



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
ΠΜΣ Τοξικολογία



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΣΤΟΝ
ΓΑΣΤΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

ΚΥΖΙΡΙΔΗ ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2024



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
ΠΜΣ Τοξικολογία



THESIS

**TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS AND ASSESSMENT OF
THE DIAGNOSTIC POTENTIAL OF CODING AND
NON-CODING TRANSCRIPTS IN GASTRIC CANCER**

KYZIRIDI APOSTOLIA

LARISA 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μαρία Σαμαρά: Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ελένη-Ειρήνη Θώδου: Επίκουρη Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Γαστρικός καρκίνος.....	7
1.1.1 Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου.....	7
1.1.2 Τύποι γαστρικού καρκίνου.....	9
1.2 Ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου	9
1.2.1 Ιστολογική ταξινόμηση	9
.....	12
1.2.2 Μοριακή ταξινόμηση	12
1.3 Διάγνωση γαστρικού καρκίνου.....	14
1.4 Βιοδείκτες.....	16
1.5 Διάγνωση του καρκίνου με τη χρήση διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων- Αξιολόγηση της ROC ανάλυσης.....	16
1.6 CRISPR	19
2. ΣΚΟΠΟΣ	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.1 Υλικά και δεδομένα	24
3.2 Δημιουργία volcano plot για στατιστική ανάλυση των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων	25
3.3 Δημιουργία VENN διαγραμμάτων για την εύρεση των κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στα διάφορα στάδια γαστρικού καρκίνου	25
3.4 Δημιουργία θερμικών χαρτών (heatmaps).....	26
3.5 Ανάλυση οντολογίας (Gene ontology).....	26
3.6 Ανάλυση ROC (receiver operating characteristics) και υπολογισμός του AUC (area under the curve).....	26
3.7 Χρήση CRISP-Cas9 για προσθήκη μεταλλάξεων.....	27
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
4.1 Στατιστική ανάλυση για την εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων.....	30
4.2 Κατασκευή διαγραμμάτων Venn για εύρεση των κοινά διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων	31
4.3 Ανάλυση θερμικών χαρτών	34
4.4 Ανάλυση οντολογίας.....	36
4.5 Εκτίμηση διαγνωστικού δυναμικού με ανάλυση ROC	41

4.6 Σχεδιασμός sgRNAs με στόχο την απενεργοποίηση ενός επιλεγμένου γονιδίου με CRISPR	44
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	57
7.1 Παράρτημα 1-Διαγράμματα volcano plots	57
7.2 Παράρτημα 2-Διαγράμματα οντολογίας.....	59
7.3 Παράρτημα 3- Σύστημα CRISPR-Cas9	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μία από τις συχνότερες μορφές καρκίνου, καταλαμβάνοντας την πέμπτη θέση σε συχνότητα και την τρίτη θέση σε αιτία θανάτου. Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας οφείλονται στην διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο, όταν εμφανίζονται συμπτώματα. Η γαστροσκόπηση αποτελεί την πιο αποτελεσματική διαγνωστική μέθοδο για τον γαστρικό καρκίνο, ωστόσο είναι επεμβατική. Η διάγνωση με χρήση βιοχημικών καρκινικών βιοδεικτών δεν παρουσιάζει επαρκή ειδικότητα για τον γαστρικό καρκίνο. Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση νέων, μοριακών και μη επεμβατικών βιοδεικτών που να είναι ειδικοί για τον γαστρικό καρκίνο και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγκυρη διάγνωση. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να εντοπίσουμε γονίδια μέσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, τα οποία εμφανίζουν διαφορετική έκφραση στον γαστρικό καρκίνο, χρησιμοποιώντας βιοπληροφορική ανάλυση. Με αυτόν τον τρόπο, επιδιώκουμε την ανάπτυξη νέων καρκινικών βιοδεικτών που θα συμβάλουν στην πρόωμη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου με μη επεμβατικό τρόπο.

ABSTRACT

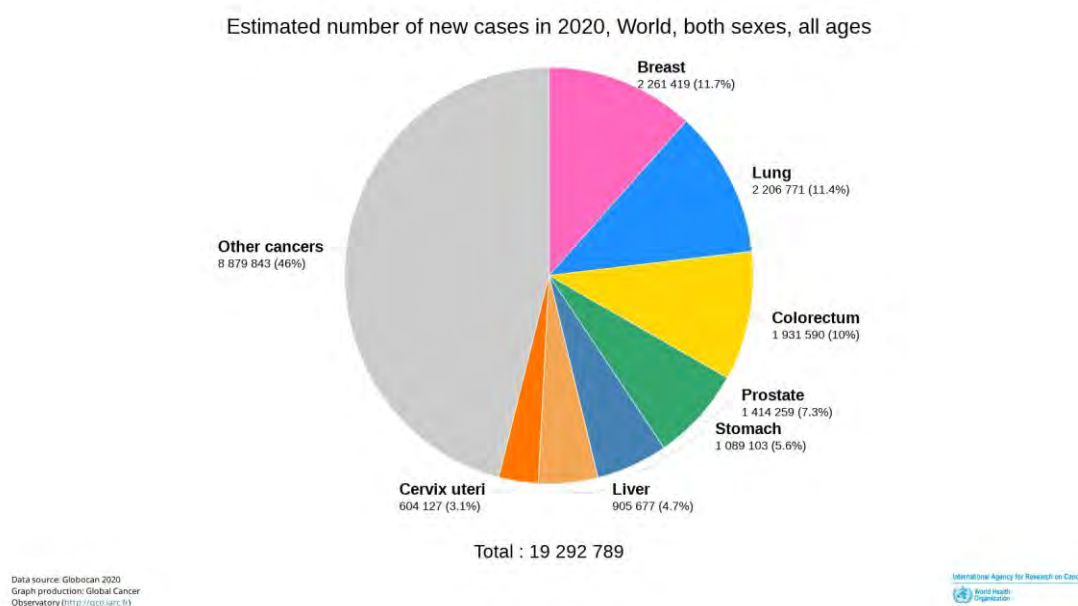
Gastric cancer is one of the most prevalent forms of the disease, ranking fifth in incidence and third in mortality worldwide. The high mortality rates are attributed to the diagnosis at an advanced stage, when symptoms become apparent. Although endoscopy is the most effective diagnostic method for gastric cancer, it is invasive. Diagnosis using biochemical cancer biomarkers lacks sufficient specificity for gastric cancer. Therefore, focus has been shifted towards new, molecular and non-invasive biomarkers specific for gastric cancer, aiming to enable timely diagnosis. The aim of this thesis is to identify genes within the human genome that exhibit differential expression in gastric cancer, utilizing bioinformatics analysis. In this way, we aim to develop new cancer biomarkers that will contribute to the early diagnosis of gastric cancer through non-invasive means.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γαστρικός καρκίνος

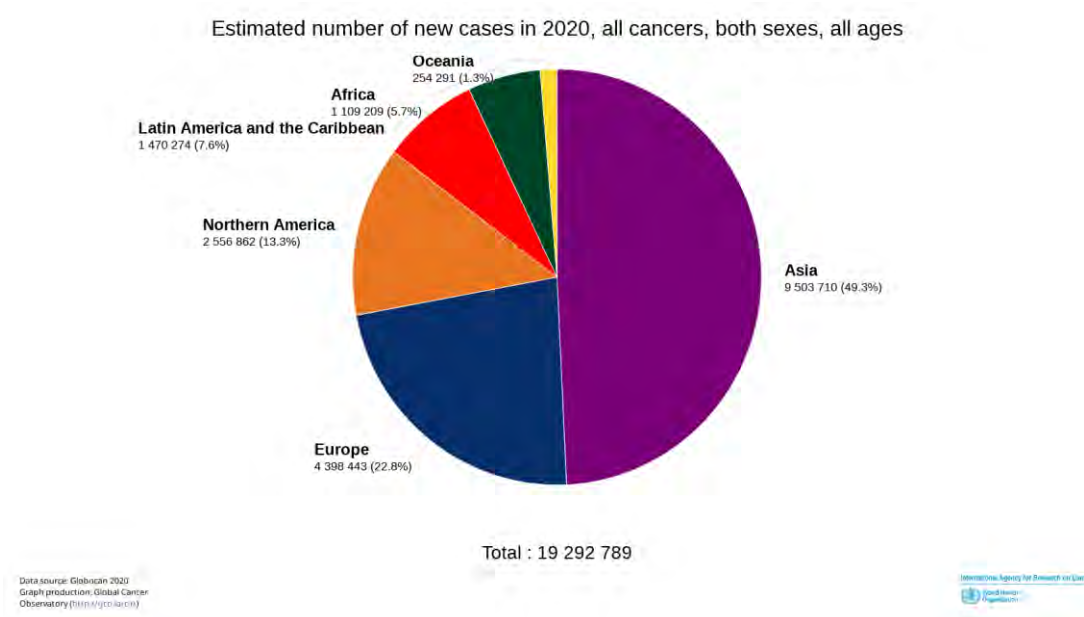
1.1.1 Επιδημιολογία του γαστρικού καρκίνου

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί την πέμπτη ως προς την συχνότητα κακοήθεια παγκοσμίως και την τρίτη αιτία θανάτου από όλους τους τύπους καρκίνου.¹ Ο αριθμός θανάτων από γαστρικό καρκίνο έχει αυξηθεί σημαντικά όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1**. Η αιτία αύξησης του αριθμού αυτού οφείλεται στην μη έγκαιρη ανίχνευση της νόσου. Στην Ευρώπη, το ποσοστό επιβίωσης κυμαίνεται στο 10 έως και 30%, ενώ σε χώρες όπως την Ιαπωνία το ποσοστό επιβίωσης φθάνει έως και το 90% λόγω της πρόωρης διάγνωσης είτε με γαστροσκόπηση είτε με την χειρουργική εκτομή του όγκου.²



Εικόνα 1: Περιπτώσεις καρκίνου το 2020.

Η εμφάνιση γαστρικού καρκίνου αυξάνεται χώρες όπως είναι η Ασία, η Ευρώπη και η Αμερική ενώ χαμηλότερη πιθανότητα εμφάνισης παρατηρείται στην Αφρική και στην Λατινική Αμερική (**Εικόνα 2**).³



Εικόνα 2: Εμφάνιση καρκίνου στον πλανήτη το 2020.

Ο γαστρικός καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική ασθένεια, η οποία μπορεί να επηρεαστεί τόσο από περιβαλλοντικούς όσο και από γενετικούς παράγοντες. Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Ταμείο Έρευνας για τον Καρκίνο/Αμερικανικό Ινστιτούτο Έρευνας για τον Καρκίνο (WCRF/AICR), η σωστή διατροφή αποτρέπει σε μεγάλο βαθμό την εμφάνιση του, όπως η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, σε αντίθεση με την κατανάλωση καρκινογόνων ουσιών, όπως τα καπνιστά τρόφιμα ή τα τρόφιμα πλούσια σε αλάτι.⁴ Τονίζεται ότι προστατευτικό ρόλο παίζουν τα φρούτα και τα λαχανικά που είναι πλούσια σε καροτένιο, βιταμίνη Β και C λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής τους δράσης.⁵ Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι το κάπνισμα επηρεάζει σημαντικά τον καρκίνο του στομάχου, με μεγαλύτερη επίπτωση στους άνδρες από ότι στις γυναίκες⁶. Επίσης, η κατανάλωση αλκοόλ προδιαθέτει για γαστρικό καρκίνο⁷.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το ελικοβακτήριο του πυλωρού (*H. pylori*) είναι ένα gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο αποτελεί καρκινογόνο για την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου.⁸ Αρχικά, πραγματοποιείται μία φλεγμονώδη αντίδραση στο γαστρικό βλεννογόνο και έπειτα μολύνονται τα επιθηλιακά γαστρικά κύτταρα.

Εκτός από το *H. pylori*, ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει το γαστρικό καρκίνο είναι ο ιός Epstein-Barr (EBV), που αποτελεί μολυσματικό ιό. Ο ιός αυτός μπορεί να επιβιώνει στα καρκινικά κύτταρα.⁹

1.1.2 Τύποι γαστρικού καρκίνου

Οι περισσότεροι τύποι γαστρικού καρκίνου αφορούν αδενοκαρκινώματα, που προέρχονται από τα κύτταρα που παράγουν βλέννα στο εσωτερικό του στομάχου. Ανάλογα με την ανατομική περιοχή, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στο καρκίνο της γαστρικής καρδιάς, που αφορά το ανώτερο τμήμα του στομάχου ακριβώς κάτω από το σημείο που συναντά τον οισοφάγο και της μη καρδιακής γαστρικής καρδιάς που αφορά όλα τα τμήματα του στομάχου.

1.2 Ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου

1.2.1 Ιστολογική ταξινόμηση

Οι γαστρικοί καρκίνοι διαφέρουν ως προς την αρχιτεκτονική, την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι πιο γνωστές ταξινομήσεις αφορούν την ταξινόμηση κατά Lauren και την WHO ταξινόμηση που ταξινομούν τους γαστρικούς όγκους με ιστοπαθολογικά κριτήρια.²²

1.2.1.1 Ταξινόμηση κατά Lauren

Η πιο διαδεδομένη ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου είναι η ταξινόμηση κατά Lauren.¹⁰ Η ταξινόμηση αυτή περιλαμβάνει δύο βασικούς τύπους: τον εντερικό και τον διάχυτο, επίσης τον μεικτό, καθώς και έναν σπανιότερα εμφανιζόμενο, τον αδιαφοροποίητο τύπο. Οι σχετικές συχνότητες εμφάνισης είναι 54% για τον εντερικό τύπο, 32% για τον διάχυτο τύπο και 15% για τον απροσδιόριστο.¹¹ Σε γυναίκες και νεαρά άτομα εμφανίζεται πιο συχνά ο γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου, ενώ ο εντερικός υπότυπος παρατηρείται πιο συχνά έπειτα από εντερική μεταπλασία¹ και λοίμωξη από *H. pylori*.¹²

Ο εντερικός γαστρικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό αδενικών δομών που μοιάζουν με τους φυσιολογικούς αδένες του στομάχου. Τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να διατάσσονται σε σωληνώδεις ή αδενικούς σχηματισμούς.¹³ Αυτός ο τύπος

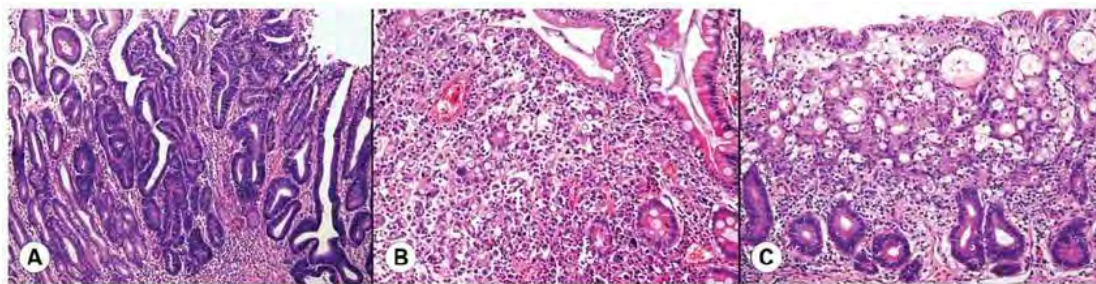
¹ Μεταπλασία είναι ο μετασχηματισμός ενός τύπου κυττάρου σε κάποιον άλλο τύπο κυττάρου. Αυτό συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες όταν το κύτταρο δεν είναι πολύ ανθεκτικό στο περιβάλλον που βρίσκεται και έτσι μετασχηματίζεται σε κάποιο άλλο τύπο κυττάρου προκειμένου να αντέξει περισσότερο στο περιβάλλον που βρίσκεται. Αποτελεί έδαφος στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί νεοπλασία.

