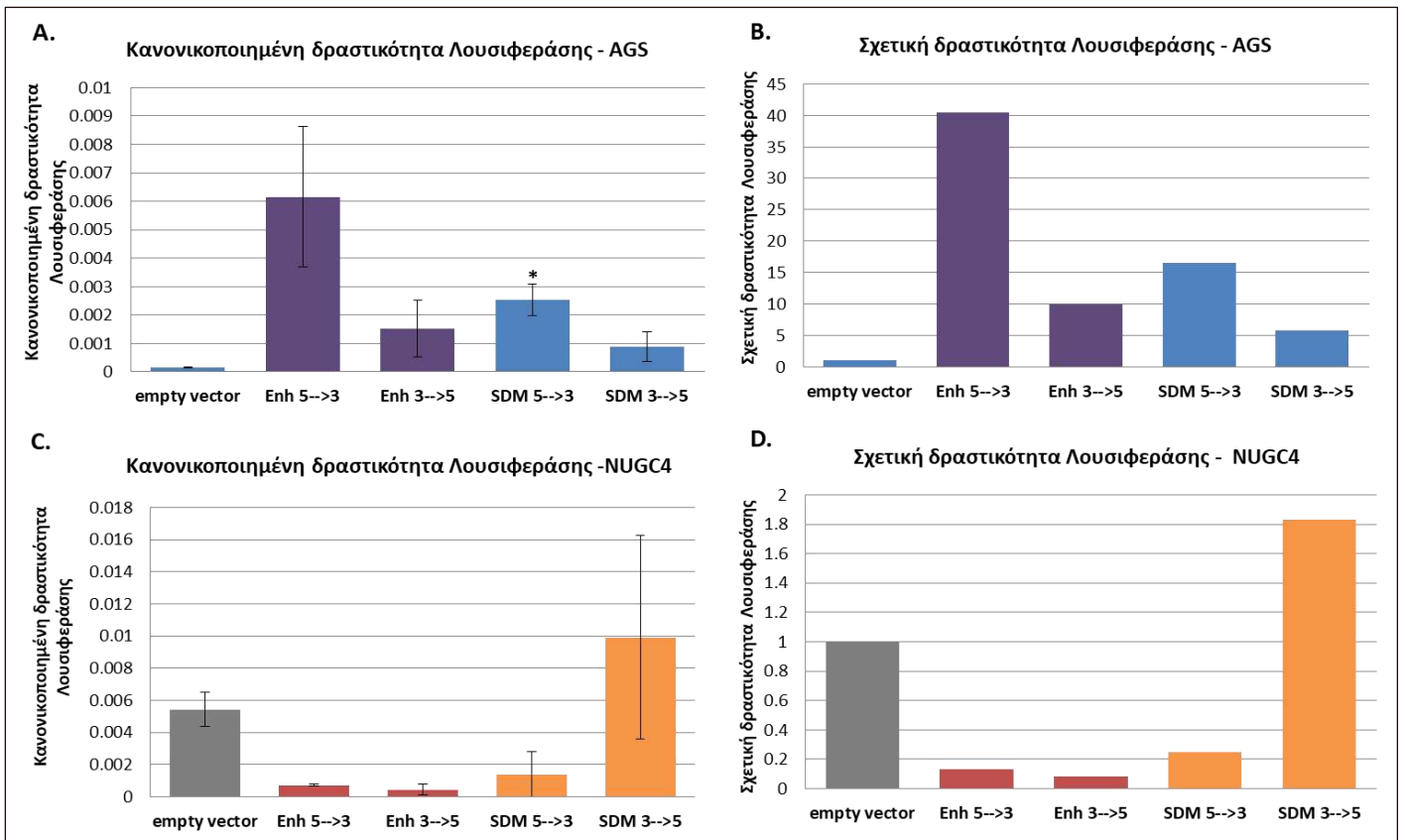
Το αποτέλεσμα των επιβεβαιωτικών αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την [Εικόνα 3.4](#), φαίνεται στην [Εικόνα 4.1](#) όπου αριστερά παρατηρείται αντίδραση PCR με χρήση των εκκινητών Forward-F1 και άρα επιβεβαιώνει ένθεση του ενισχυτή με προσανατολισμό 3'-5'. Διακρίνεται ότι από τα 6 δείγματα που εξετάστηκαν τα 3 είχαν προσανατολισμό 3'-5'. Στην δεξιά πλευρά απεικονίζεται η PCR με εκκινητές Forward-R1 που επιβεβαιώνει παρουσία του ενισχυτή με προσανατολισμό 5'-3' και φαίνεται να εμφανίζουν ζώνη τα υπόλοιπα 3 δείγματα. Είναι σημαντική η χρήση ενός αρνητικού μάρτυρα για κάθε αντίδραση PCR, που στην περίπτωση αυτή ήταν ο φορέας PGL4.10/ADML χωρίς ένθεμα και όπως ήταν αναμενόμενο δεν εμφάνισε ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης. Αξίζει να αναφερθεί πως κανένα από τα προς εξέταση δείγματα δεν εμφάνισε ζώνη και στις δύο PCR επιβεβαιώνοντας την ορθότητα του πειράματος. Αντίθετα, τα αποτελέσματα των δύο αυτών αντιδράσεων φαίνεται να είναι 'συμπληρωματικά' όπως αναμένεται άλλωστε.



Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μετά από απομόνωση DNA από βακτηριακά stock και PCR στον φορέα PGL4.10/ADML με το ένθεμα της αλληλουχίας του ενισχυτή. **A)**¹ PCR με εκκινητές Forward και F1. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Ladder (EnzyQuest), 6 δείγματα προς εξέταση, - control άκοπος φορέας. **B)**² PCR με εκκινητές Forward και R1. Φορτώθηκαν με σειρά: 6 δείγματα προς εξέταση, - control άκοπος φορέας.

4.1.2 Δοκιμασίες λουσιφεράσης για ολόκληρη αλληλουχία του ενισχυτή αγρίου τύπου και SDM με 2 προσανατολισμούς.

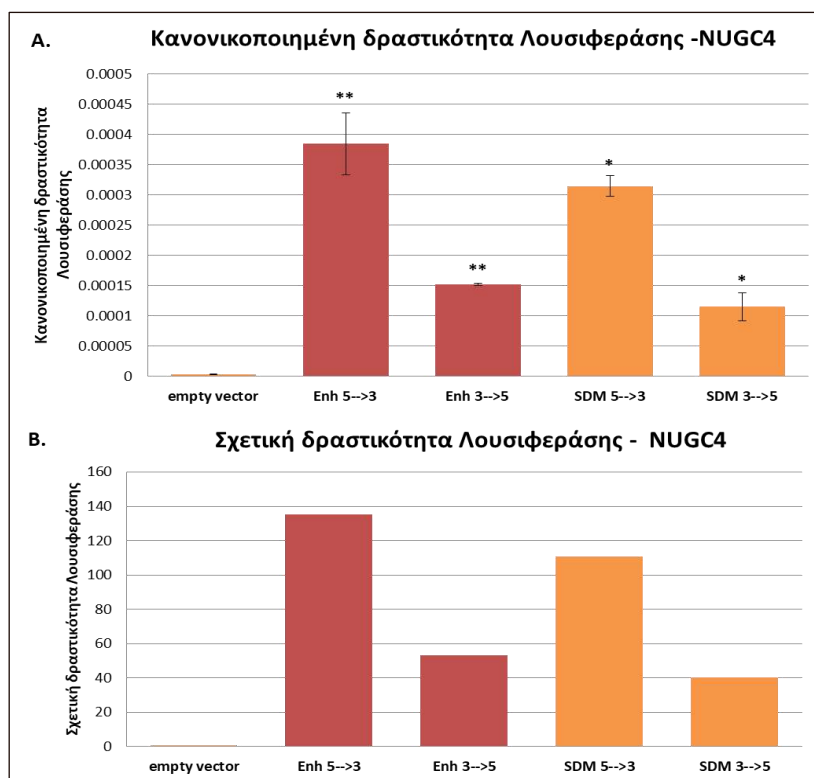
Από τα παραπάνω δείγματα κρατήθηκαν τα *Enh_clone1*, *Enh_vol1_4.1* ως αγρίου τύπου 5'-3' και 3'-5' αντίστοιχα και τα *Enh_SDM_2.2*, *Enh_SDM_2.4* ως δείγματα με την μεταλλαγμένη αλληλουχία ενισχυτή 5'-3' και 3'-5' αντίστοιχα. Μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου δύο ημερών για την δοκιμασία λουσιφεράσης την τρίτη ημέρα πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις χημειοφωταύγειας. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην [Εικόνα 4.2.A,C](#) αποτελούν τιμές μετά την διαίρεση με τις τιμές μέτρησης Renilla για κανονικοποίηση, ενώ στην [Εικόνα 4.2.B,D](#) εκφράζεται η αύξηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα δηλαδή τον φορέα PGL4.10/ADML χωρίς ένθεμα.



Εικόνα 4.2: Αποτελέσματα 1^{ης} δοκιμασίας λουσιφεράσης. **A.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα AGS. **B.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα AGS. **C.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα NUGC4. **D.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα NUGC4. (empty vector=άδειος φορέας PGL4.10/ADML, όπου SDM: δείγμα ενισχυτή με τοποειδική μεταλλαξιγένεση). * : pvalue <0.05

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ενεργότητα του ενισχυτή στα κύτταρα AGS με προσανατολισμό ένθεσης 5'-3' και όχι τόσο με προσανατολισμό 3'-5'. Παράλληλα, η μεταλλαγμένη αλληλουχία εμφανίζεται με μειωμένη δραστηριότητα, που ενισχύει την σημασία της συγκεκριμένης μετάλλαξης για την ορθή λειτουργία του ενισχυτή σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και στα διαγράμματα το πείραμα στην κυτταρική σειρά NUGC4 δεν φαίνεται να έχει τις κατάλληλες τιμές μέτρησης στον αρνητικό μάρτυρα (empty vector), που θα έπρεπε να παρουσιάζει ελάχιστο σήμα, και επομένως δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για την ενεργότητα της αλληλουχίας ενδιαφέροντος. Για τον λόγο αυτό το πείραμα με την κυτταρική σειρά αυτή επαναλήφθηκε με κάποιες αλλαγές στις συνθήκες και τους όγκους διαμόλυνσης. Τα αποτελέσματα της επανάληψης του πειράματος συνοψίζονται στην [Εικόνα 4.3](#). τα οποία φαίνεται να είναι πολύ περισσότερο αξιόπιστα.



Εικόνα 4.3: Αποτελέσματα 2^{ης} δοκιμασίας λουσιφεράσης. **A.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα NUGC4. **B.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα NUGC4. (empty vector=άδειος φορέας PGL4.10/ADML, όπου SDM: δείγμα ενισχυτή με τοποειδική μεταλλαξιγένεση). * : pvalue <0.05, ** : pvalue<0.01

Παρόμοια συμπεράσματα εξάγονται και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στην κυτταρική σειρά NUGC4. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώνεται και πάλι ενεργότητα του ενισχυτή με προσανατολισμό ένθεσης 5'-3', υποδεικνύοντας πως αυτή η φορά ένθεσης αντιστοιχεί στην βέλτιστη δράση της ρυθμιστικής αλληλουχίας.

