



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
ΠΜΣ Τοξικολογία



**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ
ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ microRNA ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΕ
ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ**

ΤΣΙΛΟΦΥΤΗ ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2021



University of Thessaly
Biochemistry and Biotechnology
MSc Toxicology



Characterization of diagnostic dynamic potential of tumor suppressing microRNAs in cancer with bioinformatic and experimental approaches

Tsilofyti Maria

Larissa 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αντώνιος Γιακουντής (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτρης Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:.....	10
1.1 Καρκίνος του στομάχου	10
1.1.1 Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου (GC)	10
1.1.1.1 Ανατομική κατηγοριοποίηση του GC	12
1.1.1.2 Ιστολογική κατηγοριοποίηση του GC	12
1.1.1.3 Μοριακή ταξινόμηση του GC	14
1.1.1.4 Διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου	16
1.2 Μη κωδικοποιητικά RNAs	17
1.2.1 Long non – coding RNAs	18
1.2.2 Micro RNAs.....	19
1.2.2.1 Βιογένεση και τρόπος δράσης των miRNA.....	20
1.2.2.2 Ο ρόλος των miRNA στον καρκίνο του στομάχου	22
1.2.2.3 Τα miRNAs ως διαγνωστικό εργαλείο	25
2. ΣΚΟΠΟΣ	29
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	30
3.1 Υλικά.....	30
3.2 Μέθοδοι.....	30
3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση	30
3.2.2 Πειραματική ανάλυση.....	34
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
4.1 Εκπαίδευση αλγορίθμου ROC.....	36
4.2 Αξιολόγηση της διαγνωστικής ικανότητας σε ανεξάρτητα δεδομένα καρκινικών βιοψιών.....	39
4.3 Εξειδίκευση της διάγνωσης μεταξύ των σταδίων του γαστρικού καρκίνου	42
4.4 Ικανότητα διάκρισης μεταξύ παρακαρκινικών ιστών από ιστολογικά σχετιζόμενους τύπους καρκίνου	45
4.5 Ικανότητα διάκρισης μεταξύ μη σχετιζόμενων καρκινικών και παρακαρκινικών ιστών	46
4.6 Έλεγχος και σύγκριση της έκφρασης των miRNAs σε βιοψίες υγιών και φυσιολογικών ανήλικων ιστών	48

.....	49
4.7 Ανίχνευση των επιλεγμένων miRNAs στα σωματικά υγρά	49
4.8 Επαλήθευση των βιοπληροφορικών αποτελεσμάτων με stem loop qPCR	51
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

Πίνακας 1 Ποσότητες αντιδραστηρίων στην stem loop RT.....	35
Πίνακας 2 Σύσταση Stem loop qPCR αντίδρασης.....	35
Πίνακας 3 Αρχική υπογραφή miRNA και οι τιμές AUC	39
Πίνακας 4 Επιλεγμένα miRNAs από το παρόν στάδιο της ανάλυσης.....	46
Πίνακας 5 Τελική υπογραφή miRNAs.....	48
Εικόνα 1 Περιστατικά καρκίνων παγκοσμίως για το 2020	10
Εικόνα 2 Θάνατοι από καρκίνο το έτος 2020	11
Εικόνα 3 Περιστατικά (μπλε) και θνησιμότητα (κόκκινο) μεταξύ των δύο φύλων.....	11
Εικόνα 4 Τύποι αδενοκαρκινώματος κατά την κατηγοριοποίηση Lauren	13
Εικόνα 5 Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου	16
Εικόνα 6 Ποσοστό κωδικών και μη κωδικών περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος.....	17
Εικόνα 7 Υποκυτταρικός εντοπισμός lncRNAs και συσχέτιση με τη λειτουργία τους.....	18
Εικόνα 8 Βιογένεση και τρόπος δράσης των miRNA.....	21
Εικόνα 9 Μονοπάτι ενεργοποίησης του OncomiR-17-92.....	23
Εικόνα 10 Μονοπάτι και μηχανισμός δράσης του ογκοκατασταλτικού miR-34s σε συνεργασία με την p53	24
Εικόνα 11 Παρουσία νουκλεϊκών οξέων, συμπεριλαμβανωμένων των miRNAs στα βιολογικά υγρά	26
Εικόνα 12Αναπαράσταση των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων ποικίλης κυτταρικής προέλευσης και παρουσίαση των περιεχομένων τους.	27
Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση σχηματισμού και απελευθέρωσης των εξωσωμάτων	28
Εικόνα 14 Βιοπληροφορική πορεία	33
Εικόνα 15 Stem loop qPCR	34
Εικόνα 16 Α. Η καμπύλη ROC για το miR_13 Β. Καμπύλες ευαισθησίας και ειδικότητας του miR_13 C & D. κατανομή της κανονικοποιημένης έκφρασης σε υγιείς και καρκινικούς ιστούς του miR_13 με καμπύλη και γράφημα διασποράς αντίστοιχα	37
Εικόνα 17 Διάγραμμα Venn με την κατανομή των miRNAs ανά ανάλυση	38
Εικόνα 18 Σύγκριση τυχαία επιλεγμένων, ογκοεπαγωγικών και ογκοκατασταλτικών miRNAs ανά μεθοδολογία. Α. E-GEOD-78775 Β. GSE26595 C. GSE28700 D. STAD.....	40
Εικόνα 19 Διάγραμμα Venn με την κατανομή των miRNAs ανά dataset	42
Εικόνα 20 Θερμικός χάρτης απεικόνισης επιπέδων έκφρασης των miRNAs στα στάδια του γαστρικού καρκίνου.....	43
Εικόνα 22 Εύρος απόκλισης του miR_137 ανά στάδιο	44
Εικόνα 21 Εύρος απόκλισης του miR_143 ανά στάδιο	44
Εικόνα 23 Θερμικός χάρτης του εύρους απόκλισης της έκφρασης σε σχετιζόμενους παρακαρκινικούς ιστούς.....	45
Εικόνα 24 Θερμικός χάρτης του εύρους απόκλισης της έκφρασης των miRNAs σε 19 διαφορετικούς παρακαρκινικούς ιστούς συγκρινόμενα με τον καρκινικό γαστρικό ιστό	47
Εικόνα 25 Θερμικός χάρτης του εύρους απόκλισης της έκφρασης των επιλεγμένων miRNAs μεταξύ του γαστρικού καρκινικού - παρακαρκινικού ιστού και υγιών ιστών.....	49

Εικόνα 26 Θερμικός χάρτης της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στα σωματικά υγρά.....	50
Εικόνα 28 Επίπεδα έκφρασης των ογκοκατεσταλμένων miRNAs απεικονισμένα ως εύρος απόκλισης από HFE145.....	52
Εικόνα 27 Επίπεδα έκφρασης των ογκοεπαγόμενων miRNAs απεικονισμένα ως εύρος απόκλισης από HFE145.....	52
Εικόνα 29 Μέσο κόστος για ασθενή με γαστρικό καρκίνο με βάση το στάδιο της νόσου στις ΗΠΑ.....	53
Εικόνα 30 Καμπύλες ROC για τους βιοχημικούς βιοδείκτες CEA & CA19-9 στον καρκίνο του στομάχου.....	54
Εικόνα 31 Μείωση της έκφρασης των miR_143 και miR_195 στα καρκινικά γαστρικά κύτταρα έναντι των φυσιολογικών	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μια από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου, καθώς είναι πέμπτος σε συχνότητα παγκοσμίως ενώ σε θνησιμότητα καταλαμβάνει τη τρίτη θέση. Η δυσαναλογία μεταξύ εμφάνισης περιστατικών και θνησιμότητας οφείλεται στην καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, όταν ήδη έχει εκκινήσει λεμφική διείσδυση ή μετάσταση σε απομακρυσμένους ιστούς. Ο λόγος για τον οποίο ο γαστρικός καρκίνος δεν μπορεί να διαγνωστεί στα αρχικά στάδια της νόσου, είναι ότι η πλέον αξιόπιστη μέθοδος διάγνωσης είναι η γαστροσκόπηση, που αφορά έναν επεμβατικού τύπου τρόπο διάγνωσης, ενώ η μοριακή διάγνωση με βιοχημικούς καρκινικούς βιοδείκτες δεν εμφανίζει εξειδίκευση ως προς τον γαστρικό καρκίνο. Για αυτό το λόγο χρειάζεται να βρεθούν νέοι, μοριακοί και μη επεμβατικού τύπου αξιόπιστοι βιοδείκτες, εξειδικευμένοι ως προς το γαστρικό καρκίνο και οι οποίοι θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Μέσα από αυτή την πτυχιακή εργασία επιδιώκουμε να βρούμε ογκοκατεσταλμένα miRNAs που εμφανίζουν διαφορετική έκφραση στην περίπτωση του γαστρικού καρκίνου, τα οποία θα εντοπιστούν μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί βιοδείκτες. Στη συνέχεια θα επαληθεύσουμε πειραματικά τα αποτελέσματα για τα ογκοκατεσταλμένα αλλά και ογκοεπαγώμενα miRNAs με μοριακές μεθόδους.

ABSTRACT

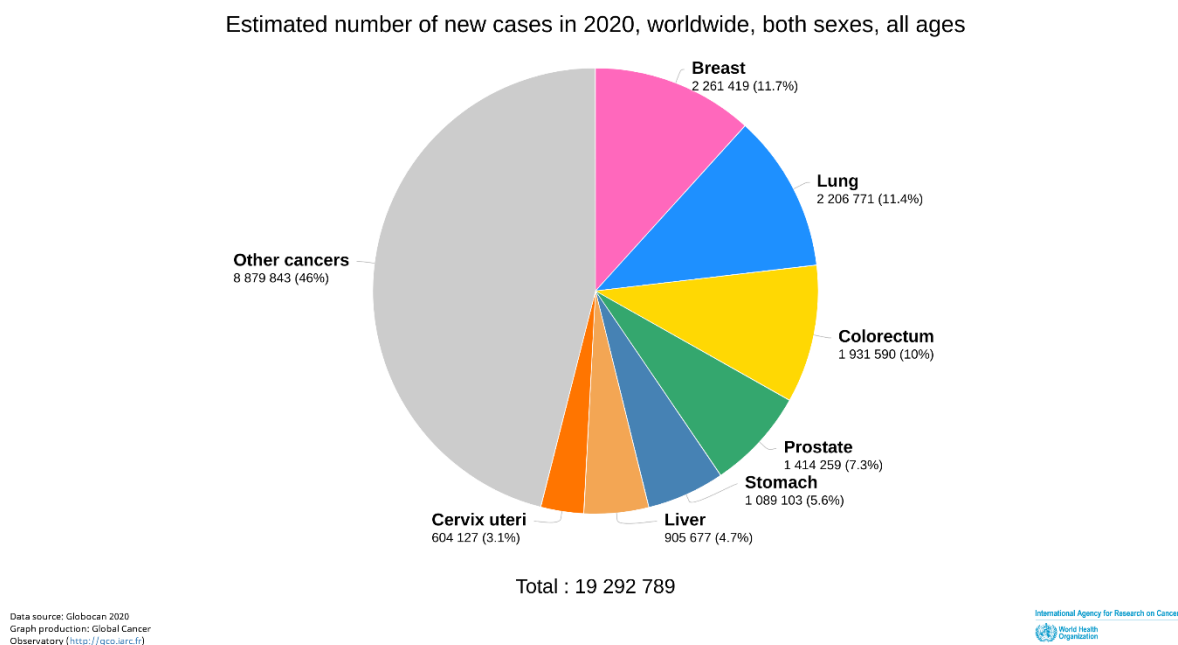
Gastric cancer is one of the most common cancers worldwide, while it takes the fifth place as incidents and third place for the deaths caused by it. The difference between incidents and deaths is based to the late diagnosis, while the tumor is already at the metastatic phase. This happens because the only diagnostic tool that is accurate is gastroscopy, a pretty much unpleasant method. As for as the biochemistry cancer biomarkers, they can show the presence of tumor, but they cannot specify the tissue of origin. So, the medical community is in need for new, minimally invasive and accurate diagnostic tools, which are going to be specific for gastric cancer. Through this dissertation, we seek to find tumor suppressor miRNAs with differential expression between gastric cancer cells and normal gastric cells. The miRNAs are going to be detected with bioinformatics analysis. The aim of this project is to find miRNAs to be used as cancer biomarkers. As final step of the analysis is set the experimental verification of the previous results through molecular methods, about suppressing miRNAs and oncogenic miRNAs.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

1.1 Καρκίνος του στομάχου

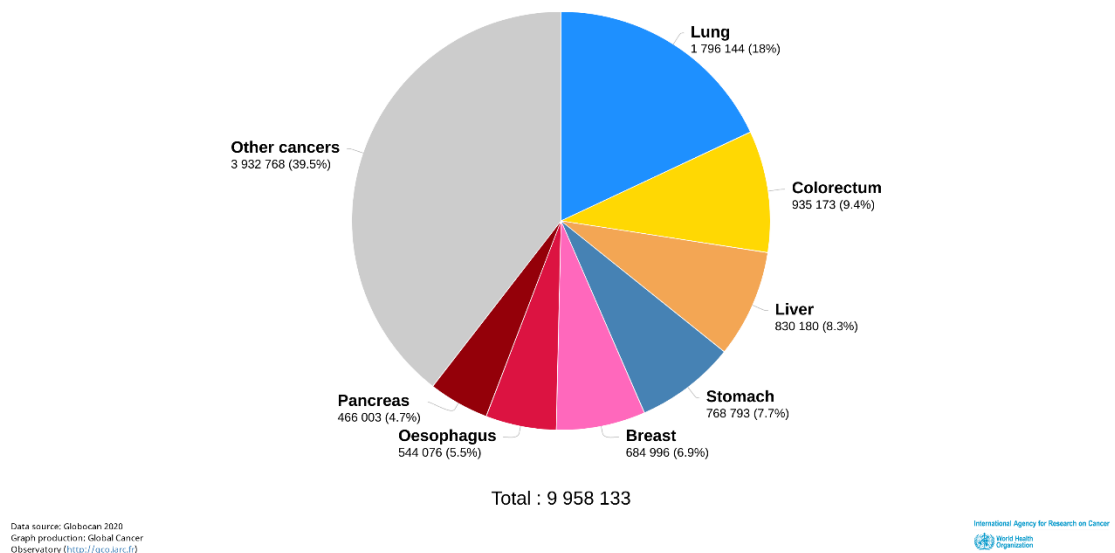
1.1.1 Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου (GC)

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί την τέταρτη σε συχνότητα κακοήθεια παγκοσμίως, με πάνω από 1.089.103 νέα περιστατικά, σύμφωνα με τα στατιστικά δεδομένα του 2020. Αντιθέτως, ανήκει στη δεύτερη αιτία θανάτου από κακοήθειες με πάνω από 700.000 θανάτους ετησίως[1], ενώ το 2020 ο αριθμός των θανάτων έφτασε τους 768.793 (Εικόνα 1 & 2) (<https://gco.iarc.fr/today/home>). Η έντονη αυτή απόκλιση μεταξύ συχνότητας και θνησιμότητας από γαστρικό καρκίνο, οφείλεται στην καθυστερημένη διάγνωσή του. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ο καρκίνος του στομάχου γίνεται αντιληπτός σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, γεγονός που συνεπάγεται δυσμενή διάγνωση, θεραπεία ανακουφιστικού τύπου και μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης [2]. Τα περισσότερα νέα περιστατικά καρκίνου του στομάχου απαντώνται στις χώρες της Ασίας, και συγκεκριμένα στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Κορέα [3], φτάνοντας το 819.944 νέα περιστατικά το 2020 (<https://gco.iarc.fr/today/home>). Γενικότερα, τα περισσότερα κρούσματα εντοπίζονται στην Ανατολική Ασία, στην Ανατολική Ευρώπη και στην Κεντρική και Νότια Αμερική [4].



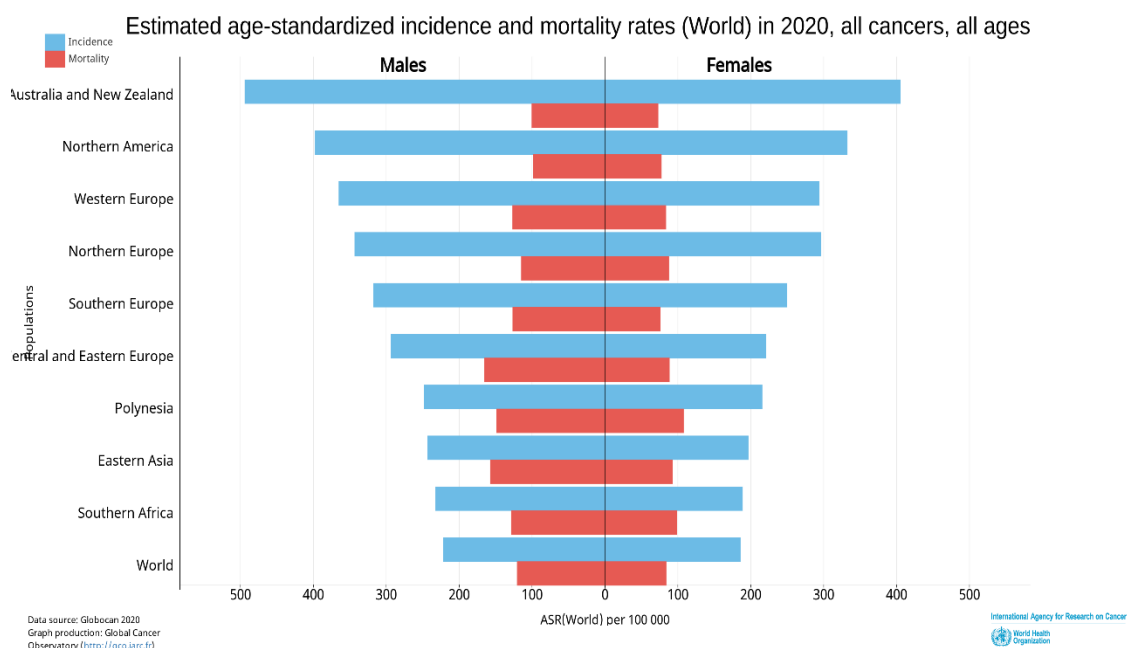
Εικόνα 1 Περιστατικά καρκίνων παγκοσμίως για το 2020

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



Εικόνα 2 Θάνατοι από καρκίνο το έτος 2020

Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων του γαστρικού καρκίνου, ανήκει στην περίπτωση του αδενοκαρκινώματος (90%) που προκύπτει από τους αδένες, το πιο επιφανειακό στρώμα του στομάχου, ή από το βλεννογόνο. Άλλες κατηγορίες γαστρικού καρκίνου είναι τα λεμφώματα και τα λειομυοσαρκώματα [5].



Εικόνα 3 Περιστατικά (μπλε) και θνησιμότητα (κόκκινο) μεταξύ των δύο φύλων

Τα αδενοκαρκινώματα με τη σειρά τους, διαχωρίζονται στα εγγύς και απομακρυσμένα από την καρδιά (cardia – non cardia), παρουσιάζοντας ετερογένεια μεταξύ των δύο φύλων, των διαφορετικών φυλών και των ηλικιακών ομάδων (Εικόνα 3) (<https://gco.iarc.fr/today/home>). Το εγγύς αδενοκαρκίνωμα, εμφανίζεται πιο συχνά στους άνδρες από ότι στις γυναίκες με αναλογία 2:1[6], ενώ τα περιστατικά είναι αρκετά περισσότερα στους μαύρους και στις χαμηλά κοινωνικο – οικονομικές ομάδες στις υπό ανάπτυξη χώρες[7]. Οι περισσότερες καταγραφές γαστρικού καρκίνου γίνονται σε άτομα μεγάλης ηλικίας, με την πλειοψηφία να συγκεντρώνεται μεταξύ των 50 – 70 χρόνων [4]. Το απομακρυσμένο αδενοκαρκίνωμα, από την άλλη πλευρά, εμφανίζεται πέντε φορές πιο συχνά στους άντρες από ότι στις γυναίκες και δύο φορές πιο συχνά στους λευκούς έναντι των μαύρων [8]. Βλέπουμε, πως ανάλογα με τη θέση που εντοπίζεται ο όγκος στο στομάχο, αλλάζουν και τα στατιστικά εμφάνισης της νόσου, γεγονός που αποδεικνύει ότι το εγγύς και απομακρυσμένο αδενοκαρκίνωμα είναι δύο διακριτές βιολογικές οντότητες [4].

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει παρατηρηθεί μια σταδιακή μείωση στα ποσοστά εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου παγκοσμίως [1]. Αυτή η μείωση μπορεί να ερμηνευθεί ως φυσικό επακόλουθο μιας καλύτερης υγιεινής, βελτίωσης των διατροφικών συνηθειών, αυξημένης πρόσληψης βιταμινών και μείωσης της μόλυνσης με το βακτήριο του πυλωρού [9].

1.1.1.1 Ανατομική κατηγοριοποίηση του GC

Η ανατομική κατηγοριοποίηση του καρκίνου του στομάχου προκύπτει από τη θέση όπου εδράζεται ο όγκος. Έτσι, έχουμε τα εγγύς (cardia) και τα απομακρυσμένα (non – cardia) αδενοκαρκινώματα[10]. Τα εγγύς αδενοκαρκινώματα, ονομάζονται αλλιώς και ως γαστρο – οισοφαγικά, διότι εντοπίζονται κοντά στον γαστρο – οισοφαγικό σωλήνα. Για να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους, όταν το επίκεντρο του όγκου εντοπίζεται στον οισοφάγο, στην γαστρο – οισοφαγική σχισμή ή στα ανώτερα πέντε εκατοστά του στομάχου κατηγοριοποιείται ως οισοφαγικός καρκίνος, ενώ όταν το επίκεντρο του στομάχου εντοπίζεται πάνω από τα πέντε εκατοστά του στομάχου, ή δεν εκτείνεται προς την γαστρο – οισοφαγική σχισμή, ο όγκος κατηγοριοποιείται ως γαστρικός [11].

1.1.1.2 Ιστολογική κατηγοριοποίηση του GC

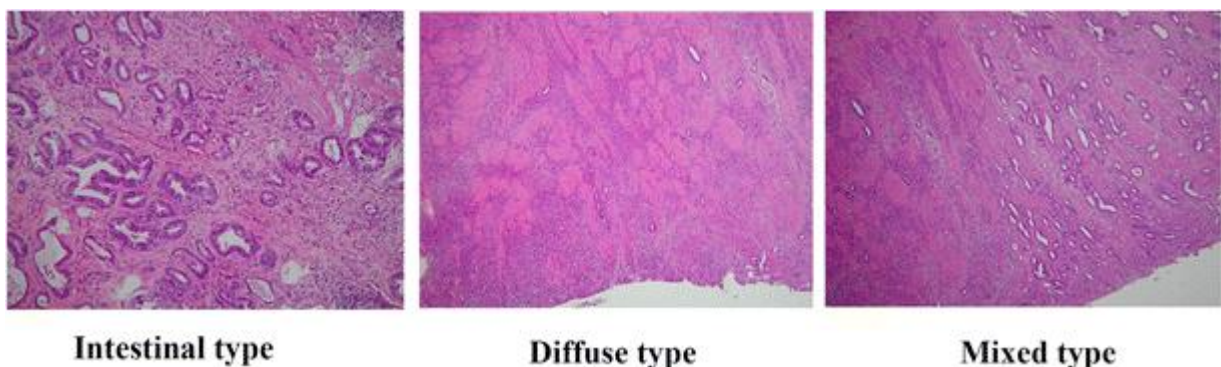
Οι περισσότεροι τύποι γαστρικού καρκίνου αφορούν περιπτώσεις αδενοκαρκινώματος. Τα αδενοκαρκινώματα μεταξύ τους εμφανίζουν μια έντονη ετερογένεια όσον αφορά την ανάπτυξη, την αρχιτεκτονική δομή τους, την κυτταρική διαφοροποίηση καθώς και το μοριακό υπόβαθρο [10]. Αυτή η ετερογένεια εξηγεί και την ποικιλία ως προς την κατηγοριοποίησή τους με βάση την ιστολογία. Πλέον, η επικρατέστερη κατηγοριοποίηση είναι κατά Lauren.