του γαστρικού καρκίνου σχετίζεται με λεμφική ή αγγειακή διήθηση και οι βλάβες είναι διάσπαρτες σε απομακρυσμένες θέσεις.¹⁴ Σε αντίθεση, ο διάχυτος γαστρικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεμονωμένων ή μικρών αθροίσεων καρκινικών κυττάρων που διηθούν το τοίχωμα του στομάχου χωρίς να σχηματίζουν διακριτές αδενικές δομές.¹⁴ Η μετάσταση αυτού του τύπου καρκίνου είναι πιο συχνή και η πρόγνωση είναι χειρότερη σε σχέση με του εντερικού τύπου.¹⁴

Ο εντερικός γαστρικός καρκίνος εμφανίζεται πιο συχνά σε περιοχές υψηλού κινδύνου σε αντίθεση με τον διάχυτο που εμφανίζεται σε περιοχές χαμηλού κινδύνου. Η παθογένεση και η ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου τόσο εντερικού όσο και διάχυτου, συνδέεται με διάφορες διαδικασίες στο γενετικό υλικό των κυττάρων όπως,

- η μεθυλίωση του DNA, δηλαδή η προσθήκη μιας μεθυλικής ομάδας σε ένα νουκλεοτίδιο του DNA,
- η τροποποίηση των ιστονών, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη δομή του χρωμοσώματος και την έκφραση των γονιδίων και
- ο ανασυνδυασμός των χρωμοσωμάτων, δηλαδή η ανακατάταξη ή η αλλαγή στη δομή των χρωμοσωμάτων που μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές αλλαγές ευνοώντας έτσι την ανάπτυξη του καρκίνου.^{15,16}

Και οι δύο τύποι επηρεάζονται τόσο από περιβαλλοντικούς όσο και από διατροφικούς παράγοντες, ωστόσο ο εντερικός σχετίζεται περισσότερο με περιβαλλοντικούς παράγοντες ενώ ο διάχυτος τύπος από γενετικούς.¹⁷ Συγκεκριμένα, το βακτήριο *H.pylori* σε συνδυασμό με τη διατροφή και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες σχετίζεται με την εμφάνιση εντερικού γαστρικού καρκίνου.¹⁷ Παρόλο που η ύπαρξη του *H.pylori* φαίνεται να προάγει τον εντερικό γαστρικό καρκίνο, η εξάλειψη του για αποτροπή του καρκίνου θεωρείται αμφιλεγόμενη.¹⁸ Ο διάχυτος γαστρικός καρκίνος προέρχεται από το γαστρικό βλεννογόνο και έχει άμεση σχέση με τη γαστρίτιδα.¹⁹ Συνεπώς σε σχέση με τον εντερικό, επηρεάζεται λιγότερο από περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενώ δεν αποκλείεται η εμπλοκή του *H. pylori* για την εμφάνισή του.²⁰ Τέλος, ο διάχυτος τύπος γαστρικού καρκίνου επάγεται από τη χρόνια φλεγμονή.²¹ (**Εικόνα 3**)



Εικόνα 3: Υπότυποι γαστρικού καρκίνου (Α). εντερικός (intestinal type), (Β). Διάχυτος καρκίνος (diffuse type) και (C). Μεικτός (mixed type)

1.2.1.2 Ταξινόμηση κατά WHO

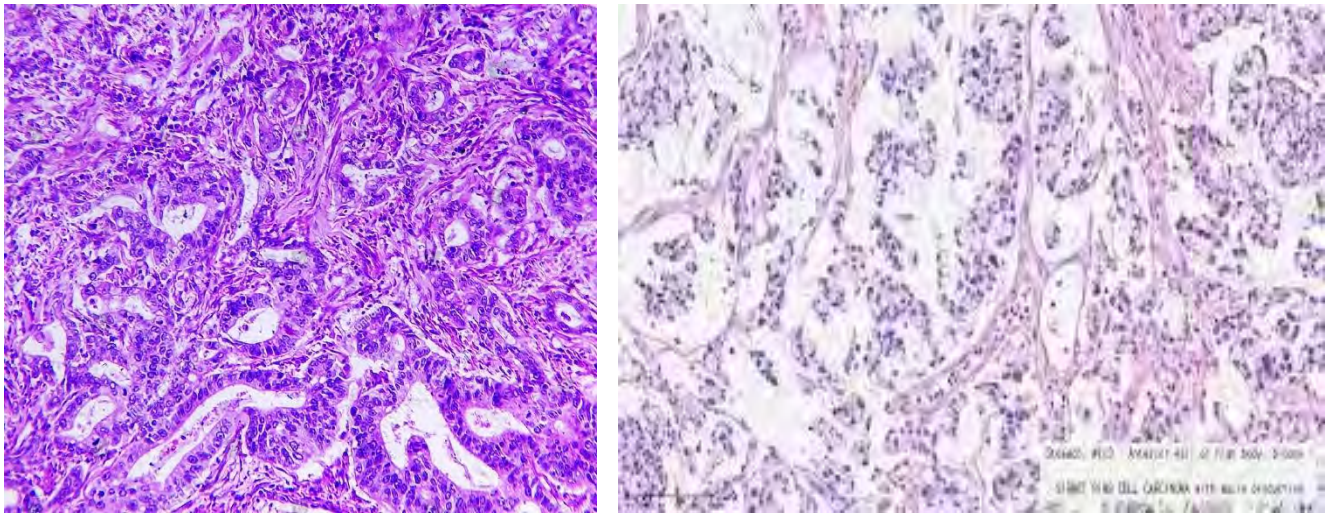
Η ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO) διακρίνεται τους εξής βασικούς υπότυπους στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου: θηλώδης, σωληνώδης, βλεννώδης και χαμηλής κυρρατικής συνοχής. Η συγκεκριμένη ταξινόμηση υποδηλώνει ότι το επικρατές ιστολογικό πρότυπο του καρκινώματος καθορίζει την κατηγοριοποίησή του, ακόμα κι αν υπάρχουν στοιχεία άλλων ιστολογικών προτύπων.

Ο σωληνώδης υπότυπος είναι ο συνηθέστερος στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου. Εμφανίζεται στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του γαστρικού καρκίνου. Τείνει να σχηματίζει πολυποειδείς ή μυκητοειδείς όγκους. Η ιστολογική εικόνα παρουσιάζει ακανόνιστα διατεταγμένες, συγχωνευμένες ή διακλαδισμένες σωληνώδεις βλάστες διαφόρων μεγεθών. **(Εικόνα 4)**

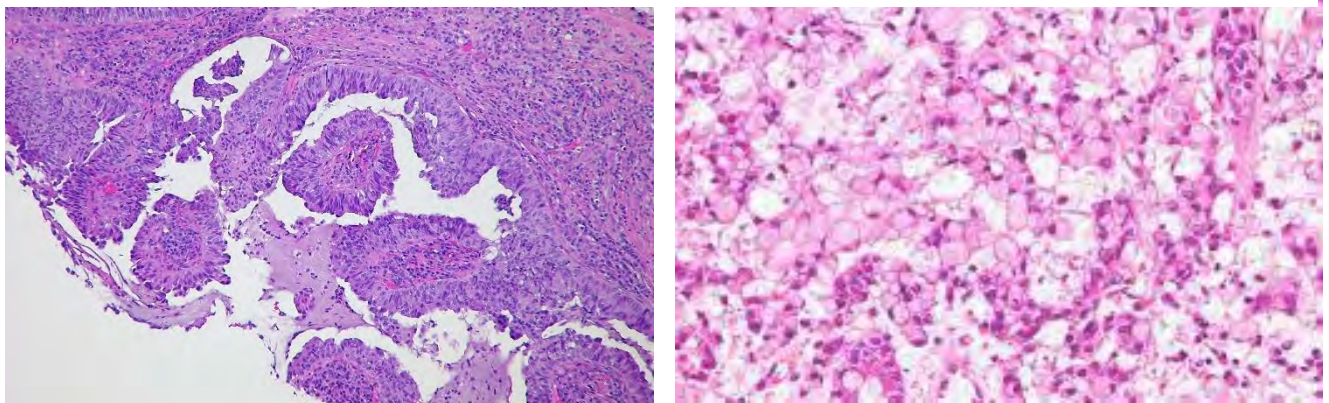
Ο θηλώδης υπότυπος εμφανίζεται στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου. Ιστολογικά, χαρακτηρίζεται από την παρουσία επιθηλιακών προεκβολών με κεντρικό ινοαγγειακό άξονα. Εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε ηλικιωμένα άτομα και συνδέεται με ηπατικές μεταστάσεις.²³ **(Εικόνα 5)**

Το βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα αντιπροσωπεύει το 10% του γαστρικού καρκινώματος. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από εξωκυττάρια παραγωγή βλέννης που αποτελούν τουλάχιστον το 50% του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να σχηματίζουν αδενική αρχιτεκτονική και ακανόνιστες αθροίσεις.²³ **(Εικόνα 4)**

Στο χαμηλής κυτταρικής συνοχής υπότυπο ανήκει το καρκίνωμα του στομάχου «δίκην σφραγιστήρος δακτυλιδίου» (SRC: signet ring carcinoma). Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση κυτταροπλασματικού κενотоπίου βλέννης που εκτοπίζει τον πυρήνα στην περιφέρεια του κυττάρου.²⁴(**Εικόνα 5**)



Εικόνα 4: Σωληνοειδές αδενοκαρκίνωμα και βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα.



Εικόνα 5: Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα και Καρκίνωμα του τύπου signet ring.

1.2.2 Μοριακή ταξινόμηση

Σύμφωνα με τον Άτλα του Γονιδιώματος του Καρκίνου, The Cancer Genome Atlas Program (TCGA), μοριακή μελέτη για την αξιολόγηση των πρωτοπαθών γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων, βασίστηκε σε έξι διαφορετικές μοριακές προσεγγίσεις. Αυτές περιλάμβαναν ανάλυση σωματικού αριθμού αντιγράφων, αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος, προφίλ μεθυλίωσης DNA, αλληλούχηση αγγελιοφόρων

ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA), αλληλούχηση μικροRNA (miRNA) και συστοιχία πρωτεϊνών αντίστροφης φάσης (RPPA).²⁵ Η μελέτη πρότεινε μια μοριακή ταξινόμηση για το γαστρικό καρκίνωμα που διαχωρίζει τους όγκους σε τέσσερις υποτύπους:

- Υπότυπος θετικός για τον ιό Epstein-Barr (EBV),
- Υπότυπος μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI),
- Υπότυπος γονιδιωματικής σταθερότητας (GS) και
- Υπότυπος χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN).

1.2.2.1 EBV, θετικός υπότυπος στον ιό Epstein-Barr (EBV)

Αυτός ο υπότυπος γαστρικού καρκίνου απαντάται κυρίως σε άνδρες ασθενείς. Περίπου το 10% των γαστρικών καρκινωμάτων οφείλονται στον ιό Epstein-Barr.²⁶ Ο ιός έχει διαπιστωθεί ότι είναι η κύρια αιτία της λοιμώδους μονοπυρήνωσης ενώ σχετίζεται στενά τόσο με λεμφοειδείς όσο και με επιθηλιακές κακοήθειες.²⁷ Μερικά από τα χαρακτηριστικά του ιού αυτά είναι:

επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου PIK3CA, το οποίο κωδικοποιεί την φωσφοινοσιτιδυλινοκινάση 3 και συμμετέχει σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η μετανάστευση, και η αποφυγή του κυτταρικού θανάτου. Μεταλλάξεις καθώς και η υπερμεθυλίωση του DNA στο γονίδιο αυτό μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση.²⁸

1.2.2.2 Υπότυπος μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI)

Ο υπότυπος μικροδορυφορικής αστάθειας (Microsatellite instability (MSI) subtype) αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες γονιδιωματικής αστάθειας και εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες ασθενείς. Οι μικροδορυφόροι είναι επαναλήψεις νουκλεοτιδίων (από 1 έως 6 νουκλεοτίδια) που είναι διάσπαρτες σε ολόκληρο το γονιδίωμα.³¹ Η κύρια αιτία εμφάνισης μικροδορυφορικής αστάθειας οφείλεται στην υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MLH1, ενός γονιδίου το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA.²⁹ Ο γαστρικός καρκίνος ανάλογα με το επίπεδο της αστάθειας μπορεί να διακριθεί σε υψηλής (MSI-H) ή χαμηλής (MSI-L) μικροδορυφορικής αστάθειας.³⁰

1.2.2.3 Υπότυπος γονιδιωματικής σταθερότητας (GS)

Ο υπότυπος γονιδιωματικής σταθερότητας αποτελεί το 20% των περιπτώσεων γαστρικών καρκίνων που εξετάστηκαν και συσχετίζεται με αδενοκαρκινώματα διάχυτου τύπου σε νεαρούς ασθενείς.³² Ο υπότυπος αυτός εμφανίζει αυξημένες μεταλλάξεις στα γονίδια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, όπως στο γονίδιο RHOA, το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου.³³ Το μεταλλαγμένο γονίδιο RHOA αλληλεπιδρά με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, προωθώντας έτσι μορφολογικές αλλαγές καθώς και κυτταρικές αλλαγές οδεύοντας προς την ανάπτυξη του όγκου.³⁴

1.2.2.4 Υπότυπος χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN)