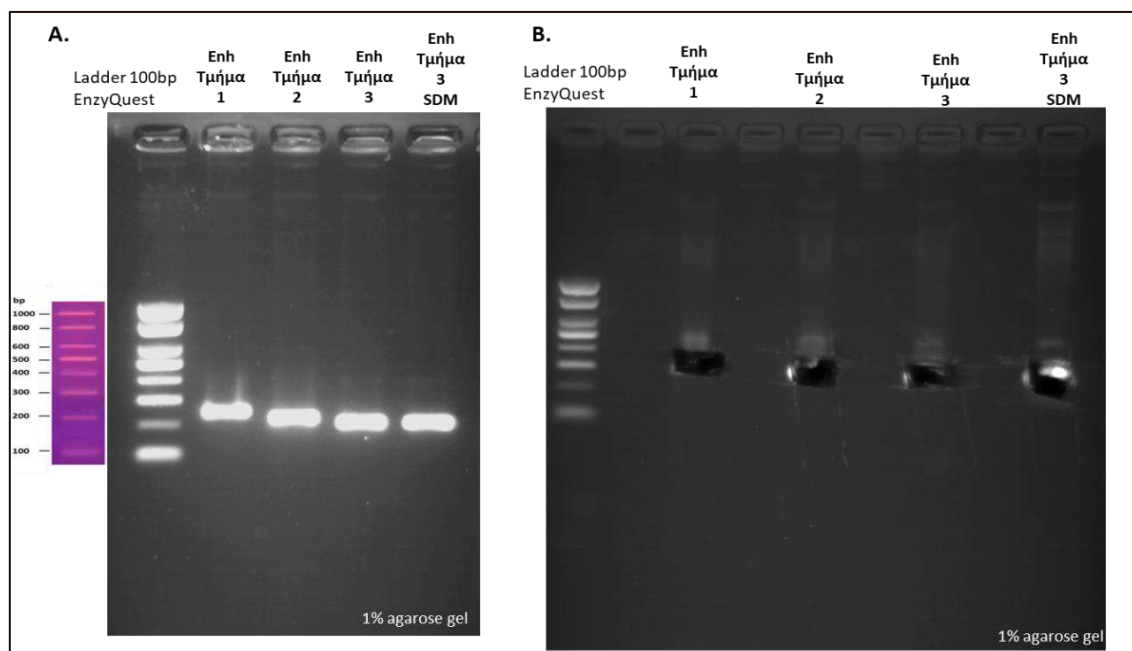
Παράλληλα, η μεταλλαγμένη αλληλουχία εμφανίζεται και σε αυτή την κυτταρική σειρά με μειωμένη δραστηριότητα, ενισχύοντας έτσι την σημασία της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Το γεγονός ότι προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα μετά από διεξαγωγή ανεξάρτητων πειραμάτων στις 2 διαφορετικές κυτταρικές σειρές προσδίδει επαναληψιμότητα, που καθιστά τα πειράματα αξιόπιστα. Μάλιστα, στα κύτταρα NUGC4 παρατηρείται αυξημένη στατιστική σημαντικότητα στα αποτελέσματα μετά από διεξαγωγή t-test (p-value=0.007-0.042), σε σχέση με αυτά που προέκυψαν από την κυτταρική σειρά AGS.

4.1.3 Κατάτμηση του ενισχυτή σε 3 τμήματα και κλωνοποίηση σε φορέα

Μετά την μελέτη ενεργότητας ολόκληρης της αλληλουχίας του ενισχυτή ακολούθησε ο διαχωρισμός του σε 3 μικρότερα τμήματα, η κλωνοποίηση κάθε

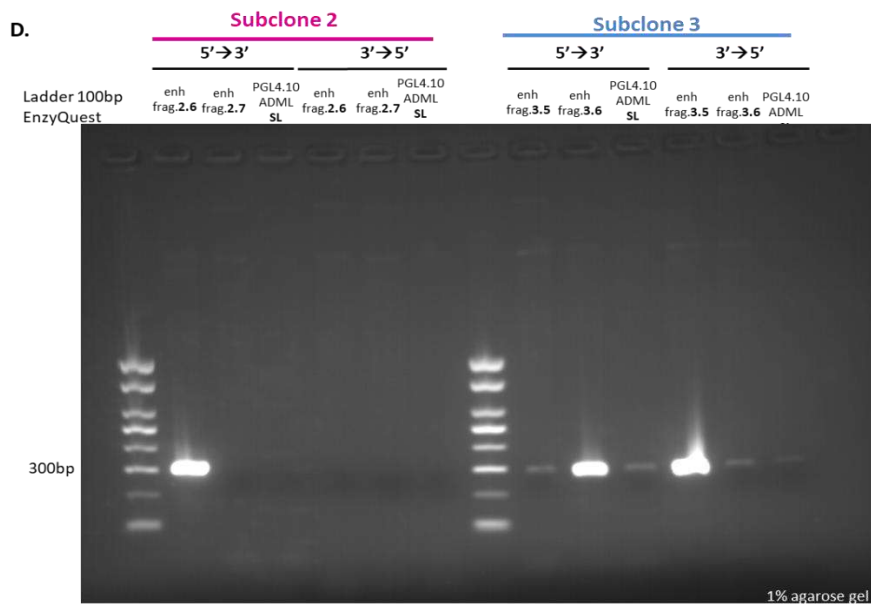
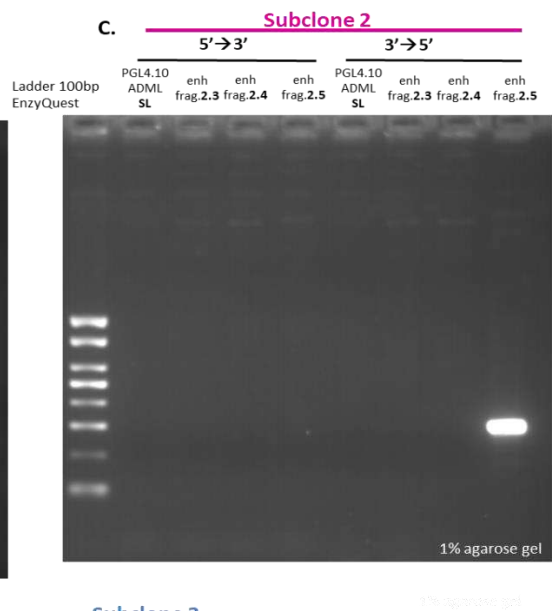
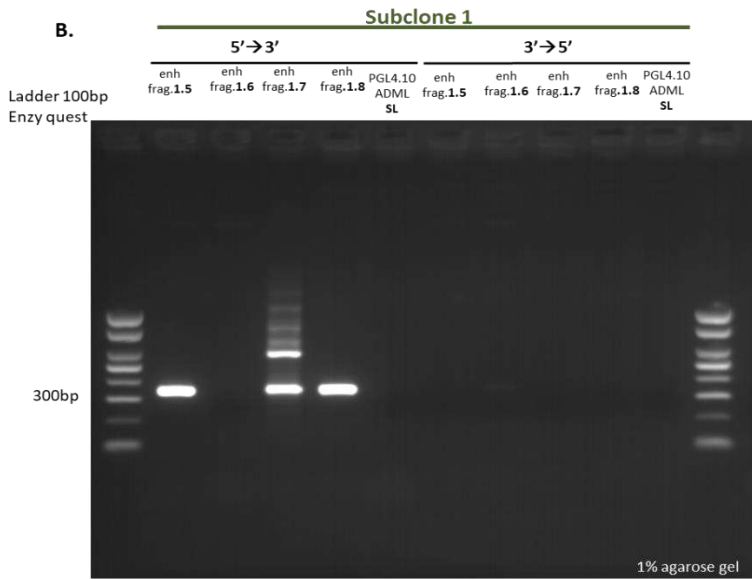
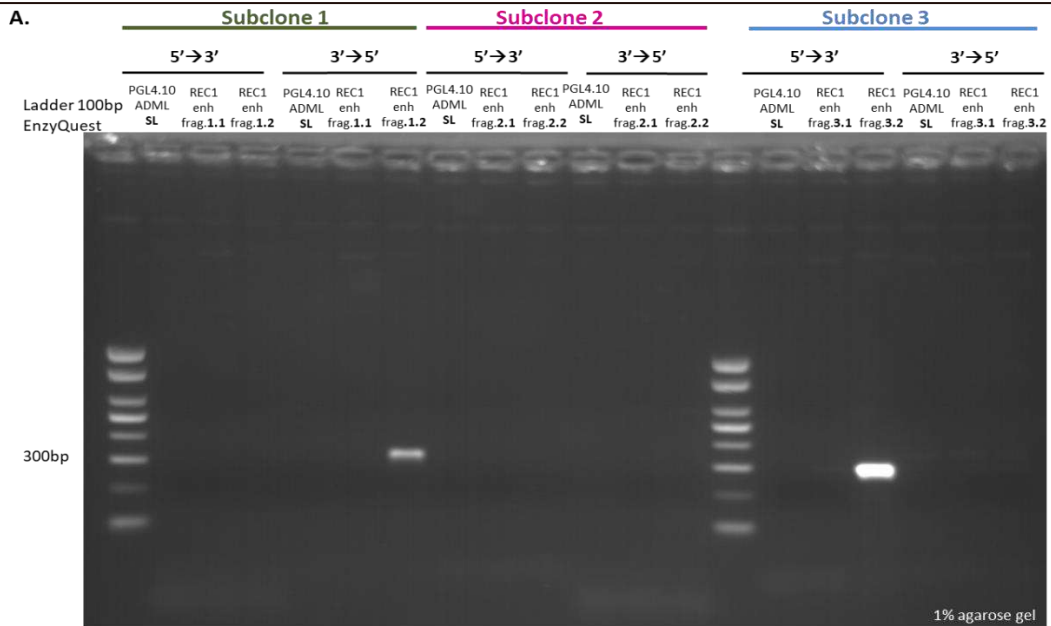
τμήματος στον φορέα PGL4.10/ADML και η διεξαγωγή δοκιμασιών λουσιφεράσης για μελέτη της ενεργότητας κάθε τμήματος ξεχωριστά. Μάλιστα, το 3^ο τμήμα κλωνοποιήθηκε τόσο στην μορφή αγρίου τύπου, όσο και με το SDM, το οποίο άλλωστε εντοπίζεται στο 3^ο και τελευταίο τμήμα προς το τέλος της αλληλουχίας του ενισχυτή (βλ. Υ&Μ).

Πραγματοποιήθηκε PCR στα παραπάνω δείγματα που έγινε επιβεβαίωση προσανατολισμού του ενισχυτή με χρήση των εκκινήτων που φαίνονται στην [Εικόνα 3.5](#) και το αποτέλεσμα απεικονίζεται στην [Εικόνα 4.4](#).



Εικόνα 4.4: **A)** Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μετά από PCR για τα τμήματα του ενισχυτή 1,2,3 και 3SDM αντίστοιχα. **B)** Κόψιμο της πηκτής αγαρόζης. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Ladder (EnzyQuest), Τμήμα 1,2,3,3SDM.