Κατηγοριοποίηση κατά Lauren

Σύμφωνα με τα κριτήρια που έθεσε ο Lauren, υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αδενοκαρκινώματος του στομάχου, ο εντερικός (intestinal) και ο διάχυτος (diffuse) τύπος, ενώ επιπλέον αναγνωρίζει και μια τρίτη κατηγορία ως ενδιάμεσος τύπος (Εικόνα 4) [12, 13]. Οι συχνότητες εμφάνισης του εκάστοτε υπότυπου έχουν υπολογιστεί ότι είναι 54% για τον εντερικό τύπο, 32% για τον διάχυτο και 15% για τον ενδιάμεσο [14].

Στον εντερικό τύπο, τα καρκινικά κύτταρα είναι διατεταγμένα σε σωληνοειδείς ή αδενικούς σχηματισμούς και συχνά σχετίζονται με εντερική μεταπλασία [15]. Αυτός ο τύπος καρκίνου σχετίζεται με λεμφική ή αγγειακή εισβολή και οι βλάβες είναι διάσπαρτες σε απομακρυσμένες θέσεις. Εμφανίζεται κυρίως σε άντρες μεγαλύτερης ηλικίας επηρεάζοντας το άνω του στομάχου, ενώ παρουσιάζει καλύτερη πρόγνωση [16]. Σε αντίθεση με τον εντερικό τύπο, τα καρκινικά κύτταρα του διάχυτου τύπου δεν προσκολλώνται και μπορούν να διεισδύσουν στο στρώμα του στομάχου ως μεμονωμένα κύτταρα ή μικρές ομάδες, δημιουργώντας έναν πληθυσμό μη συνεκτικών διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων. Εμφανίζεται πιο συχνά σε γυναίκες πιο μικρής ηλικίας συγκριτικά με τον εντερικό τύπο [17]. Η περιτοναϊκή μετάσταση του διάχυτου τύπου καρκίνου, εντοπίζεται στο σώμα του στομάχου και έχει χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τον εντερικό τύπο [13].

Η αιτιολογία και η παθογένεση των δύο τύπων καρκίνου βασίζεται τόσο σε περιβαλλοντικούς όσο και σε γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες (μεθυλίωση του DNA, τροποποίηση ιστονών και ανασχηματισμός της χρωματίνης). Ο εντερικός τύπος καρκίνου, επηρεάζεται περισσότερο από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, ένας εκ των οποίων είναι η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* [16]. Η διαδικασία πριν τη νεοπλασία είναι αναστρέψιμη, έτσι με την εκρίζωση του βακτηρίου του πυλωρού μειώνονται οι πιθανότητες της γαστρικής ατροφίας και της εντερικής μεταπλασίας [18], χωρίς όμως να υπόσχεται πλήρη αποφυγή του κινδύνου



Εικόνα 4 Τύποι αδενοκαρκινώματος κατά την κατηγοριοποίηση Lauren

για γαστρικό καρκίνο [19]. Ο διάχυτος τύπος αδenoκαρκινώματος προέρχεται από το γαστρικό βλεννογόνο και σχετίζεται με γαστρίτιδα, άρα επηρεάζεται λιγότερο από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες χωρίς να αποκλείεται η ανάπτυξή του από τη μόλυνση του βακτηρίου του πυλωρού [20]. Σε αντίθεση με τον εντερικό τύπο αδenoκαρκινώματος, ο διάχυτος τύπος προκαλείται ως αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής παρακάμπτοντας την γαστρική ατροφία και την εντερική μεταπλασία [21]. Μελέτες δείχνουν πως το επίπεδο μεθυλίωσης του DNA στα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου συνδέεται στενά με τη γαστρίτιδα που προκαλείται από τη μόλυνση με το βακτήριο του πυλωρού [22].

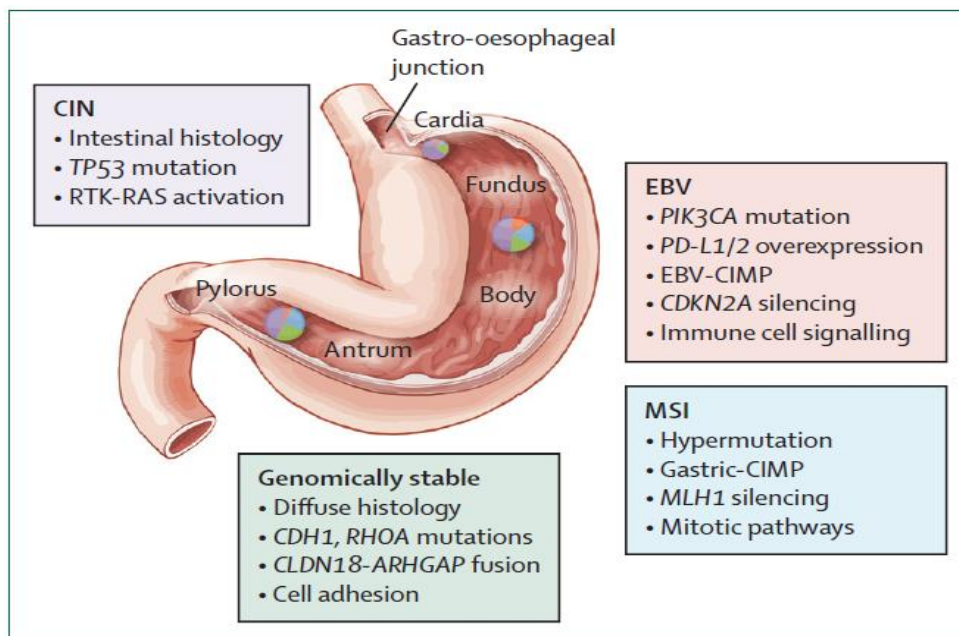
1.1.1.3 Μοριακή ταξινόμηση του GC

Η διεθνής κοινοπραξία The Cancer Genome Atlas (TCGA) εξετάζοντας 295 περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, ταυτοποίησε τέσσερις διαφορετικούς υπότυπους (Εικόνα 5) χρησιμοποιώντας βιοπληροφορικές αναλύσεις γονιδιωματικών δεδομένων.

- I. **EBV⁺ - υπότυπος θετικός στον ιό Epstein Barr:** Το 9 – 10% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου είναι θετικοί για τον ιό Epstein Barr. Η πλειοψηφία αφορά άνδρες πάσχοντες (81%) με τον όγκο να εδράζεται στο θόλο ή το σώμα του στομάχου [10]. Ο ιός EBV είναι υπεύθυνος για την πρόκληση της ασθένειας της λοιμώδους μονοπυρήνωσης και σχετίζεται με την εμφάνιση αρκετών τύπων καρκίνου [23]. Το 80% των EBV⁺ περιπτώσεων καρκίνου έχουν κοινή μετάλλαξη στο γονίδιο PI3KCA το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PI3Kα, η οποία συμμετέχει στην κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση και την επιβίωσή τους [24]. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες θετικές περιπτώσεις στον EBV εμφανίζουν υψηλό ποσοστό υπερμεθυλίωσης του DNA, ενώ συγκεκριμένα ο υποκινητής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου CDKN2A βρέθηκε υπερμεθυλιωμένος σε όλα τα θετικά δείγματα για τον EBV [25].
- II. **Υπότυπος αστάθειας μικροδορυφόρων (MSI):** Η αστάθεια μικροδορυφόρων είναι ένας από τους πιο κύριους φαινότυπους της γονιδιωματικής αστάθειας που έχει συσχετιστεί με περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου και φαίνεται να εντοπίζεται πιο συχνά σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας [25]. Η αστάθεια μικροδορυφόρων αντιπροσωπεύει το 21% των όγκων. Η κύρια αιτία αστάθειας μικροδορυφόρων στον καρκίνο του στομάχου σχετίζεται με την υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MLH1, που εμπλέκεται στο σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων του DNA [26]. Ανάλογα με το επίπεδο της αστάθειας, οι περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου μπορούν να διαχωριστούν επιπλέον σε υψηλής και χαμηλής αστάθειας

μικροδορυφόρων (MSI – H & MSI – L) είτε σε MSS σε περίπτωση που δεν παρατηρείται αστάθεια μικροδορυφόρων[27]. Ο φαινότυπος MSI – H έχει συσχετιστεί περισσότερο με τον εντερικό τύπο αδενοκαρκινώματος και έχει καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τους άλλους δύο τύπους[28]. Η αστάθεια μικροδορυφόρων επιπλέον, έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA καθώς επίσης και στη σηματοδότηση της απόπτωσης [29].

- III. **Υπότυπος γονιδιωματικής σταθερότητας (GS):** Αυτός ο υπότυπος αντιπροσωπεύει το 20% των περιπτώσεων που εξετάστηκαν και συσχετίστηκαν με αδενοκαρκινώματα διάχυτου τύπου. Ανιχνεύεται σε νεαρότερους ασθενείς, ενώ φαίνεται να έχει χαμηλότερη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο TP53 και χαμηλό βαθμό ανευπλοειδίας συγκριτικά με τους χρωμοσωμικά ασταθείς τύπους γαστρικού καρκίνου [25]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CDH1 έχουν συσχετιστεί με την κληρονόμηση του διάχυτου τύπου καθώς επίσης και με δυσμενή φαινότυπο και κλινικά αποτελέσματα [30]. Αντιθέτως, η μετάλλαξη στο γονίδιο RHOA οδηγεί στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες επάγοντας μορφολογικές αλλαγές και κυτταρική μετανάστευση, γεγονότα σημαντικά για την ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον, το μονοπάτι σηματοδότησης RHOA μπορεί να αποτελέσει νέους θεραπευτικούς στόχους του καρκίνου του στομάχου [31] [32].
- IV. **Υπότυπος Χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN):** Το 50% των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου έχει κατηγοριοποιηθεί ως χρωμοσωμικά ασταθείς, φαινότυπος που σχετίζεται περισσότερο με τον γαστρο – οισοφαγικό καρκίνο (cardia) [25]. Πάνω από το 70% των περιπτώσεων έχουν συνδυαστεί με μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 ακολουθούμενη από μεταλλάξεις στα γονίδια *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA*, *RNF43*, *ERBB2* και *APC* . Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 έχουν συσχετιστεί με προκαρκινικές αλλοιώσεις, ενώ η έλλειψη λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 πιθανολογείται να αναπαράγει ένα πρώιμο στάδιο της καρκινογένεσης [33]. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του υπότυπου, είναι η υψηλή συχνότητα μεταλλαγής σε γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς κινασών τυροσίνης, που οδηγούν στη μη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη. Πολλές από αυτές τις ιδιότητες αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους, ιδιαίτερα αναστολέων κυκλινό – εξαρτώμενων κινασών [25].



Εικόνα 5 Μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

1.1.1.4 Διάγνωση και θεραπεία του γαστρικού καρκίνου

Τα κύρια συμπτώματα που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο του στομάχου είναι η δυσπεψία, η ανορεξία ή πρώιμος κορεσμός, η απώλεια βάρους και το κοιλιακό άλγος. Στις περιπτώσεις όπου ο όγκος εντοπίζεται στα ανώτερα τμήματα του στομάχου ή στη γαστρο – οισοφαγική διασταύρωση, τότε στα συμπτώματα προστίθεται και η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση. Όταν μιλάμε για αιμορραγικό καρκίνο, τότε παρατηρείται και αναιμία. Εάν υπάρχουν συμπτώματα τη στιγμή της διάγνωσης, τότε ο καρκίνος συνήθως βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο[34]. Ένας από τους πιο κοινούς τρόπους με τους οποίους επιτυγχάνεται η διάγνωση του καρκίνου του στομάχου είναι η γαστροσκόπηση, κατά τη διάρκεια της οποίας εντοπίζεται η θέση και ο μακροσκοπικός τύπος του όγκου και λαμβάνονται βιοψίες για την ιστολογική επιβεβαίωση [35]. Εκτός από τη γαστροσκόπηση, ο γαστρικός καρκίνος μπορεί να διαγνωστεί με λιγότερο επεμβατικό τρόπο, με τη χρήση βιοχημικών και γενετικών βιοδεικτών[36]. Οι βιοδείκτες έχουν ως στόχο την όσο το δυνατόν πιο πρώιμη διάγνωση του καρκίνου, ιδανικά στα προκαρκινικά στάδια. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοχημικοί βιοδείκτες είναι ο Carcinoembryonic antigen και ο cancer antigen 19 – 9, οι οποίοι όμως δεν έχουν υψηλή εξειδίκευση στην διάγνωση του γαστρικού καρκίνου [37]. Οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται για τον καρκίνο του στομάχου είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, η χημειοθεραπεία και η ραδιοθεραπεία [1]. Ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου, το οποίο ταυτοποιείται κατά την ιστολογική επιβεβαίωση της βιοψίας, ο ασθενής λαμβάνει θεραπεία αντιμετώπισης του όγκου ή συμπτωματικής ανακούφισης, στην περίπτωση που ο όγκος βρίσκεται σε αρκετά προχωρημένο στάδιο. Κάθε αντιμετώπιση έχει ως στόχο

την αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών και τη βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης [38].

1.2 Μη κωδικοποιητικά RNAs

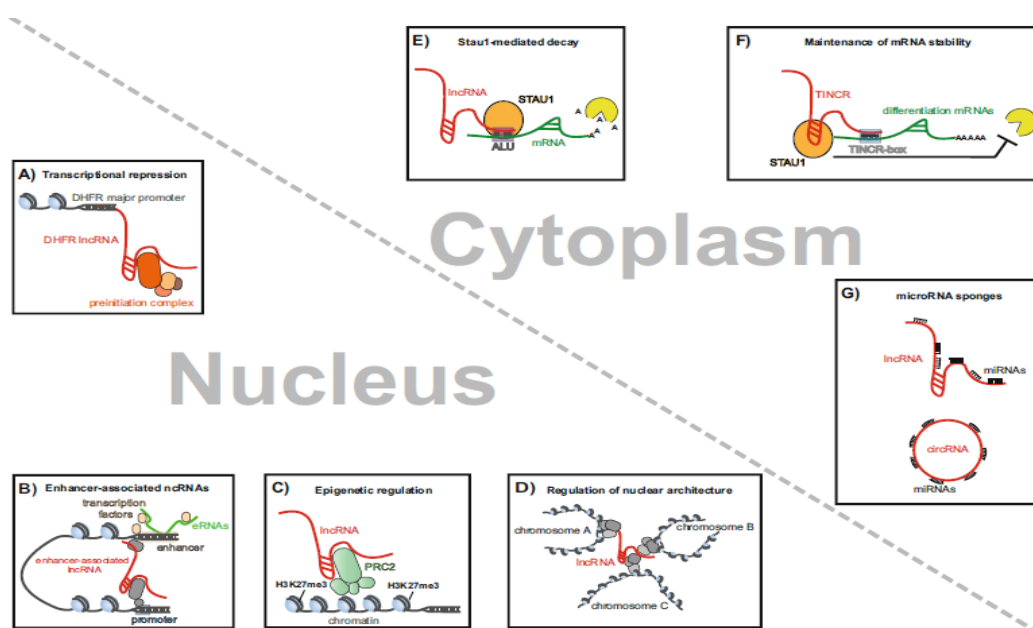
Για δεκαετίες, οι επιστήμονες είχαν εστιάσει αποκλειστικά στο τμήμα του DNA που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες, και εφόσον η λειτουργία των μη κωδικοποιητικών αλληλουχιών του DNA δεν ήταν κατανοητή, τους αποδόθηκε ο όρος “junk DNA” [39]. Η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, συνέβαλε στην αποκρυπτογράφηση της λειτουργίας των μη κωδικών περιοχών του DNA [40, 41], αποκαλύπτοντας πως μόλις το 2% του συνολικού γονιδιώματος κωδικοποιείται σε κάποια πρωτεΐνη (Εικόνα 6) [39]. Οι περιοχές που μεταγράφονται σε λειτουργικού τύπου RNA αλλά δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη ονομάστηκαν non – coding RNAs και λειτουργούν άμεσα ως δομικά, ρυθμιστικά ή καταλυτικά μόρια. Τα πιο γνωστά από τα ncRNAs αποτελούν τα tRNAs, rRNAs που παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση και συγκεκριμένα στη μετάφραση των mRNA. Τα small nuclear RNA (snRNAs) συμμετέχουν στην ωρίμανση του mRNA ενώ τα small nucleolar RNA (snoRNAs) στην τροποποίηση του rRNA [42]. Τα ncRNAs χωρίζονται αρχικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση το μέγεθός τους: small non coding RNAs (<200nt) και long non coding RNAs(>200nt)[43]. Τα μικρά μη κωδικά μόρια αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια στην οποία ανήκουν τα rRNAs, tRNAs, microRNAs, 3' UTR – derived RNAs, splicing RNAs, tiny – transcription – initiation RNAs, Antisense termini – associated short RNAs, termini – associated short RNAs, promoter – associated short RNAs. Από τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA, το rRNA και το tRNA συμβάλλουν στην κυτταρική φυσιολογία ενώ τα υπόλοιπα συμμετέχουν στη ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη [44]. Το γεγονός ότι αρκετές κατηγορίες μικρών μη κωδικοποιητικών ρυθμιστικών RNA όπως τα miRNA, συμμετέχουν στη διεξαγωγή αρκετών φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός των κυττάρων και η διαφοροποίησή τους, τα καθιστά υπεύθυνα για μια πληθώρα ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [43, 45].



Εικόνα 6 Ποσοστό κωδικών και μη κωδικών περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος.

1.2.1 Long non – coding RNAs

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA αποτελούν μια δεύτερη κατηγορία ρυθμιστικών μορίων, μεγέθους μεγαλύτερου των 200 νουκλεοτιδίων και διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά το τρόπο δράσης τους, τη λειτουργία και τη δομή τους [46]. Έχουν σημαντικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών όπως είναι η μεταγραφή, το μάτισμα και η ωρίμανση του mRNA, η μετάφραση πρωτεϊνών, ο χωροταξικός περιορισμός τους, η εξασφάλιση της διατήρησης της κυτταρικής δομής, η απόκριση από το θερμικό σοκ, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση, καθώς επίσης και η κυτταρική διαφοροποίηση [45, 47]. Τα lncRNAs μπορούν να μεταγράφονται και από τις δύο αλυσίδες του DNA, ενώ η έκφρασή τους γίνεται αμφίδρομη (bidirectional) όταν η έκφρασή ενός lncRNA και ενός γειτονικού mRNA μεταγράφου στην συμπληρωματική αλυσίδα αλληλοεπικαλύπτονται, τα lncRNA γονίδια συχνά εδρεύουν είτε μέσα σε ιντρόνια κωδικοποιητικών γονιδίων είτε μεσογονιδιακά μεταξύ δύο γονιδίων [48]. Τα lncRNAs έχουν εντοπιστεί σε μια πληθώρα ιστών, ενώ παράλληλα όπως συμβαίνει και με τα mRNAs, τα περισσότερα εκφράζονται και στον εγκέφαλο [49]. Η ρύθμιση της έκφρασης των ευκαρυωτικών γονιδίων περιλαμβάνει ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων των γονιδίων με RNA, DNA και πρωτεΐνες [50]. Η μεταγραφή των lncRNAs μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων που εμφανίζουν στενή γονιδιωματική εγγύτητα (*cis – acting regulation*), ή να στοχεύσουν απομακρυσμένες μεταγραφικές περιοχές μέσω ενεργοποίησης ή καταστολής με διάφορους μηχανισμούς [48]. Μετά τη μεταγραφή τους τα lncRNAs μπορούν να εντοπιστούν και να δράσουν είτε στον πυρήνα των κυττάρων είτε στο κυτταρόπλασμα. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των μορίων lncRNA αποτελεί έναν πρώτο δείκτη του ρυθμιστικού τους δυναμικού (Εικόνα 7)[45]. Τα lncRNA στον



Εικόνα 7 Υποκυτταρικός εντοπισμός lncRNAs και συσχέτιση με τη λειτουργία τους

πυρήνα μπορούν να δράσουν ως οδηγοί, δολώματα ή ικρίωμα για ρυθμιστικές πρωτεΐνες (πχ μεταγραφικοί παράγοντες) ώστε να επιτευχθούν οι κατάλληλες επιγενετικές τροποποιήσεις [51]. Στην περίπτωση των lncRNAs που συμπλέκονται με τη χρωματίνη, αυτά είναι υπεύθυνα για την αρχιτεκτονική και τη διαμόρφωσή της, ενώ παράλληλα μπορούν να δράσουν ως γέφυρες ώστε να επέλθουν ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Το RNA μπορεί να συνδεθεί με το DNA δημιουργώντας βρόχους που συμβάλλουν στη γονιδιακή ρύθμιση [52].

Τα κυτταροπλασματικά lncRNAs εμπλέκονται σε δύο βασικές μεταφραστικές λειτουργίες, που επηρεάζουν την παραγωγή των πρωτεϊνών, την μεταγραφική σταθερότητα και τη μετάφραση συγκεκριμένων mRNAs. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη σύνδεση του lncRNA με το mRNA - στόχο, εμποδίζοντας τη σύνδεση των RBP πρωτεϊνών (RNA Binding Proteins) που είτε προάγουν την αποσύνθεση του μορίου mRNA, είτε προάγουν ή καταστέλλουν τη μετάφραση [53]. Τα lncRNAs μπορούν να ελέγξουν την έκφραση των πρωτεϊνών παρεμποδίζοντας ή επάγοντας την αποικοδόμησή τους μέσω του συστήματος ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος [54]. Η χωρική και μοριακή διαθεσιμότητα των RBPs ρυθμίζεται επίσης από τα lncRNAs, τα οποία φαίνεται να επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική απόκριση σε επιβλαβείς παράγοντες, την ογκοεπαγωγή και τη διαδικασία διαφοροποίησης των μυϊκών κυττάρων. Τέλος, τα lncRNAs μπορούν να δεσμεύσουν τα microRNAs μειώνοντας τη διαθεσιμότητά τους στο σύμπλοκο RISC και την πρωτεΐνη αργοναύτη και ως εκ τούτου μειώνουν τη συνδεσιμότητα στα μόρια mRNA – στόχους. Με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται η μεταφραστική καταστολή που προκαλείται από τα μόρια miRNA [53]. Η διαταραχή της έκφρασής τους έχει συνδεθεί με μια πληθώρα ασθενειών, όπως είναι τα μεταβολικά σύνδρομα ακόμα και ο καρκίνος [55-57].