Ο υπότυπος αυτός προκαλείται με συσσώρευση χρωμοσωμικών μεταλλαγών. Διακρίνεται σε αριθμητική αστάθεια και σε δομική αστάθεια. Η αριθμητική αστάθεια σχετίζεται με ανευπλοειδία, δηλαδή μείωση στον αριθμό των χρωμοσωμάτων, ή με πολυπλοειδία, δηλαδή ενίσχυση χρωμοσωμικών τμημάτων, ενώ η δομική αστάθεια σχετίζεται με την εμφάνιση πολλών χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, όπως η διαγραφή, ο διπλασιασμός, οι μετατοπίσεις, η συχνότητα των οποίων μπορεί να επηρεάσει τη κυτταρική διαίρεση και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση.^{35,36} Αλλαγές στην διάταξη των χρωμοσωμάτων 17p και 18q σχετίζονται με την ανάπτυξη του υπότυπου CIN. Το γονίδιο TP53, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p αποτελεί έναν ογκοκατασταλτικό παράγοντα. Παίζει ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες όπως στην επιδιόρθωση του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση. Με την εμφάνιση μεταλλάξεων στο γονίδιο αυτό σχετίζεται η καρκινογένεση. Η έλλειψη της κανονικής λειτουργίας του γονιδίου αυτού επιτρέπει στα κύτταρα να αποφεύγουν την απόπτωση με αποτέλεσμα τον μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξη καρκίνου.^{34,37}

1.3 Διάγνωση γαστρικού καρκίνου

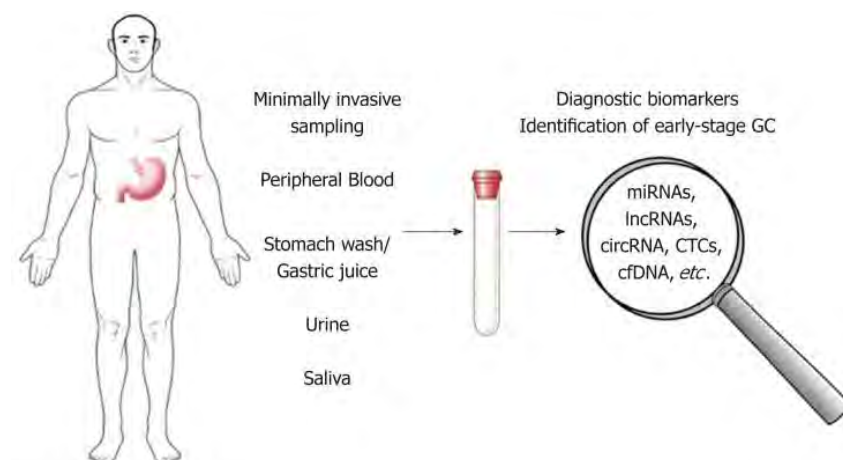
Σε αρχικό στάδιο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, οι ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί. Συνήθως η διάγνωση γίνεται σε προχωρημένο στάδιο, καθώς γίνονται εμφανή τα συμπτώματα. Τα πιο συνήθη συμπτώματα είναι η ανορεξία, η δυσπεψία, η απώλεια βάρους και το κοιλιακό άλγος. Οι όγκοι στη γαστροοισοφαγική συμβολή ή στο εγγύς στομάχι μπορεί να προκαλέσουν δυσφαγία, η οποία είναι μια κατάσταση κατά την οποία ο ασθενής αντιμετωπίζει δυσκολίες ή πόνο κατά την

κατάποση τροφής. Η διάγνωση του γαστρικού καρκίνου γίνεται με τους παρακάτω τρόπους:

α) με ενδοσκόπηση του ανώτερου γαστρεντερικού συστήματος. Μία σημαντική μέθοδο αποτελεί η μεγεθυντική ενδοσκόπηση με απεικόνιση στενής ζώνης (NBI), με την οποία ελέγχεται η αρχιτεκτονική του βλεννογόνου για τυχόν βλάβη. Επιπρόσθετα, μία άλλη μέθοδος αποτελεί η ενδοκυτταροσκόπηση, μία τεχνική που επιτρέπει την μικροσκοπική απεικόνιση της επιφάνειας του βλεννογόνου.³⁸

β) με λαπαροσκόπηση, μία ελάχιστη επεμβατική μέθοδος που χρειάζεται μόνο μία μικρή τομή. Σκοπός της λαπαροσκόπησης είναι η ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου ακόμη και σε απομακρυσμένες θέσεις, προκειμένου να γίνει σωστή σταδιοποίηση της νόσου.³⁹

γ) με τη χρήση βιοδεικτών. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την εύρεση των κατάλληλων βιοδεικτών, οι οποίοι θα είναι εξιδεικευμένοι στον καρκίνο του στομάχου και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευσή του. Κάποιες προσπάθειες απέτυχαν σε κλινικές μελέτες. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί δύο βασικοί χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες, το *Carcinoembryonic antigen* (CEA) και το CA 19-9.⁴⁰ Οι βιοδείκτες θα πρέπει να ανιχνεύονται από τα αρχικά ακόμα στάδια της εμφάνισης του καρκίνου. Τέλος, γίνονται συνεχώς προσπάθειες για την χρήση αυτών των βιοδεικτών όχι μόνο για την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου αλλά και για την θεραπεία του.⁴⁰



Εικόνα 6: Ανίχνευση γαστρικού καρκίνου με την χρήση διαγνωστικών βιοδεικτών.

1.4 Βιοδείκτες

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), βιοδείκτης ορίζεται κάθε ουσία, δομή ή διαδικασία που μπορεί να μετρηθεί στο σώμα ή στα προϊόντα του και να επηρεάσει ή να προβλέψει την επίπτωση της έκβασης ή της νόσου.⁴¹ Συγκεκριμένα, ένας βιοδείκτης μπορεί να είναι μία πρωτεΐνη, μια μετάλλαξη ή ένα μετάγραφο, το οποίο υποδηλώνει μία κατάσταση στον οργανισμό. Ένας διαγνωστικός βιοδείκτης ανιχνεύει ή επιβεβαιώνει την ύπαρξη της νόσου.⁴² Στόχος της ανάπτυξης νέων βιοδεικτών είναι η επικύρωση μεθόδων που να εξασφαλίζουν ότι ο βιοδείκτης που θα χρησιμοποιηθεί θα είναι αξιόπιστος, η μέτρηση θα είναι ακριβής και το κόστος χαμηλό.⁴³ Οι βιοδείκτες ως επί το πλείστον είναι μη επεμβατικοί, βιοχημικής ή μοριακής φύσεως. Οι βιοδείκτες αυτοί είναι συνήθως γονίδια ή πρωτεΐνες που βρίσκονται στο αίμα, στα σωματικά υγρά ή στους ιστούς ή παράγονται από κύτταρα του ιστού που νοσεί ή εναλλακτικά από φυσιολογικά ως απόκριση σε διάφορες ασθένειες. Στην περίπτωση καρκίνου, οι μοριακοί βιοδείκτες μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τον τύπο του καρκίνου, το στάδιο, την πρόγνωση. Μπορούν να αναλύονται από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των συμπαγών όγκων και των σωματικών υγρών. Η ανίχνευση αλλαγών στην αλληλουχία του DNA, RNA ή των αμινοξέων στις πρωτεΐνες μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τις γενετικές αλλαγές που σχετίζονται με τον καρκίνο. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου, την επιλογή της θεραπείας ή/και την προσαρμογή της εξατομικευμένα και σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του ασθενούς.⁴⁴

Επιπλέον, οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία και την πιθανή ανάπτυξη υποτροπής της νόσου. Συμπερασματικά, η χρήση βιοδεικτών στον καρκίνο ενισχύει την ιατρική ακρίβεια και επιτρέπει την πιο εξατομικευμένη προσέγγιση στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου.⁴⁴

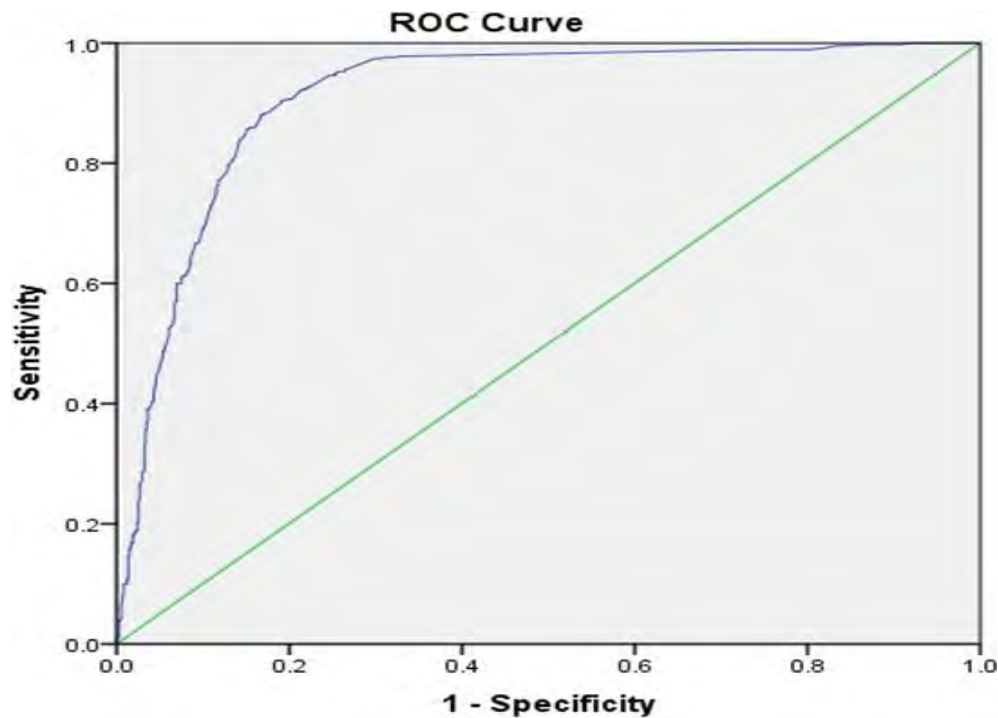
1.5 Διάγνωση του καρκίνου με τη χρήση διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων- Αξιολόγηση της ROC ανάλυσης.

Η διάγνωση γαστρικού καρκίνου λόγω έλλειψης προγνωστικών δεικτών καθυστερεί.⁴⁵ Η διάγνωση βασίζεται κυρίως σε επεμβατικές προσεγγίσεις, όπως η ενδοσκόπηση και η βιοψία. Γι'αυτό είναι απαραίτητη η εύρεση μη επεμβατικών δοκιμασιών και

βιοδεικτών για τον έλεγχο και τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου.⁴⁶ Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν βρεθεί ορισμένοι βιοδείκτες και συγκεκριμένα διάφορες μορφές RNAs, ως προγνωστικοί δείκτες.⁴⁷ Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη μεθόδων και εργαλείων βιοπληροφορικής έχουν σημειώσει σημαντική πρόοδο στον προσδιορισμό πολλών καρκινωμάτων και αδενοκαρκινωμάτων, όπως στον καρκίνο του στομάχου.⁴⁸ Ένας τρόπος για τον εντοπισμό βιοδεικτών σε βιολογικό πλαίσιο είναι η ανάλυση του μεταγραφώματος. Μέσω της αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος και της επακόλουθης σύγκρισης φυσιολογικών και παθολογικών βιοψιών όλων των σταδίων, προκύπτουν διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια. Η έκφραση αυτών των γονιδίων απορρυθμίζεται επειδή τα κύτταρα μετασχηματίζονται σε καρκινικά. Οι τιμές έκφρασης των γονιδίων μπορεί να είναι αυξημένες, συνεπώς τα γονίδια υπερεκφράζονται ή μειωμένες συνεπώς τα γονίδια υποεκφράζονται ή και ανεπηρέαστες που αντιστοιχούν σε μη διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια.

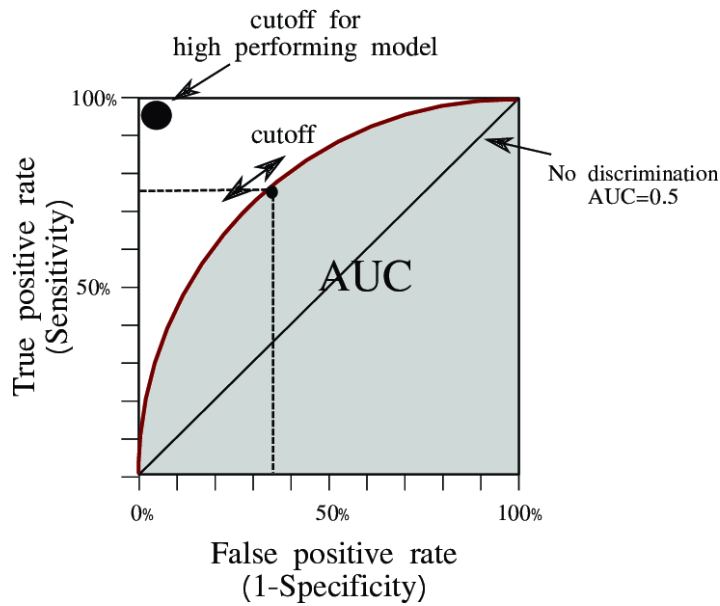
Τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια εκτιμώνται μέσω αναλύσεων ROC (*receiving operating characteristics*), με τις οποίες πραγματοποιείται αξιολόγηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της διαγνωστικής ικανότητας κάθε γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι αναλύσεις στηρίζονται στον υπολογισμό της διαγνωστικής ευαισθησίας, που ορίζεται ως το ποσοστό των ατόμων που πραγματικά έχουν μια συγκεκριμένη ασθένεια (στόχο) και ανιχνεύονται ως θετικά από τον βιοδείκτη, και της ειδικότητας που ορίζεται ως το ποσοστό των ατόμων που δεν νοσούν από την συγκεκριμένη ασθένεια (στόχο) και ανιχνεύονται ως αρνητικά.⁴⁹

Στην ανάλυση ROC, ορίζεται μία τιμή αποκοπής (cut-off) όπου πραγματοποιείται διαχωρισμός των ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Σαν ψευδώς θετικό ορίζεται το ποσοστό των ατόμων που δεν πάσχουν από κάποια ασθένεια αλλά ανιχνεύονται ως θετικά από τον βιοδείκτη ενώ σαν ψευδώς αρνητικό ορίζεται το ποσοστό των ατόμων που έχουν την ασθένεια αλλά εσφαλμένα ανιχνεύονται ως αρνητικά. Για την αξιολόγηση των επιλεγόμενων γονιδίων, αν οι τιμές των γονιδίων είναι μεγαλύτερες από την τιμή αποκοπής που έχουμε ορίσει, τότε ο ασθενής πάσχει από την νόσο, ενώ αν οι τιμές των γονιδίων είναι μικρότερες από την τιμή αποκοπής τότε ο ασθενής δεν νοσεί.^{49,50} Ένα διάγραμμα ROC απεικονίζεται στην **Εικόνα 7**.



Εικόνα 7: Καμπύλη ROC, με τον άξονα x να ορίζει τον όρο (1-ειδικότητα) και τον άξονα y την ευαισθησία.