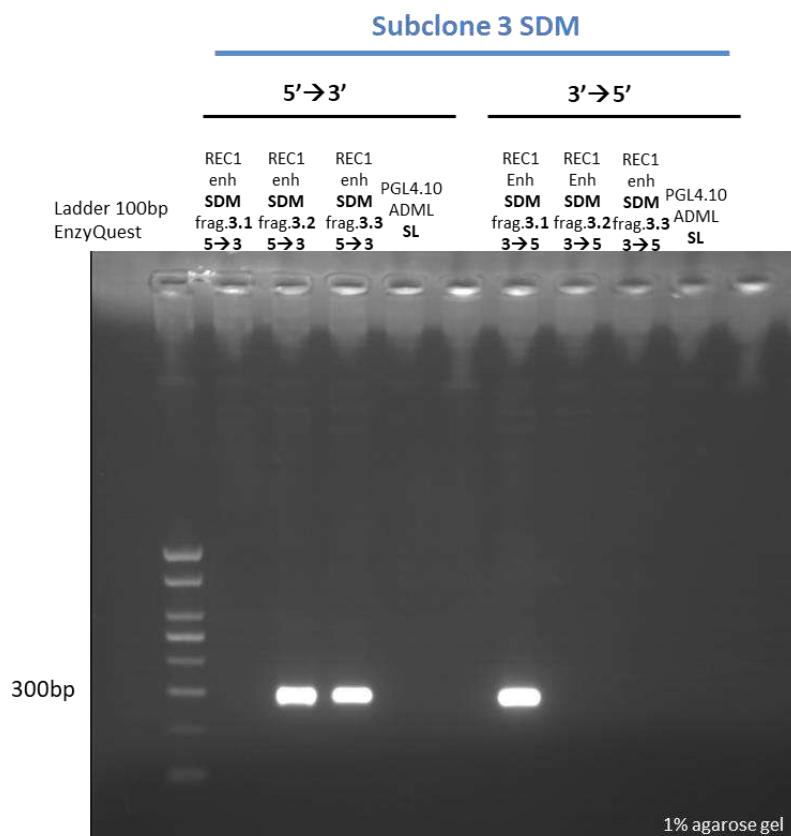
Μάλιστα αξίζει να παρατηρηθεί πως η ζώνη που εμφανίζει το τμήμα 1 που είναι 245 ζεύγη βάσεων είναι ελαφρώς ψηλότερα και επομένως το προϊόν μεγαλύτερο όπως θα έπρεπε. Αμέσως επόμενο είναι το τμήμα 2 στα 219ζ.β. και τέλος το τμήμα 3 χωρίς και με το SDM φαίνεται να βρίσκονται ακριβώς στο ίδιο ύψος του gel. Μετά την ενίσχυση των προϊόντων οι αλληλουχίες ανακτήθηκαν με κοπή του gel όπως φαίνεται στην [Εικόνα 4.4.B](#) και απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης. Ακολούθησε κλωνοποίηση καθενός από τα 4 τμήματα στον φορέα PGL4.10/ADML και διαγνωστικές PCR για την επιβεβαίωση της ένθεσης. Επειδή τα άκρα κάθε τμήματος είναι τυφλά μπορεί να έχουν εισαχθεί στον φορέα κλωνοποίησης και με τους 2 πιθανούς προσανατολισμούς ένθεσης. Για τον λόγο αυτόν οι επιβεβαιωτικές PCR πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τόσο την επιβεβαίωση της ένθεσης όσο και την διάγνωση της φοράς ένθεσης. Στην [Εικόνα 4.5](#) φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από απομόνωση DNA από διάφορες αποικίες και διαγνωστικές PCR.



Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης μετά από απομόνωση DNA από βακτηριακές αποικίες και PCR στον φορέα PGL4.10/ADML με ένθεμα κάθε ένα από τα τμήματα του ενισχυτή. **A.** Ηλεκτοφόρηση μετά από την 1^η απομόνωση DNA από 2 αποικίες για κάθε ένα από τα τμήματα του ενισχυτή και PCR και για τους 2 προσανατολισμούς. **B.** 2^η απομόνωση DNA από 4 αποικίες για το 1^ο τμήμα του ενισχυτή και PCR και για τους 2 προσανατολισμούς. **C.** 3^η απομόνωση DNA από 3 αποικίες για το 2^ο τμήμα του ενισχυτή και PCR και για τους 2 προσανατολισμούς. **D.** 4^η απομόνωση DNA από 2 αποικίες για τα τμήματα 2 και 3 του ενισχυτή και PCR και για τους 2 προσανατολισμούς.

Από τις παραπάνω ηλεκτροφορήσεις βγήκε συμπέρασμα για το ποιες βακτηριακές αποικίες είχαν λάβει ένθεμα και με ποιον προσανατολισμό. Κρατήθηκαν: για το 1^ο τμήμα οι αποικίες 1.5, 1.2, για το 2^ο τμήμα οι αποικίες 2.6, 2.5 και για το 3^ο τμήμα οι αποικίες 3.6, 3.5 με φορά 5→3 και 3→5 αντίστοιχα.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το 3^ο τμήμα με το SDM όπως φαίνεται στην [Εικόνα 4.6](#).

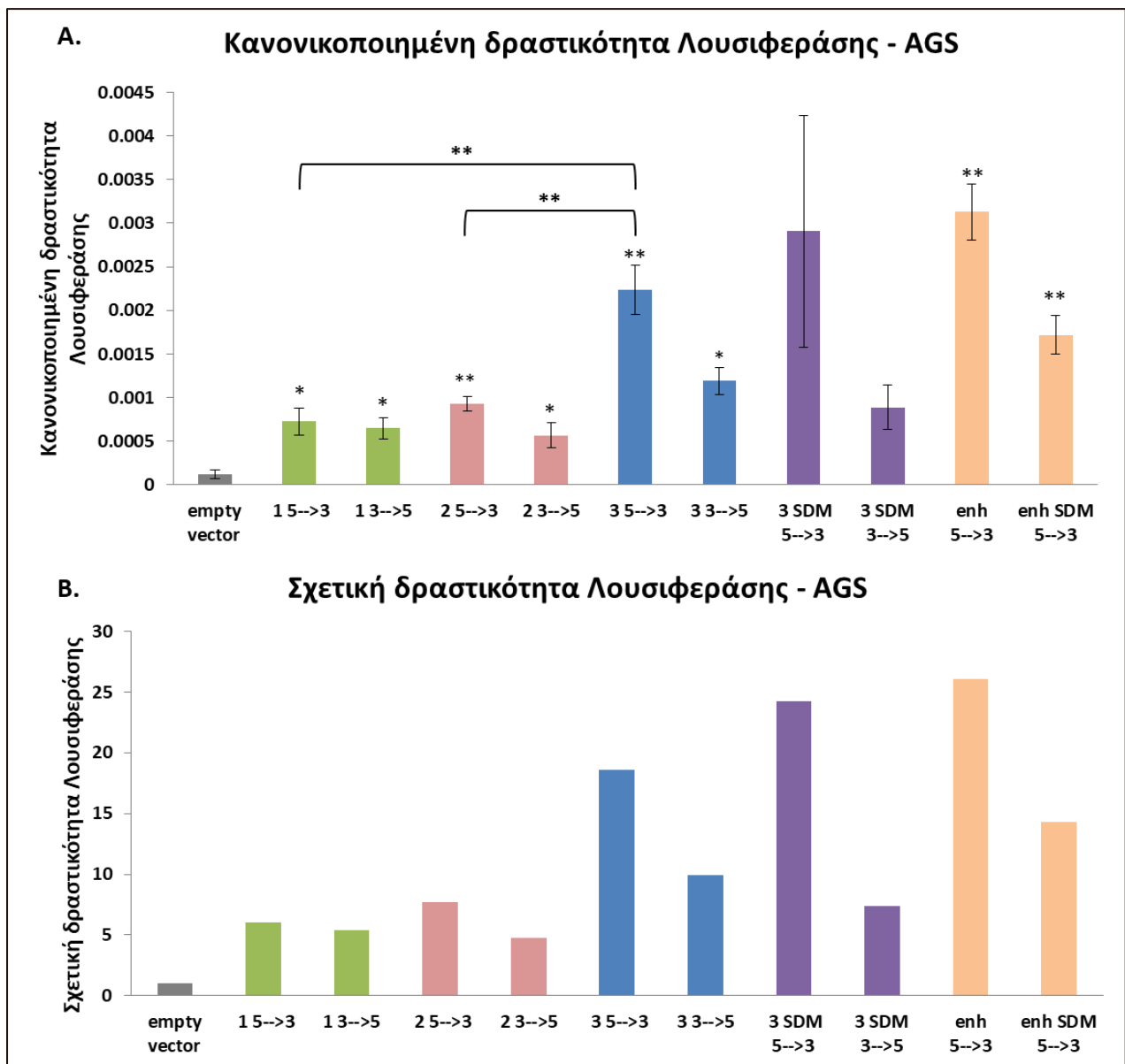


Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης μετά από απομόνωση DNA από βακτηριακές αποικίες και επιβεβαιωτική PCR στον φορέα PGL4.10/ADML με ένθεμα το 3^ο τμήμα του ενισχυτή με την τοποειδική μεταλλαξιγένεση (SDM).

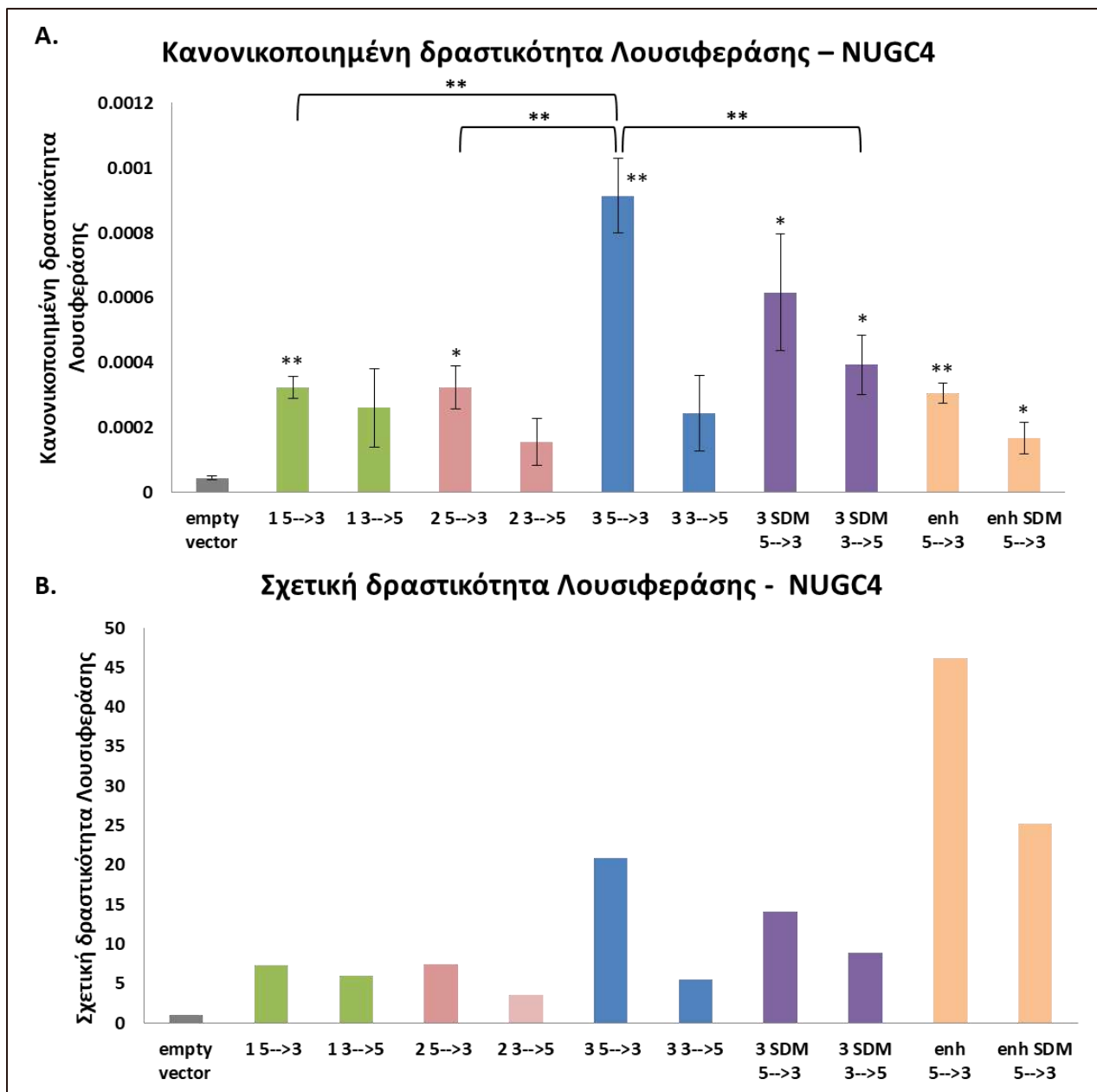
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει τελικό συμπέρασμα για το ποιες βακτηριακές αποικίες είχαν λάβει το 3^ο τμήμα του ενισχυτή με το SDM καθώς και για τον προσανατολισμό της ένθεσης τους, σύμφωνα με τα οποία τελικά διατηρήθηκαν οι αποικίες 3.2 και 3.1 με φορά 5→3 και 3→5 αντίστοιχα.