1.2.2 Micro RNAs

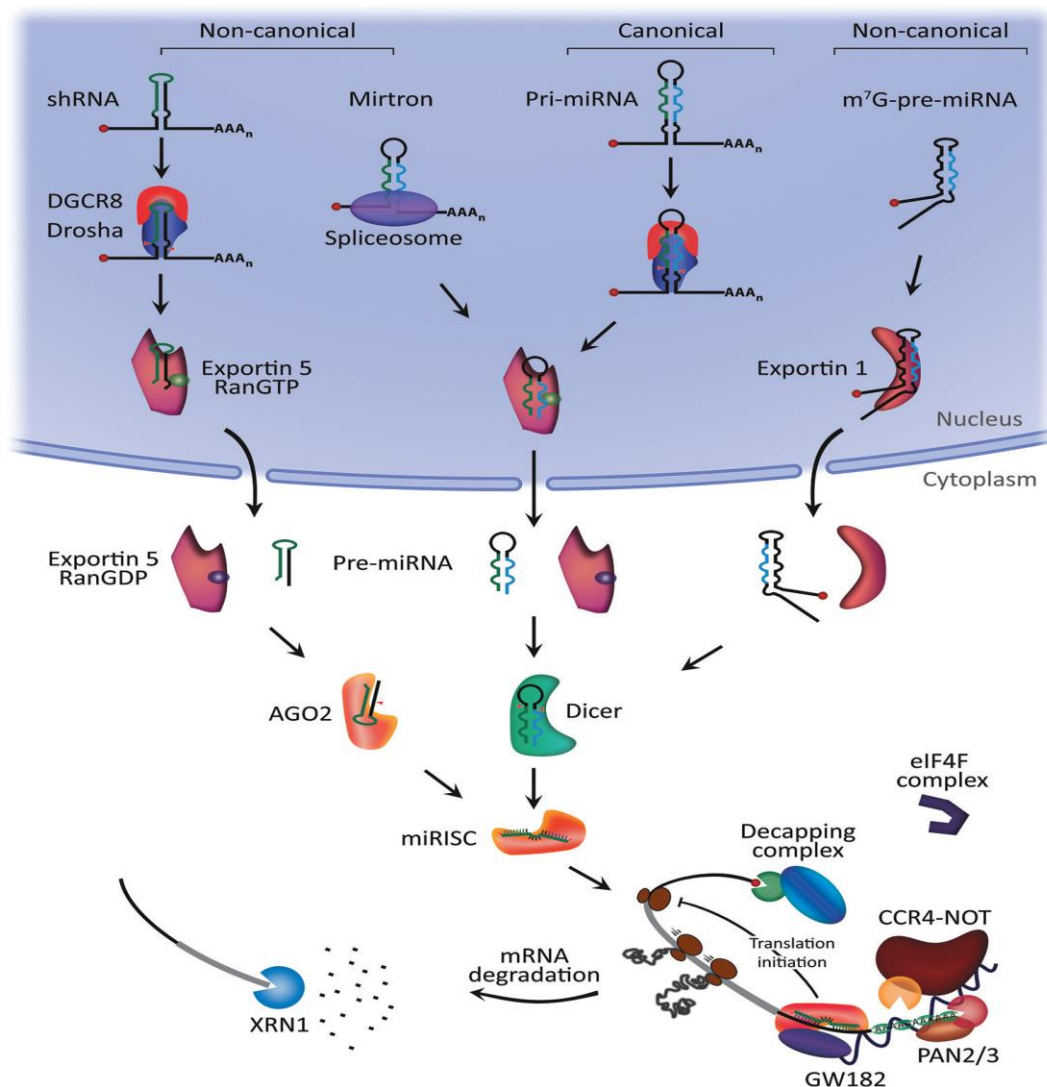
Τα micro RNAs, είναι μικρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA, με ρυθμιστικό ρόλο και μέσο όρο μήκους λειτουργικού μεταγράφου τα 22 νουκλεοτίδια. Στο γονιδίωμα εντοπίζονται σε ποικίλες θέσεις, είτε μέσα σε ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη, είτε σε αμετάφραστες περιοχές (UTR) [58]. Τα περισσότερα miRNAs κωδικοποιούνται από τμήματα DNA στα πρωταρχικά μόρια (pri – miRNA), υπόκεινται σε επεξεργασία από την οποία προκύπτουν τα πρώιμα μόρια (pre – miRNA) τα οποία τέλος μετατρέπονται στα ώριμα μόρια miRNA [59]. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα miRNA αλληλοεπιδρούν με την 3' UTR περιοχή των mRNA στόχων τους, ενώ στα θηλαστικά έχουν καταγραφεί και αλληλεπιδράσεις με την 5' UTR καθώς επίσης και με την κωδική περιοχή των γονιδίων [60, 61]. Κύρια δράση των miRNA είναι η καταστολή της έκφρασης, ενώ σε συγκεκριμένες περιπτώσεις φαίνεται να επάγει εμμέσως την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης [62].

Τα miRNAs εντοπίζονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα για να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος όσον αφορά το ρυθμό της μετάφρασης ή και της μεταγραφής των γονιδίων [63]. Τα miRNA είναι σημαντικά για τη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών, καθώς συμμετέχουν σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών. Η απορρυθμισμένη έκφρασή τους όμως, συσχετίζεται με αρκετές ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [64]. Επί προσθέτως, τα miRNA έχουν εντοπιστεί σε βιολογικά υγρά, γεγονός που τα καθιστά μη επεμβατικού τύπου βιοδείκτες για αρκετές ασθένειες ενώ δρουν και ως σηματοδοτικά μόρια για τη διεξαγωγή της διακυτταρικής επικοινωνίας [65].

1.2.2.1 Βιογένεση και τρόπος δράσης των miRNA

Τα miRNA μεταγράφονται από το ένζυμο της πολυμεράσης του RNA II ή III στο πρωταρχικό μόριο pri – miRNA το οποίο στη συνέχεια υφίσταται μια σειρά διεργασιών, αποκοπής, προσθήκης καλύπτρας και πολυαδενυλίωσης με παραπλήσιο τρόπο με ένα μόριο mRNA [66].

Η ωρίμανση του miRNA συμβαίνει κατά το ήμισυ στον πυρήνα του κυττάρου, ενώ ολοκληρώνεται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 8). Το pri – miRNA χρειάζεται δύο στάδια καταλυόμενα από ενδονουκλεάσες πριν ωριμάσει πλήρως. Κατά το πρώτο στάδιο, το pri – miRNA αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες DGCR8 και Drosha και το σύμπλοκο προσδένεται στο δίκλωνο τμήμα του μορίου που σχηματίζει μια φουρκέτα [67]. Η ενδονουκλεάση Drosha απελευθερώνει τη δομή φουρκέτας από το pri – miRNA οδηγώντας στο σχηματισμό του pre – miRNA. Το πρώιμο, πλέον, μόριο συνοδεύεται από την Εξπορτίνη 5 στο κυτταρόπλασμα, όπου θα πραγματοποιηθούν τα τελικά βήματα της ωρίμανσης [68]. Στο κυτταρόπλασμα, η δομή φουρκέτας του pre – miRNA δεσμεύεται από την πρωτεΐνη αργοναύτης (AGO) με έναν τρόπο εξαρτώμενο από το ATP [69]. Η πρωτεΐνη AGO στρατολογεί την ενδονουκλεάση DICER η οποία κόβει τη μια από τις δύο αλυσίδες που απαρτίζουν το pre – miRNA. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η επιλογή της αλυσίδας βασίζεται στη θερμοδυναμική σταθερότητα του 5' άκρου [70].



Εικόνα 8 Βιογένεση και τρόπος δράσης των miRNA

Έχουν εντοπισθεί κι άλλα εναλλακτικά μονοπάτια βιογένεσης των miRNA τα οποία χρησιμοποιούν διαφορετικούς συνδυασμούς πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο κανονικό μονοπάτι που περιεγράφηκε προηγουμένως. Η μη κανονική βιογένεση των miRNA μπορεί να διακριθεί στην ανεξάρτητη της Dicer και ανεξάρτητη της Drosha/DGCR8. Μια ομάδα μορίων miRNA που ακολουθούν αυτό το πρότυπο βιογένεσης είναι τα mitrons τα οποία κωδικοποιούνται από τα ιντρόνια mRNAs κατά το μάτισμα, και το pre – miRNA με καλύπτρα την 7 μεθυλογουανοσίνη (m7G) [71]. Αυτά τα μόρια RNA εξάγονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξαπορτίνης 1, χωρίς προηγουμένως να υποστούν κάποια τροποποίηση από την Drosha. Λόγω της παρουσίας της m7G καλύπτρας στον 5p κλώνο, η επιλογή του ώριμου μορίου miRNA μεροληπτεί υπέρ του κλώνου 3p[72]. Η βιογένεση που

πραγματοποιείται ανεξάρτητα της Dicer, ξεκινάει απευθείας από την τροποποίηση των short hairpin RNA (shRNA) και εξάγεται από τον πυρήνα συνοδεύει της εξπορίνης 5. Στο κυτταρόπλασμα δεσμεύεται από την πρωτεΐνη AGO2, ώστε να υποστούν το τελικό στάδιο της ωρίμανσής τους. Ο λόγος για τον οποίο δεν στρατολογείται η DICER είναι επειδή δεν έχουν το απαραίτητο μήκος για να δράσουν ως υπόστρωμά της[73]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, επιλέγεται ο 5p κλώνος του πρώιμου μορίου miRNA με τεμαχισμό του 3p κλώνου[74].

Στη συνέχεια, το ώριμο πλέον miRNA συνδέεται μέσω συμπληρωματικότητας, στην 3' UTR περιοχή του mRNA – στόχου, με σκοπό την αναστολή της μετάφρασης και την αποδόμηση του μορίου, η οποία είναι πιο συχνή σε αυτή την περίπτωση [75]. Επιπλέον, τα μόρια miRNA μπορούν να προσδεθούν και στην 5' UTR περιοχή του mRNA καθώς επίσης και στις περιοχές του εκκινητή ενός γονιδίου[76]. Η σύνδεση στην 5' UTR συνεπάγεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, ενώ η αλληλοεπίδραση με τον εκκινητή δρα παρεμποδιστικά στη διαδικασία της μεταγραφής[59]. Το αποτέλεσμα της δράσης των miRNAs εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ποσοστό συμπληρωματικότητας με το οποίο συνδέονται στο mRNA στόχο. Στην περίπτωση που υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα με το mRNA στόχο, τότε επάγεται ο κατακερματισμός του μορίου [77]. Αντιθέτως, όταν το μόριο miRNA δεν εμφανίζει πλήρη συμπληρωματικότητα με το mRNA στόχο, τότε επάγεται η μεταγραφική σίγηση του μορίου, με αποτέλεσμα να μην παράγεται πρωτεΐνη [78].

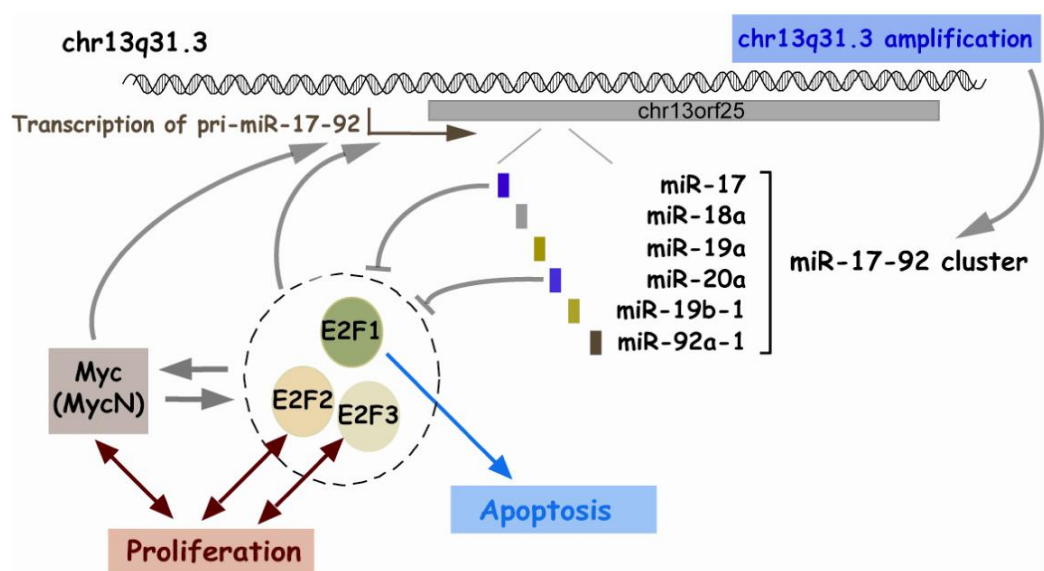
Η σημαντικότητα των miRNA για την εύρυθμη λειτουργία των οργανισμών, έγινε κατανοητή κατόπιν σίγησης των γονιδίων που κωδικοποιούν για την Dicer και την DGCR8, με την απώλεια της DGCR8 να είναι πιο αντιπροσωπευτική καθώς συμμετέχει μόνο στη βιογένεση των miRNA[79, 80]. Οποιαδήποτε απώλεια στη βιογένεση των miRNA οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα, ενώ η εξουδετέρωση των δύο αυτών γονιδίων σε οποιοδήποτε ενήλικο ιστό, οδηγεί σε αναπτυξιακά προβλήματα αυτού του ιστού [81]. Φυσικά, στην περίπτωση του knockdown, πραγματοποιείται σίγηση όλων των miRNA, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να αποδοθεί σε ένα συγκεκριμένο miRNA η ανάπτυξη ενός ιστού. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, δεν αρκεί μόνο ένα miRNA για τη δόμηση και την ανάπτυξη ενός ιστού, ενώ συμμετέχουν ενεργά στη διατήρηση της ομοιόστασής του [82]. Τα miRNA, επίσης, φαίνεται να είναι απαραίτητα στη διατήρηση της κατάστασης διαφοροποίησης ενός ιστού, καθώς αρκετά miRNA μειώνονται σε περιπτώσεις ασθένειας συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, που θα αναλυθεί και παρακάτω[66].

1.2.2.2 Ο ρόλος των miRNA στον καρκίνο του στομάχου

Είναι γνωστό πως η έκφραση των miRNA είναι απορυθμισμένη στις ανθρώπινες κακοήθειες. Κάποια παραδείγματα είναι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αλλαγές του

μεταγραφικού ελέγχου καθώς επίσης επιγενετικές αλλαγές και ελλείψεις στο μονοπάτι βιογένεσης των miRNA[83]. Στα κακοήγη κύτταρα έχει παρατηρηθεί μια μη φυσιολογική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα miRNA, καθώς υφίστανται ποικίλες αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων μέσω ενίσχυσης ή απαλοιφής χρωμοσωμικών περιοχών. Η έκφραση των miRNA ελέγχεται στενά από ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων, η απορρύθμιση των οποίων θα μπορούσε να ερμηνεύσει την ανώμαλη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα [84]. Επιπροσθέτως, η επιγενετική τροποποίηση είναι ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου και αφορά γεγονότα υπερμεθυλίωσης του γονιδιωματικού DNA και ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς επίσης και διαταραχή στα πρότυπα τροποποίησης των ιστονών. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για miRNA έχουν την ίδια ευαισθησία στις επιγενετικές τροποποιήσεις όπως και τα γονίδια που κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη [85]. Ανάλογα με το ρόλο τους στα καρκινικά κύτταρα, διαχωρίζονται σε δύο ομάδες, τα ογκοεπαγωγικά miRNAs (oncomiRs) και τα ογκοκατασταλτικά miRNAs (tumor suppressing miRs) [86].

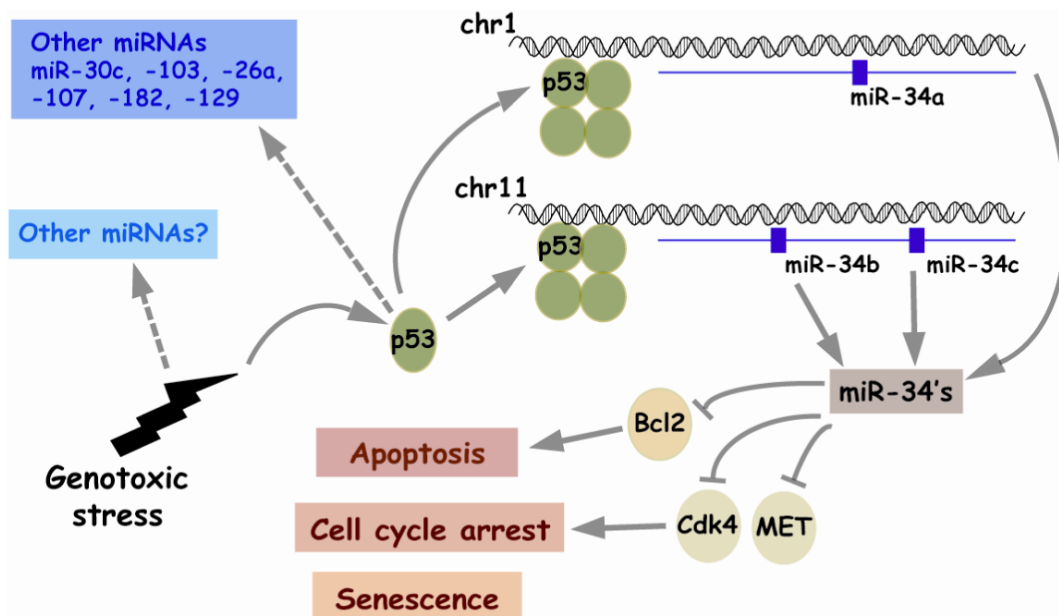
- i. **Ογκοεπαγώμενα miRNAs:** Τα micro RNAs εκφράζονται υψηλότερα στους καρκινικούς ιστούς και μπορούν να δράσουν ως ογκογονίδια είτε με άμεσο τρόπο, καταστέλλοντας την έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είτε έμμεσα, με καταστολή της έκφρασης γονιδίων που θα μπορούσαν να αντισταθούν στη δράση διαφόρων ογκογονιδίων[87]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλληλοεπίδραση με το ογκογονίδιο MYC, το οποίο επάγει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της αναστολής της κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης [88]. Ένα ακόμα παράδειγμα ενός ογκοεπαγώμενου miRNA είναι αυτό της οικογένειας miR-17-92, που αποτελείται από έξι miRNAs (miR-17, -18a, -19a, -20a, -19b-1, and -92a-1) και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε αρκετούς τύπους καρκίνου, μέσω δύο



Εικόνα 9 Μονοπάτι ενεργοποίησης του OncomiR-17-92

μηχανισμών (Εικόνα 9), όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του πνεύμονα [89, 90].

- ii. **Ογκοκατεσταλμένα miRNAs:** Τα miRNAs που έχουν ταυτοποιηθεί ως ογκοκατασταλτικά, εκφράζονται υψηλότερα στους φυσιολογικούς ιστούς έναντι των αντίστοιχων καρκινικών, με την έκφρασή τους να ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες με ενδογενή ογκοκατασταλτική δράση [83]. Τα επίπεδα έκφρασης των ογκοκατασταλτικών miRNAs είναι αντιστρόφως ανάλογα με την εξέλιξη του όγκου και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων [91]. Ως στόχοι αυτής της ομάδας των miRNA τίθενται σημαντικά ογκογονίδια, που προάγουν μονοπάτια επαγωγής της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επομένως, αποτελούν σημαντική πηγή πρόληψης της ανάπτυξης και εξέλιξης της ογκογένεσης [92]. Σε αρκετές περιπτώσεις, ενώ βλέπουμε αυξημένη ογκοκατασταλτική δράση ορισμένων miRNAs, καθώς συμμετέχουν σε μονοπάτια με άλλα γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως είναι το p53, μπορεί να εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε διάφορους καρκίνους. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το miR-34s, το οποίο κατατάσσεται στα ογκοκατασταλτικά miRNA αλλά εκφράζεται και σε αρκετούς τύπους καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος των νεφρών, του εντέρου και του ήπατος (Εικόνα 10)[90].



Εικόνα 10 Μονοπάτι και μηχανισμός δράσης του ογκοκατασταλτικού miR-34s σε συνεργασία με την p53

Συγκεκριμένα, στον καρκίνο του στομάχου, η οικογένεια miR-106-25b που περιλαμβάνει τα miR-25, miR-106 και miR-93b, εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης

στον πρωτεύον όγκο και σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου [93]. Ορισμένα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου με έμμεση ή άμεση ρύθμιση ποικίλων ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ένα συναφές παράδειγμα είναι το miR-544, το οποίο σε πειράματα που έγιναν *in vitro* κατέστησε ανενεργό το ογκοκατασταλτικό γονίδιο IRX1 ελαττώνοντας τα επίπεδα έκφρασής του στον καρκίνο του στομάχου [94].

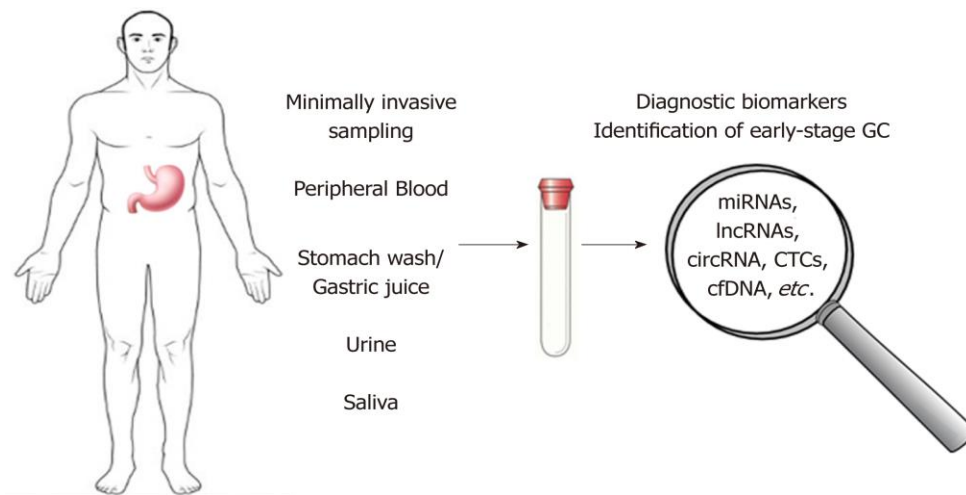
Αναφορικά με τα ογκοκατασταλτικά miRNAs, αυτά φαίνεται πως δρουν επιλεκτικά σε συγκεκριμένα γονίδια – στόχους. Ένα παράδειγμα που επιβεβαιώνει αυτή την υπόθεση είναι το miR-34a, το οποίο αναστέλλει την καρκινογένεση στο στομάχο επιδρώντας στο μονοπάτι της PI3k/Akt στοχεύοντας στον υποδοχέα αυξητικών παραγόντων PDGFR και MET [95]. Ένας άλλος τρόπος δράσης των ογκοκατασταλτικών miRNAs στον καρκίνο του στομάχου, είναι μέσω της επαγωγής της απόπτωσης και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του Let-7a έχουν συσχετιστεί με τον καρκινικό ιστό του στομάχου ενώ αντιθέτως η υπερέκφρασή του μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και οδηγεί σε καταστολή της ανάπτυξης του όγκου [96]. Σε κύτταρα με μετάλλαξη στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 το miR-34, που αναφέρθηκε και προηγουμένως, μπορεί να στοχεύσει σε μια σειρά γονιδίων παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ επί προσθέτως επάγει την απόπτωση αυξάνοντας την ενεργή μορφή της κασπάσης – 3 [97].

1.2.2.3 Τα miRNAs ως διαγνωστικό εργαλείο

Ένα μόριο για να μπορέσει να χαρακτηριστεί βιοδείκτης θα πρέπει να υπακούει σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Αρχικά θα πρέπει να είναι ορατός και ανιχνεύσιμος από τα αρχικά στάδια της κακοήθειας, πριν παρατηρηθούν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, αλλά να παραμένει ενδεικτικό της νόσου και μετά από την πρόκληση ενεργής βλάβης. Σε δεύτερο επίπεδο, θα πρέπει να είναι ευαίσθητο αλλά να αντιπροσωπεύει και τη σοβαρότητα της νόσου, να ανιχνεύεται στα σωματικά υγρά του ασθενούς και η συγκέντρωσή του να είναι συγκριτικά σταθερή στον ιστό, ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί και μετά τη λήψη της βιοψίας. Τέλος ο ιδανικός καρκινικός βιοδείκτης θα πρέπει να είναι εξειδικευμένος για τον υπότυπο της νόσου και να μην ανιχνεύεται σε φυσιολογικά και υγιή άτομα καθώς επίσης και να εντοπίζει το ακριβές σημείο της βλάβης, δηλαδή να παρουσιάζει ιστοειδικότητα [98].