Με βάση τα παραπάνω, για κάθε γονίδιο υπολογίζεται η περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC (area under the curve), με την οποία εκτιμάται η αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η καμπύλη ROC στην άνω αριστερή γωνία του γραφήματος, τόσο υψηλότερη είναι η ακρίβεια της εξέτασης, διότι στην άνω αριστερή γωνία, η ευαισθησία = 1 και το ψευδώς θετικό ποσοστό = 0 (ειδικότητα = 1). Η ιδανική καμπύλη ROC έχει επομένως $AUC = 1,0$. Οι τιμές AUC κυμαίνονται μεταξύ 0 και 1. Για να είναι αποδεκτή οποιαδήποτε διαγνωστική μέθοδος, αρκεί η τιμή $AUC \geq 0,8$.^{49,50} (**Εικόνα 8**)



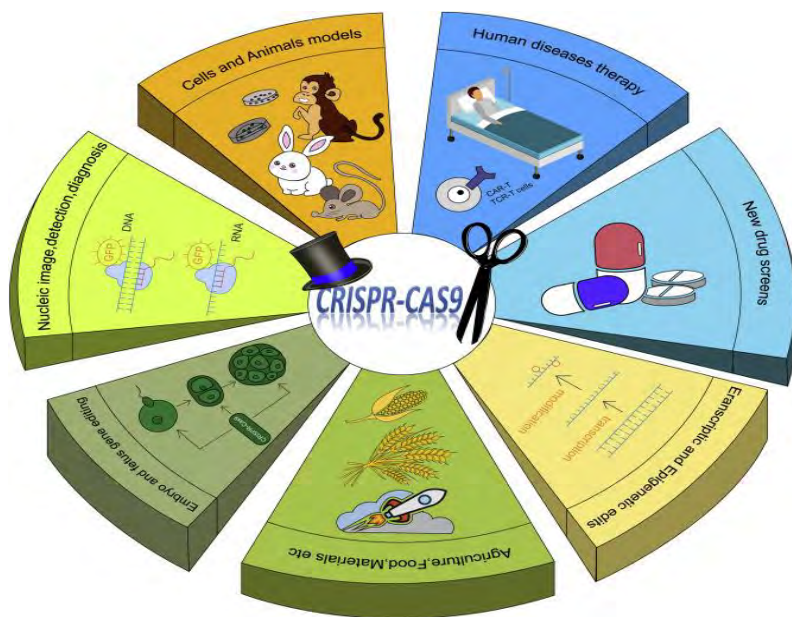
Εικόνα 8: Καμπύλη ROC και καμπύλη AUC.

1.6 CRISPR

Η επεξεργασία του γονιδιώματος μπορεί να επιτευχθεί, με αποτέλεσμα την αλλαγή του γενετικού υλικού. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω:

- εισαγωγής γονιδίων που μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση νέων χαρακτηριστικών,
- διαγραφής γονιδίων, που οδηγεί σε απενεργοποίηση γονιδίων,
- αντικατάστασης γονιδίων, που μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένες λειτουργίες,
- απενεργοποίησης γονιδίων, που οδηγεί στην απενεργοποίηση γονιδίων και αποσιώπησή, εμποδίζοντας την έκφρασή τους καθώς και μέσω
- διόρθωσης μεταλλάξεων, έτσι ώστε να αποφευχθούν ασθένειες.⁵¹

Οι τεχνικές αυτές επεξεργασίας του γονιδιώματος περιλαμβάνουν μεθόδους, όπως η CRISPR-Cas9, οι οποίες βοηθούν στην γενετική έρευνα και στη θεραπεία ασθενειών. Όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 9**, η CRISPR-Cas9 βρίσκει εφαρμογές τόσο στη βιολογία όσο στη βιοτεχνολογία και στην ιατρική.



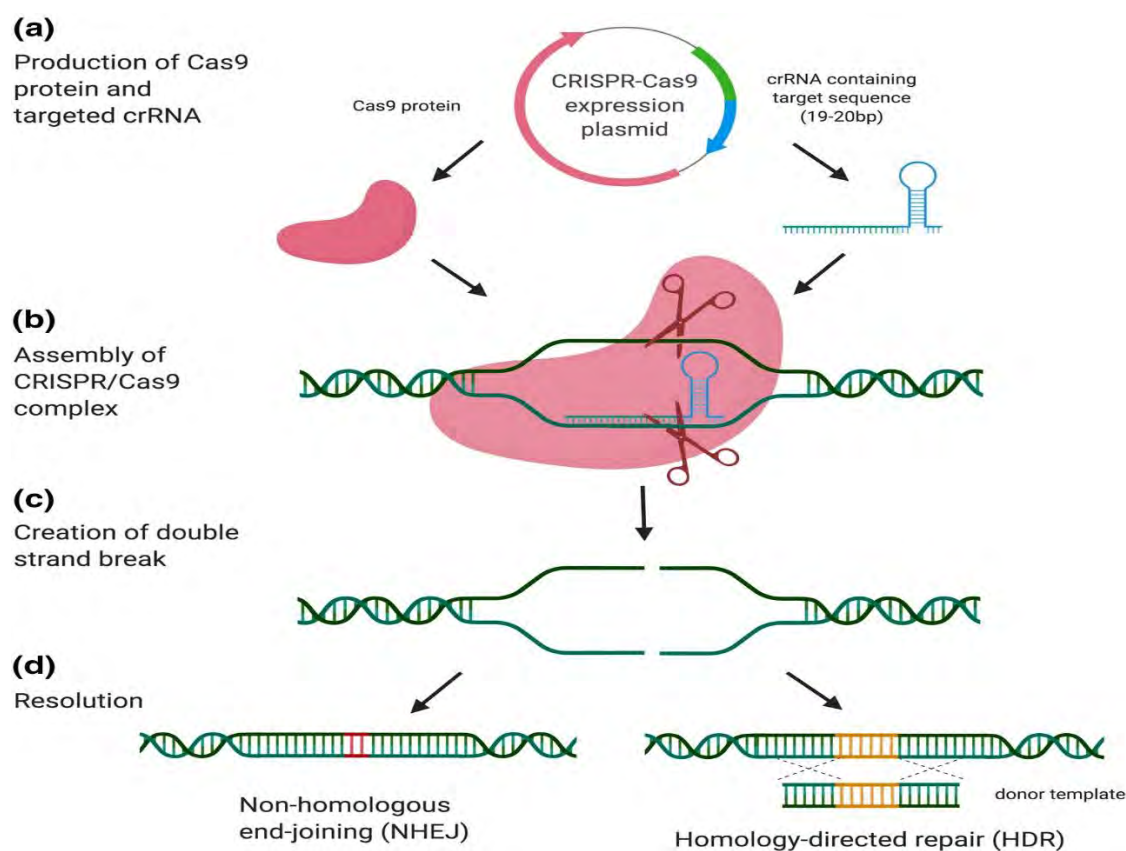
Εικόνα 9:Εφαρμογή της μεθόδου CRISPR-Cas9

Το σύστημα CRISPR-Cas9 είναι ένα προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο βρίσκεται σε πολλά βακτήρια και αρχαιοβακτήρια.⁵² Το σύστημα CRISPR εμφανίζεται στο γονιδίωμα ως αφορά τακτικά επαναλαμβανόμενες βραχείες παλινδρομικές συστοιχίες (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) και ο όρος Cas9 αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη Cas9 που παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του συστήματος. Ιδιαίτερη σημασία διαδραματίζει η ύπαρξη τμημάτων μήκους 30-35 νουκλεοτιδίων, οι οποίες χωρίζουν τις παλινδρομικές αλληλουχίες και εμφανίζουν ομολογία έναντι ιικών γονιδιωμάτων, πράγμα που οδήγησε στην υποψία ότι ίσως αυτές οι περιοχές εμπλέκονται στην άμυνα του γονιδιώματος από την εισβολή των ιών.⁵³

Η πρωτεΐνη Cas9 καθώς και το καθοδηγητικό RNA (guideRNA) είναι δύο βασικά στοιχεία του συστήματος CRISPR-Cas9. Η πρωτεΐνη Cas9 αποτελείται από δύο επικράτειες, την επικράτεια με δράση αναγνώρισης και την επικράτεια με δράση νουκλεάσης. Η επικράτεια αναγνώρισης περιλαμβάνει τμήματα στα οποία προσδένεται το RNA οδηγός, ενώ η επικράτεια νουκλεάσης περιλαμβάνει τμήματα ένα εκ των οποίων είναι η PAM, η οποία βοηθάει στην έναρξη της πρόσδεσης του DNA.⁵⁴ Το RNA οδηγός αποτελείται από το crRNA και το tracrRNA. Το crRNA είναι ένα μικρό RNA που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο DNA-στόχο που πρόκειται να τροποποιηθεί. Αναγνωρίζει τον στόχο με σύζευξη με την αλληλουχία-στόχο, που αποτελεί το σημείο όπου θα πραγματοποιηθεί η κοπή του DNA. Το tracrRNA είναι μια μακριά ακολουθία που χρησιμεύει ως ικρίωμα πρόσδεσης για τη νουκλεάση Cas9. Αυτό το τμήμα βρόχων

επιτρέπει στο σύστημα να επικοινωνεί με την Cas9 προκειμένου να επιτευχθεί η ακριβής εκτοπή του DNA. Το crRNA και το tracrRNA μπορούν να συνδυαστούν για να δημιουργήσουν ένα guideRNA, που ονομάζεται sgRNA. Αυτό το sgRNA μπορεί να σχεδιαστεί ώστε να στοχεύσει σχεδόν οποιαδήποτε γονιδιωματική αλληλουχία που είναι επιθυμητό να τροποποιηθεί.⁵⁵

Κατά τη διάρκεια έκθεσης σε φάγο, η γονιδιωματική αλληλουχία του ιού εισέρχεται στο βακτήριο. Τρία στάδια λαμβάνουν χώρα κατά την έκθεση, η αναγνώριση, η διάσπαση και η επιδιόρθωση.⁵⁶ Το sgRNA κατευθύνει την πρωτεΐνη Cas9 ώστε να αναγνωρίσει την αλληλουχία-στόχο. Απουσία sgRNA, η πρωτεΐνη Cas9 είναι ανενεργή. Όταν η πρωτεΐνη είναι συνδεδεμένη με το sgRNA, ενεργοποιείται και αναγνωρίζει την περιοχή PAM όπου και κόβει την αλληλουχία του DNA στο σημείο αυτό. Στη συνέχεια, η Cas9 διασπά το DNA στη θέση-στόχο, με την επικράτεια HNH να κόβει τον κλώνο που συνδέεται το crRNA ενώ η επικράτεια RuvC να κόβει τον συμπληρωματικό του στην ίδια θέση. Με τον τρόπο αυτό, το ιικό DNA καταστρέφεται⁵⁷ (**Εικόνα 6**)



Εικόνα 6: Μηχανισμός του συστήματος CRISPR/Cas9. Αρχικά, ένα τμήμα crRNA και η πρωτεΐνη Cas9 εισάγεται στο κύτταρο-στόχο και δημιουργείται σύμπλοκο. Το DNA-στόχος δεσμεύεται από το

σύμπλοκο crRNA και Cas9. Στη συνέχεια, η νουκλεάση Cas9 κόβει το DNA στο σημείο-στόχο. Τα ελεύθερα άκρα του DNA επιδιορθώνονται στη συνέχεια από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA του κυττάρου, είτε μέσω της επιρρεπούς σε σφάλματα μη ομόλογης ένωσης άκρων (NHEJ) είτε, με την προσθήκη ενός προτύπου ομολογίας, μέσω της επιδιόρθωσης με ομολογία (HDR).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην επιστήμη και βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως η ιατρική, η γεωργία, η βιοτεχνολογία. Παρακάτω, αναφέρονται μερικοί σημαντικοί ρόλοι του συστήματος CRISPR-Cas9:

- Ρόλος στη γονιδιακή θεραπεία: Η γονιδιακή θεραπεία αποσκοπεί στην αντικατάσταση ενός ελαττωματικού γονιδίου/αλληλουχίας και η επεξεργασία του μεταλλαγμένου, στη θέση που βρίσκεται. Η γονιδιακή επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση γενετικών ασθενειών όπως είναι η β-θαλασσαιμία, η κυστική ίνωση και η μυϊκή δυστροφία.⁵⁸
- Θεραπευτικός ρόλος του συστήματος CRISPR/Cas9: Η πρώτη απόπειρα θεραπείας με το σύστημα CRISPR-Cas9 πραγματοποιήθηκε σε ασθενή που έπασχε από καρκίνο του πνεύμονα. Αρχικά, ελήφθησαν τα πρώτα Τ-λεμφοκύτταρα από το αίμα του ασθενή και έγινε τροποποίησή τους με τη βοήθεια του CRISPR-Cas9, με σκοπό την διαγραφή γονιδίων που συμμετείχαν στην προώθηση του καρκίνου. Έπειτα, τα τροποποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα εισήχθησαν στον ασθενή τα οποία αποδείχτηκε ότι μπορούσαν να συνδεθούν στα αντιγόνα και να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα.⁵⁹ Η τεχνολογία γονιδιακής επεξεργασίας CRISPR/Cas-9 έχει την προοπτική να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών που προκαλούνται από μικροοργανισμούς. Στον τομέα αυτό, ένας σημαντικός στόχος είναι η θεραπεία του HIV, του ιού που προκαλεί το AIDS.⁶⁰

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εντοπισμός διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων που μπορούν να αποτελέσουν διαγνωστικούς και προγνωστικούς δείκτες για την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου. Η εργασία περιλαμβάνει βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με στόχο τον εντοπισμό εκείνων των γονιδίων που εμφανίζουν μεταβολή στην έκφρασή τους σε δείγματα καρκινικού ιστού από διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς γαστρικούς ιστούς.

Η ανάλυση περιλαμβάνει μια εξειδικευμένη προσέγγιση στη βιοπληροφορική και τη στατιστική, καθώς εξετάζονται λεπτομερώς τα γονίδια που υποστηρίζουν την εμφάνιση του καρκίνου σε διάφορα στάδια της πάθησης. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει επίσης την αξιολόγηση της σημασίας των εκφραζόμενων γονιδίων ως δείκτες για τη διάκριση μεταξύ καρκίνου και φυσιολογικών καταστάσεων.