4.1.4 Δοκιμασία λουσιφεράσης για καθένα από τα 3 τμήματα του ενισχυτή με δύο προσανατολισμούς.

Έχοντας καταστήσει την νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενισχυτή ανεξάρτητα σε τρία μικρότερα τμήματα και έχοντας κλωνοποιήσει καθένα από τα τμήματα αυτά στον φορέα PGL4.10/ADML και με τους δύο προσανατολισμούς, ήταν δυνατή η διεξαγωγή των δοκιμασιών λουσιφεράσης στις δύο γαστρικές καρκινικές σειρές (AGS και NUGC4), τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στις εικόνες [Εικόνα 4.7](#) και [Εικόνα 4.8](#). Βάσει αυτών, παρατηρείται ότι το 3^ο τμήμα παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τα προηγούμενα 2 τμήματα με (p -value<0.05). Οι τιμές p -value είναι 0.00678 (με το τμήμα 1) και 0.00798 (με το τμήμα 2) για την κυτταρική σειρά AGS και για την κυτταρική σειρά NUGC4 0.00681 και 0.00887 αντίστοιχα. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές το 3^ο τμήμα διαθέτει φανερά αυξημένη ενεργότητα και επομένως ίσως αποτελεί την κρίσιμη ρυθμιστική αλληλουχία του υπό μελέτη ενισχυτή. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως η ενεργότητά του αγγίζει τα επίπεδα της ενεργότητας ολόκληρης της αλληλουχίας του ενισχυτή. Σχετικά με την μεταλλαγμένη αλληλουχία, παρά την έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας στην κυτταρική σειρά AGS, δεν μπορεί να παραβλεφθεί η σχετική μείωση που σημειώθηκε στην κυτταρική σειρά NUGC4. Μάλιστα, εάν συγκριθεί η ενεργότητα του 3^{ου} τμήματος σε μορφή αργίου τύπου και φορά 5'-3' με αυτήν της μεταλλαγμένης μορφής και φορά 3'-5', παρατηρείται εμφανής μείωση με στατιστική σημαντικότητα (p -value=0.01), όπως φαίνεται στην [Εικόνα 4.8.A](#). Έτσι υποδεικνύεται η σημασία τόσο του προσανατολισμού όσο και της συγκεκριμένης σημειακής μετάλλαξης στην αλληλουχία του ρυθμιστικού αυτού τμήματος.



Εικόνα 4.7: Αποτελέσματα 3^{ης} δοκιμασίας λουσιφεράσης για τμήματα του ενισχυτή σε κύτταρα AGS. **A.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα AGS. **B.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα AGS. (empty vector=άδειος φορέας PGL4.10/ADML, όπου SDM: δείγμα ενισχυτή με τοποειδική μεταλλαξιγένεση, όπου enh=ολόκληρη αλληλουχία του ενισχυτή).



Εικόνα 4.8: Αποτελέσματα 3^{75} δοκιμασίας λουσιφεράσης για τμήματα του ενισχυτή σε κύτταρα NUGC4. **A.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης με γραμμές σφάλματος, σε κύτταρα NUGC4. **B.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών δραστηριότητας της λουσιφεράσης εκφρασμένες ως προς το δείγμα ελέγχου του άδειου φορέα, σε κύτταρα NUGC4. (empty vector=άδειος φορέας PGL4.10/ADML, όπου SDM: δείγμα ενισχυτή με τοποειδική μεταλλαξιγένεση, όπου enh=ολόκληρη αλληλουχία του ενισχυτή).

4.2 Knock-out του ενισχυτή του RECUR1 με CRISPR/Cas9 nickase

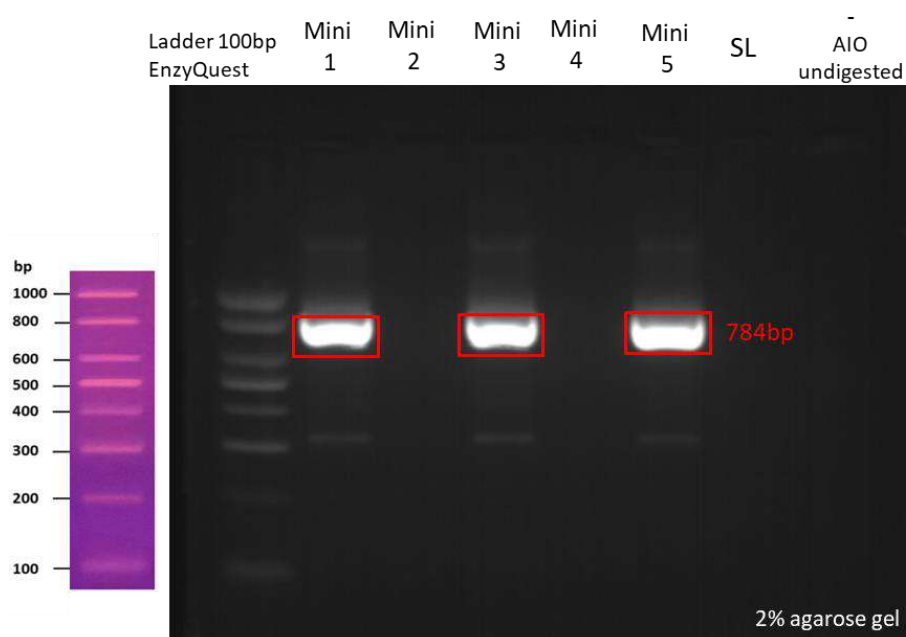
Μετά τις δοκιμασίες λουσιφεράσης διαπιστώθηκε επανειλημμένα η ενεργότητα του υπό μελέτη ρυθμιστικού στοιχείου σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, υποδεικνύοντας το ενδιαφέρον που παρουσιάζει η αλληλουχία του ενισχυτή. Το γεγονός αυτό, συνδυαστικά με άλλα πειράματα του εργαστηρίου, κατέδειξε την ανάγκη περαιτέρω μελέτης του ρυθμιστικού στοιχείου αυτού, όχι μόνο ως νουκλεοτιδική αλληλουχία αλλά και ως δομή στο πλαίσιο χρωματινικών

αλληλεπιδράσεων. Προκειμένου να μελετηθεί η σημαντικότητα της ρυθμιστικής αλληλουχίας, επιτεύχθηκε σταθερή γενετική τροποποίηση απαλοιφής της αλληλουχίας του ενισχυτή του RECUR1 μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 νικάσης.

4.2.1 Κλωνοποίηση των sgRNA1 & sgRNA2 σε πλασμιδιακό φορέα

Μετά το πέρας της κλωνοποίησης του single guide RNA1 (sgRNA1) στον πλασμιδιακό φορέα AIO-puro, απομονώθηκε DNA από 5 διαφορετικές αποικίες βακτηρίων και πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR, με στόχο την επιβεβαίωση της εισαγωγής του ενθέματος, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό που φαίνεται στην [Εικόνα 3.6.A](#).

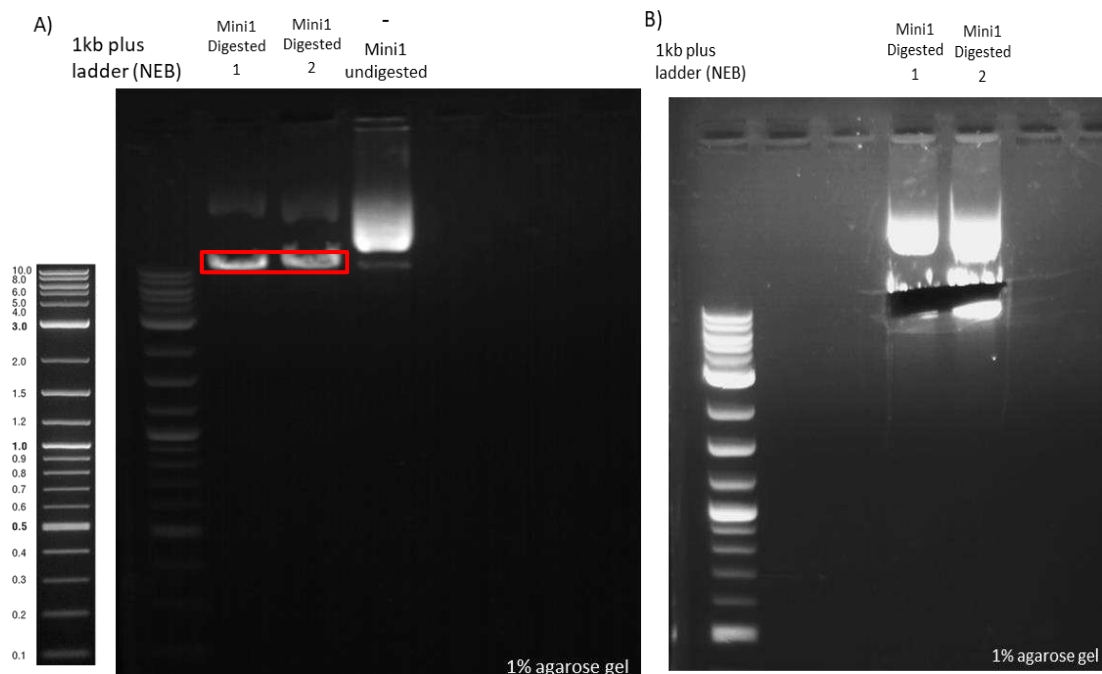
Μετά την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης της οποίας το αποτέλεσμα φαίνεται στην [Εικόνα 4.9](#). Πέρα από τα 5 δείγματα προς εξέταση, φαίνονται και τα δύο αρνητικά control που χρησιμοποιήθηκαν. Παρατηρήθηκε ότι οι αποικίες 1,3 και 5 ήταν θετικές, δηλαδή έφεραν το sgRNA1 καθώς εμφανίζουν την χαρακτηριστική μπάντα με μέγεθος 784 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 4.9: Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης μετά από απομόνωση DNA από 5 βακτηριακές αποικίες και PCR στον φορέα AIO-puro μετά την ένθεση του sgRNA1. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Ladder (EnzyQuest), mini preparation 1,2,3,4,5, Self Ligation, - control άκοπος φορέας.