Η ύπαρξη εξειδικευμένων βιοδεικτών για κάθε περίπτωση καρκίνου, αποτελεί στόχο μείζονος σημασίας, καθώς η πρόγνωση και η εκτίμηση της θνησιμότητας των ασθενών βασίζεται σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό στη φάση και το στάδιο που βρίσκεται ο όγκος τη στιγμή της διάγνωσης [99]. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ήδη υπάρχουν αρκετοί βιοχημικοί βιοδείκτες, όπως το CEA, CA19-9

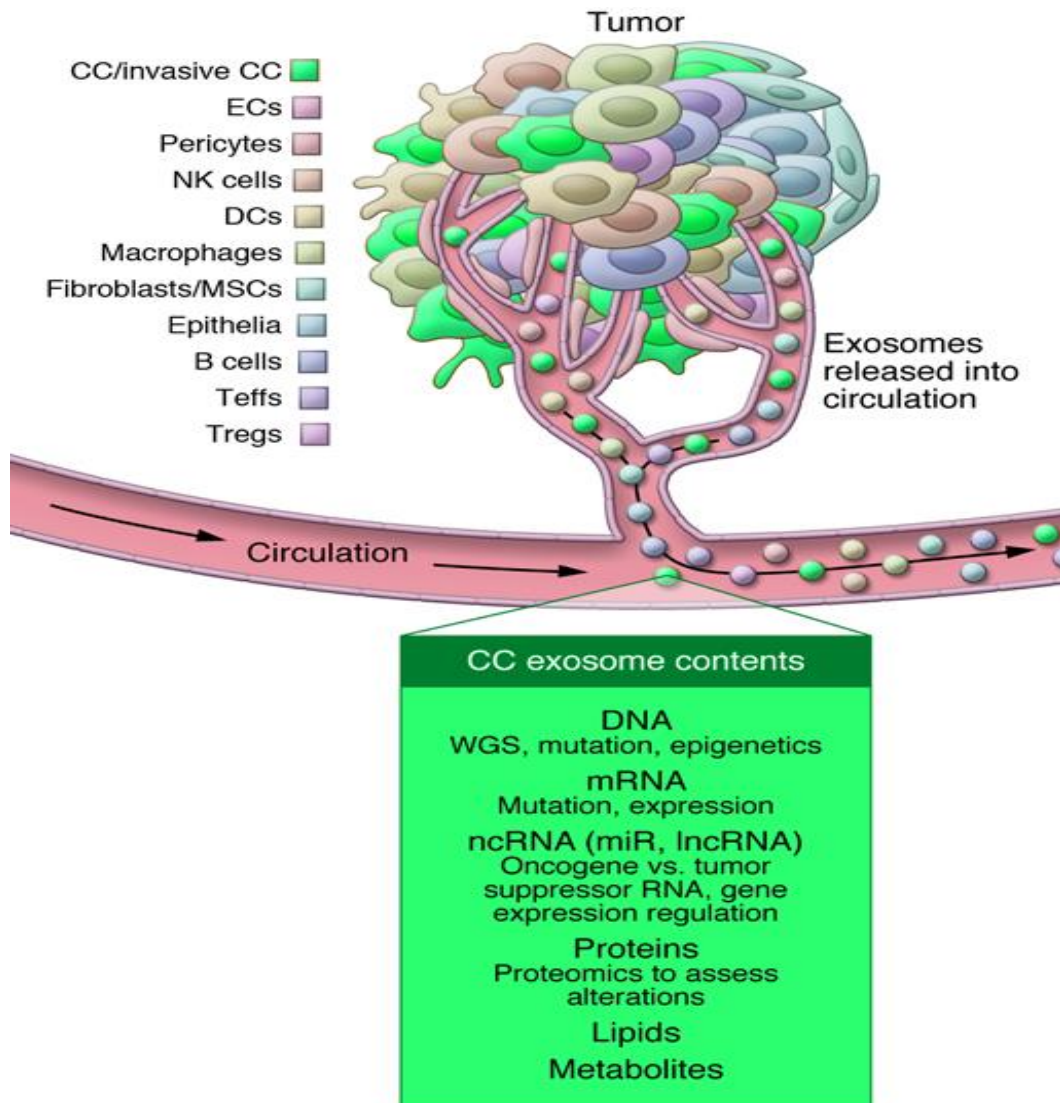
κλπ, που μπορούν να εντοπίσουν την ύπαρξη κακοήθειας, δεν είναι εξειδικευμένοι όσον αφορά το γαστρικό καρκίνο και το στάδιο της κακοήθειας [100].



Εικόνα 11 Παρουσία νουκλεϊκών οξέων, συμπεριλαμβανόμενων των miRNAs στα βιολογικά υγρά

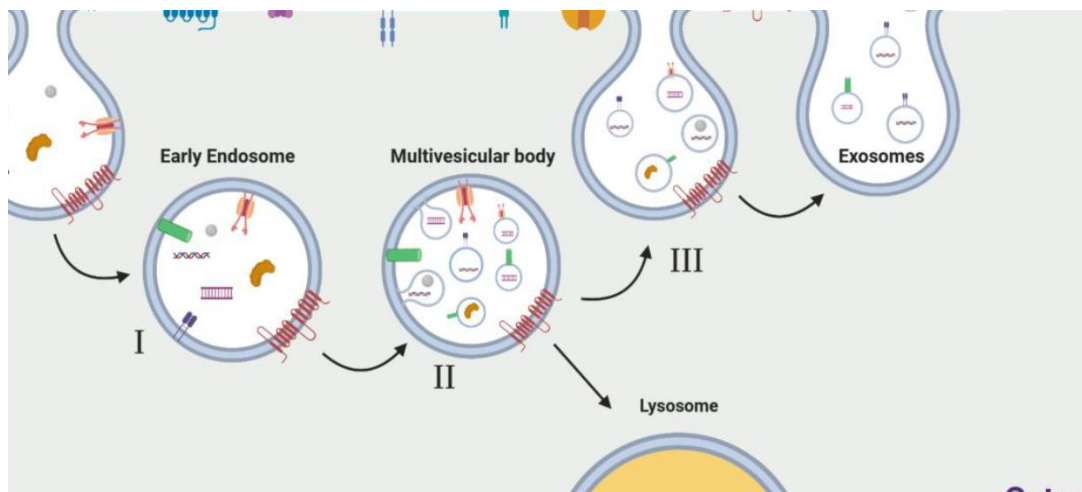
Η απορρυθμισμένη και συχνά έκτοπη έκφραση των miRNAs στα καρκινικά κύτταρα, συγκριτικά με τα αντίστοιχα φυσιολογικά, αποτελεί τη βάση για έγκαιρη διάγνωση, διευκολύνει την πρόγνωση, ενώ μπορεί ακόμα και να αναδείξει συγκεκριμένα miRNAs ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους ή καινοτόμα θεραπευτικά μέσα [101]. Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα των miRNAs, είναι η παρουσία τους στα κυκλοφορούντα βιολογικά υγρά, όπως είναι το αίμα, ο ορός, τα ούρα και το σάλιο (Εικόνα 11). [102]

Τα κυκλοφορούντα miRNAs εντοπίζονται μέσα στα εξωσώματα μέσω των οποίων εισάγονται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα εξωσώματα είναι εξωκυττάρια κυστίδια μεγέθους 40 – 150nm και εντοπίζονται σε όλους τους τύπους κυττάρων [103]. Ομοίως με τα κύτταρα, τα εξωσώματα αποτελούνται από μια λιπιδιακή μεμβράνη και στο εσωτερικό τους περιλαμβάνουν όλα τα γνωστά μοριακά συστατικά των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, του DNA και του RNA [104], ενώ επίσης είναι πολύ πιθανό το περιεχόμενο των εξωσωμάτων να αντανακλά την κατάσταση του κυττάρου (Εικόνα 12)[104, 105]. Στον καρκίνο, τα εξωσώματα έχουν περιγραφεί ως προαγωγείς εξέλιξης του όγκου[106], ωστόσο, είναι πιθανό να διαθέτουν και αντικαρκινικές λειτουργίες δρώντας περιοριστικά στην πρόοδο των ασθενειών[104]. Λόγω του γεγονότος ότι τα εξωσώματα αναπαριστούν την ενδοκυτταρική κατάσταση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανή πηγή πληροφοριών για την ανίχνευση καρκίνου [103, 107]. Επιπροσθέτως, έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα βιολογικών υγρών, όπως το σάλιο, τα ούρα, το αμνιακό υγρό, το αίμα κλπ, γεγονός που καθιστά τα εξωσώματα καρκινικής προέλευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υγρή βιοψία για την έγκαιρη διάγνωση κακοήθειών[108-110].



Εικόνα 12 Αναπαράσταση των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων ποικίλης κυτταρικής προέλευσης και παρουσίαση των περιεχομένων τους.

Τα εξωσώματα προστατεύουν τα miRNAs από τις RNάσες, και άλλους κινδύνους που θα μπορούσαν να τα αλλοιώσουν γεγονός που τα καθιστά δομικά σταθερά μόρια, δίνοντάς τους τη δυνατότητα να εντοπίζονται σε απομακρυσμένες θέσεις από το κύτταρο προέλευσής τους (Εικόνα 13)[111]. Εξ αιτίας της παρουσίας τους στα εξωσώματα, τα miRNA συμμετέχουν στον έλεγχο της διακυτταρικής επικοινωνίας και της κυτταρικής σηματοδότησης. Έτσι, τα εξωσώματα αποτελούν μια μικρογραφία του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος, καθώς οποιαδήποτε διαταραχή των κυττάρων θα αποτυπωθεί και στη σύσταση των εξωσωμάτων. Αυτή η λειτουργία, αποτελεί το μέσο για έναν λιγότερα επεμβατικό και πιο έγκαιρο τρόπο διάγνωσης του γαστρικού, και όχι μόνο, καρκίνου, με τη διαδικασία λήψης μιας υγρής βιοψίας [112].



Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση σχηματισμού και απελευθέρωσης των εξωσωμάτων

Είναι αρκετά σημαντικό, να γνωρίζουμε πως τα miRNAs που εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά, προέρχονται όντως από τον όγκο και όχι από περιφερειακούς ιστούς ή από τα κύτταρα του αίματος. Για αυτό, τα miRNAs τα οποία εξετάζονται κάθε φορά θα πρέπει να εμφανίζουν ιστοειδικότητα και καρκινοειδικότητα ως προς τον συγκεκριμένο όγκο[113]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το miR-21 το οποίο σε 37 περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου, βρέθηκε αυξημένο σε ποσοστό 92%. Το miR-21 συνδέεται στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο PDCD4 παρεμποδίζοντας την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί [114]. Σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση των ογκοεπαγωγικών miRNAs θα πρέπει να μελετάται και η μείωση της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών miRNAs, όσο εξετάζουμε πιο προχωρημένα στάδια καρκίνου του στομάχου, έτσι ώστε να υπάρχει συνδυασμός διαγνωστικού και προγνωστικού εργαλείου κατά του γαστρικού καρκίνου[115].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτελεί η ανίχνευση διαφορετικά εκφρασμένων miRNA με διαγνωστική και προγνωστική αξία στα φυσιολογικά γαστρικά κύτταρα, έναντι των καρκινικών γαστρικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης miRNAs μεταξύ των φυσιολογικών παρακαρκινικών ιστών και των καρκινικών ιστών του στομάχου. Επόμενη φάση της βιοπληροφορικής ανάλυσης αποτέλεσε η ανίχνευση των επιλεγμένων μορίων miRNAs σε φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς, άλλους τύπους καρκίνου και σε βιολογικά υγρά, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο τα επιλεγμένα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μη παρεμβατικοί βιοδείκτες νεοπλασίας, εξειδικευμένοι για τον καρκίνο του στομάχου. Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε στα miRNAs που υπερεκφράζονται στα φυσιολογικά γαστρικά κύτταρα έναντι των αντίστοιχων καρκινικών.

Σε επόμενο στάδιο, αξιοποιώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την βιοπληροφορική ανάλυση αλλά και από αντίστοιχη ανάλυση προηγούμενης πτυχιακής εργασίας του εργαστηρίου που αφορά τα αυξορρυθμισμένα miRNAs στον γαστρικό καρκίνο, πραγματοποιήθηκε πειραματική επαλήθευση επιλεγμένων ογκοεπαγωγικών και ογκοκατασταλτικών miRNA. Το πειραματικό κομμάτι περιλαμβάνει εξέταση των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων αυξορρυθμισμένων και μειορρυθμιζόμενων miRNAs μέσω της τεχνολογίας stem loop qPCR σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές που αντικατοπτρίζουν τα διαφορετικά στάδια του γαστρικού καρκίνου, έναντι μιας αθανατοποιημένης κυτταρικής σειράς φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου.

Απώτερος, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι μέσω βιοπληροφορικών αναλύσεων να συγκροτηθεί μια μοριακή υπογραφή αυξορρυθμιζόμενων και μειορρυθμιζόμενων miRNAs σε γαστρικές καρκινικές βιοψίες τα οποία εν συνεχεία να επιβεβαιωθούν πειραματικά σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, ώστε τελικά να χρησιμοποιηθούν εν δυνάμει ως μη επεμβατικοί μοριακοί βιοδείκτες εξειδικευμένοι για τον καρκίνο του στομάχου. Επειδή, ο παρακαρκινικός ιστός συχνά δεν εμφανίζει ιστολογικά ευρήματα, αυτό που χρήζει σημασίας είναι να δημιουργηθούν βιοδείκτες που θα μας δείχνουν κατά πόσο η νόσος έχει εξελιχθεί.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

HFE145: Αποτελεί τον φυσιολογικό μάρτυρα καθώς προέρχεται από αθανатоποιημένο φυσιολογικό επιθήλιο στομάχου. Παρόλα αυτά, κατά την αθανатоποίησή τους έχουν υποστεί τροποποιήσεις που δεν τα καθιστά 100% φυσιολογικά και για αυτό ονομάζεται «normal – like» κυτταρική σειρά.

AGS: Αποτελεί καρκινική κυτταρική σειρά που προέρχεται από κύτταρα πρωτεύοντος όγκου από το στομάχι.

NUGC4: Αποτελεί καρκινική κυτταρική σειρά που προέρχεται από πλήρως διαφοροποιημένο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, από παραγαστρικούς λεμφαδένες.

KATOIII: Αποτελεί καρκινική κυτταρική σειρά που προέρχεται από ιστό πλευρικής μετάστασης αδενοκαρκινώματος και αφορά απομακρυσμένους λεμφαδένες.

MKN45: Αποτελεί καρκινική κυτταρική σειρά που προέρχεται από φτωχά συνεκτικό αδενοκαρκίνωμα γαστρικού επιθηλίου, εστία μετάστασης του οποίου είναι το ήπαρ.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν TCGA δεδομένα έκφρασης των miRNA στον καρκινικό ιστό του στομάχου αλλά και από ανατομικά φυσιολογικό παρακαρκινικό ιστό, για να αξιολογηθεί το εύρος της αλλαγής της έκφρασης μεταξύ των δύο καταστάσεων. Στην εικόνα 18 συνοψίζονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν στα πλαίσια της ανάλυσης.

Σε πρώτο επίπεδο, εκτελέσθηκε η ανάλυση ROC από δεδομένα έκφρασης ενός τυχαία επιλεγμένου και αντιπροσωπευτικού υποσυνόλου καρκινικών και παρακαρκινικών βιοψιών που αποτελείται από 102 καρκινικούς και 12 παρακαρκινικούς ιστούς στομάχου. Η ROC analysis, δηλαδή **Receiver Operator Characteristic curve analysis**, αποτελεί μια μεθοδολογία βάση της οποίας μελετάται η ειδικότητα και την ευαισθησία που χαρακτηρίζει την παρουσία ενός συγκεκριμένου παράγοντα (π.χ έκφραση miRNA) στην υπόθεση ότι συσχετίζεται με μια δεδομένη κατάσταση (π.χ ασθένεια). Η ευαισθησία ορίζεται ως η αναλογία αληθώς θετικών υποθέσεων (True positive rate), ενώ η αναλογία ψευδώς θετικών υποθέσεων (False positive rate) υποδηλώνει την ειδικότητα σύμφωνα με τον τύπο: Ειδικότητα = 1 – Αναλογία ψευδώς θετικών. Στην περίπτωση ενός αυξορρευμιζόμενου miRNA όπου θέλουμε να επιβεβαιώσουμε την συσχέτιση του με την εμφάνιση μιας νεοπλασίας, η καμπύλη

που δημιουργείται από την αναλογία των αληθώς θετικών στον άξονα των y' ως προς την αναλογία των ψευδώς θετικών στον άξονα των x' είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας που έχει το συγκεκριμένο miRNA στην πρόβλεψη της εμφάνισης καρκίνου. Για αυτό το λόγο μετράμε τον λόγο του εμβαδού που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη που σχηματίζεται προς το συνολικό εμβαδόν του γραφήματος (Area Under the Curve or AUC). Μια AUC μεγαλύτερη του 0,5 δείχνει ότι το υπόθεση που έγινε ισχύει, με την ισχύ της να αυξάνεται περισσότερο όσο η AUC τείνει στην τιμή ένα. Τιμές AUC κάτω του 0.5 δηλώνουν ότι η υπόθεση που έγινε είναι ασθενής και δεν ισχύει καθώς δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός μεταξύ των αληθώς θετικών και των ψευδώς αρνητικών υποθέσεων. Στην περίπτωση που εξετάζουμε ένα ογκοκατασταλτικό miRNA θέλουμε η τιμή AUC να είναι κάτω του 0,5 όταν θέτουμε σαν συνθήκη τον καρκινικό ιστό. Αυτό πρακτικά συνεπάγεται ότι αυξημένη έκφραση αυτού του miRNA δεν εντοπίζεται και συνεπώς δεν ταυτοποιεί καρκινικές βιοψίες. Αντίθετα, ογκοεπαγωγικά miRNA με τιμές AUC που προσεγγίζουν το 1 συνεπάγονται αυξημένη πιθανότητα υψηλής έκφρασης στο σύνολο των καρκινικών βιοψιών αλλά όχι στις παρακαρκινικές βιοψίες.

Η δεύτερη μεθοδολογία ανάλυσης ήταν η ανάλυση σχετικού λόγου πιθανοτήτων (Odds Ratio: OR). Η ανάλυση αυτή αφορά το λόγο πιθανοτήτων, ο οποίος είναι ένα στατιστικό μέτρο το οποίο υπολογίζει την συσχέτιση μεταξύ δύο ενδεχομένων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το ενδεχόμενο αυτό ήταν η αυξημένη έκφραση ενός miRNA σε φυσιολογικό ιστό. Όταν ο λόγος απόδοσης είναι μεγαλύτερος του 1 τότε υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο ενδεχομένων, δηλαδή αυξημένη πιθανότητα το miRNA να υπερεκφράζεται στην πλειοψηφία των παρακαρκινικών ιστών έναντι των καρκινικών

Η τρίτη μεθοδολογία ήταν η ανάλυση διαφορικής έκφρασης (Differential expression analysis: DESeq). Η ανάλυση διαφορικής έκφρασης είναι μια στατιστική ανάλυση με την οποία ανιχνεύσουμε ποσοτικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μεταξύ δύο συνθηκών, στην προκειμένη περίπτωση μεταξύ του καρκινικού ιστού και του ανατομικά υγιούς παρακαρκινικού ιστού. Τα δεδομένα έκφρασης αξιολογούνται βάσει της στατιστικής σημαντικότητας τους και του εύρους αλλαγής της έκφρασης τους μεταξύ των δύο συνθηκών. Στη δική μας περίπτωση, θέλαμε ο logFC να παίρνει αρνητικές τιμές, δηλαδή το miRNA να υποεκφράζεται στον καρκίνο τουλάχιστον κατά 50% έναντι του φυσιολογικού και παράλληλα να πληροί το κριτήριο της στατιστικής σημαντικότητας δηλαδή $pvalue < 0.05$.

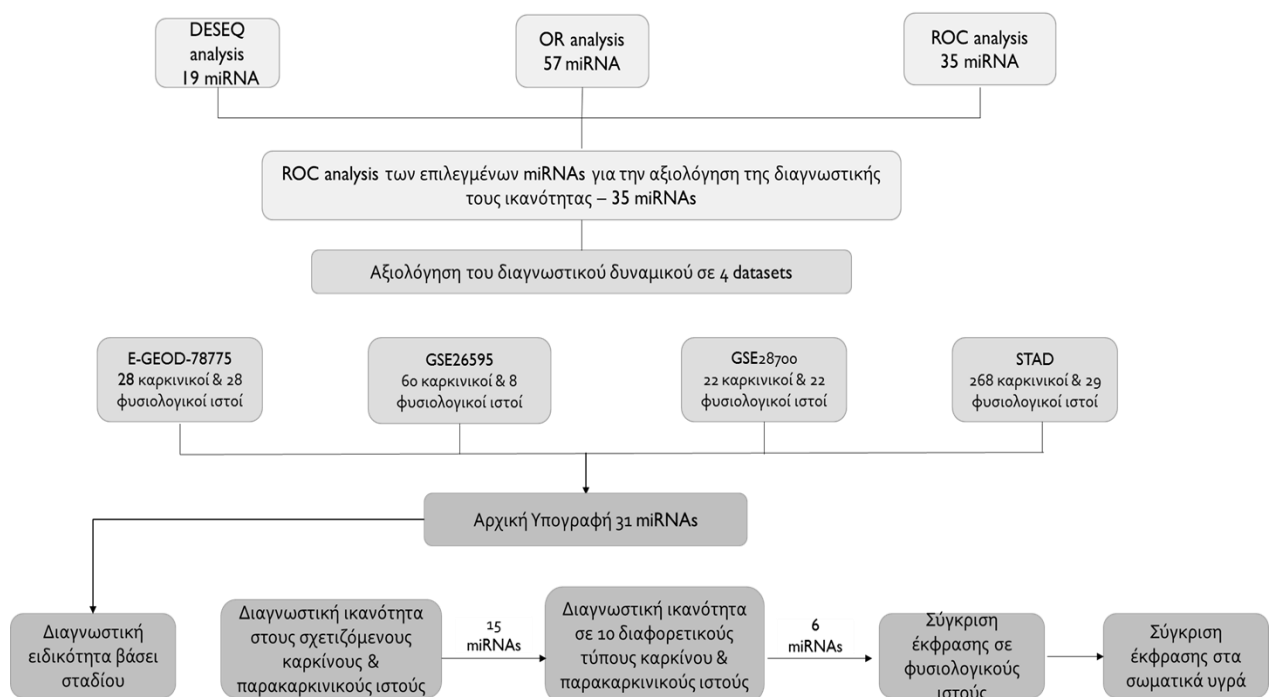
Από κάθε μια από τις παραπάνω αναλύσεις προέκυψε μια λίστα υποψήφιων miRNA τα οποία εν συνεχεία αξιολογήθηκαν παράλληλα με μια ROC analysis, με σκοπό να ξεχωρίσουμε μια υπογραφή miRNAs ου θα υποεκφράζονται στον καρκινικό ιστό και

θα υπερεκφράζονται στον φυσιολογικά παρακαρκινικό ιστό με συντεταγμένο και αξιόπιστο τρόπο στο σύνολο των βιοψιών. Η επιλογή της miRNA υπογραφής έγινε με βάση την τιμή AUC που προέκυψε από την ανάλυση. Ο πρώτος έλεγχος της διαγνωστικής ικανότητας έγινε με τη σύγκριση των επιλεγμένων αυτών miRNAs έναντι τυχαία επιλεγμένων miRNAs. Με αυτό το τρόπο προέκυψαν 3 υπογραφές miRNA, οι οποίες συγκρίθηκαν σε διαγράμματα Venn (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) ώστε να βρεθούν τα κοινά miRNA. Από αυτά προέκυψε η αρχική miRNA υπογραφή.

Στη συνέχεια ακολούθησε ένας δεύτερος ανεξάρτητος γύρος αξιολόγησης της διαγνωστικής ικανότητας της miRNA υπογραφής σε τέσσερα ανεξάρτητα σετ δεδομένων από βιοψίες καρκινικών και παρακαρκινικών ιστών παράλληλα με miRNA-seq ή μικροσυστοιχίες miRNA. Για κάθε σετ, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ROC ώστε να εκτιμηθεί το διαγνωστικό δυναμικών των επιλεγμένων miRNA και να συγκριθεί Ο πρώτος έλεγχος της διαγνωστικής ικανότητας έγινε με τη σύγκριση των επιλεγμένων αυτών miRNAs έναντι τυχαία επιλεγμένων miRNAs. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη φάση της ανάλυσης προέρχονται από τέσσερις διαφορετικές ομάδες δεδομένων. Η πρώτη αφορά την E-GEOD-78775 και περιλαμβάνει δεδομένα έκφρασης που προέρχονται από 28 καρκινικούς και 28 παρακαρκινικούς ιστούς αντίστοιχα και προέρχεται από δεδομένα μικροσυστοιχιών. Η δεύτερη ομάδα δεδομένων αφορά την GSE26595 η οποία περιλαμβάνει δεδομένα από 60 καρκινικούς και 8 παρακαρκινικούς ιστούς, ενώ στην ίδια κατηγορία η GSE28700, περιέχει δεδομένα από 22 καρκινικούς και 22 παρακαρκινικούς ιστούς. Και οι δύο αυτές ομάδες δεδομένων, συλλέγουν πληροφορίες από δεδομένα μικροσυστοιχιών. Τέλος, η ομάδα δεδομένων TCGA – STAD (η οποία θα αναφέρεται ως STAD), περιλαμβάνει δεδομένα από αλληλούχηση RNA (RNAseq) από 268 καρκινικούς και 29 παρακαρκινικούς ιστούς. Από αυτό το στάδιο επαλήθευσης τελικά επιλέχθηκαν τα πλέον αξιόπιστα miRNA τα οποία πέρασαν στο τρίτο στάδιο της βιοπληροφορικής ανάλυσης. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο excel με t-test.