Απώτερος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η δημιουργία μιας υπολογιστικής πλατφόρμας για εύρεση εκείνων των RNAs που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατάλληλοι βιοδείκτες, μη επεμβατικού τύπου, με εξειδίκευση για τον γαστρικό καρκίνο.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά και δεδομένα

Από προηγούμενες μεταγραφομικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο The Cancer Genome Atlas Project ([TCGA](#))⁶⁴, προέκυψαν τιμές έκφρασης 45,970 γονιδίων για 657 δείγματα, τα οποία αντιστοιχούν σε φυσιολογικό υγιή ιστό, σε υγιή ιστό καθώς και σε καρκινικό ιστό, στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου (Stage I, Stage II, Stage III, Stage IV, Πίνακας 1). Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των τιμών έκφρασης των γονιδίων αυτών (RNAs, coding and non-coding), προκειμένου να ανιχνευτούν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλύτεροι βιοδείκτες, για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου. Στο παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται ο αριθμός των δειγμάτων που αντιστοιχούν στα φυσιολογικά, τα παρακαρκινικά και στα διαφορετικά στάδια γαστρικού καρκίνου:

Δείγματα	Περιγραφή	Αριθμός δειγμάτων
Φυσιολογικά (Normal)	Αναφέρεται στα δείγματα τα οποία δεν νοσούν από γαστρικό καρκίνο	204
Παράπλευρα του καρκίνου (Paracancerous)	Αναφέρεται στα δείγματα που προέρχονται από περιοχές του ιστού γύρω από τον καρκίνο του στομάχου	37
Στάδιο I (Stage I)	Αναφέρεται στα δείγματα όπου ο όγκος βρίσκεται στον επιθήλιο του στομάχου	58
Στάδιο II (Stage II)	Αναφέρεται στα δείγματα όπου ο όγκος έχει μεταστάσεις σε επιχώριους λεμφαδένες	122
Στάδιο III (Stage III)	Αναφέρεται σε δείγματα όπου ο όγκος έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένους λεμφαδένες	169
Στάδιο IV (Stage IV)	Αναφέρεται σε δείγματα όπου έχει γίνει μετάσταση του όγκου σε 28άλλο όργανο	39
Στάδιο N/A (Stage N/A)	Αναφέρεται σε δείγματα στα οποία δεν γνωρίζουμε το στάδιο στο οποίο	28

	βρίσκεται η εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου.	
--	--	--

Πίνακας 1: Απεικόνιση των δειγμάτων της ανάλυσης

3.2 Δημιουργία volcano plot για στατιστική ανάλυση των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων

Η ανάλυση διαφορικής έκφρασης αποτελεί μια στατιστική διαδικασία με σκοπό τον εντοπισμό ποσοτικών αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων μεταξύ δύο συνθηκών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εξετάζονται οι διαφορές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ του καρκινικού ιστού και του ανατομικά υγιούς παρακαρκινικού ιστού. Με τη δημιουργία γραφημάτων volcano plot απεικονίζονται οι τιμές έκφρασης των γονιδίων οι οποίες είναι αυξημένες, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, καθώς και οι τιμές έκφρασης των γονιδίων που είναι μειωμένες σε σχέση με τα φυσιολογικά. Δύο σημαντικοί παράμετροι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κατασκευή του γραφήματος. Αρχικά είναι η τιμή $\log_2FC$, η οποία αντιστοιχεί στο εύρος της αλλαγής σε λογαριθμική κλίμακα και αντανakλά στις αλλαγές ανά συνθήκη και για κάθε γονίδιο χωριστά, καθώς και η στατιστική σημαντικότητα, μέσω υπολογισμού της τιμής p (p -value), η οποία ορίζεται ως μέτρο της επαναληψιμότητας ενός πειράματος (ή της έκφρασης ενός γονιδίου μεταξύ ομοειδών δειγμάτων). Η στατιστική σημαντικότητα θα πρέπει να είναι ≤ 0.05 , η οποία σε αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο μεταφράζεται σε τιμές μεγαλύτερες του 1.3, και το εύρος αλλαγής επιλέγεται να είναι μεγαλύτερο (ή μικρότερο) από 2 (ή -2 αντίστοιχα), που αντιστοιχούν σε $\log_2$ ίσο με 1 ή -1 και υποδηλώνουν διαφορικά εκφρασμένες τιμές έκφρασης σε σχέση με το φυσιολογικό δείγμα.

3.3 Δημιουργία VENN διαγραμμάτων για την εύρεση των κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στα διάφορα στάδια γαστρικού καρκίνου

Ένα διάγραμμα VENN απεικονίζει σε τομές επικαλυπτόμενων κύκλων τα κοινά σημεία μεταξύ δύο ή περισσότερων συνόλων. Με τη βοήθεια του προγράμματος Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), γίνεται η εύρεση των κοινών και μοναδικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων για όλα τα δείγματα. Αυτό αποσκοπεί στην επιλογή των κατάλληλων γονιδίων, που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες.

3.4 Δημιουργία θερμικών χαρτών (heatmaps)

Οι θερμικοί χάρτες δημιουργήθηκαν με σκοπό την παρακολούθηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων σε διάφορα δείγματα βιοψιών που υποβλήθηκαν σε ανάλυση. Τα χρώματα χρησιμοποιούνται για να αναπαραστήσουν τις αυξημένες και μειωμένες τιμές έκφρασης των γονιδίων, καθιστώντας ευδιάκριτη την εικόνα της έκφρασης των γονιδίων από το φυσιολογικό δείγμα έως το καρκινικό. Μέσω αυτού του τρόπου απεικόνισης, είναι δυνατό να παρατηρηθούν και να αναλυθούν οι διαφορές στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών βιοψιών, προσφέροντας εμβληματική εικόνα της γονιδιακής δραστηριότητας.

3.5 Ανάλυση οντολογίας (Gene ontology)

Η ανάλυση οντολογίας επιτρέπει την αναζήτηση των βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν διάφορα γονίδια. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήσαμε για εύρεση των βιολογικών διεργασιών είναι το Gene-codis (<https://genecodis.genyo.es/>). Το πρόγραμμα αυτό λειτουργεί με βάσεις δεδομένων των γονιδίων του οργανισμού. Έτσι, εισάγοντας μόνο τα ονόματα των γονιδίων, γίνεται δυνατή όχι μόνο η εύρεση των βιολογικών διεργασιών, στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια αυτά αλλά και η εύρεση των ασθενειών με τις οποίες σχετίζονται. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται με γραφήματα, οι μπάρες των οποίων ανήκουν στις βιολογικές διεργασίες/ ασθένειες που συμμετέχει το γονίδιο.

3.6 Ανάλυση ROC (receiver operating characteristics) και υπολογισμός του AUC (area under the curve)

Η ανάλυση ROC, αποτελεί μία μεθοδολογία για την αξιολόγηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας των γονιδίων που επιλέχθηκαν στην υπόθεση ότι το συγκεκριμένο γονίδιο σχετίζεται με κάποια ασθένεια. Σαν ευαισθησία ορίζεται η αναλογία των αληθώς θετικών υποθέσεων (true positive rate), ενώ σαν ειδικότητα ορίζεται η αναλογία των ψευδώς θετικών υποθέσεων (false positive rate), με βάση τον τύπο

$$\text{Ειδικότητα} = 1 - \text{Αναλογία ψευδώς θετικών υποθέσεων}$$

Στην περίπτωση υπερεκφραζόμενων γονιδίων και για την συσχέτισή τους με την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου, η καμπύλη που δημιουργείται από την αναλογία των

αληθώς θετικών υποθέσεων (yy') ως προς την αναλογία των ψευδώς θετικών υποθέσεων (xx') αποτελεί μέτρο της αποτελεσματικότητας για το συγκεκριμένο γονίδιο στην πρόβλεψη ότι η έκφραση του μεταβάλλεται μεταξύ καρκινικών και υγιών ιστών. Για τον λόγο αυτό, υπολογίζεται η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC), δηλαδή ο λόγος του εμβαδού κάτω από την καμπύλη προς το συνολικό εμβαδόν του γραφήματος. Μία τιμή $AUC \geq 0.5$, υποδηλώνει ότι η υπόθεση σχετικά με το γονίδιο είναι αληθής, ενώ μία τιμή $AUC < 0.5$ υποδηλώνει ότι η υπόθεση είναι ασθενής και δεν γίνεται πλήρης διαχωρισμός των αληθώς θετικών και των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

3.7 Χρήση CRISP-Cas9 για προσθήκη μεταλλάξεων

Το σύστημα CRISPR-Cas αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την μοριακή βιολογία. Μέσω αυτού είναι δυνατή η εύρεση των θέσεων στις οποίες μπορεί να γίνει προσθήκη μεταλλάξεων, προσθήκη νουκλεοτιδίων, ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση αλληλουχιών στο γονιδίωμα. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήσαμε είναι το ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Βασικός ρόλος του συστήματος αυτού είναι η προσθήκη μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα και ειδικότερα στα εξόνια, προκειμένου να επιτευχθεί απενεργοποίηση αλληλουχιών οι οποίες φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της νόσου που μελετάμε. Για να ξεκινήσουμε την εύρεση των αλληλουχιών που φαίνεται να επηρεάζονται από την νόσο:

- εισάγουμε το όνομα του γονιδίου που έχει επιλεγεί και φαίνεται ότι επηρεάζεται η έκφρασή του με την ύπαρξη του γαστρικού καρκίνου,
- επιλέγουμε τον οργανισμό που θέλουμε να μελετήσουμε (π.χ. ανθρώπινο γονιδίωμα),
- επιλέγουμε τον τελεστή CRISPR (CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas13 κ.ο.κ) και τέλος,
- επιλέγουμε το σκοπό (π.χ. knockout, καταστολή, ενεργοποίηση κ.ο.κ).

Η πρωτεΐνη Cas9, μέσω της αλληλουχίας του οδηγού RNA που περιέχει, προσδένεται στα εξόνια, με σκοπό την προσθήκη μεταλλάξεων.

Σε μορφή πίνακα εμφανίζονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- αλληλουχίες-στόχοι, τις οποίες μπορεί να αναγνωρίσει η πρωτεΐνη Cas9 και μέσω μιας σειράς βημάτων να καταφέρει να εισάγει μετάλλαξη καθώς και η γονιδιωματική θέση,
- το ποσοστό της αλληλουχίας αυτής σε GC (γουανίνη-κυτοσίνη). Η περιεκτικότητα αυτή μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα του DNA και, ως εκ τούτου, την αποτελεσματικότητα του συστήματος CRISPR/Cas9. Οι περιοχές με μέτρια περιεκτικότητα GC (μεταξύ 45% και 80%) ενδέχεται να είναι πιο κατάλληλες για τη στόχευση και
- η εξειδίκευση (miss match). Η πρωτεΐνη Cas9, μέσω του οδηγού RNA, στοχεύει σε συγκεκριμένη θέση στο εξόνιο του γονιδίου που επιλέχθηκε να μελετηθεί. Επειδή τα νουκλεοτίδια είναι λίγα, αυτό μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα η Cas9 να προσδεθεί και σε άλλο σημείο εισάγοντας μεταλλάξεις. Συνεπώς, οι όροι MM0, MM1, MM2, MM3 αναφέρονται στον αριθμό των στόχων του ανθρώπινου γονιδιώματος που το συγκεκριμένο οδηγό RNA μπορεί να εισάγει μεταλλάξεις πέρα του γονιδίου που έχουμε ορίσει να μελετήσουμε. Όταν η τιμή MM0, MM1, MM2, MM3 είναι μηδενική, σημαίνει ότι το οδηγό RNA θα οδηγήσει την Cas9 να προσδεθεί μόνο στο συγκεκριμένο γονίδιο που έχουμε ορίσει και μόνο εκεί θα γίνει η προσθήκη μετάλλαξης.

Συνεπώς, μέσω του προγράμματος πραγματοποιείται μια βελτιωμένη διαδικασία προκειμένου να γίνει ο σχεδιασμός μεταλλάξεων και αποτελεί σημαντικό εργαλείο επεξεργασίας γονιδιώματος.⁶³

Από τα δεδομένα μεταγραφομικής ανάλυσης που λήφθηκαν, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σε δείγματα έναντι φυσιολογικών. Αφού τα γονίδια διαχωρίστηκαν σε υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα έναντι των φυσιολογικών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση VENN προκειμένου να ανιχνευτούν τα κοινά γονίδια στα τέσσερα στάδια γαστρικού καρκίνου τόσο για τα υπερεκφραζόμενα όσο και για τα υποεκφραζόμενα γονίδια.

Σε επόμενο στάδιο, έπειτα από την επιλογή των κοινών γονιδίων δημιουργήθηκε θερμικός χάρτης, ώστε να παρατηρηθούν οι μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων στα διάφορα δείγματα. Τα κοινά γονίδια χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση οντολογίας, μία ανάλυση που επιτρέπει την εύρεση τόσο των βιολογικών διεργασιών όσο και των ασθενειών στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια. Επιλεγμένα γονίδια, που φάνηκαν να επηρεάζονται από την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου, αναλύθηκαν μέσω

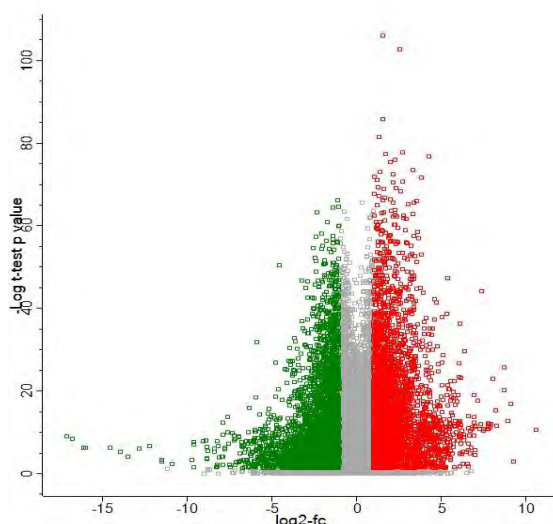
δημιουργίας ROC διαγραμμάτων με σκοπό την εύρεση εκείνων των γονιδίων που εμφανίζουν υψηλή διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα. Με τον τρόπο αυτό, έγινε δυνατή η επιλογή των γονιδίων εκείνων και συγκεκριμένα των mRNAs που φάνηκαν να έχουν την καλύτερη διαγνωστική ικανότητα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε υπολογιστική ανάλυση με στόχο των εύρεση κατάλληλων αλληλουχιών-στόχων έναντι επιλεγόμενων γονιδίων-βιοδεικτών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, στις οποίες η πρωτεΐνη Cas9 μπορεί να εισάγει μετάλλαξη, με σκοπό την απενεργοποίηση του γονιδίου που φαίνεται να συμβάλλει αρνητικά στον γαστρικό καρκίνο μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9 και την μελλοντική του πειραματική μελέτη ώστε να γίνει και λειτουργικός χαρακτηρισμός του προτεινόμενου βιοδείκτη.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Στατιστική ανάλυση για την εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων

Κατά την πρώτη φάση της βιοπληροφορικής ανάλυσης, αξιοποιήθηκε το πρόγραμμα Perseus, με τη βοήθεια του οποίου κατασκευάστηκαν 5 διαγράμματα volcano. Αρχικά, οι τιμές έκφρασης των γονιδίων στα διάφορα δείγματα που επιλέχθηκαν μετατράπηκαν σε αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο και έπειτα από τον υπολογισμό του μέσου όρου των επαναλήψεων ανά συνθήκη, υπολογίστηκε το εύρος απόκλισης. Αυτές οι τιμές αποτελούν και τον άξονα xχ' στα διαγράμματα volcano. Στη συνέχεια, υπολογίζουμε με διάφορα βήματα στο πρόγραμμα, τη στατιστική σημαντικότητα, η οποία παράμετρος αυτή αντιστοιχεί στον άξονα yy' ($\log_2_FC$). Έτσι, κατασκευάστηκαν 5 volcano plots, με παρόμοιο διάγραμμα όπως απεικονίζεται στην παρακάτω **Εικόνα 7**, τα οποία περιέχουν ομαδοποιημένα τα υπερεκφραζόμενα και τα υποεκφραζόμενα γονίδια στα δείγματα του σταδίου Stage I έναντι των φυσιολογικών, Stage II έναντι των φυσιολογικών, Stage III έναντι των φυσιολογικών, Stage IV έναντι των φυσιολογικών και Stage N/A έναντι των φυσιολογικών δειγμάτων.