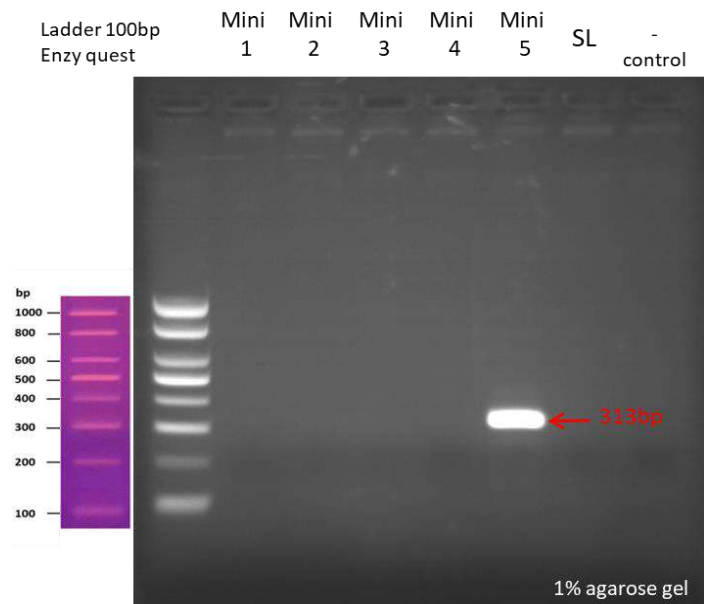
Στη συνέχεια για την ένθεση του sgRNA2 στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα έγινε πέψη του πλασμιδίου στο οποίο είχε ήδη εισαχθεί το sgRNA1. Έτσι, επιλέχθηκε το δείγμα mini preparation 1 και κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο BsaI, ώστε τα μονόκλωνα άκρα που να είναι συμβατά με αυτά του δεύτερου ενθέματος. Όπως φαίνεται στην [Εικόνα 4.10.A](#), στο πήκτωμα αгарόζης εμφανίζεται η μπάντα που είναι χαρακτηριστική για την γραμμοποιημένη μορφή του πλασμιδίου, ενώ αντίθετα στο control του άκοπου φορέα παρατηρείται smear που αντιστοιχεί στις

υπόλοιπες μορφές που μπορεί να πάρει ένα άκοπο πλασμίδιο, όπως η υπερελικωμένη και η απλή κυκλική. Το επόμενο βήμα ήταν να κοπούν οι μπάντες που αντιστοιχούν στην γραμμοποιημένη μορφή, ώστε να ακολουθήσει εξαγωγή DNA από την πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 4.10.B).



Εικόνα 4.10: **A)** Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μετά από πέψη πλασμιδίου με *Bsa*I. Φορτώθηκαν με σειρά: 1kb Ladder (NEB), αντίδραση πέψης 1, αντίδραση πέψης 2, control άκοπου φορέα. **B)** Κόψιμο της πηκτής αγαρόζης στο σημείο που βρίσκεται το γραμμοποιημένο πλασμίδιο και από τις 2 αντιδράσεις πέψης.

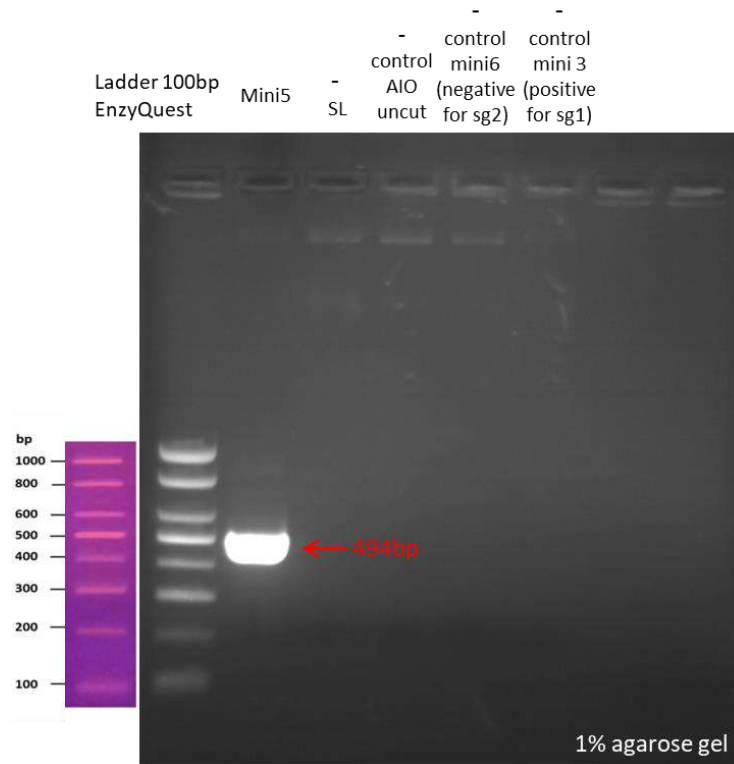
Ακολούθησε κλωνοποίηση του sgRNA2 και απομόνωση DNA από 3 διαφορετικές αποικίες βακτηρίων, εκ των οποίων δεν ήταν καμία θετική. Για αυτό πραγματοποιήθηκε επανάληψη της διαδικασίας απομόνωσης DNA από άλλες 5 αποικίες. Η ένθεση του sgRNA2 επιβεβαιώθηκε μέσω διαγνωστικής PCR με χρήση ενός εμπρόσθιου εκκινητή ο οποίος υβριδίζει στην αλληλουχία του sgRNA2 και του ίδιου οπίσθιου εκκινητή που υβριδίζει στον πλασμδιακό φορέα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6.B.



Εικόνα 4.11: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μετά από απομόνωση DNA από 5 βακτηριακές αποικίες και PCR στον φορέα AIO-puro μετά την ένθεση του sgRNA2. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Ladder (EnzyQuest), mini preparation 1,2,3,4,5, Self Ligation, - control άκοπος φορέας.

Όπως παρατηρείται στην [Εικόνα 4.11](#) μόνο η αποικία 5 ήταν θετική, δηλαδή έφερε το sgRNA2 καθώς υπάρχει παρουσία της χαρακτηριστικής μπάντας με μέγεθος 313 ζεύγη βάσεων. Με σκοπό την τελική επιβεβαίωση πως ο φορέας περιλαμβάνει το sgRNA2 αλλά και το sgRNA1 ακολούθησε μία τελευταία επιβεβαιωτική PCR σε αυτό το θετικό δείγμα, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό που φαίνεται στην [Εικόνα 3.8](#).

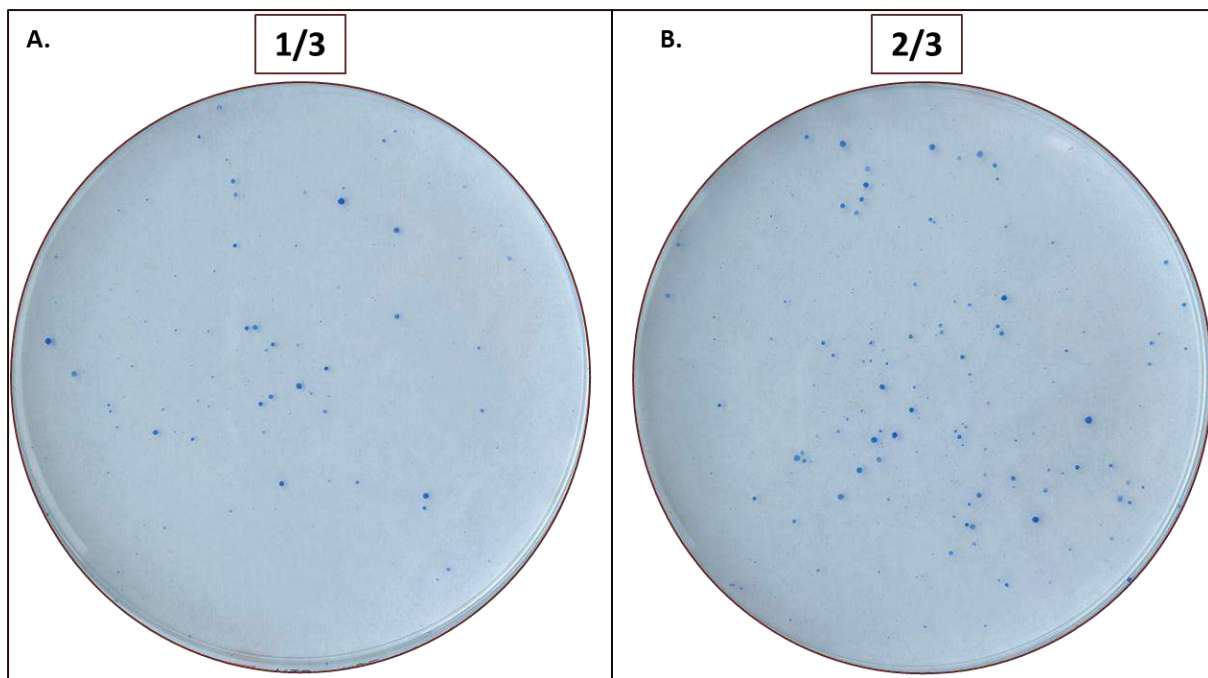
Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης αυτής της αντίδρασης φαίνεται στην [Εικόνα 4.12](#) όπου επιβεβαιώνεται πως το mini preparation 5 από την δεύτερη κλωνοποίηση είναι θετικό και για τα δύο guide RNA και παράλληλα όλα τα αρνητικά control αποτελούν μάρτυρες για την σωστή εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας.



Εικόνα 4.12: Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης μετά από διπλή επιβεβαιωτική PCR στον φορέα AIO-ruro μετά την ένθεση του sgRNA1 και sgRNA2. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Ladder (EnzyQuest), mini preparation 5, και 4 διαφορετικά αρνητικά control (Self Ligation, άκοπος φορέας, mini6, mini3 από την πρώτη κλωνοποίηση).

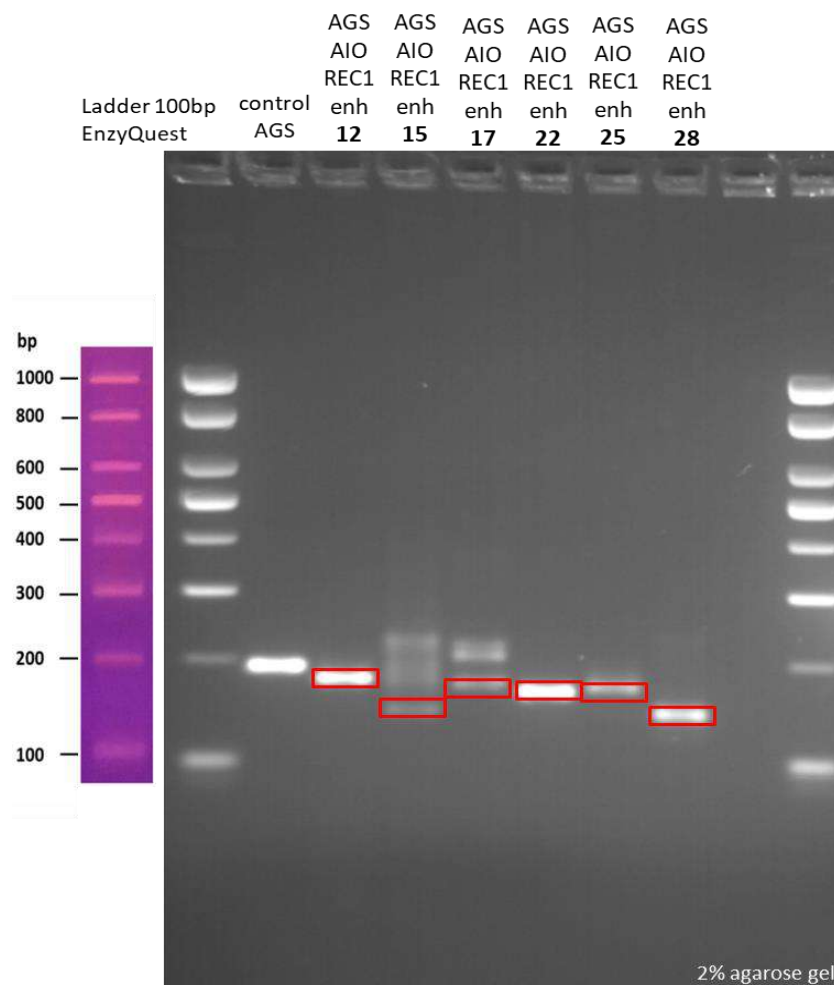
4.2.2 Έλεγχος κλώνων για γενετική τροποποίηση

Το πλασμίδιο που δημιουργήθηκε εισήχθη σε κύτταρα AGS και μετά την διαμόλυνση των κυττάρων και την επιλογή με αντιβιοτικό απομονώθηκαν συγκεκριμένοι κυτταρικοί κλώνοι για να διερευνηθεί εάν πραγματοποιήθηκε γενετική τροποποίηση αυτών. Στην [Εικόνα 4.13](#) διαφαίνεται ο αριθμός των μεμονωμένων κλώνων σε ένα πιάτο κυτταρικής καλλιέργειας.