Κατά το τρίτο στάδιο της βιοπληροφορικής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε μια σύγκριση της έκφρασης των επιλεγμένων miRNA στα διάφορα στάδια εξέλιξης του γαστρικού καρκίνου, ώστε να παρατηρηθεί αν υπάρχει διαφορετική έκφραση μεταξύ των διαφορετικών σταδίων και του φυσιολογικού παρακαρκινικού ιστού. Σε επόμενο στάδιο, παρατηρήθηκε η έκφραση των miRNA στους συσχετιζόμενους ιστολογικά τύπους καρκίνου (καρκίνος του οισοφάγου, του στομάχου, του ήπατος, του κόλου και του ορθού) με σκοπό να αποκλειστούν miRNAs που υποεκφράζονται στον γαστρικό όγκο αλλά υπερεκφράζονται σε άλλους τύπους καρκίνου. Από τα επιλεγμένα miRNA, πραγματοποιήθηκε επίσης μια διευρυμένη ανάλυση της έκφρασής τους σε 19

διαφορετικούς τύπους καρκίνου και παρακαρκινικού ιστού, συμπεριλαμβανομένων και των συγγενικών ιστών, για να επιβεβαιωθεί η ιστοειδικότητα που εμφανίζουν έναντι του στομάχου. Οι τύποι καρκίνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για τον καρκίνο του θυρεοειδούς (THCA), μελάνωμα της επιδερμίδας του δέρματος (SKCM), αδеноκαρκίνωμα του προστάτη (PRAD), θηλώδες καρκίνωμα του νεφρού (KIRP), διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (KIRC), χρωμόφοβο αδеноκαρκίνωμα του νεφρού (KICH), καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων των πνευμόνων (LUSC), χολαγγειοκαρκίνωμα (CHOL), διεισδυτικό καρκίνωμα του στήθους (BRCA), Καρκίνωμα ενδομητρίου μήτρας (UCEC), καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας και ενδοτραχηλικό αδеноκαρκίνωμα (CESC), αδеноκαρκίνωμα των πνευμόνων (LUAD), ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (BLCA) και καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου (HNSC), αδеноκαρκίνωμα του στομάχου (STAD), καρκίνωμα του οισοφάγου (ESCA), καρκίνος του ήπατος (LIHC), αδеноκαρκίνωμα του ορθού (READ), αδеноκαρκίνωμα του κόλου (COAD). Έπειτα, η ανάλυση προχώρησε με τη σύγκριση της έκφρασης των επιλεγμένων μορίων miRNA ανάμεσα σε διαφορετικούς φυσιολογικούς ιστούς, για να ελεγχθεί κατά πόσο αυτά εκφράζονται και σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς εκτός του στομάχου. Όλα τα προαναφερθέντα δεδομένα παρατέθηκαν σε σύγκριση με τον καρκινικό και τον παρακαρκινικό ιστό του στομάχου. Τέλος, μελετήθηκε η παρουσία τους στα βιολογικά υγρά του σώματος, για να δούμε κατά πόσο θα μπορέσουν να αποτελέσουν γόνιμο έδαφος για τη λήψη υγρής βιοψίας. Η πορεία που περιεγράφηκε συνοψίζεται στην Εικόνα 14. Για τις προαναφερθέντες αναλύσεις κατασκευάστηκαν θερμικοί χάρτες στο πρόγραμμα Perseus.



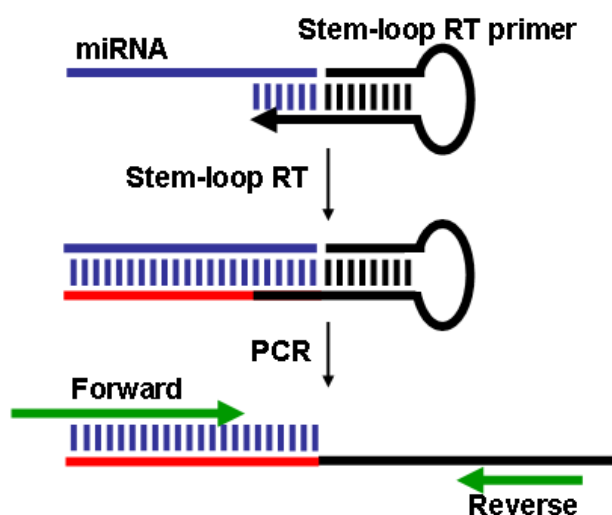
Εικόνα 14 Βιοπληροφορική πορεία

3.2.2 Πειραματική ανάλυση

Stem loop qPCR

Από την τελική υπογραφή των ογκοεπαγωγικών και ογκοκατασταλτικών miRNAs πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά έλεγχος σε ορισμένα από αυτά για τα επίπεδα έκφρασης στις κυτταρικές σειρές που προαναφέρθηκαν.

Τα miRNAs, όπως προαναφέρθηκε έχουν κατά μέσο όρο μήκος 22 νουκλεοτιδίων, όσο περίπου είναι και το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην real time PCR. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούμε τη stem loop qPCR. Κατά το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής, προσθέτουμε μαζί με το μίγμα τους εκκινητές stem loop, οι οποίοι αποτελούνται από ένα τμήμα συμπληρωματικό προς το τμήμα του miRNA και από ένα τμήμα το οποίο έχει δομή φουρκέτας. Κατά την αντίστροφη μεταγραφή παράγεται ένα μόριο cDNA το οποίο αποτελείται από την αλληλουχία του miRNA καθώς επίσης και από την αλληλουχία του stem loop εκκινητή. Στη συνέχεια, για την qPCR σχεδιάζουμε έναν εκκινητή συμπληρωματικό προς το τμήμα του miRNA και έναν εκκινητή universal ο οποίος θα υβριδοποιεί στη συντηρημένη περιοχή του stem loop εκκινητή [116, 117] (Εικόνα 15) .



Εικόνα 15 Stem loop qPCR

Η αντίστροφη μεταγραφή του miRNA έγινε σε ήδη πομονωμένα δείγματα RNA με τη μέθοδο της τριζόλης, πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2 ώρες και τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 1. Η qPCR που πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια, βασίστηκε στη φθορίζουσα χρωστική SYBR green (KAPA 2x SYBR mix), η οποία παρεμβάλλεται στο δίκλωνο DNA. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η BioRad. Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης των miRNAs έγινε στις κυτταρικές σειρές που

αναφέρθηκαν προηγουμένως, ενώ χρησιμοποιήθηκε και το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα CFX manager. Τα συστατικά της αντίδρασης παρατίθενται στον πίνακα 2.

Πίνακας 1 Ποσότητες αντιδραστηρίων στην stem loop RT

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
SL mix (1μl/ reaction)	5μl each primer
	5μl oligo dT
Mix 1 (2μl/reaction)	6,5μl dNTPs
	6,5μl SL mix
Mix 2	0,5μl RNase out
	4μl Buffer (5X)
	2μl DTT
	1μl RT
H ₂ O	380μl

Πίνακας 2 Σύσταση Stem loop qPCR αντίδρασης

	Ποσότητες αντιδραστηρίων
SYBR green Buffer Mix (2x)	10μl
Forward primer	1μl
Reverse primer	1μl
cDNA template	4μl
ddH ₂ O	4μl

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

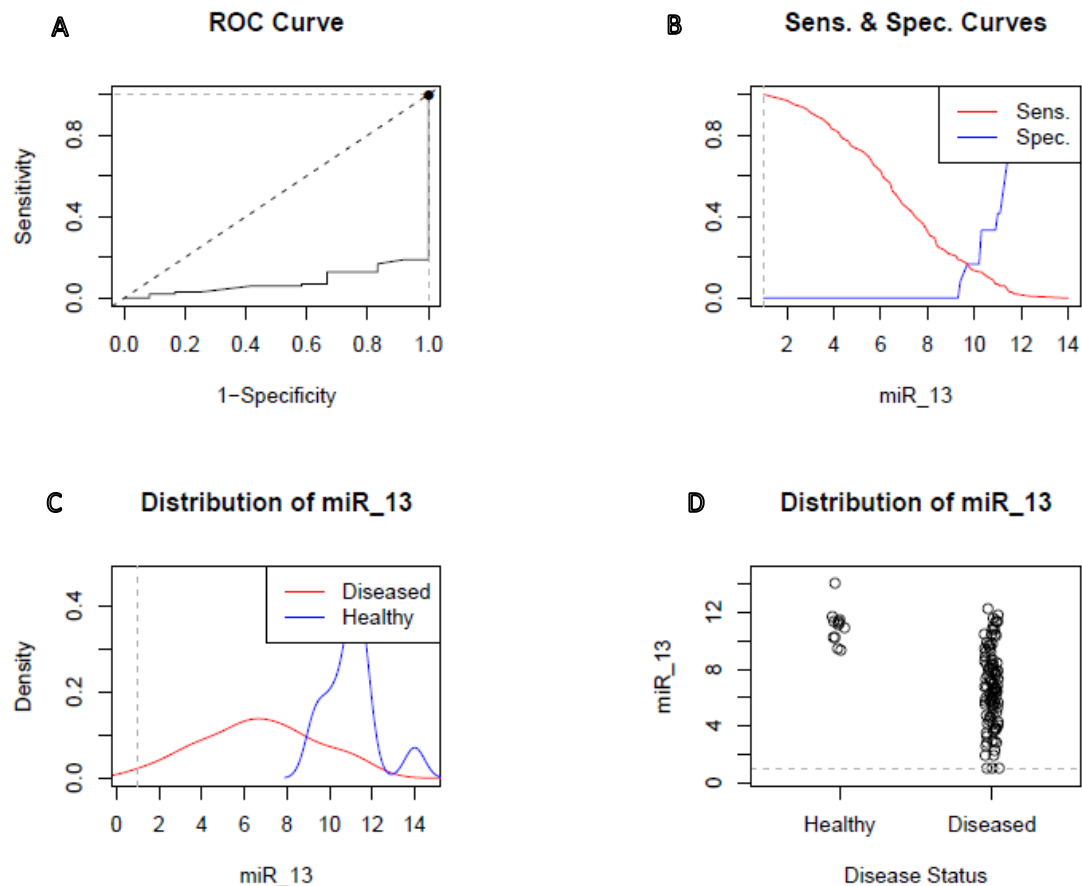
4.1 Εκπαίδευση αλγορίθμου ROC

Κατά την πρώτη φάση της βιοπληροφορικής ανάλυσης, που αφορούσε την εκπαίδευση του βιοπληροφορικού μοντέλου (training model), αξιοποιήθηκε κυρίως ο αλγόριθμος ROC. Ο λόγος που χρησιμοποιήσαμε τη συγκεκριμένη μεθοδολογία ήταν για να αξιολογηθεί το διαγνωστικό δυναμικό των τριών ανεξάρτητων μεθοδολογιών εκτίμησης της διαφορικής έκφρασης miRNA σε καρκινικές και παρακαρκινικές βιοψίες. Οι τρεις μεθοδολογίες και ομάδες δεδομένων ήταν η ανάλυση διαφορικής έκφρασης, η ανάλυση σχετικού λόγου πιθανοτήτων και η ανάλυση καμπύλης λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROC). Ξεκινήσαμε την ανάλυση με μια ομάδα 1500 miRNA που εκφράζονται γενικά σε βιοψίες ασθενών γαστρικού καρκίνου (καρκινικός ή παρακαρκινικός ιστός) από το σύνολο 3000 ανθρώπινων miRNA που είναι γνωστά. Από τις μεθοδολογίες DESeq και OR, όπου τα δεδομένα είχαν ήδη υποστεί την ανάλυση στα πλαίσια προηγούμενης πτυχιακής του εργαστηρίου, επιλέχθηκαν miRNA με κριτήρια που εξασφάλιζαν αυξημένη παρουσία στους γαστρικούς παρακαρκινικούς ιστούς. Στην περίπτωση του OR τα κριτήρια αυτά ήταν miRNA με τιμή $OR < 1$ τιμή που δηλώνει την απουσία έκφρασης κατά τη νεοπλασία. Κατά αντιστοιχία, από τη μεθοδολογία DESeq επιλέχθηκαν τα miRNA με $\log_2FC < -1$ και $pvalue < 0,05$, που συνεπάγεται στατιστικώς σημαντικό κατ' ελάχιστον υποδιπλασιασμό της έκφρασης στον παρακαρκινικό ιστό συγκριτικά με τον καρκινικό.

Σε όλα τα δεδομένα πραγματοποιήθηκε μια ROC analysis, με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου easyROC, από την οποία έγινε μια πρώτη επιλογή των miRNA που είχαν τιμή Area Under the Curve (AUC) κάτω του 0,2. Στην ανάλυση θέσαμε ως συνθήκη την ύπαρξη καρκίνου ώστε τα αποτελέσματά μας να είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα που έγιναν για τα ογκοεπαγωγικά miRNAs σε προηγούμενη πτυχιακή. Επομένως, με τιμή $AUC \leq 0,2$ η καμπύλη στο διάγραμμα θα εντοπίζεται κάτω της διαγωνίου και συνεπάγεται χαμηλή έκφραση συντεταγμένα στον γαστρικό όγκο. Τα δεδομένα τα οποία ελέγχθηκαν κατά την πρώτη φάση προέρχονταν από 102 καρκινικές βιοψίες και 12 φυσιολογικές – παρακαρκινικές βιοψίες. Ως στόχος αυτού του σταδίου τέθηκε η δημιουργία μιας αρχικής υπογραφής miRNAs που θα υποεκφράζονται στον καρκινικό ιστό και θα υπερεκφράζονται στον φυσιολογικά παρακαρκινικό ιστό αντίστοιχα. Το πρώτο φιλτράρισμα έγινε με την ατομική ή και ομαδική κατηγοριοποίησή τους μέσω της καμπύλης ROC με βάση τις τιμές AUC.

Για παράδειγμα, στην εικόνα 16 φαίνεται χαρακτηριστικά η περίπτωση του miR_13, το οποίο από την ανάλυση ROC έδωσε τιμή $AUC = 0,07921$. Στο διάγραμμα 16A φαίνεται η καμπύλη ROC για το συγκεκριμένο miRNA, που παρουσιάζει την τιμή AUC και επιβεβαιώνει την παρουσία της καμπύλης κάτω της διαμέσου. Στο διάγραμμα 16B

παρουσιάζονται οι καμπύλες της ειδικότητας και της ευαισθησίας του ενώ στο διάγραμμα 16C & 16D η κατανομή της έκφρασής τους μεταξύ καρκινικών και παρακαρκινικών ιστών. Στα διαγράμματα αυτά παρουσιάζεται η διασπορά που εμφανίζει στον καρκινικό και παρακαρκινικό ιστό σε συνάρτηση με την έκφρασή του κανονικοποιημένη σε λογάριθμο του 2.

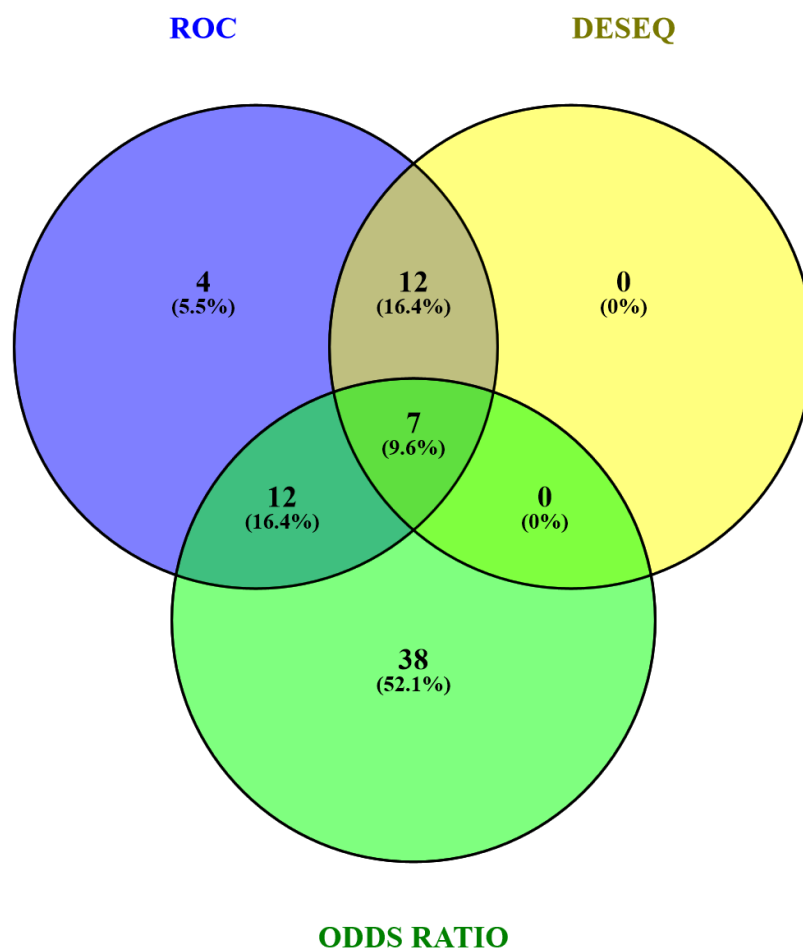


Εικόνα 16 A. Η καμπύλη ROC για το miR_13 B. Καμπύλες ευαισθησίας και ειδικότητας του miR_13 C & D. κατανομή της κανονικοποιημένης έκφρασης σε υγιείς και καρκινικούς ιστούς του miR_13 με καμπύλη και γράφημα διασποράς αντίστοιχα

Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα της εικόνας 16, το miR_13 εντοπίζεται υπερεκφρασμένο στον υγιή / ανατομικά φυσιολογικό παρακαρκινικό ιστό συγκριτικά με τον καρκινικό ιστό. Συγκεκριμένα, στο διάγραμμα 16C η κορυφή της καμπύλης κατανομής στον υγιή ιστό εμφανίζεται μετατοπισμένη σε υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τον καρκινικό ιστό. Ομοίως, βλέπουμε στο διάγραμμα 16D σε μορφή διασποράς τιμών, ότι στον παρακαρκινικό ιστό τα επίπεδα έκφρασης του miR_13 είναι συγκεντρωμένα σε υψηλές τιμές σε αντίθεση με τον καρκινικό ιστό που παρουσιάζει μια μεγάλη έκταση στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA. Η τιμή AUC του συγκεκριμένου miRNA είναι αρκετά χαμηλή, γεγονός που επιβεβαιώνει

τη χαμηλή συσχέτισή του με τον καρκινικό ιστό, που ήταν και η αρχική μας υπόθεση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η τιμή AUC αποτελεί μέτρο ποσοτικοποίησης του διαγνωστικού δυναμικού του miR_13 αναφορικά με την ικανότητά του να διαχωρίζει τον φυσιολογικό από τον καρκινικό ιστό. Έτσι, αξιολογήθηκε μεμονωμένα το διαγνωστικό δυναμικό όλων των miRNAs που προέκυψαν από τις τρεις μεθοδολογίες ανάλυσης.

Σε επόμενο βήμα, αξιολογήθηκε συνδυαστικά και συγκριτικά το διαγνωστικό δυναμικό των miRNA με $AUC < 0,2$ που προέκυψαν ανεξάρτητα από τις τρεις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να βρεθούν κοινά miRNAs με υψηλό διαγνωστικό δυναμικό. Το φιλτράρισμα αυτό έγινε με την κατασκευή του διαγράμματος Venn, για να βρούμε την τομή των κοινών miRNAs μεταξύ των τριών διαφορετικών μεθοδολογιών. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17 Διάγραμμα Venn με την κατανομή των miRNAs ανά ανάλυση

Η αρχική υπογραφή των miRNAs προκύπτει από τα δεδομένα του διαγράμματος Venn, καθώς επιλέγονται τα miRNAs που εντοπίζονται κοινά σε περισσότερες από μια μεθοδολογίες. Έτσι, καταλήγουμε σε μια ομάδα 35 miRNAs η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

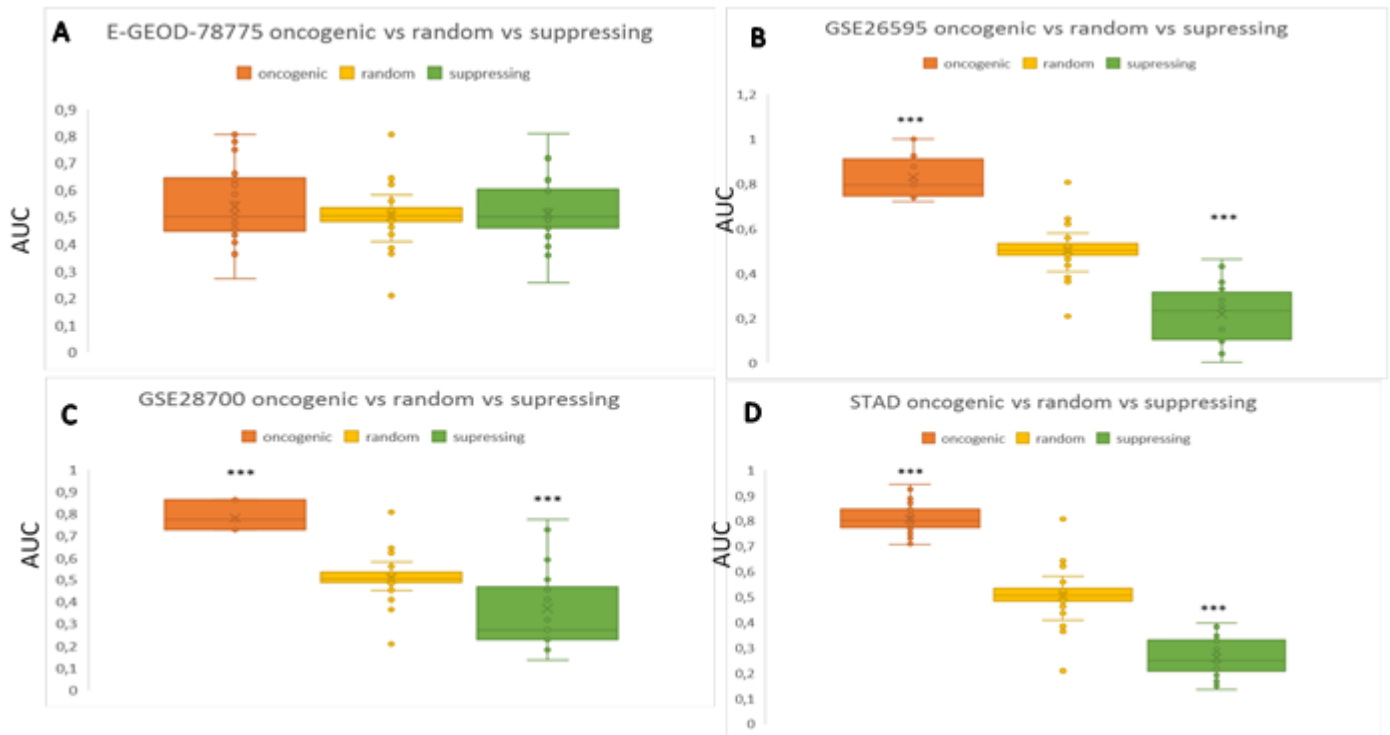
Πίνακας 3 Αρχική υπογραφή miRNA και οι τιμές AUC

Marker	AUC	Marker	AUC	Marker	AUC	Marker	AUC
miR_267	0.14769	miR_255	0.18894	miR_126	0.06642	miR_649	0.18276
miR_284	0.15223	miR_67	0.19513	miR_125	0.06972	miR_487	0.1184
miR_103	0.15305	miR_443	0.09571	miR_13	0.07921	miR_102	0.1217
miR_633	0.15305	miR_442	0.09695	miR_137	0.08086	miR_1050	0.15058
miR_264	0.15512	miR_274	0.1151	miR_143	0.08622	miR_748	0.19142
miR_241	0.16172	miR_220	0.12376	miR_821	0.10272		
miR_289	0.16295	miR_1006	0.16089	miR_201	0.10314		
miR_142	0.16749	miR_151	0.16543	miR_66	0.13861		
miR_268	0.17203	miR_141	0.16873	miR_827	0.14604		
miR_853	0.17698	miR_127	0.06188	miR_957	0.16873		

4.2Αξιολόγηση της διαγνωστικής ικανότητας σε ανεξάρτητα δεδομένα καρκινικών βιοψιών

Για να αξιολογηθεί η διαγνωστική ικανότητα των 35 επιλεγμένων miRNA από την προηγούμενη φάση της ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική ROC ανάλυση μεταξύ αυτών και ίσου αριθμού τυχαία επιλεγμένων miRNA σε τέσσερα διαφορετικά και ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων έκφρασης miRNA σε γαστρικές καρκινικές και παρακαρκινικές βιοψίες. Στόχος αυτής της ανάλυσης (Validation model), ήταν η επιβεβαίωση του διαγνωστικού δυναμικού της τελικής υπογραφής miRNA σε ετερογενή (ως προς τη σύσταση των ασθενών και τη μεθοδολογία ανίχνευσης της έκφρασης) δεδομένα συγκριτικά με την προηγούμενη φάση ανίχνευσης (βλ. υλικά και μέθοδοι). Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε με t-test στις τιμές AUC, θέτοντας ως μηδενική υπόθεση ότι το μέσο διαγνωστικό δυναμικό (AUC signature median) των δύο υπογραφών (selected & random) δεν εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση στο φυσιολογικό / παρακαρκινικό ιστό.