Εικόνα 7: Διάγραμμα volcano plot με απεικόνιση των υπερεκφραζόμενων (κόκκινες κουκίδες) και υποεκφραζόμενων (πράσινες κουκίδες) γονιδίων σε δείγματα Stage I έναντι φυσιολογικών δειγμάτων.

Τα διαγράμματα volcano στα δείγματα για τα υπόλοιπα στάδια γαστρικού καρκίνου έναντι των φυσιολογικών δειγμάτων έχουν παρόμοια μορφή όπως στην **Εικόνα 7**, και απεικονίζονται στο Παράρτημα 1.

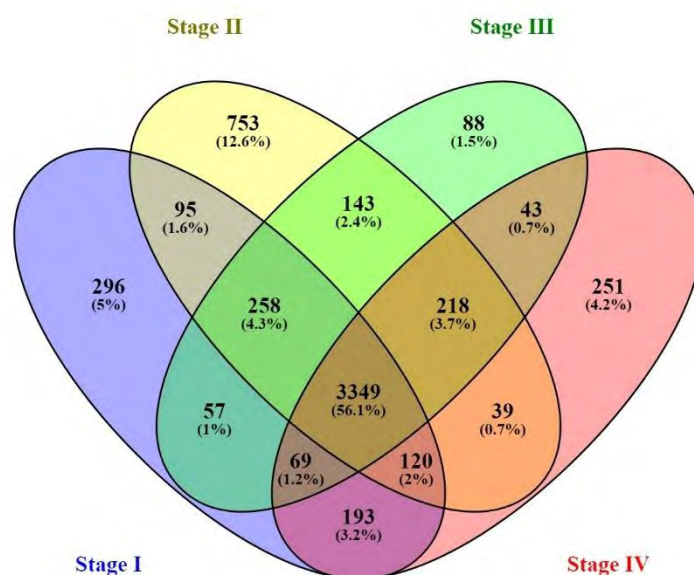
Στόχος του σταδίου αυτού είναι ο διαχωρισμός των γονιδίων που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται στα καρκινικά δείγματα έναντι των φυσιολογικών. Ο αριθμός των υπερεκφραζόμενων και υποεκφραζόμενων γονιδίων στα διάφορα στάδια γαστρικού καρκίνου σε σύγκριση με τα φυσιολογικά απεικονίζονται στον παρακάτω **Πίνακας 2**.

Samples	Differential expressed genes	Upregulated genes	Downregulated genes
Normal vs Stage I	9136	4437 (48.6%)	4699 (51.4%)
Normal vs Stage II	9671	4975 (51.4%)	4696 (48.6%)
Normal vs Stage III	8784	4225 (48.1%)	4559 (51.9%)
Normal vs Stage IV	9141	4282 (46.8%)	4859 (53.2%)
Normal vs Stage N/A	9802	4724 (48.2%)	5078 (51.8%)
Normal vs Paracancerous	8583	4053 (47.2%)	4530 (52.8%)

Πίνακας 2: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων στα δείγματα διαφόρων σταδίων γαστρικού καρκίνου έναντι των φυσιολογικών δειγμάτων

4.2 Κατασκευή διαγραμμάτων Venn για εύρεση των κοινά διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων

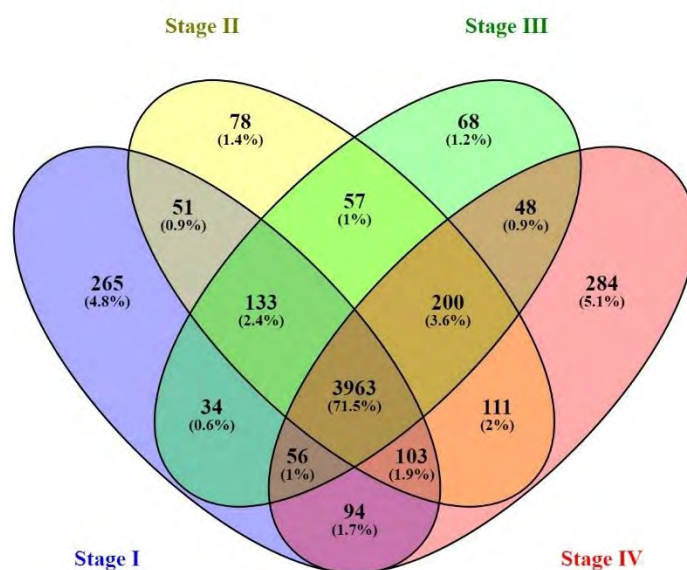
Σε επόμενο στάδιο, αξιολογήθηκαν τα υπερεκφραζόμενα και τα υποεκφραζόμενα γονίδια, με σκοπό την εύρεση των κοινών γονιδίων στα διάφορα στάδια γαστρικού καρκίνου καθώς και των μοναδικών γονιδίων για κάθε στάδιο. Στόχος ήταν η εύρεση των γονιδίων που από το αρχικό στάδιο γαστρικού καρκίνου, δηλαδή από το Stage I, εμφάνιζαν αυξημένη ή μειωμένη ρύθμιση έναντι των επιπέδων σε φυσιολογικούς ιστούς. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη δημιουργία διαγραμμάτων VENN, όπως απεικονίζονται στην **Εικόνα 8** και **Εικόνα 9**. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (**Πίνακας 3, Πίνακας 4**) και απεικονίζονται όλα τα υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα γονίδια για όλες τις συγκρίσεις έναντι των φυσιολογικών ιστών.



Εικόνα 8: Διάγραμμα VENN για τα υπερεκφραζόμενα γονίδια των σταδίων I, II, III, και IV.

Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
265	78	68	284
Stage I-Stage II	Stage I-Stage III	Stage I-Stage IV	Stage II-Stage III
51	34	94	57
Stage II-Stage IV	Stage III-Stage IV	Stage I-Stage II-Stage III	Stage I-Stage II-Stage IV
111	48	190	56
Stage II-Stage III-Stage IV	Stage I-Stage II-Stage III-Stage IV	-	-
200	3349	-	-

Πίνακας 3: Απεικόνιση των μοναδικών και κοινών υπερεκφραζόμενων γονιδίων στα διάφορα στάδια γαστρικού καρκίνου (Stage I-Stage IV).

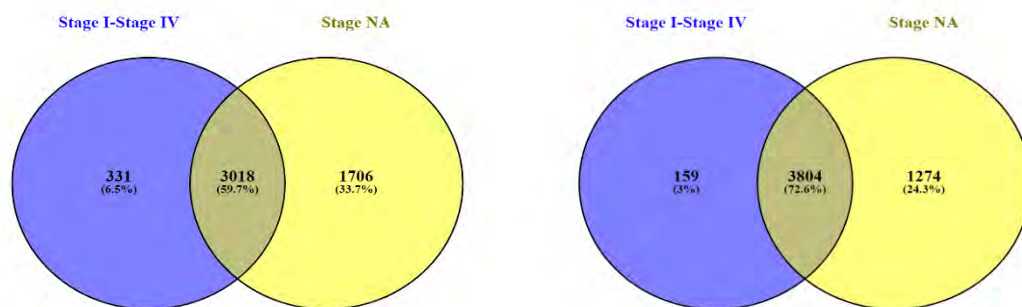


Εικόνα 9: Διάγραμμα VENN για τα υποεκφραζόμενα γονίδια των σταδίων I, II, III, και IV.

Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
296	753	88	251
Stage I-Stage II	Stage I-Stage III	Stage I-Stage IV	Stage II-Stage III
95	57	193	143
Stage II-Stage IV	Stage III-Stage IV	Stage I-Stage II-Stage III	Stage I-Stage II-Stage IV
39	43	258	69
Stage II-Stage III-Stage IV	Stage I-Stage II-Stage III-Stage IV	-	-
218	3963	-	-

Πίνακας 4: Απεικόνιση των μοναδικών και κοινών υποεκφραζόμενων γονιδίων στα διάφορα στάδια γαστρικού καρκίνου (Stage I-Stage IV).

Οι περιοχές των τεμνόμενων κύκλων απεικονίζουν τα γονίδια που είναι κοινά στα διάφορα στάδια, ενώ οι περιοχές που δεν είναι κοινές μεταξύ των διαφόρων συγκρίσεων ανήκουν στα γονίδια τα οποία είναι μοναδικά για κάθε στάδιο. Συλλέγοντας μόνο τα κοινά γονίδια των υπερεκφραζόμενων και υποεκφραζόμενων γονιδίων στα διάφορα στάδια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση VENN και για το στάδιο Stage N/A. (*Εικόνα 10*).



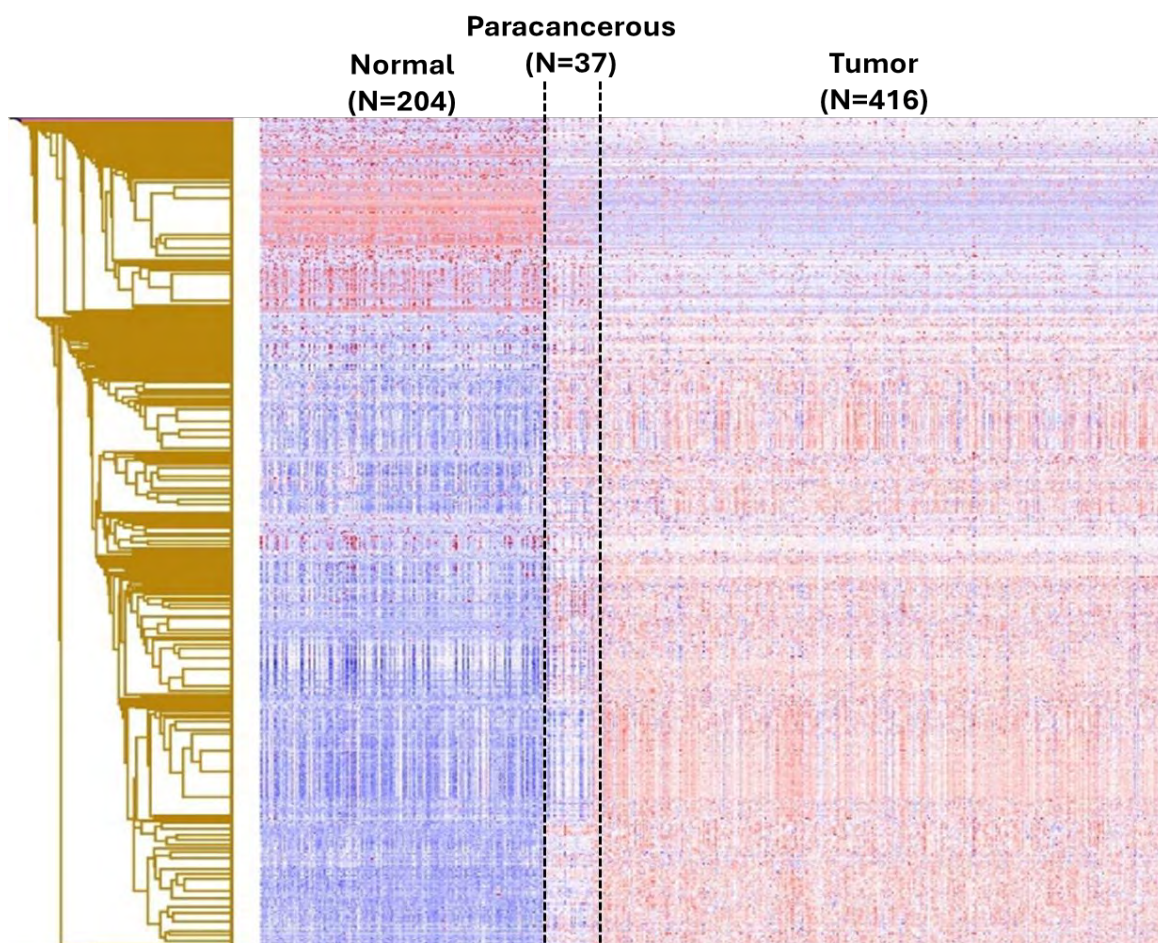
Εικόνα 104: Διάγραμμα VENN των κοινών υπερεκφραζόμενων γονιδίων στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου έναντι των δειγμάτων του σταδίου Stage N/A (αριστερή εικόνα) καθώς και των υποεκφραζόμενων γονιδίων στα διάφορα στάδια γαστρικού καρκίνου έναντι των δειγμάτων του σταδίου Stage N/A (δεξιά εικόνα).

Παρατηρούμε ότι τα κοινά υπερεκφραζόμενα γονίδια στα Stage I-IV σε σύγκριση με το Stage N/A είναι συνολικά 3018, ενώ για τα υποεκφραζόμενα γονίδια είναι 3804.

Συμπερασματικά από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η πλειοψηφία των κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων όχι μόνο αφορά τα πολύ αρχικά στάδια της νόσου αλλά επεκτείνεται και στα δείγματα που δεν έχουν χαρακτηριστεί ιστολογικά.