Εικόνα 4.13: Πιάτα καλλιέργειας με κλώνους κυττάρων AGS μετά από διαμόλυνση με το transgene AIO_RECUR1_εηh_KO, επιλογή με πουρομυκίνη και βαφή με Methylene-blue. **A.** Πιάτο όπου στρώθηκαν το 1/3 των κυττάρων και παρατηρούνται λιγότεροι κλώνοι. **B.** Πιάτο όπου στρώθηκαν το 2/3 των κυττάρων και η πυκνότητα των κλώνων είναι μεγαλύτερη.

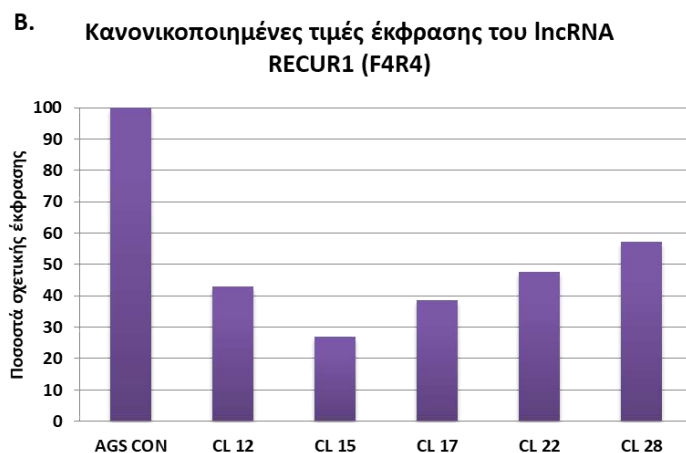
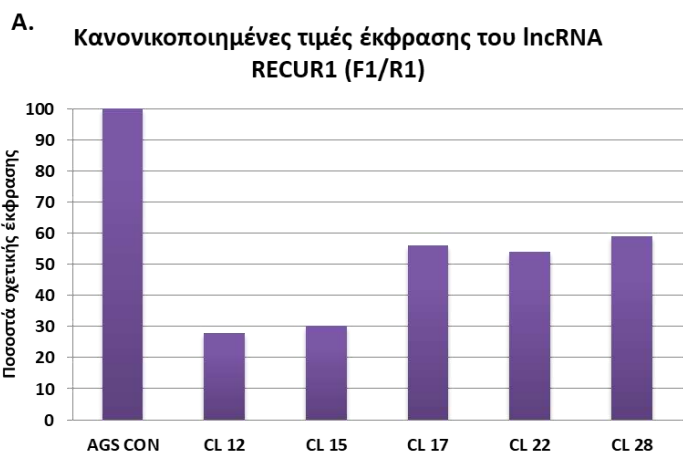
Συνολικά απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από 35 κλώνους, οι οποίοι ελέγχθηκαν με PCR. Επιλέχθηκαν 6 κλώνοι με ενδιαφέρον πρότυπο, οι οποίοι φαίνονται στην [Εικόνα 4.14](#). Αρνητικό μάρτυρα αποτέλεσαν κύτταρα AGS που δεν είχαν τροποποιηθεί γενετικά και το αναμενόμενο προϊόν αγρίου τύπου είχε μέγεθος 193 νουκλεοτίδια, όπως διακρίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Αντίθετα, μετά την γενετική τροποποίηση με CRISPR, το προϊόν αναμενόταν σε διαφορετικά, συνήθως μικρότερα, μεγέθη τα οποία αντιστοιχούν στην αλληλουχία που προκύπτει από την επιδιόρθωση του DNA μετά τις τομές στην αλληλουχία του από την ενδονουκλεάση Cas9. Συμπερασματικά, κρατήθηκαν οι 6 αυτοί κυτταρικοί κλώνοι που εμφάνισαν ενδιαφέρον πρότυπο ζωνών στην πηκτική αγαρόζης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα μη τροποποιημένων κυττάρων AGS. Αυτό, υποδεικνύει επιτυχία της γενετικής τροποποίησης και πιθανή απαλοιφή του τμήματος ενδιαφέροντος από το γονιδίωμα των κυττάρων. Ωστόσο, για την επιβεβαίωση της επιδιόρθωσης θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση DNA για να διαπιστωθεί η απουσία της αλληλουχίας στόχου.



Εικόνα 4.14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από διαγνωστικές PCR σε γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από κυτταρικούς κλώνους γενετικά τροποποιημένους με το transgene AIO_RECUR1_enh_KO. Με κόκκινο σημειώνονται οι χαμηλότερες ζώνες των τροποποιημένων κυττάρων. Φορτώθηκαν με σειρά: 100bp Ladder (EnzyQuest), αρνητικός μάρτυρας, ενδεικτικοί κλώνοι 12,15,17,22,25 και 28.

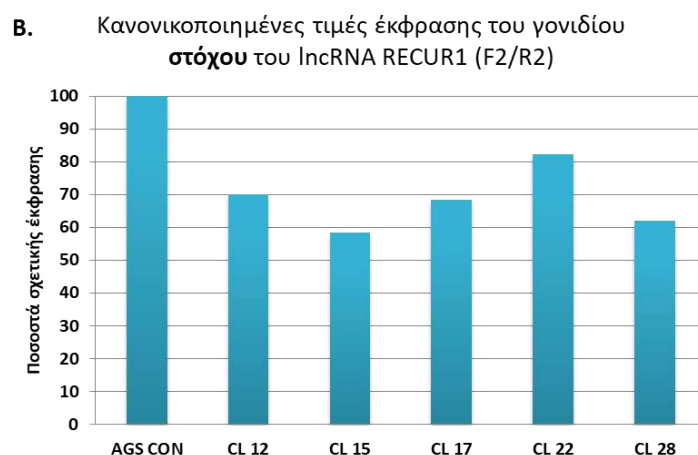
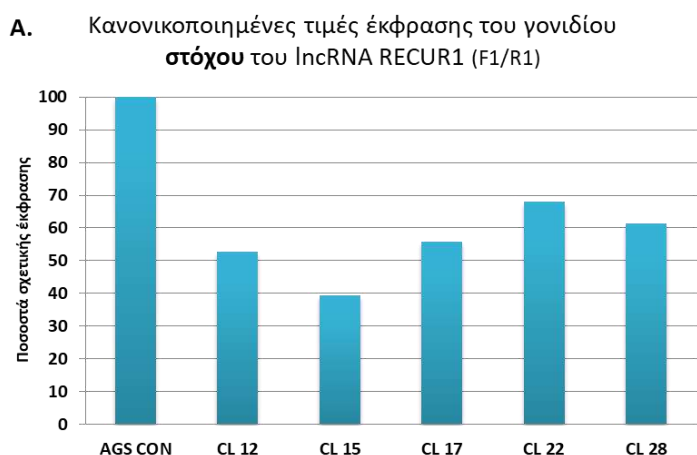
4.2.3 Μελέτη έκφρασης επιπέδων RNA

Πέρα από το πρότυπο που εμφάνισε η αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA μετά την γενετική απαλοιφή έπρεπε να ελεγχθεί και το πρότυπο έκφρασης του lncRNA για να διερευνηθεί πώς επηρέασε η απαλοιφή του ενισχυτή τα επίπεδα έκφρασής του RECUR1. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR που πραγματοποιήθηκε για το lncRNA με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών φαίνονται στην [Εικόνα 4.15](#). Παρατηρείται ότι οι κλώνοι 12,15,17,22,28 εμφάνισαν όλοι πάνω από 42% σίγηση του μεταγράφου, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από τις δύο ποσοτικές PCR με τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Πιο συγκεκριμένα, οι κλώνοι 12 και 15 φαίνεται να εμφανίζουν σίγηση της τάξης του 73% και 70% αντίστοιχα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα μη γενετικά τροποποιημένων κυττάρων AGS.



Εικόνα 4.15: Αποτελέσματα ποσοτικής PCR για το lncRNA RECUR1 μετά το knock-out της αλληλουχίας του ενισχυτή στην κυτταρική σειρά AGS. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με χρήση του ιδιοσυστατου γονιδίου GAPDH. **A.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών έκφρασης του RECUR1 με εκκινητές F1/R1. Πρώτος φαίνεται ο αρνητικός μάρτυρας μη τροποποιημένων κυττάρων AGS και έπειτα οι κλώνοι 12,15,17,22 και 28. **B.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών έκφρασης του RECUR1 με διαφορετικούς εκκινητές F4/R4. Πρώτος φαίνεται ο αρνητικός μάρτυρας μη τροποποιημένων κυττάρων AGS και έπειτα οι κλώνοι 12,15,17,22 και 28.

Στη συνέχεια, έχοντας διαπιστώσει εμφανή σίγηση του RECUR1 έως και 73% στον κλώνο 12 και 15, ελέγχθηκαν και τα επίπεδα ενός γονιδίου που αποτελεί υποψήφιο στόχο του lncRNA σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου. Τα αποτελέσματα της δεύτερης ποσοτικής PCR που πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο στόχο με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών φαίνονται στην [Εικόνα 4.16](#). Παρατηρείται μείωση της έκφρασης του γονιδίου στόχου από 20% έως και 60%.

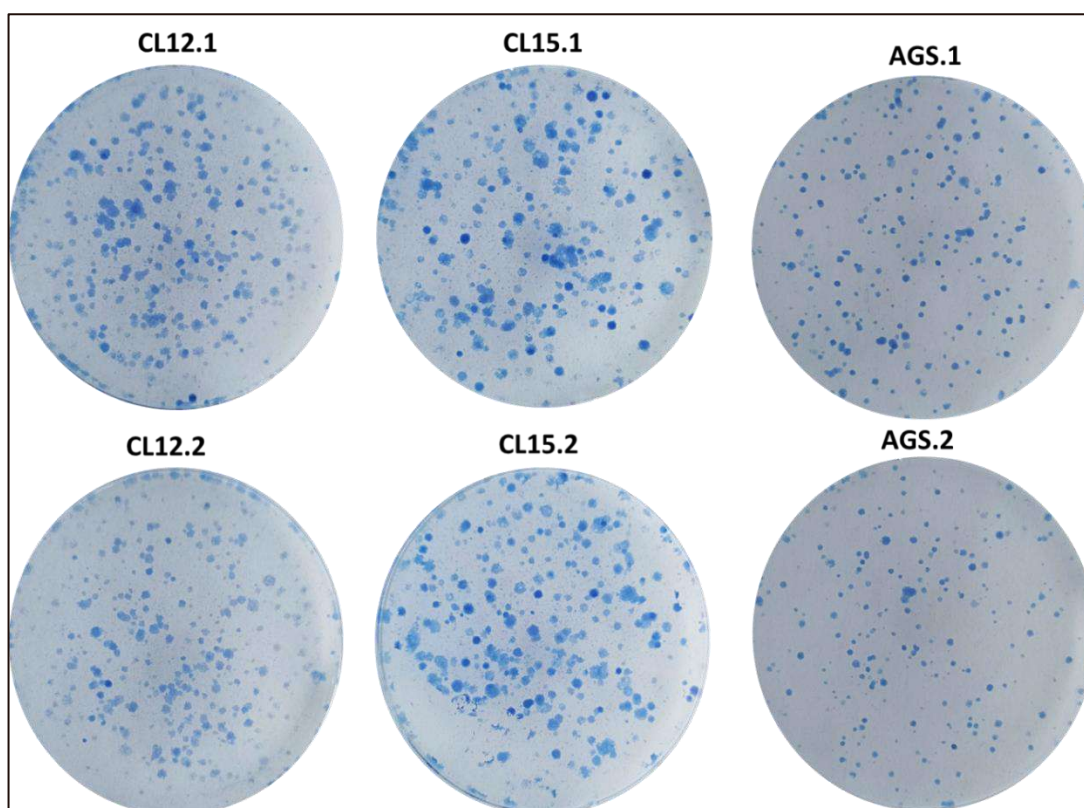


Εικόνα 4.16: Αποτελέσματα ποσοτικής PCR για τον πιθανό στόχο του lncRNA RECUR1 μετά το knock-out της αλληλουχίας του ενισχυτή στην κυτταρική σειρά AGS. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με χρήση του γονιδίου GAPDH. **A.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών έκφρασης του γονιδίου στόχου του RECUR1 με εκκινητές F1/R1. Πρώτος φαίνεται ο αρνητικός μάρτυρας μη τροποποιημένων κυττάρων AGS και μετά οι κλώνοι 12,15,17,22 και 28. **B.** Ιστόγραμμα απεικόνισης των κανονικοποιημένων τιμών έκφρασης του στόχου του RECUR1 με διαφορετικούς εκκινητές F2/R2. Πρώτος φαίνεται ο αρνητικός μάρτυρας μη τροποποιημένων κυττάρων AGS και έπειτα οι κλώνοι 12,15,17,22 και 28.