Στην Εικόνα 18 παρουσιάζονται τα γραφήματα που παραθέτουν ανά πακέτο δεδομένων, την κατανομή των τιμών AUC μεταξύ των επιλεγμένων για καταστολή στον όγκο miRNA συγκριτικά με ίσο αριθμό τυχαία επιλεγμένων miRNA ή miRNA επιλεγμένων για υπερέκφραση στον γαστρικό όγκο (προηγούμενη πτυχιακή του εργαστηρίου).



Εικόνα 18 Σύγκριση τυχαία επιλεγμένων, ογκοεπαγωγικών και ογκοκατασταλτικών miRNAs ανά μεθοδολογία. A. E-GEOD-78775 B. GSE26595 C. GSE28700 D. STAD

Στο διάγραμμα A της εικόνας 18, πραγματοποιείται η σύγκριση για το πρώτο σετ δεδομένων, το E-GEOD-78775 (μικροσυστοιχίες, 28 δότες) στο οποίο βλέπουμε πως δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των επιλεγμένων και τυχαίων miRNA, καθώς ο μέσος όρος των τιμών AUC των επιλεγμένων miRNA, τόσο των ογκοκατεσταλμένων όσο και των ογκοεκφρασμένων, είναι στα ίδια επίπεδα με αυτόν των τυχαίων miRNA. Επιπλέον η τιμή p – value που προέκυψε από το t – test είναι ίση με 0,365 για τα ογκοκατεσταλμένα miRNAs και 0,083 για τα ογκοεκφρασμένα miRNAs.

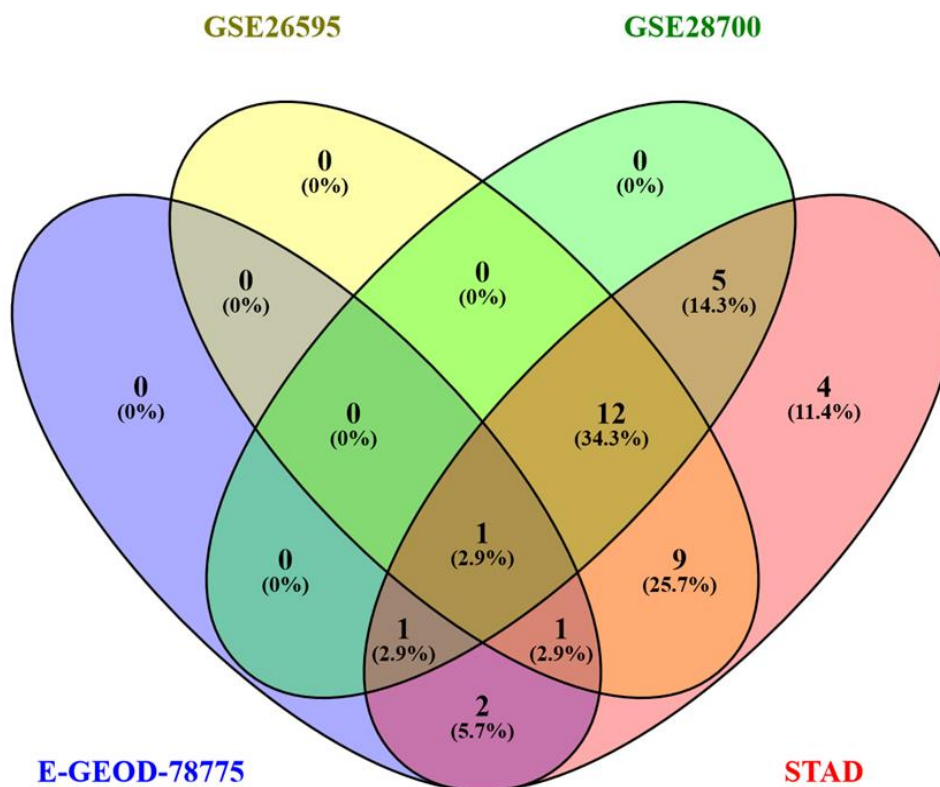
Στο γράφημα 18B της εικόνας, βλέπουμε τα δεδομένα από το δεύτερο dataset GSE26595 (μικροσυστοιχίες, 60 καρκινικά & 8 φυσιολογικά), όπου φαίνεται πως ο μέσος όρος των τιμών AUC των επιλεγμένων ογκοκατεσταλμένων miRNAs είναι αρκετά χαμηλότερος από αυτόν των τυχαίων miRNAs, ενώ κατά αντιστοιχία ο μέσος όρος των τιμών AUC των ογκοεκφρασμένων miRNAs είναι αρκετά υψηλότερος και

από τα τυχαία επιλεγμένα και από τα ογκοκατεσταλμένα. Οι τιμές p-value όπως προέκυψαν από το t – test είναι $16 \cdot 10^{-7}$ για τα ογκοκατεσταλμένα miRNAs και $7 \cdot 10^{-9}$ για τα αντίστοιχα ογκοεκφρασμένα miRNAs.

Ομοίως, στο γράφημα 18C, όπου αναπαρίσταται η σύγκριση για το τρίτο dataset, GSE28700 (μικροσυστοιχίες, 22 δότες), ο μέσος όρος των τιμών AUC των επιλεγμένων ογκοκατεσταλμένων miRNAs είναι αρκετά χαμηλότερος από αυτόν των τυχαίων miRNAs, ενώ κατά αντιστοιχία ο μέσος όρος των τιμών AUC των ογκοεκφρασμένων miRNAs είναι αρκετά υψηλότερος και από τα τυχαία επιλεγμένα και από τα ογκοκατεσταλμένων. Έτσι, συμπεραίνουμε πως στα δύο από τα τρία datasets που προέρχονται από δεδομένα μικροσυστοιχιών, επιβεβαιώθηκε το υψηλότερο διαγνωστικό δυναμικό των επιλεγμένων ογκοκατασταλτικών miRNAs. Οι τιμές p-value όπως προέκυψαν από το t – test είναι $1,78 \cdot 10^{-7}$ για τα ογκοκατεσταλμένα miRNAs και 0,00219 για τα αντίστοιχα ογκοεκφρασμένα miRNAs.

Στην ίδια εικόνα, στο γράφημα 18D βλέπουμε τη σύγκριση για το τέταρτο dataset το STAD, το οποίο διαφέρει από τα προηγούμενα όσον αφορά την πηγή άντλησης δεδομένων, καθώς σε αυτή την περίπτωση τα δεδομένα προέρχονται από sRNAseq (268 καρκινικά & 29 παρακαρκινικά). Παρατηρούμε είναι ότι τα τυχαία επιλεγμένα miRNAs παρουσιάζουν ενδιάμεση τιμή του μέσου όρου των τιμών AUC, η οποία διαφέρει σημαντικά τόσο με τα ογκοεκφρασμένα όσο και με τα ογκοκατεσταλμένα miRNAs. Αυτό σημαίνει ότι οι επιλεγμένες ανά περίπτωση υπογραφές miRNA μπορούν να διακρίνουν τόσο την καρκινική όσο και τη φυσιολογική κατάσταση συγκριτικά με τα τυχαία miRNAs. Οι τιμές p-value όπως προέκυψαν από το t – test είναι $15 \cdot 10^{-17}$ για τα ογκοκατεσταλμένα miRNAs και $8,9 \cdot 10^{-23}$ για τα αντίστοιχα ογκοεκφρασμένα miRNAs.

Στη συνέχεια, κατασκευάσαμε ένα διάγραμμα Venn για τα miRNA με τιμή $AUC \leq 0,4$, για να βρούμε την κατανομή των miRNAs από τα τέσσερα διαφορετικά datasets. Από τα αποτελέσματα, θα επιλεγούν τα miRNAs που είναι κοινά σε παραπάνω από ένα dataset. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 19. Παρατηρούμε πολλά κοινά miRNA μεταξύ των τριών dataset, πλην του EGEO78775, γεγονός που επιβεβαιώνει την ανεξάρτητη επαλήθευση του διαγνωστικού τους δυναμικού ανεξαρτήτως από μεθοδολογία ανίχνευσης ή την κλινική εικόνα των ασθενών από όπου συλλέχθηκαν τα δεδομένα.

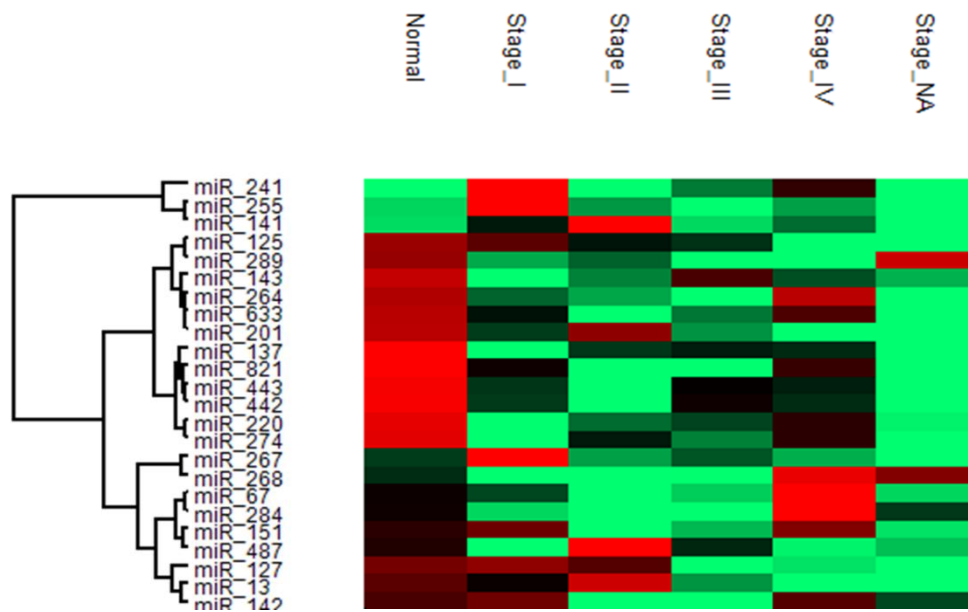


Εικόνα 19 Διάγραμμα Venn με την κατανομή των miRNAs ανά dataset

4.3 Εξειδίκευση της διάγνωσης μεταξύ των σταδίων του γαστρικού καρκίνου

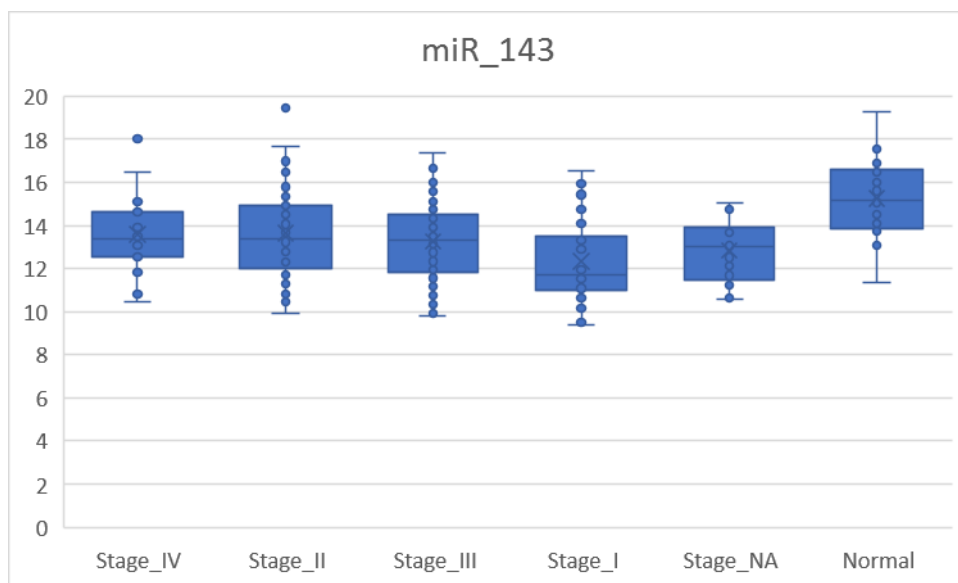
Ένα βασικό χαρακτηριστικό που πρέπει να εξετάσουμε στα miRNAs είναι η διαγνωστική τους ικανότητα ακόμα και συγκριτικά με αρχικά στάδια του γαστρικού καρκίνου. Για αυτό το λόγο αξιοποιήθηκαν δεδομένα από sRNAseq που περιλαμβάνουν τη μέση τιμή έκφρασης των επιλεγμένων miRNAs, κατόπιν ομαδοποίησης των όγκων ανά στάδιο της νόσου συμπεριλαμβανομένων και όγκων χωρίς παθολογοανατομική ταξινόμηση (στάδιο NA) το οποίο δεν εμφανίζει ιστολογικά ευρήματα, έναντι της παρακαρκινικής βιοψίας. Μετά τη συλλογή των δεδομένων κατασκευάστηκε ένας θερμικός χάρτης στο Perseus (heat map) ο οποίος μας δείχνει τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των miRNAs. Σε αυτόν τον θερμικό χάρτη, το κόκκινο χρώμα συμβολίζει την υπερέκφραση του μορίου που απεικονίζεται ενώ με πράσινο χρώμα η υποέκφραση αυτού συγκριτικά με τον μέσο όρο όλων των

δειγμάτων (ιστοί) της ανάλυσης. Με μαύρο χρώμα δηλώνεται η μη διαφορική έκφραση μεταξύ των συγκρινόμενων ιστών (παρακαρκινικός και στάδια γαστρικών όγκων). Στην Εικόνα 20 απεικονίζεται ο θερμικός χάρτης, στον οποίο φαίνεται ότι η πλειοψηφία των miRNAs υπερεκφράζεται στον ανατομικά φυσιολογικό παρακαρκινικό ιστό, ενώ στις καρκινικές βιοψίες βλέπουμε συγκριτικά χαμηλότερη έκφραση ακόμα και για τα αρχικά στάδια του όγκου.

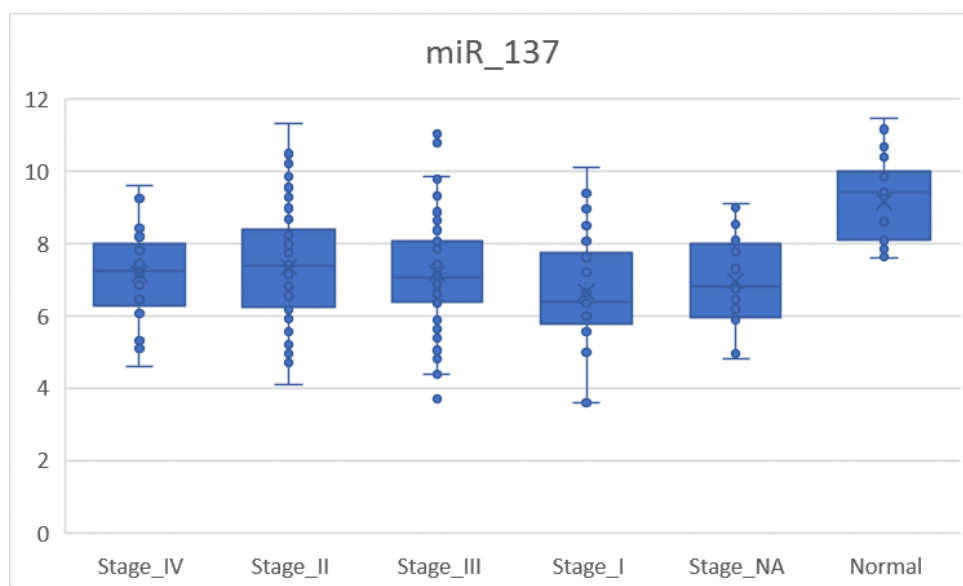


Εικόνα 20 Θερμικός χάρτης απεικόνισης επιπέδων έκφρασης των miRNAs στα στάδια του γαστρικού καρκίνου

Στην εικόνα 21 απεικονίζεται το εύρος απόκλισης ανά στάδιο για το miR_143, όπου φαίνεται πως ανεξαρτήτως του μεγάλου εύρους των τιμών η μέση τιμή του φυσιολογικού παρακαρκινικού ιστού είναι υψηλότερη από τη μέση τιμή των υπόλοιπων σταδίων. Ομοίως στην Εικόνα 22, απεικονίζεται το εύρος απόκλισης ανά στάδιο για το miR_137, όπου ομοίως με προηγουμένως, η μέση τιμή του φυσιολογικού παρακαρκινικού ιστού είναι υψηλότερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα στάδια, ενώ επιπλέον το miR_137 φαίνεται να εκφράζεται υψηλότερα στον φυσιολογικό παρακαρκινικό ιστό συγκριτικά με το miR_143. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την αρχική μας υπόθεση για υπερέκφραση της επιλεγμένης υπογραφής miRNA στον φυσιολογικό παρακαρκινικό γαστρικό ιστό έναντι του καρκινικού ιστού.



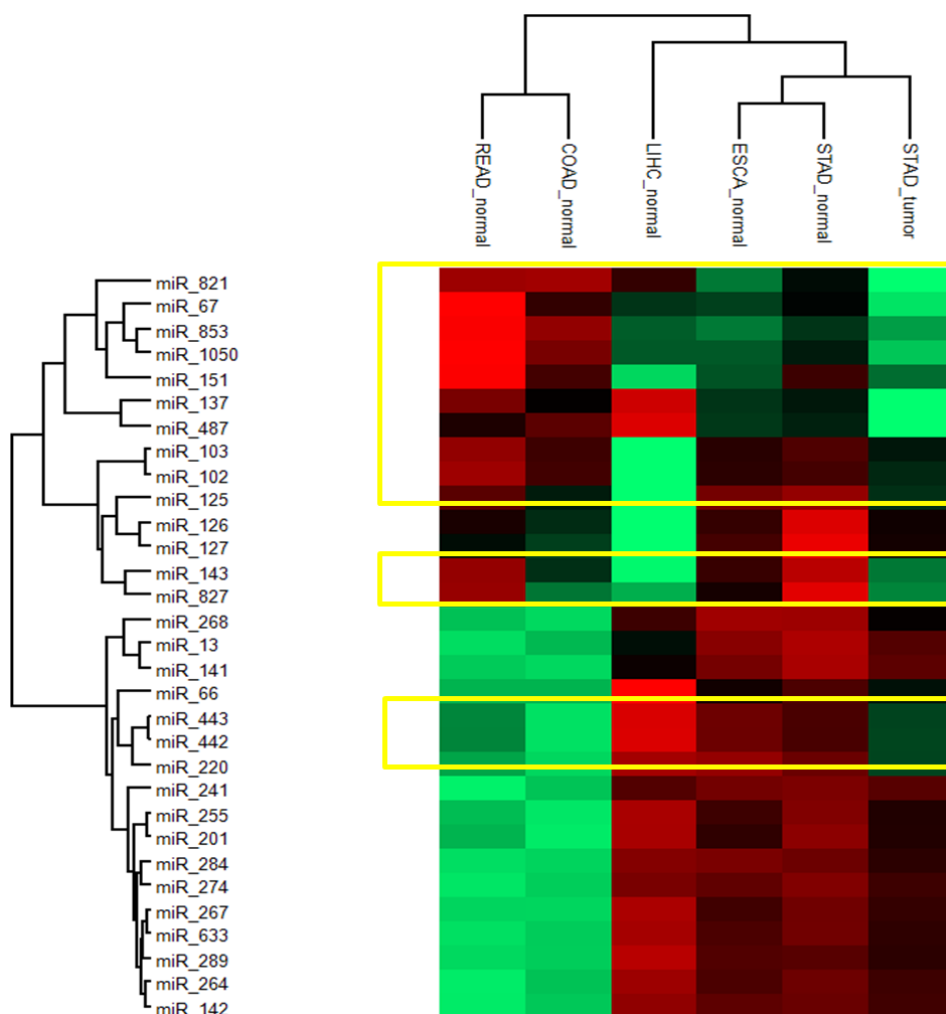
Εικόνα 22 Εύρος απόκλισης του *miR_143* ανά στάδιο



Εικόνα 21 Εύρος απόκλισης του *miR_137* ανά στάδιο

4.4 Ικανότητα διάκρισης μεταξύ παρακαρκινικών ιστών από ιστολογικά σχετιζόμενους τύπους καρκίνου

Όπως συζητήθηκε και στην εισαγωγή, η διάγνωση του καρκίνου του στομάχου γίνεται σε αρκετά προχωρημένο στάδιο της νόσου με αποτέλεσμα σε αρκετές περιπτώσεις να έχει μετασταθεί σε γειτονικούς ιστούς, όπως το ήπαρ, ο οισοφάγος και το έντερο, είτε και σε πιο απομακρυσμένους ιστούς, ο πιο κοινός εκ των οποίων είναι οι πνεύμονες [118, 119]. Για αυτό το λόγο είναι χρήσιμο να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων miRNAs στους συγγενικούς με τον γαστρικό, τύπους παρακαρκινικού ιστού. Στην Εικόνα 23 απεικονίζεται ο θερμικός χάρτης που κατασκευάστηκε, για τη σύγκριση του εύρους απόκλισης της έκφρασης των αρχικά επιλεγμένων miRNAs, καθώς αυτά αντιπαραβάλλονται με τα δεδομένα έκφρασης του γαστρικού καρκινικού ιστού.



Εικόνα 23 Θερμικός χάρτης του εύρους απόκλισης της έκφρασης σε σχετιζόμενους παρακαρκινικούς ιστούς

STAD: αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, **ESCA:** καρκίνωμα του οισοφάγου, **LIHC:** καρκίνος του ήπατος **READ:** αδενοκαρκίνωμα του ορθού, **COAD:** αδενοκαρκίνωμα του κόλου,

Όπως φαίνεται και στην εικόνα, ο παρακαρκινικός ιστός του στομάχου εμφανίζει ένα κοινό πρότυπο έκφρασης με τον παρακαρκινικό ιστό του οισοφάγου και λιγότερο κοινό με το ήπαρ. Οι ομοιότητες μεταξύ στομάχου και οισοφάγου πιθανότατα να οφείλονται στη κοινή γενεαλογία και την ιστολογική τους ομοιότητα, ενώ με το ήπαρ πιθανότατα το κοινό πρότυπο έκφρασης να οφείλεται στις συχνές μεταστάσεις του γαστρικού καρκίνου στον ηπατικό ιστό. Ο παρακαρκινικός ιστός του ορθού και του κόλου ενώ μεταξύ τους εμφανίζουν κοινό εκφραστικό πρότυπο, είναι αντίθετο με αυτό του στομάχου, γεγονός που συμβάλλει στο διαχωρισμό του γαστρικού και εντερικού καρκίνου.

Συγκριτικά με το γαστρικό καρκινικό ιστό, παρατηρείται πως σε αντίθεση με τις προηγούμενες αναλύσεις, υπάρχουν αρκετά miRNAs που φαίνεται να υπερεκφράζονται σε αυτόν, με παρόμοια επίπεδα έκφρασης με τον παρακαρκινικό ιστό του στομάχου και του οισοφάγου. Από αυτό το στάδιο, επιλέχθηκαν 15 miRNAs, τα οποία βρίσκονται σε κίτρινο πλαίσιο στην εικόνα, τα οποία εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ του γαστρικού παρακαρκινικού και καρκινικού ιστού, δηλαδή υπερεκφράζονται στον γαστρικό παρακαρκινικό και υποεκφράζονται στην πλειοψηφία των συγγενικών καρκινικών ιστών. Τα miRNAs τα οποία επιλέχθηκαν συνοψίζονται στον πίνακα 4.