4.3 Ανάλυση θερμικών χαρτών

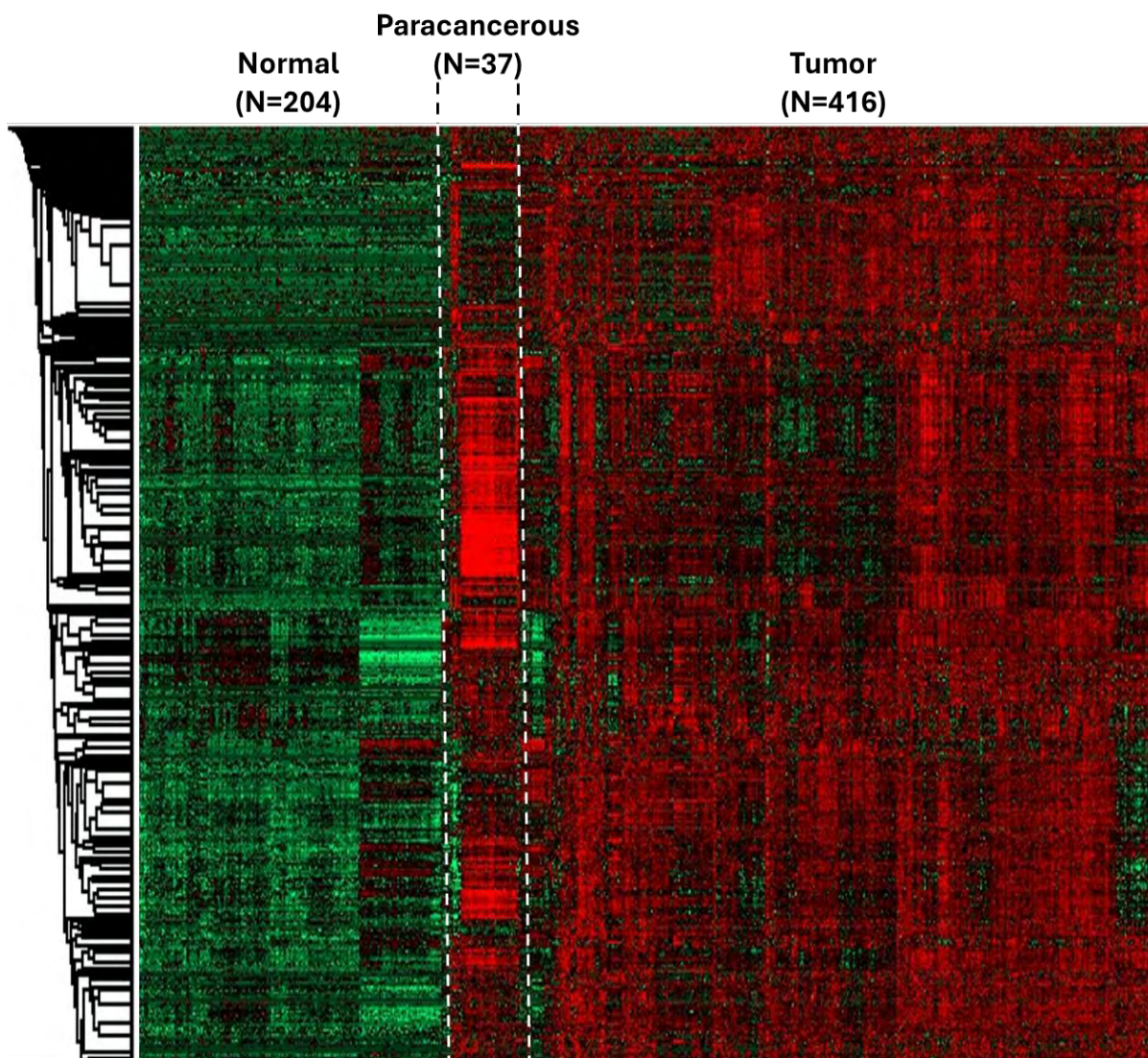
Το επόμενο βήμα της ανάλυσης ήταν η απεικόνιση των κοινά διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τα VENN διαγράμματα σε μορφή θερμικού χάρτη χωριστά για τα κωδικοποιητικά και μη κωδικοποιητικά γονίδια προκειμένου να γίνει μία συνολική αξιολόγηση για το πως η έκφραση τους επηρεάζεται στα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου. Συνολικά αξιολογήθηκαν 7312 γονίδια για τα οποία παρατηρήθηκε αλλαγή της έκφρασης σε καρκινικά δείγματα. Στο θερμικό χάρτη, που απεικονίζεται στην **Εικόνα 11**, τα δείγματα έχουν οργανωθεί και παρατίθενται από αριστερά προς τα δεξιά ξεκινώντας από τα φυσιολογικά και πηγαίνοντας προς τα παρακαρκινικά, σταδίου I έως σταδίου IV και τελευταία (δεξιά) τα σταδίου NA.



Εικόνα 115: Διάγραμμα θερμικού χάρτη για τα κοινά κωδικοποιητικά γονίδια.

Παρατηρώντας τον θερμικό χάρτη, φαίνεται η αλλαγή έκφρασης των επιλεγόμενων γονιδίων από τα φυσιολογικά δείγματα έως τα δείγματα με γαστρικό καρκίνου σταδίου IV, αριστερά και καθέτως εμφανίζονται τα διάφορα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια, ενώ στην κρυφή και οριζοντίως του θερμικού χάρτη απεικονίζονται τα διάφορα δείγματα που εξετάστηκαν. Έτσι, με τη βοήθεια του θερμικού χάρτη μπορούμε να αντιληφθούμε τις αλλαγές στην έκφραση κάθε γονιδίου στις διάφορες βιοψίες καρκίνου σε σχέση με τα φυσιολογικά υγιή δείγματα. Το μπλε χρώμα απεικονίζει ότι η τιμή έκφρασης ενός γονιδίου στη συγκεκριμένη συνθήκη μειώνεται, ενώ το κόκκινο απεικονίζει την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου συγκριτικά με τα φυσιολογικά δείγματα.

Παρόμοιο διάγραμμα θερμικού χάρτη προκύπτει και από τα non-coding γονίδια, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 12**.

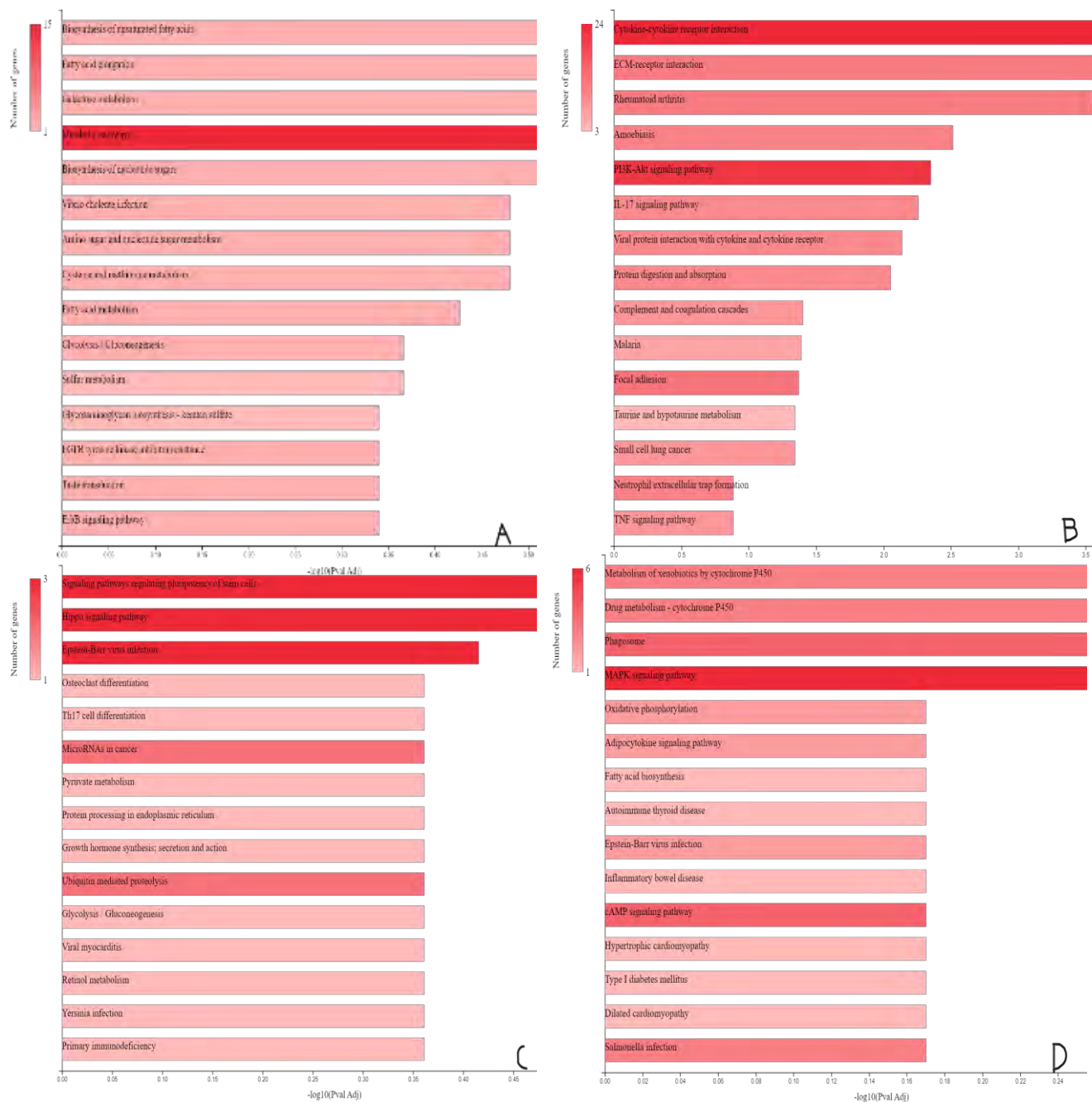


Εικόνα 12: Διάγραμμα θερμικού χάρτη για τα κοινά μη κωδικοποιητικά γονίδια.

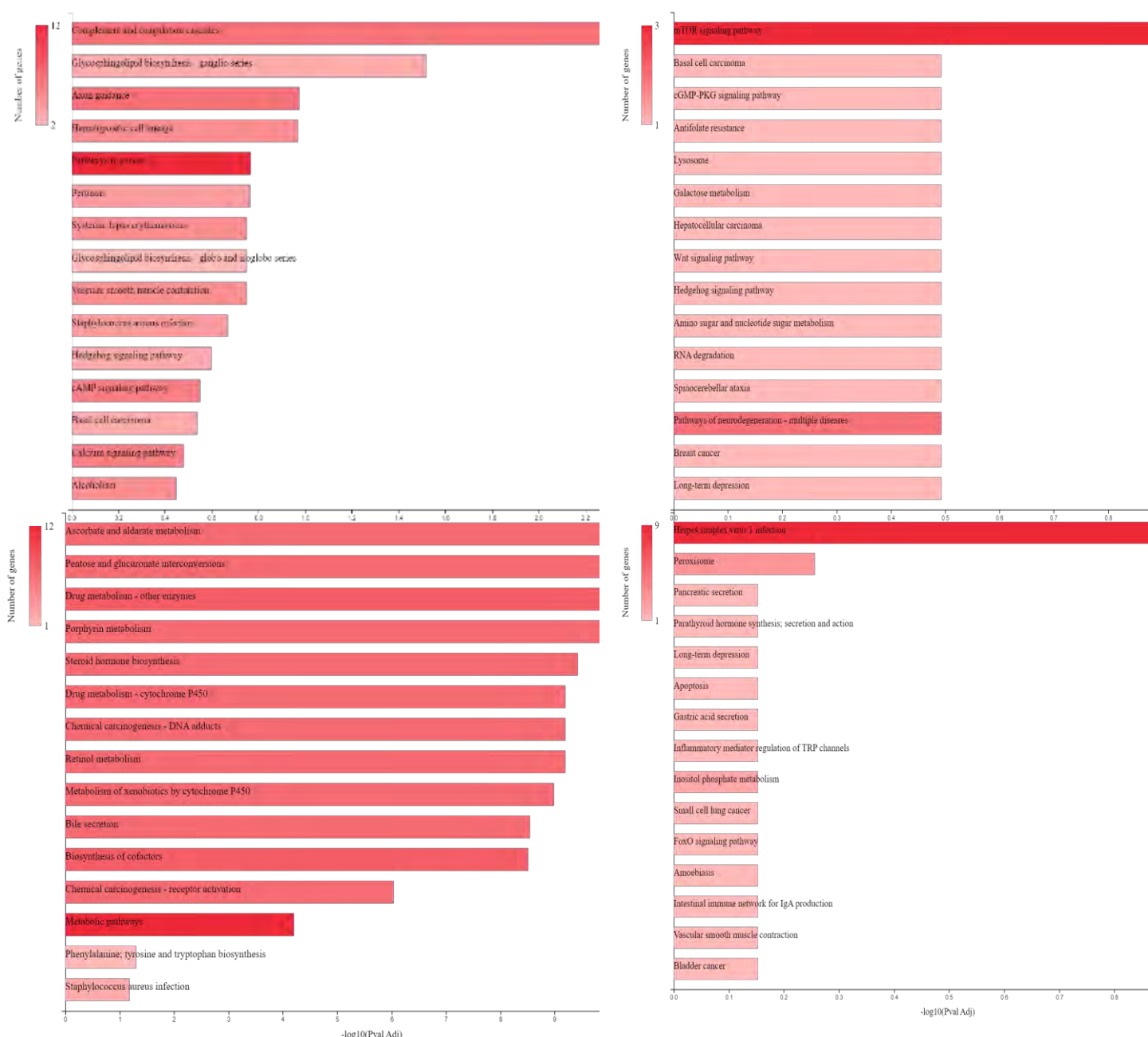
4.4 Ανάλυση οντολογίας

Έχοντας εντοπίσει τα κοινά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια μεταξύ όλων των σταδίων γαστρικού καρκίνου με την βοήθεια των θερμικών χαρτών και των διαγραμμάτων Venn, πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας χωριστά για τα υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα γονίδια με στόχο την η εύρεση των βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν αυτά. Επιλέγουμε να αναλύσουμε τα μοναδικά γονίδια που προκύπτουν για τα διάφορα στάδια του γαστρικού καρκίνου (Stage I, Stage II, Stage III, Stage IV) καθώς και τα κοινά γονίδια όλων των σταδίων γαστρικού καρκίνου, τόσο για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών που συμμετέχουν (*GO Biological Process*),

όσο και για την εύρεση των πιθανών ασθενειών στα οποία μπορεί να εμπλέκονται (*KEGG Pathways*). Τοποθετώντας στο πρόγραμμα μόνο τα ονόματα των γονιδίων, δημιουργούνται τα παρακάτω γραφήματα (*Εικόνα 13, Εικόνα 14*).



Εικόνα 13: Απεικόνιση των διαγραμμάτων οντολογίας των δειγμάτων των τεσσάρων σταδίων γαστρικού καρκίνου. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι μοναδικά για κάθε στάδιο και υπερεκφραζόμενα και παρατηρούνται οι 15 πιο σημαντικές κατηγορίες ή ασθένειες που ενισχύονται με στατιστικό τρόπο λόγω εμπλοκής των υπό ανάλυση γονιδίων



Εικόνα 14: Απεικόνιση των διαγραμμάτων οντολογίας των δειγμάτων των τεσσάρων σταδίων γαστρικού καρκίνου. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι μοναδικά για κάθε στάδιο και υποεκφραζόμενα και παρατηρούνται οι 15 πιο σημαντικές κατηγορίες ή ασθένειες που ενισχύονται με με στατιστικό τρόπο λόγω εμπλοκής των υπό ανάλυση γονιδίων

Οι βιολογικές διεργασίες και οι ασθένειες που εμπλέκονται τα γονίδια απεικονίζονται σε μπάρες. Το μήκος της μπάρας απεικονίζει και τον αριθμό των γονιδίων που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη βιολογική διεργασία και ασθένεια. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η μπάρα, τόσο πιο σημαντικό είναι το αποτέλεσμα. Τέλος, με τη βοήθεια του προγράμματος, είναι εφικτή η εύρεση των γονιδίων καθώς και ο συνολικός

αριθμός των γονιδίων που παίζουν ρόλο σε συγκεκριμένες διεργασίες καθώς και στις ασθένειες.