Συμπερασματικά από τα παραπάνω προκύπτει ότι η σίγηση του RECUR1 είχε ως επακόλουθο την σίγηση του πιθανού γονιδίου στόχου του, υποδεικνύοντας έτσι κάποια σχέση ρύθμισης μεταξύ των 2 γονιδίων. Μάλιστα, αξίζει να παρατηρηθεί η αντιστοιχία που παρουσιάζει η μείωση της έκφρασης του RECUR1 με αυτή του γονιδίου στόχου σε κάθε κλώνο όπως φαίνεται στα διαγράμματα των εικόνων [Εικόνα 4.15](#) και [Εικόνα 4.16](#), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ρύθμισης μεταξύ τους.

4.2.4 Διαδικασία σχηματισμού κλώνων (CFA)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα κρατήθηκαν οι κλώνοι 12 και 15 που εμφάνισαν τα καλύτερα επίπεδα σίγησης και πραγματοποιήθηκε η μέθοδος CFA για παρατήρηση του κυτταρικού φαινότυπου. Στην [Εικόνα 4.17](#) φαίνονται τα αποτελέσματα ανάπτυξης των κλώνων 12 και 15 σε σύγκριση με τα control AGS μετά από καλλιέργεια και χρώση. Παρατηρείται ότι οι κλώνοι που αναπτύχθηκαν μετά από ανακαλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων κλώνων 12 και 15 αντίστοιχα, εμφανίζουν μεγαλύτερη διάμετρο και επομένως αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα όπου οι κλώνοι φαίνονται μικρότεροι. Δηλαδή, στοχεύοντας τον ενισχυτή του RECUR1 με CRISPR/Cas9 και επιτυγχάνοντας 70% σίγηση αυτού, οι κυτταρικοί κλώνοι καρκινικής σειράς υπεραναπτύσσονται σε μέγεθος. Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η απουσία του υπό μελέτη lncRNA οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 4.17: Κυτταρικός φαινότυπος με τη μέθοδο χρώσης κυττάρων CFA. Κλώνοι 12, 15 και αρνητικός μάρτυρας AGS σε duplicates.

5. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Τα lncRNA αποτελούν λειτουργικά μόρια των οποίων ο ρόλος, στον πυρήνα ή και στο κυτταρόπλασμα, είναι κομβικός για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων. Η απορρυθμισμένη έκφραση ενός lncRNA μπορεί να οδηγήσει σε διαταραγμένη φυσιολογία και εν τέλει σε παθολογία. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι πολλά lncRNA εμφανίζουν διαφορετική έκφραση σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με υγιείς ιστούς, γεγονός που τα έχει συνδέσει με την καρκινογένεση [78]. Κάποια από αυτά είναι το MALAT1, το GAS5, το lincRNA-p21, το CUDR, το UCA1, το PANDA και πολλά άλλα [79].

Δεδομένου ότι η απορρυθμισμένη έκφραση των lncRNA είναι αυτή που έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο, αξίζει να μελετηθούν τα ρυθμιστικά στοιχεία που συμμετέχουν στην ρύθμιση της έκφρασης αυτής. Οι ενισχυτές μπορούν να παίξουν κρίσιμο ρόλο στην γονιδιακή έκφραση. Μάλιστα, κάποιοι υπερσυντηρημένοι ενισχυτές είναι απαραίτητοι για την φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, απαλοιφή κάποιων από αυτούς με CRISPR/Cas9 σε έμβρυα ποντικών οδήγησε σε ανωμαλίες ανάπτυξης και δομικά ελαττώματα στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα [80].

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η ενεργότητα ενός ενισχυτή που όπως αποδείχθηκε ενισχύει την μεταγραφή του lncRNA RECUR1. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της 1^{ης} δοκιμασίας λουσιφεράσης (Εικόνα 4.2, Εικόνα 4.3) ο ενισχυτής παρουσιάζει υψηλότερη ενεργότητα όταν είναι κλωνοποιημένος στον φορέα με προσανατολισμό 5'-3' και στις 2 κυτταρικές σειρές, υποδεικνύοντας πως αυτή είναι η φορά βέλτιστης δράσης του. Μάλιστα στο δείγμα με την τοποειδική μεταλλαξινέωση στην αλληλουχία του ενισχυτή (SDM), τα επίπεδα ενεργότητας φαίνονται αρκετά μειωμένα. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία πως είναι δύσκολη η εύρεση αλληλουχιών ενισχυτών οι οποίες να παρουσιάζουν σημαντική ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Αξίζει να αναφερθεί, πως σε μία μελέτη 6 πιθανών ενισχυτών του γονιδίου VEGFA μόνο ένας παρουσίασε αύξηση στην έκφραση της λουσιφεράσης της τάξης 2- με 5.8-fold σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ενώ οι υπόλοιποι πέντε δεν κατάφεραν να προκαλέσουν αξιοσημείωτη ενεργοποίηση έκφρασης της λουσιφεράσης [81].

Παράλληλα, η αναζήτηση του τμήματος του ενισχυτή με την μέγιστη ενεργότητα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το 3^ο τμήμα του ενισχυτή εμφανίζει φανερό και στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τα προηγούμενα δύο τμήματα και στις 2 κυτταρικές σειρές (Εικόνα 4.7, Εικόνα 4.8). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αλληλουχία ενός ρυθμιστικού στοιχείου είναι εξαιρετικής σημασίας και αλλαγές σε αυτήν μπορούν να διαταράξουν πιθανές θέσεις/μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων ή παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [82, 83]. Για παράδειγμα, μία θέση πολυμορφισμού (SNP) στον

ενισχυτή του lncRNA ANRIL's οδηγεί σε διατάραξη της θέσης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα STAT1 που φυσιολογικά δρα ως καταστολέας, με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του [84]. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι το 3^ο τμήμα του ενισχυτή μπορεί να περιλαμβάνει είτε κάποια ρυθμιστική αλληλουχία είτε θέση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, όμως αυτό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Έτσι, μετά τα πειράματα λουσιφεράσης και την απόδειξη της ενεργότητας του ενισχυτή του RECUR1 έπρεπε να διερευνηθεί εάν η ύπαρξή του στο γονιδίωμα επηρεάζει την έκφραση του RECUR1 και σε ποιο βαθμό. Αυτό επιτεύχθηκε με knock-out ενός τμήματός του με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9, επιλογή συγκεκριμένων κλώνων και έπειτα αναλύσεις RT-qPCR για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1. Φαίνεται στην [Εικόνα 4.15](#) πως σημειώθηκε σίγηση της τάξεως του 73% (3,7-fold), αξιοσημείωτο ποσοστό δεδομένου ότι πρόκειται για αλληλουχία ενισχυτή και όχι υποκινητή του lncRNA. Στην βιβλιογραφία σε παρόμοιες μελέτες έχει δειχθεί μείωση των επιπέδων του μεταγράφου μετά από knock-out ενός ενισχυτή του έως και 60% (2,5-fold) [81]. Σε μία άλλη μελέτη επιτεύχθηκε σχεδόν ολοκληρωτική σίγηση του μεταγράφου Sox2 μετά από απαλοιφή του ενισχυτή του, υποδεικνύοντας πως ένας ενισχυτής μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταγραφή ενός γονιδίου [85]. Ωστόσο απαιτούνται παραπάνω μελέτες χαρακτηρισμού του ενισχυτή του RECUR1 με σκοπό να αποκαλυφθεί ο τρόπος με τον οποίο επιτελεί την μεταγραφική ρύθμιση.

Εκτός από τα επίπεδα έκφρασης του RECUR1, προσδιορίστηκε με RT-qPCR η έκφραση του πιθανού γονιδίου στόχου του lncRNA. Τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου αυτού, μετά το knock-out του ενισχυτή, παρουσίασαν επίσης μείωση. Όμως αυτό που αξίζει να αναφερθεί, είναι πως η πτώση της έκφρασης του γονιδίου στόχου που φαίνεται σε κάθε κλώνο αντιστοιχεί στην πτώση της έκφρασης του RECUR1 ([Εικόνα 4.15](#), [Εικόνα 4.16](#)). Αυτό φανερώνει παρόμοιο πρότυπο μείωσης και υποδεικνύει άμεση σχέση ρύθμισης μεταξύ του lncRNA και του γονιδίου στόχου του.

Τέλος με τη μέθοδο CFA παρατηρήθηκε και ο φαινότυπος των κυττάρων AGS με μικροσκόπιο, ώστε να διακριθεί η δομή των κυτταρικών κλώνων μετά από κυτταρική καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα της CFA ανάλυσης έδειξαν πως απαλοιφή του ενισχυτή του RECUR1 έχει φανερό αντίκτυπο στον κυτταρικό φαινότυπο και πιο συγκεκριμένα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ([Εικόνα 4.17](#)). Αυτό αποτελεί ένδειξη πως όταν το RECUR1 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, τα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ παρουσία του ενισχυτή τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του RECUR1 οδηγούν σε πιθανή ογκοκατασταλτική δράση.

Από τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνεται η ρυθμιστική αξία του ενισχυτή του RECUR1 και η έλλειψή του φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τόσο την έκφραση του lncRNA όσο και του γονιδίου στόχου του. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με σκοπό να επιβεβαιωθεί ο ρυθμιστικός ρόλος του ενισχυτή και ο συγκεκριμένος τρόπος με τον οποίον ρυθμίζει το RECUR1 αλλά και αυτό με τη σειρά του το γονίδιο στόχο του. Οι μελλοντικοί στόχοι περιλαμβάνουν τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) για την εύρεση πρόσδεσης πρωτεϊνών και παραγόντων που οδηγούν στον σχηματισμό τοπολογικά συνδεδεμένων περιοχών (TADs). Παράλληλα, στους μελλοντικούς πειραματικούς σχεδιασμούς εντάσσονται τεχνικές Hi-C με σκοπό την αποκάλυψη χρωματινικών αναδιπλώσεων και εμφάνιση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενισχυτή και του υποκινητή του RECUR1. Επιπλέον, έχοντας δεδομένα από πειράματα απαλοιφής του υποκινητή του RECUR1 προηγούμενων πτυχιακών του εργαστηρίου, αξίζει να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη απαλοιφή υποκινητή και ενισχυτή για να παρατηρηθεί ο φαινότυπος των κυττάρων και το αντίκτυπο που θα έχει τότε η έλλειψη του RECUR1 στην καρκινογένεση.