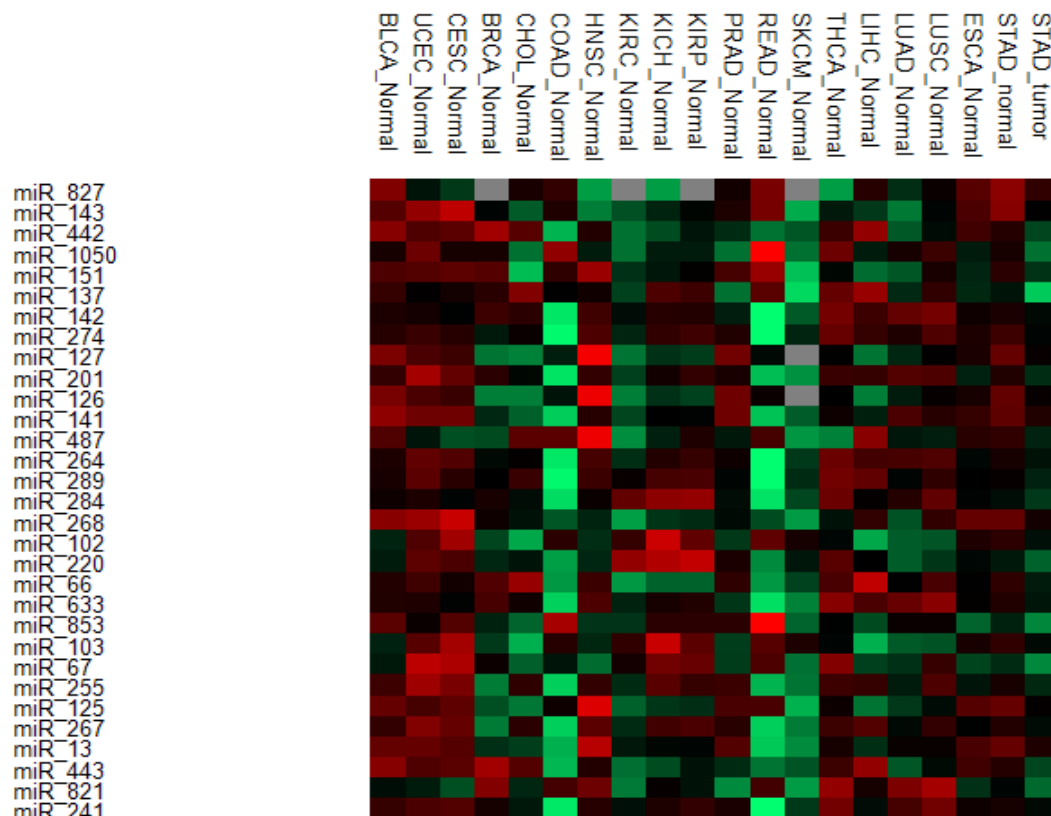
Πίνακας 4 Επιλεγμένα miRNAs από το παρόν στάδιο της ανάλυσης

miRNAs				
miR_827	miR_103	miR_853	miR_143	miR_821
miR_220	miR_102	miR_125	miR_443	miR_137
miR_67	miR_1050	miR_151	miR_442	miR_487

4.5 Ικανότητα διάκρισης μεταξύ μη σχετιζόμενων καρκινικών και παρακαρκινικών ιστών

Στο επόμενο βήμα, τα 15 miRNAs που επιλέχθηκαν, συγκρίνονται ως προς το εύρος απόκλισης της έκφρασής τους σε 19 διαφορετικούς τύπους παρακαρκινικού ιστού, συμπεριλαμβανομένων και των σχετιζόμενων καρκίνων από το προηγούμενο στάδιο. Ο σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν να αποκλειστούν miRNAs με συχνή υπερέκφραση σε καρκινικούς ιστούς παράλληλα με τον παρακαρκινικό γαστρικό. Ομοίως με προηγούμενως, τα δεδομένα αντιπαραβάλλονται με τον γαστρικό καρκινικό ιστό. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 24.

Οι τύποι καρκίνου που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη φάση της ανάλυσης ήταν για τον καρκίνο του θυρεοειδούς (THCA), μελάνωμα της επιδερμίδας του δέρματος (SKCM), Αδενοκαρκίνωμα του προστάτη (PRAD), θηλώδες καρκίνωμα του νεφρού (KIRP), διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (KIRC), χρωμόφοβο αδενοκαρκίνωμα του νεφρού (KICH), καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων των πνευμόνων (LUSC), χολαγγειοκαρκίνωμα (CHOL), διεισδυτικό καρκίνωμα του στήθους (BRCA), Καρκίνωμα ενδομητρίου μήτρας (UCEC), καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας και ενδοτραχηλικό αδενοκαρκίνωμα (CESC), αδενοκαρκίνωμα των πνευμόνων (LUAD), ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (BLCA) και καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου (HNSC).



Εικόνα 24 Θερμικός χάρτης του εύρους απόκλισης της έκφρασης των *miRNAs* σε 19 διαφορετικούς παρακαρκινικούς ιστούς συγκρινόμενα με τον καρκινικό γαστρικό ιστό

Στο θερμικό χάρτη, με εξαίρεση το *miR_827*, βλέπουμε πως η πλειοψηφία των *miRNAs* εμφανίζει χαμηλή έκφραση στον γαστρικό καρκινικό ιστό έναντι των παρακαρκινικών ιστών. Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται η επιλογή 6 *miRNAs* τα οποία υπερεκφράζονται στον παρακαρκινικό ιστό του στομάχου και υποεκφράζονται στον καρκινικό ιστό του στομάχου. Στον πίνακα 5 συνοψίζονται τα 6 *miRNAs* τα οποία αποτελούν και την τελική υπογραφή των ογκοκατασταλτικών *miRNAs*.

Πίνακας 5 Τελική υπογραφή miRNAs

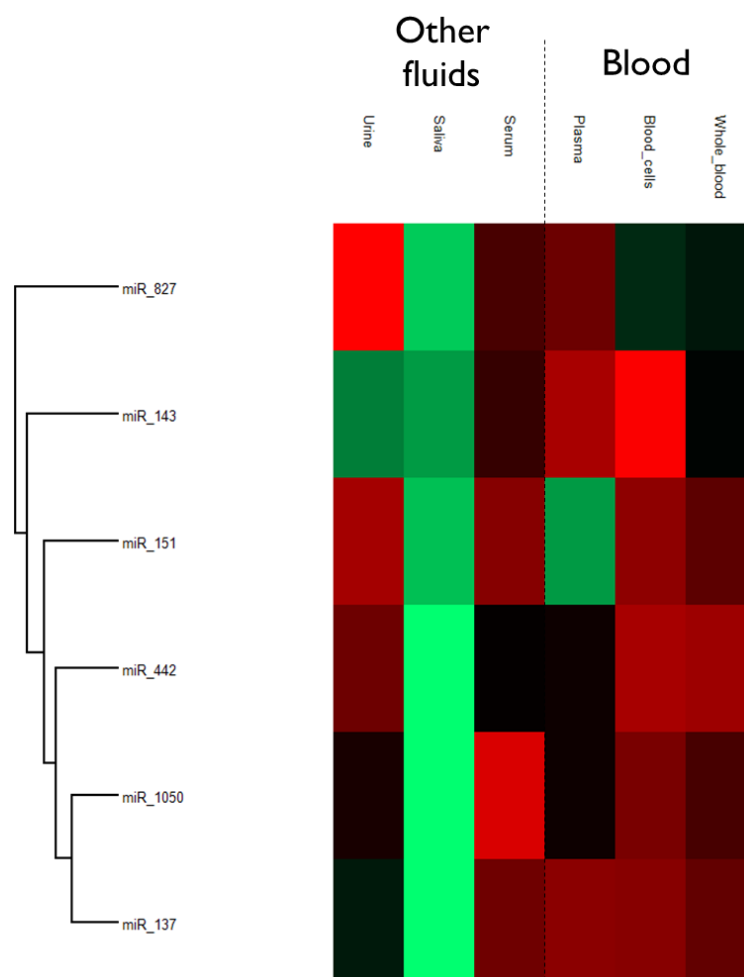
miRNAs		
miR_827	miR_143	miR_442
miR_1050	miR_151	miR_137

4.6 Έλεγχος και σύγκριση της έκφρασης των miRNAs σε βιοψίες υγιών και φυσιολογικών ανήλικων ιστών

Εφόσον ελέγχθηκε η έκφραση των miRNAs στον παρακαρκινικό ιστό, επόμενο βήμα ήταν να παρατηρηθούν τα επίπεδα έκφρασής τους σε φυσιολογικούς ιστούς από ενήλικες δότες, ώστε να διαπιστωθεί το πρότυπο έκφρασης των επιλεγμένων miRNA απουσία της νόσου. Ο λόγος που χρειάζεται αυτό το βήμα έγκειται στη διαφορά μεταξύ παρακαρκινικού και φυσιολογικού ιστού. Ο παρακαρκινικός ιστός δεν είναι φυσιολογικός ως προς την ολότητά του, καθώς αποτελεί διπλανό ιστό του καρκίνου, όμως ανατομικά ιστολογικά δεν εμφανίζει αλλοιώσεις. Για αυτό το λόγο και χαρακτηρίζεται ως «ανατομικά φυσιολογικός παρακαρκινικός ιστός». Επομένως, το επόμενο βήμα αφορά τη μελέτη της έκφρασης των επιλεγμένων miRNAs σε μεταγραφώματα από διαφορετικούς φυσιολογικούς ενήλικες ιστούς του ανθρώπινου σώματος.

Στην Εικόνα 25, απεικονίζεται ο θερμικός χάρτης με το εύρος απόκλισης της έκφρασης των επιλεγμένων miRNAs μεταξύ του καρκινικού και παρακαρκινικού γαστρικού ιστού έναντι των υγιών ιστών. Από τα αριστερά προς τα δεξιά, φαίνονται πρώτα ο καρκινικός και παρακαρκινικός ιστός του στομάχου, έπειτα έχουν ομαδοποιηθεί οι ιστοί του αίματος, στη συνέχεια οι συγγενικοί ιστοί του στομάχου και τέλος οι υπόλοιποι ιστοί. Οι ιστοί του αίματος μας ενδιαφέρουν ιδιαίτερα, διότι θέλουμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο ότι κατά τη λήψη υγρής βιοψίας, τα miRNAs τα οποία εντοπίζονται προέρχονται από το ίδιο το αίμα και όχι από τον ιστό του στομάχου.

Όπως φαίνεται στο θερμικό χάρτη, η πλειοψηφία των miRNAs υπερεκφράζεται στους φυσιολογικούς ιστούς συγκριτικά με τον καρκινικό και παρακαρκινικό ιστό. Επίσης, βλέπουμε την έκφραση των miRNAs να είναι πιο αυξημένη στους συγγενικούς ιστούς του στομάχου και στο στόμαχο, έναντι των υπόλοιπων υγιών ιστών, γεγονός που επιβεβαιώνει και επαληθεύει την αρχική μας υπόθεση για την ανίχνευση ογκοκατεσταλμένων miRNAs που υπερεκφράζονται στο φυσιολογικό γαστρικό ιστό. Συνεπώς, η τελική υπογραφή των επιλεγμένων miRNAs θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης με εξειδίκευση για τον φυσιολογικό ιστό, εφόσον τα συγκεκριμένα miRNA ανιχνεύονται και σε σωματικά υγρά.

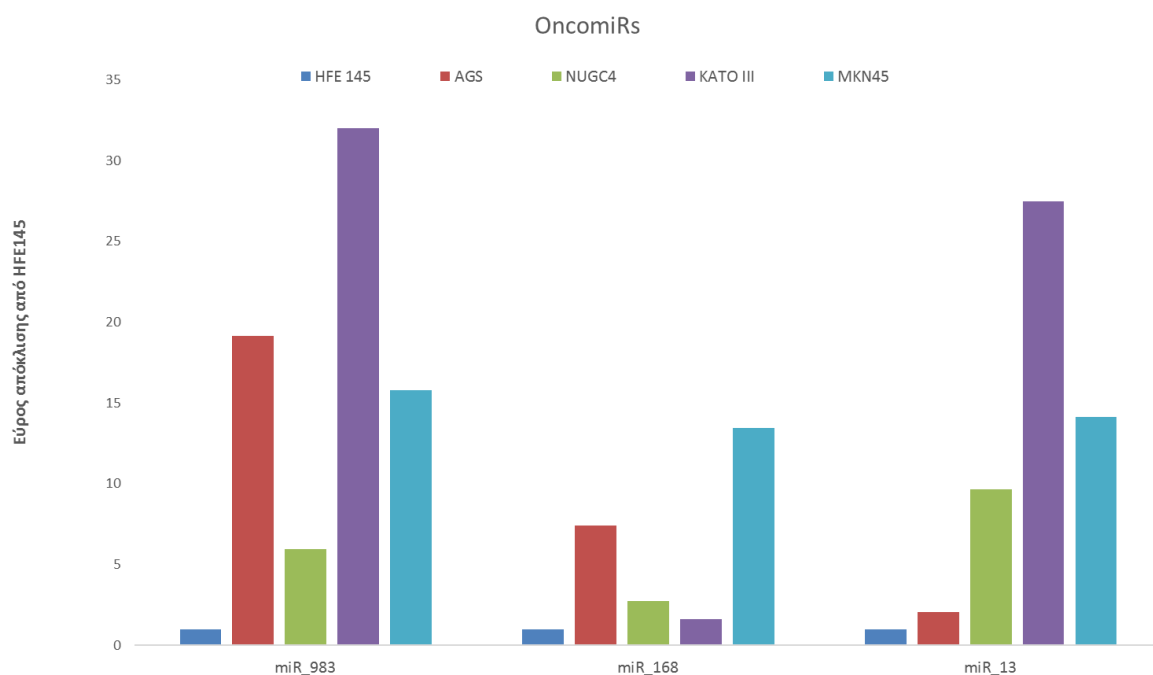


Εικόνα 26 Θερμικός χάρτης της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στα σωματικά υγρά

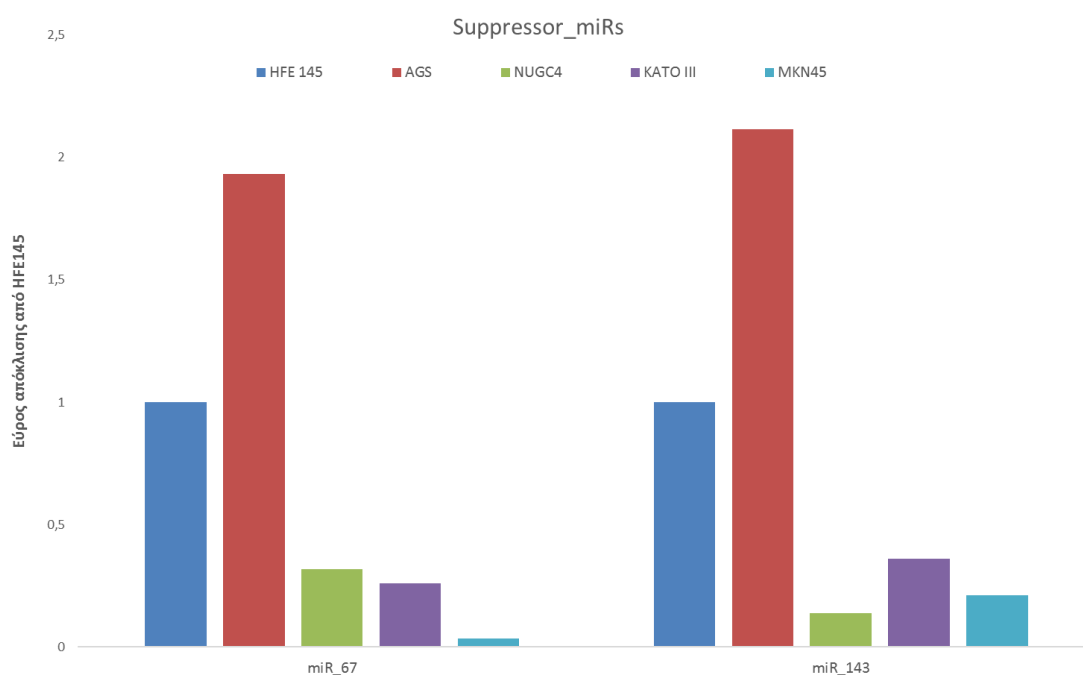
Όπως φαίνεται στην εικόνα, η πλειοψηφία των miRNAs εντοπίζονται σε όλα τα σωματικά υγρά εκτός από το σάλιο. Συγκεκριμένα, βλέπουμε μια υψηλή έκφραση των miRNAs στα ούρα και στον ορό και το αίμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η λήψη δείγματος θα είναι ελάχιστη ή καθόλου παρεμβατική, στην περίπτωση των ούρων. Από την αντίθετη πλευρά, στο σάλιο δεν εντοπίζεται κανένα miRNA άρα συμπεραίνουμε ότι δεν είναι κατάλληλο προς χρήση για την ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών.

4.8 Επαλήθευση των βιοπληροφορικών αποτελεσμάτων με stem loop qPCR

Αφότου ολοκληρώθηκε η βιοπληροφορική ανάλυση, και καταλήξαμε στην υπογραφή των miRNAs που δρουν ογκοκατασταλτικά, θέλαμε να επιβεβαιώσουμε και πειραματικά την έκφραση κάποιων από τα επιλεγμένα miRNA σε αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές. Για να γίνει η επαλήθευση κάναμε stem loop qPCR σε επιλεγμένα miRNAs με ογκοκατεσταλμένο και ογκοεκφρασμένο πρότυπο έκφρασης, όπως αυτό προέκυψε από τη βιοπληροφορική ανάλυση που περιεγράφηκε και την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία του εργαστηρίου αντίστοιχα. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χαρακτηριστικές για τα στάδια του γαστρικού καρκίνου. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε μια φυσιολογική, αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά γαστρικού επιθηλίου (HFE145), και τέσσερις καρκινικές γαστρικές κυτταρικές σειρές (AGS, NUGC4, KATOIII, MKN45). Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για ένα ιδιόσυστατο γονίδιο αναφοράς με υψηλά επίπεδα έκφρασης (GAPDH). Στη συνέχεια τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν εκ νέου ως εύρος απόκλισης ως προς τα επίπεδα έκφρασης της κυτταρικής σειράς HFE145, ώστε τα αποτελέσματα να εμφανίζονται ως εύρος απόκλισης από την έκφραση στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο. Στις εικόνες 27 και 28 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από την stem loop qPCR για τα ογκοεπαγωγικά και τα ογκοκατασταλτικά miRNAs αντίστοιχα. Τα miRNAs τα οποία επιλέχθηκαν για την πειραματική επαλήθευση ήταν τα ογκοεπαγωγικά miR_983, miR_168 και miR_13, ενώ για τα ογκοκατασταλτικά ήταν τα miR_67 και miR_143. Αυτό που παρατηρούμε στα ογκοεπαγωγικά miRNAs, είναι ότι όσο αυξάνεται το στάδιο έκτασης του γαστρικού καρκίνου, τόσο αυξάνεται και η έκφρασή τους στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Τουναντίον, στην περίπτωση των ογκοκατασταλτικών miRNAs, βλέπουμε γενικότερα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τα ογκοεπαγωγικά miRNAs, όμως σε αυτή την περίπτωση, στα προχωρημένα στάδια του γαστρικού καρκίνου, η έκφρασή τους μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με τη φυσιολογική κυτταρική σειρά και τον πρωτεύων όγκο. Τα αποτελέσματα αυτά, επαληθεύουν τις βιοπληροφορικές αναλύσεις που διεξήχθησαν και επιβεβαιώνουν τις αρχικές μας υποθέσεις, ενώ παράλληλα προσφέρουν και μια πρώτη εργαστηριακή μεθοδολογία ανίχνευσης των μοριακών βιοδεικτών μας.



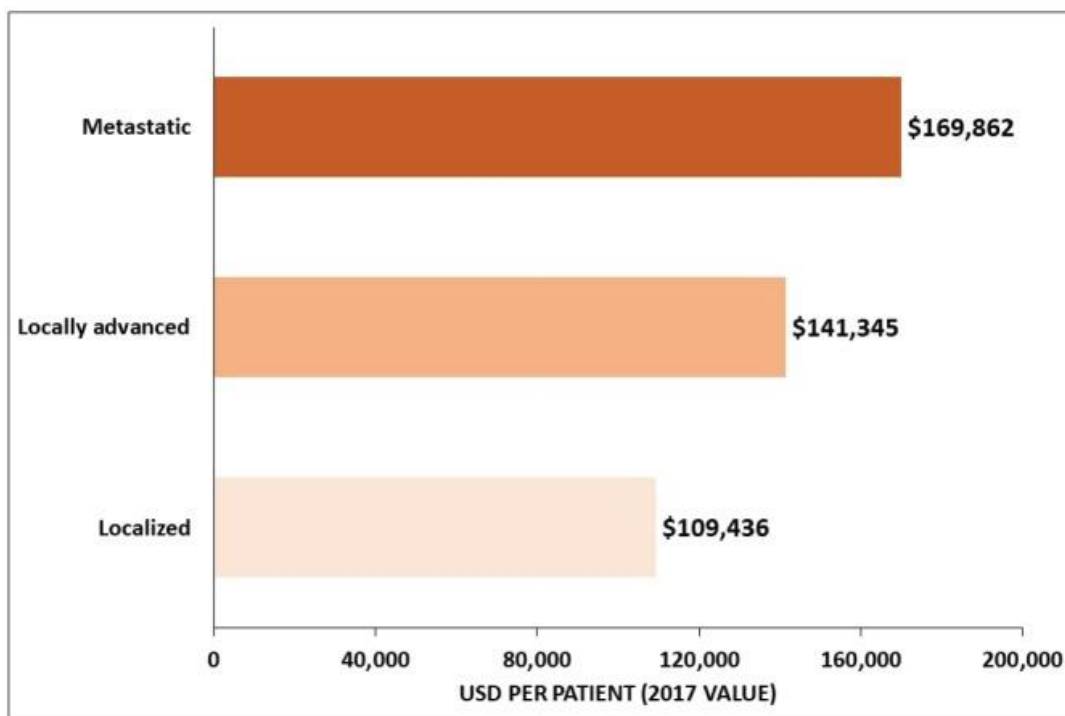
Εικόνα 27 Επίπεδα έκφρασης των ογκοεπαγόμενων *miRNAs* απεικονισμένα ως εύρος απόκλισης από HFE145



Εικόνα 28 Επίπεδα έκφρασης των ογκοκατεσταλμένων *miRNAs* απεικονισμένα ως εύρος απόκλισης από HFE145

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

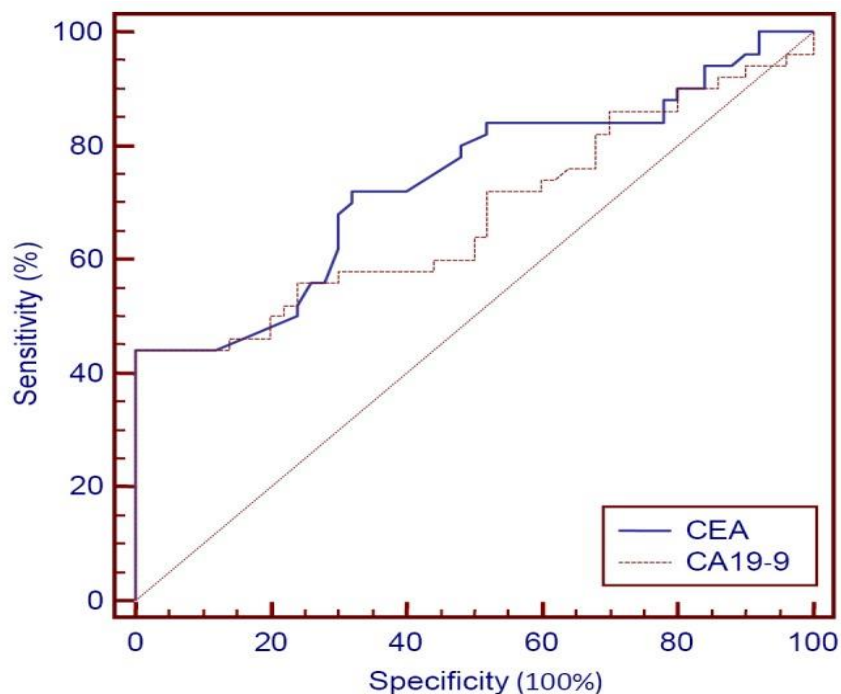
Το οικονομικό κόστος για τη διαχείριση του γαστρικού καρκίνου είναι υψηλότερο από το αντίστοιχο κόστος για κάθε άλλο τύπο καρκίνου [120]. Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, το μέσο κόστος για έναν ασθενή τους πρώτους 18 μήνες μετά τη διάγνωση με γαστρικό καρκίνο ανέρχεται στα 96.571\$, με το κόστος να αυξάνεται με το στάδιο του γαστρικού καρκίνου με το οποίο διαγιγνώσκεται ο ασθενής. (Εικόνα 29) [121].