6. Βιβλιογραφία

1. Sexton, R.E., et al., *Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies*. *Cancer Metastasis Rev*, 2020. **39**(4): p. 1179-1203.
2. Han, J.P., S.J. Hong, and H.K. Kim, *Long-term outcomes of early gastric cancer diagnosed as mixed adenocarcinoma after endoscopic submucosal dissection*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015. **30**(2): p. 316-20.
3. Stahl, P., et al., *Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer*. *BMC Gastroenterol*, 2015. **15**: p. 7.
4. 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.
5. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. *Nature*, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
6. Sun, K., et al., *EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 583463.
7. 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.
8. Puliga, E., et al., *Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows*. *Cancer Treat Rev*, 2021. **95**: p. 102175.
9. Grabsch, H.I. and P. Tan, *Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms*. *Dig Surg*, 2013. **30**(2): p. 150-8.
10. Chia, N.Y. and P. Tan, *Molecular classification of gastric cancer*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(5): p. 763-9.
11. Usui, G., et al., *DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer*. *Digestion*, 2021. **102**(1): p. 25-32.
12. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. *Lancet*, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
13. Ajani, J.A., et al., *Gastric adenocarcinoma*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17036.
14. Pasechnikov, V., et al., *Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(38): p. 13842-62.
15. Leja, M. and A. Line, *Early detection of gastric cancer beyond endoscopy - new methods*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2021. **50-51**: p. 101731.
16. Zhang, Z., et al., *Liquid biopsy in gastric cancer: predictive and prognostic biomarkers*. *Cell Death Dis*, 2022. **13**(10): p. 903.
17. Parasramka, M.A., et al., *Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma*. *Pharmacol Ther*, 2016. **161**: p. 67-78.
18. Necsulea, A., et al., *The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods*. *Nature*, 2014. **505**(7485): p. 635-40.
19. de Goede, O.M., et al., *Population-scale tissue transcriptomics maps long non-coding RNAs to complex disease*. *Cell*, 2021. **184**(10): p. 2633-2648 e19.
20. Begolli, R., N. Sideris, and A. Giakountis, *lncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(10).
21. Devaux, Y., et al., *Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing*. *Nat Rev Cardiol*, 2015. **12**(7): p. 415-25.
22. Audas, T.E. and S. Lee, *Stressing out over long noncoding RNA*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1859**(1): p. 184-91.
23. Parnigoni, A., et al., *The role of the multifaceted long non-coding RNAs: A nuclear-cytosolic interplay to regulate hyaluronan metabolism*. *Matrix Biol Plus*, 2021. **11**: p. 100060.
24. Noh, J.H., et al., *Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. **9**(3): p. e1471.

25. Liu, B., et al., *A cytoplasmic NF-kappaB interacting long noncoding RNA blocks IkappaB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(3): p. 370-81.
26. Mele, M., et al., *Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs*. *Genome Res*, 2017. **27**(1): p. 27-37.
27. 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.
28. Yao, R.W., Y. Wang, and L.L. Chen, *Cellular functions of long noncoding RNAs*. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(5): p. 542-551.
29. Davidovich, C., et al., *Toward a consensus on the binding specificity and promiscuity of PRC2 for RNA*. *Mol Cell*, 2015. **57**(3): p. 552-8.
30. Han, P., et al., *A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy*. *Nature*, 2014. **514**(7520): p. 102-106.
31. Rinn, J.L., et al., *Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
32. Kumar, S., et al., *Non-Coding RNAs as Mediators of Epigenetic Changes in Malignancies*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(12).
33. Katsushima, K., et al., *Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13616.
34. Wang, Y., et al., *Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal*. *Dev Cell*, 2013. **25**(1): p. 69-80.
35. Arab, K., et al., *Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A*. *Mol Cell*, 2014. **55**(4): p. 604-14.
36. Barreto, G., et al., *Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation*. *Nature*, 2007. **445**(7128): p. 671-5.
37. Canzio, D., et al., *Antisense lncRNA Transcription Mediates DNA Demethylation to Drive Stochastic Protocadherin alpha Promoter Choice*. *Cell*, 2019. **177**(3): p. 639-653 e15.
38. Lin, D., *Commentary on "The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer."* Chakravarty D, Sboner A, Nair SS, Giannopoulou E, Li R, Hennig S, Mosquera JM, Pauwels J, Park K, Kossai M, MacDonald TY, Fontugne J, Erho N, Vergara IA, Ghadessi M, Davicioni E, Jenkins RB, Palanisamy N, Chen Z, Nakagawa S, Hirose T, Bander NH, Beltran H, Fox AH, Elemento O, Rubin MA, University of Washington-Urology, Seattle, WA. *Nat Commun* 2014; 5:5383. *Urol Oncol*, 2016. **34**(11): p. 522.
39. Zou, Z.W., et al., *LncRNA ANRIL is up-regulated in nasopharyngeal carcinoma and promotes the cancer progression via increasing proliferation, reprogramming cell glucose metabolism and inducing side-population stem-like cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(38): p. 61741-61754.
40. Diaz-Lagares, A., et al., *Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(47): p. E7535-E7544.
41. Zhang, Y., et al., *Long noncoding RNA TP53TG1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma development by acting as a molecular sponge of microRNA-96*. *Cancer Sci*, 2019. **110**(9): p. 2760-2772.
42. Binabaj, M.M., et al., *The prognostic value of long noncoding RNA MEG3 expression in the survival of patients with cancer: A meta-analysis*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(11): p. 9583-9590.
43. Huang, Z.L., et al., *Long non-coding RNA MEG3 induces cell apoptosis in esophageal cancer through endoplasmic reticulum stress*. *Oncol Rep*, 2017. **37**(5): p. 3093-3099.

44. Kimura, T., et al., *Stereotactic body radiotherapy for patients with small hepatocellular carcinoma ineligible for resection or ablation therapies*. *Hepatol Res*, 2015. **45**(4): p. 378-86.
45. Wu, H., et al., *The role and application of small extracellular vesicles in gastric cancer*. *Mol Cancer*, 2021. **20**(1): p. 71.
46. Xie, Y., et al., *The role of exosomal noncoding RNAs in cancer*. *Mol Cancer*, 2019. **18**(1): p. 37.
47. Prensner, J.R., et al., *Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(8): p. 742-9.
48. Guo, L., et al., *An integrated evolutionary analysis of miRNA-lncRNA in mammals*. *Mol Biol Rep*, 2014. **41**(1): p. 201-7.
49. Yin, W. and M. Rogge, *Targeting RNA: A Transformative Therapeutic Strategy*. *Clin Transl Sci*, 2019. **12**(2): p. 98-112.
50. 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).
51. Hinger, S.A., et al., *Diverse Long RNAs Are Differentially Sorted into Extracellular Vesicles Secreted by Colorectal Cancer Cells*. *Cell Rep*, 2018. **25**(3): p. 715-725 e4.
52. Akerman, I., et al., *Human Pancreatic beta Cell lncRNAs Control Cell-Specific Regulatory Networks*. *Cell Metab*, 2017. **25**(2): p. 400-411.
53. Schmitt, A.M. and H.Y. Chang, *Gene regulation: Long RNAs wire up cancer growth*. *Nature*, 2013. **500**(7464): p. 536-7.
54. Matharu, N. and N. Ahituv, *Minor Loops in Major Folds: Enhancer-Promoter Looping, Chromatin Restructuring, and Their Association with Transcriptional Regulation and Disease*. *PLoS Genet*, 2015. **11**(12): p. e1005640.
55. Dao, L.T.M. and S. Spicuglia, *Transcriptional regulation by promoters with enhancer function*. *Transcription*, 2018. **9**(5): p. 307-314.
56. Li, X. and X.D. Fu, *Chromatin-associated RNAs as facilitators of functional genomic interactions*. *Nat Rev Genet*, 2019. **20**(9): p. 503-519.
57. Narendra, V., et al., *CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation*. *Science*, 2015. **347**(6225): p. 1017-21.
58. Grubert, F., et al., *Genetic Control of Chromatin States in Humans Involves Local and Distal Chromosomal Interactions*. *Cell*, 2015. **162**(5): p. 1051-65.
59. Laffleur, B., et al., *Noncoding RNA processing by DIS3 regulates chromosomal architecture and somatic hypermutation in B cells*. *Nat Genet*, 2021. **53**(2): p. 230-242.
60. Nora, E.P., et al., *Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization*. *Cell*, 2017. **169**(5): p. 930-944 e22.
61. Rao, S.S.P., et al., *Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains*. *Cell*, 2017. **171**(2): p. 305-320 e24.
62. Shlyueva, D., G. Stampfel, and A. Stark, *Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions*. *Nat Rev Genet*, 2014. **15**(4): p. 272-86.
63. de Laat, W. and D. Duboule, *Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes*. *Nature*, 2013. **502**(7472): p. 499-506.
64. Lupianez, D.G., et al., *Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions*. *Cell*, 2015. **161**(5): p. 1012-1025.
65. Hnisz, D., et al., *Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods*. *Science*, 2016. **351**(6280): p. 1454-1458.
66. Nozawa, R.S. and N. Gilbert, *RNA: Nuclear Glue for Folding the Genome*. *Trends Cell Biol*, 2019. **29**(3): p. 201-211.

67. Yang, L., et al., *lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 598-602.
68. Gerstberger, S., M. Hafner, and T. Tuschl, *A census of human RNA-binding proteins*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(12): p. 829-45.
69. Nishida, K., et al., *RNA Binding Proteins and Genome Integrity*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
70. Khorkova, O., J. Hsiao, and C. Wahlestedt, *Basic biology and therapeutic implications of lncRNA*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 15-24.
71. Lai, F., et al., *Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription*. Nature, 2013. **494**(7438): p. 497-501.
72. Tan, J.Y., et al., *cis-Acting Complex-Trait-Associated lincRNA Expression Correlates with Modulation of Chromosomal Architecture*. Cell Rep, 2017. **18**(9): p. 2280-2288.
73. Li, Y., et al., *TRInc: a comprehensive database for human transcriptional regulatory information of lncRNAs*. Brief Bioinform, 2021. **22**(2): p. 1929-1939.
74. Krijger, P.H.L., et al., *4C-seq from beginning to end: A detailed protocol for sample preparation and data analysis*. Methods, 2020. **170**: p. 17-32.
75. Tseng, Y.Y., et al., *PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase*. Nature, 2014. **512**(7512): p. 82-6.
76. Cho, S.W., et al., *Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element*. Cell, 2018. **173**(6): p. 1398-1412 e22.
77. Chiang, T.W., et al., *CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24356.
78. Gibb, E.A., et al., *Human cancer long non-coding RNA transcriptomes*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25915.
79. Hrdlickova, B., et al., *Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(10): p. 1910-1922.
80. Dickel, D.E., et al., *Ultraconserved Enhancers Are Required for Normal Development*. Cell, 2018. **172**(3): p. 491-499 e15.
81. Mushimiyimana, I., et al., *Genomic Landscapes of Noncoding RNAs Regulating VEGFA and VEGFC Expression in Endothelial Cells*. Mol Cell Biol, 2021. **41**(7): p. e0059420.
82. Ding, M., et al., *Enhancer RNAs (eRNAs): New Insights into Gene Transcription and Disease Treatment*. J Cancer, 2018. **9**(13): p. 2334-2340.
83. Yang, M.G., et al., *Characterization of sequence determinants of enhancer function using natural genetic variation*. Elife, 2022. **11**.
84. Harismendy, O., et al., *9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response*. Nature, 2011. **470**(7333): p. 264-8.
85. Li, Y., et al., *CRISPR reveals a distal super-enhancer required for Sox2 expression in mouse embryonic stem cells*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114485.