Εικόνα 27 Μέσο κόστος για ασθενή με γαστρικό καρκίνο με βάση το στάδιο της νόσου στις ΗΠΑ

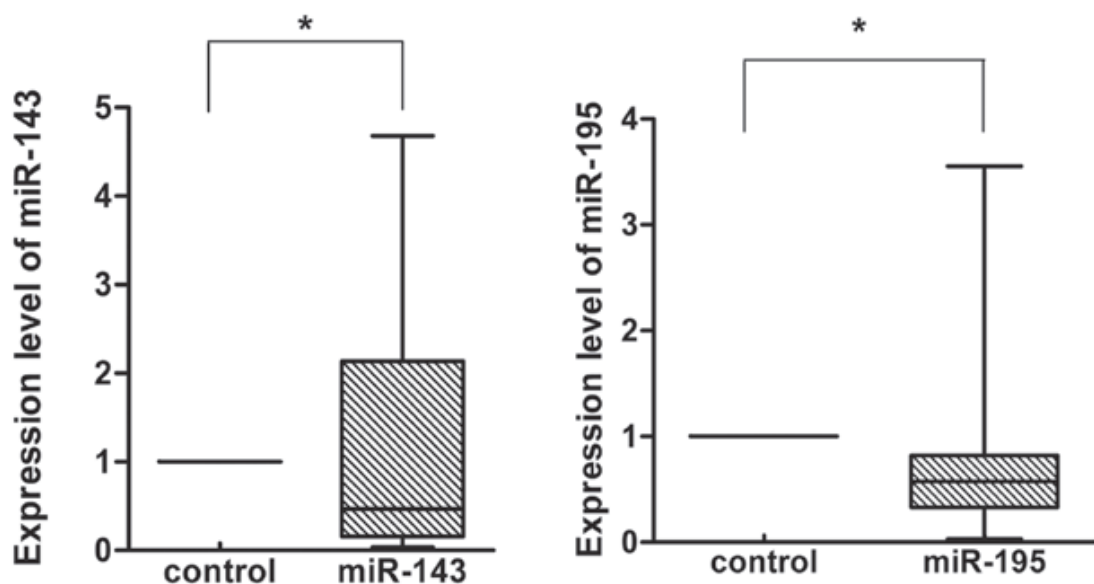
Συνεπώς, θεωρείται αναγκαία η ανάπτυξη νέων μη επεμβατικών μοριακών μεθόδων ανίχνευσης και διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου. Το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται στα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA, και συγκεκριμένα στα micro RNAs, βασιζόμενοι στην ιστοειδικότητα και καρκινοειδικότητά τους, καθώς επίσης και στον εντοπισμό τους στα βιολογικά υγρά. Ορμώμενοι από αυτές τις ιδιότητες και την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, γεννήθηκε η παρούσα πτυχιακή εργασία που είχε ως σκοπό την βιοπληροφορική και στατοστική ανάλυση της έκφρασης των μειορρυθμιζόμενων στον γαστρικό καρκίνο miRNA, την σύγκρισή της με την έκφραση που παρουσιάζουν σε διαφορετικούς καρκινικούς και υγιείς ιστούς καθώς επίσης και την πειραματική επαλήθευση των βιοπληροφορικών αποτελεσμάτων με stem loop qPCR.

Από την βιοπληροφορική ανάλυση προέκυψε μια υπογραφή έξι miRNAs τα οποία θεωρούνται ογκοκατεσταλμένα, διότι η έκφρασή τους είναι μειωμένη στον καρκινικό γαστρικό ιστό έναντι του παρακαρκινικού και του υγιούς γαστρικού ιστού (Εικόνα 25). Δεδομένου ότι ο απώτερος σκοπός είναι η χρήση των miRNAs ως διαγνωστικό εργαλείο, θεωρείται αναγκαία η σύγκριση του διαγνωστικού δυναμικού τους με του ήδη υπάρχοντες βιοχημικούς βιοδείκτες. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, από τους πιο γνωστούς βιοχημικούς βιοδείκτες είναι το Carcinoembryonic antigen και ο cancer antigen 19 – 9. Η ευαισθησία του CEA για την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου αγγίζει το 30%, με $AUC = 0,442$, ενώ για το CA19-9 η ευαισθησία υπολογίστηκε 42% με $AUC = 0,679$ και οι καμπύλες ROC που κατασκευάστηκαν για τους δύο αυτούς βιοδείκτες για την ευαισθησία και την εξειδίκευσή τους στον γαστρικό καρκίνο παρατίθενται στην Εικόνα 30 [122]. Ενώ φαίνεται ότι μπορούν να διαχωρίσουν την καρκινική από την φυσιολογική κατάσταση στον γαστρικό καρκίνο, εμφανίζουν παραπλήσια ποσοστά ευαισθησίας και τιμές AUC και με άλλους τύπους καρκίνου, συγκεκριμένα με τον καρκίνο του οισοφάγου και του εντέρου. Επιπλέον, ως βιοδείκτες στον γαστρικό καρκίνο εξετάστηκαν τα γονίδια SLC5A6 και MFAP2, τα οποία εμφάνισαν υψηλή ειδικότητα και εξειδίκευση στην ανίχνευση του καρκινικού ιστού με τιμές AUC 1 και 0,9842 αντίστοιχα [123]. Ομοίως, οι βιοδείκτες INHBA και SPP1 έδωσαν τιμές AUC 0,97 και 0,924 αντίστοιχα [124].



Εικόνα 28 Καμπύλες ROC για τους βιοχημικούς βιοδείκτες CEA & CA19-9 στον καρκίνο του στομάχου.

Αναφορικά με τα ογκοεπαγόμενα miRNAs, εμφανίζουν αρκετά υψηλότερη ευαισθησία στην ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου συγκριτικά με τους CEA και CA19-9 [125]. Αντιθέτως, τα miRNA τα οποία μελετήθηκαν ως ογκοκατεσταλμένα στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εμφάνιζαν τιμή AUC αρκετά χαμηλή, κάτω της διαμέσου, δείχνοντας χαμηλή εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση του καρκινικού ιστού. Αντίστοιχες μελέτες, έχουν πραγματοποιηθεί επίσης για miRNAs, τα οποία υποεκφράζονται στον καρκινικό ιστό του στομάχου, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες, συνδυαστικά με miRNAs που υπερεκφράζονται στον καρκινικό ιστό για μεγαλύτερη αξιοπιστία[126]. Το miR_143, το οποίο κατατάσσεται στην τελική υπογραφή των ογκοκατεσταλμένων miRNA, αποτέλεσε προϊόν έρευνας και παλιότερα, με αποτελέσματα να δείχνουν μείωση της έκφρασής του στον γαστρικό καρκίνο στο 75% των περιπτώσεων, έναντι του φυσιολογικού ιστού, ενώ το miR_195 έδειξε μείωση της έκφρασής του στο 80% των περιπτώσεων (Εικόνα 31)[127].



Εικόνα 29 Μείωση της έκφρασης των *miR_143* και *miR_195* στα καρκινικά γαστρικά κύτταρα έναντι των φυσιολογικών

Κατά την επαλήθευση των βιοπληροφορικών αποτελεσμάτων με τη stem loop qPCR, αναφορικά με τα ογκοεπαγόμενα miRNAs φαίνεται αυξημένη η έκφρασή τους στις καρκινικές κυτταρικές σειρές συγκριτικά με την φυσιολογική αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά HFE145, με την έκφρασή τους να αυξάνεται στις κυτταρικές σειρές που υποδηλώνουν πιο προχωρημένα στάδια του γαστρικού καρκίνου, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 27. Όσον αφορά τα ογκοκατεσταλμένα miRNAs τα οποία ελέγχθηκαν, παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα προχωρημένα καρκινικά στάδια, ενώ εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση στη φυσιολογική κυτταρική σειρά και στα κύτταρα

του πρωτεύοντος όγκου AGS, όμως συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης των ογκοεπαγώμενων miRNAs στην αντίστοιχη κυτταρική σειρά, βλέπουμε πως είναι αρκετά χαμηλότερα, γεγονός που επαληθεύει την μειορρυθμιζόμενη έκφραση των ογκοκατεσταλμένων miRNAs όσο οδεύουμε στα πιο προχωρημένα στάδια του γαστρικού καρκίνου (Εικόνα 28).

Εφόσον βρεθούν miRNAs τα οποία μπορούν να δράσουν ως μοριακοί βιοδείκτες, στόχος είναι η κατασκευή ενός διαγνωστικού εργαλείου που να μπορεί να μας δείξει κατά πόσο η νόσος έχει εξελιχθεί ή βρίσκεται στα αρχικά στάδιά της. Αυτό θα επιτευχθεί με τη χρήση των κατάλληλων miRNAs που παρουσιάζουν εξειδίκευση για συγκεκριμένα στάδια εξέλιξης της νόσου. Για αυτό το λόγο δεν χρειαζόμαστε μόνο τα ογκοεπαγώμενα miRNAs, ώστε να μας δείξουν την εμφάνιση νεοπλασίας, αλλά και τα ογκοκατεσταλμένα miRNAs για την δήλωση της φυσιολογικής κατάστασης. Ως μελλοντικοί στόχοι, τίθεται αρχικά η επέκταση της λίστας των miRNAs τα οποία θα ελεγχθούν πειραματικά με stem loop qPCR και η εξέταση των γονιδίων στόχων τόσο των ογκοεπαγώμενων όσο και των ογκοκατεσταλμένων miRNA, με βιοπληροφορικά ή πειραματικά εργαλεία, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί μια εξειδικευμένη αλλά αξιόπιστη ομάδα miRNAs ως διαγνωστικό εργαλείο για την έγκαιρη ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sitarz, R., et al., *Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 239-248.
2. Stock, M. and F. Otto, *Gene deregulation in gastric cancer*. Gene, 2005. **360**(1): p. 1-19.
3. Park, J.Y., et al., *Epidemiology of Helicobacter pylori and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer*. Toxins (Basel), 2018. **10**(4).
4. Crew, K.D. and A.I. Neugut, *Epidemiology of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(3): p. 354-62.
5. Karimi, P., et al., *Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(5): p. 700-13.
6. Ahn, Y.O., et al., *Incidence estimation of stomach cancer among Koreans*. J Korean Med Sci, 1991. **6**(1): p. 7-14.
7. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
8. El-Serag, H.B., et al., *Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA*. Gut, 2002. **50**(3): p. 368-72.
9. Munoz, N. and S. Franceschi, *Epidemiology of gastric cancer and perspectives for prevention*. Salud Publica Mex, 1997. **39**(4): p. 318-30.
10. Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
11. Demicco, E.G., et al., *The dichotomy in carcinogenesis of the distal esophagus and esophagogastric junction: intestinal-type vs cardiac-type mucosa-associated adenocarcinoma*. Mod Pathol, 2011. **24**(9): p. 1177-90.
12. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
13. Chen, Y.C., et al., *Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer*. Pathol Oncol Res, 2016. **22**(1): p. 197-202.
14. Polkowski, W., et al., *Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction*. Ann Surg Oncol, 1999. **6**(3): p. 290-7.
15. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
16. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
17. Qiu, M.Z., et al., *Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 58.
18. Kodama, M., et al., *Helicobacter pylori eradication improves gastric atrophy and intestinal metaplasia in long-term observation*. Digestion, 2012. **85**(2): p. 126-30.
19. Take, S., et al., *The long-term risk of gastric cancer after the successful eradication of Helicobacter pylori*. J Gastroenterol, 2011. **46**(3): p. 318-24.
20. Palestro, G., et al., *Prevalence of Helicobacter pylori infection and intestinal metaplasia in subjects who had undergone surgery for gastric adenocarcinoma in Northwest Italy*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(45): p. 7131-5.
21. Nardone, G., A. Rocco, and P. Malfertheiner, *Review article: helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20**(3): p. 261-70.

22. Yoshida, T., et al., *Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active Helicobacter pylori-related gastritis*. Gastric Cancer, 2013. **16**(4): p. 488-97.
23. Iizasa, H., et al., *Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma*. Viruses, 2012. **4**(12): p. 3420-39.
24. Cislo, M., et al., *Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Lauren to molecular pathology*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19427-19442.
25. Riquelme, I., et al., *Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 24750-79.
26. Falchetti, M., et al., *Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival*. Hum Pathol, 2008. **39**(6): p. 925-32.
27. Yamamoto, H., H. Sawai, and M. Perucho, *Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype*. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4420-6.
28. Karaman, A., et al., *Genetic alterations in gastric precancerous lesions*. Genet Couns, 2010. **21**(4): p. 439-50.
29. French, A.J., et al., *Allelic imbalance of 8p indicates poor survival in gastric cancer*. J Mol Diagn, 2004. **6**(3): p. 243-52.
30. Humar, B. and P. Guilford, *Hereditary diffuse gastric cancer: a manifestation of lost cell polarity*. Cancer Sci, 2009. **100**(7): p. 1151-7.
31. Murray, D., et al., *NET1-mediated RhoA activation facilitates lysophosphatidic acid-induced cell migration and invasion in gastric cancer*. Br J Cancer, 2008. **99**(8): p. 1322-9.
32. Liu, N., et al., *Reversal of the malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibition of RhoA expression and activity*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 6239-47.
33. Ayed-Guerfali, D.B., et al., *Expression of APC, beta-catenin and E-cadherin in Tunisian patients with gastric adenocarcinoma: clinical significance*. Tumour Biol, 2014. **35**(3): p. 1775-83.
34. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
35. Kula, Z.K., W. Zegarski, and W. Jozwicki, *Diagnosis and treatment of early gastric cancer: experience of one center*. Prz Gastroenterol, 2018. **13**(3): p. 200-205.
36. Yasui, W., et al., *Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future*. Gastric Cancer, 2001. **4**(3): p. 113-21.
37. Nakamura, S., M. Kanda, and Y. Kodera, *Incorporating molecular biomarkers into clinical practice for gastric cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2019. **19**(9): p. 757-771.
38. Roukos, D.H. and A.M. Kappas, *Perspectives in the treatment of gastric cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(2): p. 98-107.
39. Shabalina, S.A. and N.A. Spiridonov, *The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences*. Genome Biol, 2004. **5**(4): p. 105.
40. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
41. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 57-74.
42. Mattick, J.S. and I.V. Makunin, *Non-coding RNA*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R17-29.
43. Slack, F.J. and A.M. Chinnaiyan, *The Role of Non-coding RNAs in Oncology*. Cell, 2019. **179**(5): p. 1033-1055.

44. Huang, Y.K. and J.C. Yu, *Circulating microRNAs and long non-coding RNAs in gastric cancer diagnosis: An update and review*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(34): p. 9863-86.
45. Hombach, S. and M. Kretz, *Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning*. Adv Exp Med Biol, 2016. **937**: p. 3-17.
46. Kung, J.T., D. Colognori, and J.T. Lee, *Long noncoding RNAs: past, present, and future*. Genetics, 2013. **193**(3): p. 651-69.
47. Shamovsky, I., et al., *RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 556-60.
48. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 629-41.
49. Mercer, T.R., et al., *Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 716-21.
50. Goodrich, J.A. and J.F. Kugel, *Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 612-6.
51. Guh, C.Y., Y.H. Hsieh, and H.P. Chu, *Functions and properties of nuclear lncRNAs-from systematically mapping the interactomes of lncRNAs*. J Biomed Sci, 2020. **27**(1): p. 44.
52. Spilianakis, C.G., et al., *Interchromosomal associations between alternatively expressed loci*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 637-45.
53. Noh, J.H., et al., *Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018. **9**(3): p. e1471.
54. Yoon, J.H., et al., *LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation*. Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 648-55.
55. Losko, M., J. Kotlinowski, and J. Jura, *Long Noncoding RNAs in Metabolic Syndrome Related Disorders*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 5365209.
56. Peng, W.X., P. Koirala, and Y.Y. Mo, *LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer*. Oncogene, 2017. **36**(41): p. 5661-5667.
57. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.
58. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
59. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 402.
60. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
61. Broughton, J.P., et al., *Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity*. Mol Cell, 2016. **64**(2): p. 320-333.
62. Vasudevan, S., *Posttranscriptional upregulation by microRNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(3): p. 311-30.
63. Makarova, J.A., et al., *Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role*. Prog Histochem Cytochem, 2016. **51**(3-4): p. 33-49.
64. Paul, P., et al., *Interplay between miRNAs and human diseases*. J Cell Physiol, 2018. **233**(3): p. 2007-2018.
65. Wang, J., J. Chen, and S. Sen, *MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics*. J Cell Physiol, 2016. **231**(1): p. 25-30.
66. Hammond, S.M., *An overview of microRNAs*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 3-14.
67. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.

68. Okada, C., et al., *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1275-9.
69. Yoda, M., et al., *ATP-dependent human RISC assembly pathways*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 17-23.
70. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
71. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
72. Xie, M., et al., *Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1568-80.
73. Yang, J.S., et al., *Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15163-8.
74. Cheloufi, S., et al., *A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis*. Nature, 2010. **465**(7298): p. 584-9.
75. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
76. Xu, W., et al., *Identifying microRNA targets in different gene regions*. BMC Bioinformatics, 2014. **15 Suppl 7**: p. S4.
77. Jo, M.H., et al., *Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs*. Mol Cell, 2015. **59**(1): p. 117-24.
78. Jonas, S. and E. Izaurralde, *Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(7): p. 421-33.
79. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 215-7.
80. Wang, Y., et al., *DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 380-5.
81. Park, C.Y., Y.S. Choi, and M.T. McManus, *Analysis of microRNA knockouts in mice*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R169-75.
82. Vidigal, J.A. and A. Ventura, *The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(3): p. 137-47.
83. Jansson, M.D. and A.H. Lund, *MicroRNA and cancer*. Mol Oncol, 2012. **6**(6): p. 590-610.
84. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 15004.
85. Saito, Y. and P.A. Jones, *Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells*. Cell Cycle, 2006. **5**(19): p. 2220-2.
86. Stahlhut Espinosa, C.E. and F.J. Slack, *The role of microRNAs in cancer*. Yale J Biol Med, 2006. **79**(3-4): p. 131-40.
87. Svoronos, A.A., D.M. Engelman, and F.J. Slack, *OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer*. Cancer Res, 2016. **76**(13): p. 3666-70.
88. Pelengaris, S., M. Khan, and G.I. Evan, *Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression*. Cell, 2002. **109**(3): p. 321-34.
89. Matsubara, H., et al., *Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92*. Oncogene, 2007. **26**(41): p. 6099-105.
90. Lee, Y.S. and A. Dutta, *MicroRNAs in cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 199-227.
91. Kent, O.A. and J.T. Mendell, *A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes*. Oncogene, 2006. **25**(46): p. 6188-96.

92. Asghari, F., et al., *Tumor suppressor microRNAs: Targeted molecules and signaling pathways in breast cancer*. Biomed Pharmacother, 2016. **81**: p. 305-317.
93. Espinosa-Parrilla, Y., et al., *Genetic association of gastric cancer with miRNA clusters including the cancer-related genes MIR29, MIR25, MIR93 and MIR106: results from the EPIC-EURGAST study*. Int J Cancer, 2014. **135**(9): p. 2065-76.
94. Zhi, Q., et al., *Oncogenic miR-544 is an important molecular target in gastric cancer*. Anticancer Agents Med Chem, 2013. **13**(2): p. 270-5.
95. Peng, Y., et al., *MicroRNA-34A inhibits the growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting PDGFR and MET expression*. Biosci Rep, 2014. **34**(3).
96. Yang, Q., et al., *Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C*. Carcinogenesis, 2011. **32**(5): p. 713-22.
97. Ji, Q., et al., *Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 266.
98. in *Emerging Safety Science: Workshop Summary*. 2008: Washington (DC).
99. Paranjape, T., F.J. Slack, and J.B. Weidhaas, *MicroRNAs: tools for cancer diagnostics*. Gut, 2009. **58**(11): p. 1546-54.
100. Jin, Z., W. Jiang, and L. Wang, *Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review)*. Oncol Lett, 2015. **9**(4): p. 1502-1508.
101. Lan, H., et al., *MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 125094.
102. Huang, Z., et al., *Six Serum-Based miRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers for Gastric Cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017. **26**(2): p. 188-196.
103. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
104. Kahlert, C., et al., *Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer*. J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 3869-75.
105. Kalluri, R., *The biology and function of exosomes in cancer*. J Clin Invest, 2016. **126**(4): p. 1208-15.
106. Melo, S.A., et al., *Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis*. Cancer Cell, 2014. **26**(5): p. 707-21.
107. De Toro, J., et al., *Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 203.
108. Li, J., et al., *Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 244.
109. Corcoran, C., et al., *Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer*. Clin Chem, 2011. **57**(1): p. 18-32.
110. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
111. Ingenito, F., et al., *The Role of Exo-miRNAs in Cancer: A Focus on Therapeutic and Diagnostic Applications*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(19).
112. Fu, M., et al., *Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 41.
113. Sierzega, M., et al., *Evaluation of serum microRNA biomarkers for gastric cancer based on blood and tissue pools profiling: the importance of miR-21 and miR-331*. Br J Cancer, 2017. **117**(2): p. 266-273.

114. Motoyama, K., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer*. *Int J Oncol*, 2010. **36**(5): p. 1089-95.
115. Necula, L., et al., *Recent advances in gastric cancer early diagnosis*. *World J Gastroenterol*, 2019. **25**(17): p. 2029-2044.
116. Varkonyi-Gasic, E., et al., *Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs*. *Plant Methods*, 2007. **3**: p. 12.
117. Chen, C., et al., *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(20): p. e179.
118. Riihimäki, M., et al., *Metastatic spread in patients with gastric cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 52307-52316.
119. Karamchandani, M.M., et al., *A Rare Occurrence of Isolated Brain Metastases from Gastric Cancer*. *Case Rep Med*, 2019. **2019**: p. 8075421.
120. Li, X., et al., *Economic burden of gastrointestinal cancer under the protection of the New Rural Cooperative Medical Scheme in a region of rural China with high incidence of oesophageal cancer: cross-sectional survey*. *Trop Med Int Health*, 2016. **21**(7): p. 907-16.
121. Casamayor, M., et al., *Targeted literature review of the global burden of gastric cancer*. *Ecanermedicalscience*, 2018. **12**: p. 883.
122. Bagaria, B., et al., *Comparative study of CEA and CA19-9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination (ROC curve analysis)*. *Cancer Biol Med*, 2013. **10**(3): p. 148-57.
123. Sun, T., et al., *Integrated profiling identifies SLC5A6 and MFAP2 as novel diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer patients*. *Int J Oncol*, 2020. **56**(2): p. 460-469.
124. Seeruttun, S.R., et al., *Identification of molecular biomarkers for the diagnosis of gastric cancer and lymph-node metastasis*. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2019. **7**(1): p. 57-66.
125. Liu, X., et al., *Plasma miR-940 may serve as a novel biomarker for gastric cancer*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(3): p. 3589-97.
126. Liang, Q.L., et al., *Diagnostic accuracy of tumour markers for malignant pleural effusion: a meta-analysis*. *Thorax*, 2008. **63**(1): p. 35-41.
127. Guo, B., et al., *Dysregulation of miRNAs and their potential as biomarkers for the diagnosis of gastric cancer*. *Biomed Rep*, 2013. **1**(6): p. 907-912.