Παρατηρούμε ότι τα γονίδια που εμφανίζουν αυξημένη ρύθμιση στα δείγματα διαφόρων σταδίων γαστρικού καρκίνου, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 13**, από το πρώτο κιόλας στάδιο Stage I, τα περισσότερα γονίδια επηρεάζονται κατά τη διεργασία της βιοσύνθεσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων, ενώ για τα δείγματα Stage II σημαντική παρατήρηση αποτελεί το ερέθισμα που εμφανίζουν οι κυττοσίνες, που συμμετέχουν στην προσαρμοστική φλεγμονώδη άμυνα του οργανισμού.⁶⁵ Τέλος για τα δείγματα σταδίου Stage III και σταδίου IV παρατηρείται η συσχέτιση των γονιδίων αυτών με τον ιό Epstein Barr.

Επίσης, σύμφωνα με την **Εικόνα 14** που αναφέρεται στα γονίδια που εμφανίζουν μειωμένη ρύθμιση σε γαστρικό καρκινικό ιστό έναντι του φυσιολογικού, παρατηρούμε ότι από το αρχικό στάδιο τα γονίδια αυτά αρχίζουν να επηρεάζονται λόγω εμφάνισης καρκίνου. Σχετικά με τα γονίδια του σταδίου Stage II, επηρεάζονται όταν συμβαίνει κάποια παθολογική συνθήκη, ενώ για τα στάδια Stage III και Stage IV φαίνεται να επηρεάζονται λόγω διαφόρων μεταβολικών διεργασιών καθώς και ύπαρξης γαστρικού καρκίνου, τα οποία συνολικά μπορούν να μας οδηγήσουν σε μία πρώτη διάγνωση της νόσου.

Συμπερασματικά από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι συνδυαστικά με την επιρροή που έχουν τα γονίδια αυτά στις διάφορες ασθένειες/κατηγορίες που αναφέρθηκαν, μπορούν να μας βοηθήσουν στην επιλογή των κατάλληλων γονιδίων που μπορούν να αξιοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις, με σκοπό την εύρεση των καλύτερων βιοδεικτών για το γαστρικό καρκίνο.

Τα διαγράμματα οντολογίας για τις βιολογικές διεργασίες των αυξορρυθμιζόμενων και μειορρυθμιζόμενων γονιδίων, απεικονίζονται στο Παράρτημα 2.

Από τα παραπάνω γονίδια επιλέχθηκαν 90 αυξορρυθμιζόμενα γονίδια και 76 μειορρυθμιζόμενα γονίδια, όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες (**Πίνακας 3, Πίνακας 4**), τα οποία φαίνεται να παίζουν ρόλο στην εμφάνιση γαστρικού καρκίνου καθώς και γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε βιολογικές διεργασίες, οι οποίες μπορεί να οφείλονται ή/και να είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, όπως για παράδειγμα ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου, μείωση της απορρόφησης

θρεπτικών συστατικών κ.ο.κ. Κατά την καρκινογένεση, η ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου γίνεται από τα πρώτα κιόλας στάδια εμφάνισής του, ενώ η μείωση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών αποτελεί σύμπτωμα για την εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου.

Description	Genes
mitotic sister chromatid segregation	NUSAP1, SMC4, ZWINT, NDC80, KIF18A, MAD2L1, CDCA8, SGOL2, KNTC1, ESPL1, CENPK, INCENP, KIFC1, SGOL1, PLK1, NEK2
mitotic cell cycle	RNF2, MYB, NCAPD2, NDC80, TPX2, CENPW, CDK1, CDT1, TUBB, WDHD1, CDCA5, KIF15, SKA1, BIRC5, PLK4, CENPE, CENPF, TUBA1B, PBK, AURKA, CDC6, ESPL1, MYBL2, GSG2, SKA3, KIF11, XRCC2, PLK1, NEK2, TUBA1C
Cell cycle	BUB1B, CDC25C, YWHAZ, TFDPI, CDC45, CDK1, E2F2, PCNA, MCM6, MAD2L1, MCM2, CDC20, MCM5, CDKN2B, CCNE1, CHEK1, CCNA2, DBF4, SKP2, CDKN2A, CDC6, TP53, ESPL1, CCNB2, TTK, RBL1, ORC6, CDC25A, MCM4, SFN, PTTG1, BUB1, ORC1, CCNB1, CCND1, RB1, PLK1
Gastric cancer	BAK1, WNT7B, JUP, CDH17, MET, LEF1, E2F2, WNT2, NRAS, CDKN2B, WNT10A, CCNE1, TP53, TCF7, FGF18, REG4, FZD2, WNT5A, PIK3R2, CDX2, CCND1, RB1

Πίνακας 3: Απεικόνιση των επιλεγόμενων αυξηορρυθμιζόμενων γονιδίων έπειτα από ανάλυση οντολογίας

Description	Genes
Protein digestion and absorption	COL25A1, CELA2B, COL4A3, PGA3, PGA5, ELN, COL26A1, COL9A2, CPB1, CTRB2, CELA3A, PRSS1, COL16A1, SLC8A2, COL2A1, COL28A1, PGA4, SLC16A10, CELA3B, CPA1, COL4A5, KCNQ1, KCNJ13, CPA2, CTRB1, COL13A1, SLC8A3
Gastric acid secretion	KCNE2, HRH2, MYLK2, CAMK2B, ATP4A, CALML5, CALML6, KCNJ1, ADCY6, ATP4B, SSTR2, CCKBR, MYLK4, CALML3, KCNJ16, SLC26A7, GNAI1, KCNQ1, ADCY4, KCNK2, SST
digestion	CAPN8, PGA3, PGA5, CTRB2, CLPS, AKR1C1, PRSS1, LRCOL1, PGA4, CTRB1, PGC, SST
cell-matrix adhesion	ITGA7, FGA, ADAMTS13, TSC1, FGB, STRC, MSLNL, EDA, ITGA2B, TNXB, SNED1, TMEM8B, TECTA, THBS3, ITGA10, FGG, FBLN5, ANGPTL3, COL13A1
negative regulation of growth	MT1X, MT2A, MT1M, ING5, IGFBP5, ING4

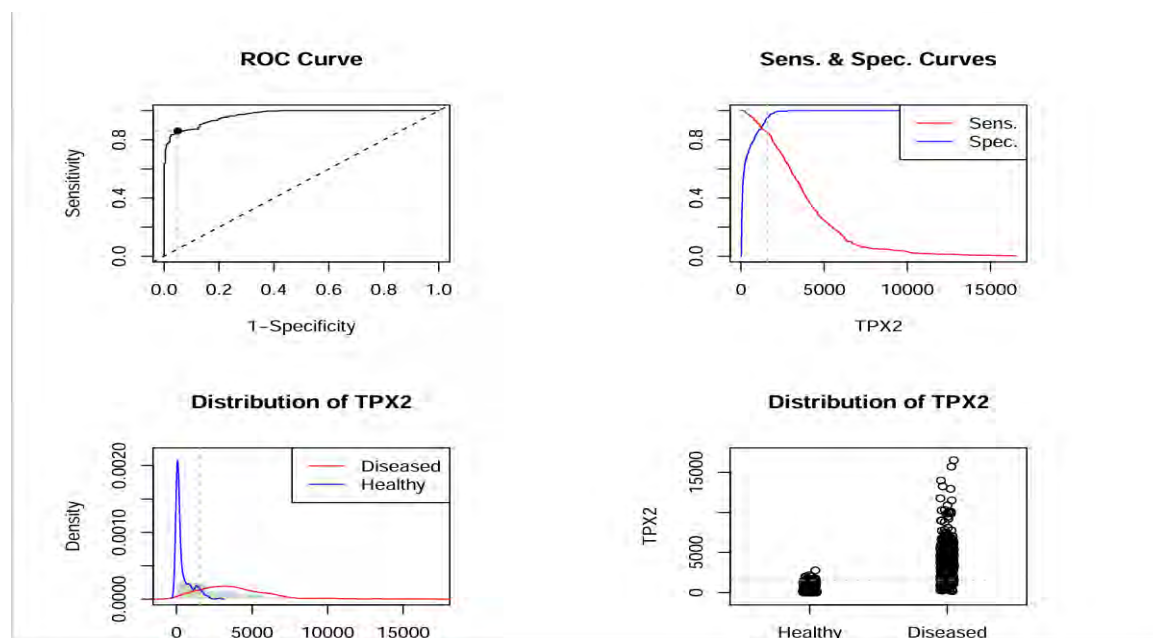
Πίνακας 4: Απεικόνιση των επιλεγόμενων μειορρυθμιζόμενων γονιδίων έπειτα από ανάλυση οντολογίας

4.5 Εκτίμηση διαγνωστικού δυναμικού με ανάλυση ROC

Σε επόμενο στάδιο, για τα επιλεγμένα γονίδια που παρουσιάζονται στους πίνακες (*Πίνακας 3, Πίνακας 4*), αξιοποιήθηκε ο αλγόριθμος ROC, ώστε να γίνει η εκτίμηση του διαγνωστικού δυναμικού των γονιδίων αυτών, που πιθανόν να εμπλέκονται στην εμφάνιση γαστρικού καρκίνου. Το διαγνωστικό δυναμικό των επιλεγόμενων γονιδίων αξιολογήθηκε με υπολογισμό της ευαισθησίας και της ειδικότητας των γονιδίων αυτών στο γαστρικό καρκίνο, με τη βοήθεια των καμπύλων ROC. Στην περίπτωση καρκινικού δείγματος, οι τιμές έκφρασης των υπερεκφραζόμενων γονιδίων είναι ενισχυμένες. Υπάρχει περίπτωση όμως και σε φυσιολογικό δείγμα, οι τιμές έκφρασης κάποιων από αυτά τα γονίδια να αυξάνονται για λόγους που δεν σχετίζονται με την καρκινογένεση. Τέτοιες παρατηρήσεις χαρακτηρίζονται ως ψευδώς θετικές. Αντίστοιχα, σε καρκινικό δείγμα, υπάρχει περίπτωση οι τιμές έκφρασης κάποιων γονιδίων να μην επηρεάζονται παρόλο που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Τέτοιες παρατηρήσεις χαρακτηρίζονται ως ψευδώς αρνητικές. Όμως, η ανάλυση ROC βοηθάει στον εντοπισμό των αποτελεσμάτων αυτών ώστε να γίνεται εκτίμηση των ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων. Όσο πλησιάζουμε τον άξονα yy' στο 1 και τον xx' στο μηδέν, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα το αποτέλεσμα να είναι ψευδώς θετικό ή ψευδώς αρνητικό. Υπολογίζοντας το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη μπορούμε να υπολογίσουμε την αξιοπιστία της διάγνωσης. Συνεπώς όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη, τόσο καλύτερη και πιο αξιόπιστη είναι η διάγνωση που θέτουμε. Εάν οι τιμές πλησιάζουν τη διαγώνιο, η διάγνωση δεν είναι αξιόπιστη. Κάτω από τη διαγώνιο, υπερισχύουν τα ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, πράγμα που φανερώνει ότι η διάγνωση που κάναμε είναι αναξιόπιστη και δεν υπάρχει λόγος για περαιτέρω ανάλυση.

Από τα επιλεγόμενα γονίδια, και αφού πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ROC, αξιολογήσαμε τα αποτελέσματα και σαν πιθανούς βιοδείκτες επιλέξαμε εκείνα τα γονίδια που παρουσιάζουν ευαισθησία και ειδικότητα ≥ 0.90 . Όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 19*), στο πρώτο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές του γονιδίου TPX2 να πλησιάζουν το 1 στον άξονα yy' και να αποκλίνουν από την καμπύλη, πράγμα που σημαίνει ότι η πιθανότητα για ψευδώς θετικό αποτέλεσμα και στην προκειμένη περίπτωση, για ψευδή θετική διάγνωση είναι σχεδόν μηδενική. Στο δεύτερο διάγραμμα, παρουσιάζονται οι καμπύλες της ειδικότητας και της ευαισθησίας, ενώ στα δύο τελευταία διαγράμματα παρουσιάζεται η κατανομή της έκφρασης του

συγκεκριμένου γονιδίου σε φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα. Στην **Εικόνα 15** και στην **Εικόνα 16**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν από την ανάλυση ROC, στα οποία απεικονίζονται οι τιμές ευαισθησίας, ειδικότητας καθώς και οι τιμές AUC.



Εικόνα 19: Διαγράμματα που προκύπτουν έπειτα από ανάλυση ROC για το γονίδιο TPX2.

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το πρώτο διάγραμμα, παρατηρείται ότι το καλύτερο αποτέλεσμα με υψηλή ευαισθησία και χαμηλή αβεβαιότητα είναι το σημείο που η διακεκομμένη γραμμή συναντά την καμπύλη. Αυτό το σημείο ορίζεται ως κατώφλι αναφοράς (threshold). Το σημείο αυτό υποδεικνύει ότι αν η τιμή έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου είναι μικρότερη από το σημείο αναφοράς, τότε το δείγμα είναι φυσιολογικό, ενώ αν η τιμή έκφρασης του γονιδίου είναι μεγαλύτερη από το σημείο αναφοράς τότε το δείγμα είναι καρκινικό.

Στο διπλανό διάγραμμα, εμφανίζεται η διακεκομμένη γραμμή, που ομοίως της στο προηγούμενο διάγραμμα αφορά το σημείο αναφοράς. Παρατηρείται ότι καθώς προχωράμε της διακεκομμένης γραμμής, η καμπύλη της ευαισθησίας μειώνεται που σημαίνει ότι τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα είναι μειωμένα σε υψηλές τιμές έκφρασης, άρα σε καρκινικά. Επίσης, παρατηρείται αύξηση της ειδικότητας πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή που δείχνει ότι ο όρος 1- αναλογία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων είναι μειωμένος άρα τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα είναι λίγα, όσον αφορά τα φυσιολογικά δείγματα.

Επιπρόσθετα, στο τρίτο διάγραμμα παρατηρείται ότι στον xx' παρουσιάζεται η τιμή έκφρασης του γονιδίου, η κόκκινη καμπύλη αντικατοπτρίζει τα καρκινικά δείγματα ενώ η μπλε καμπύλη αντικατοπτρίζει τα υγιή δείγματα. Παρατηρούμε ότι κατανομή της έκφρασης του γονιδίου στα υγιή δείγματα κυμαίνεται σε εμφανώς χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τα καρκινικά δείγματα. Συνεπώς, με βάση τα ραβδογράμματα που δημιουργούνται, σχηματίζονται και οι καμπύλες κατανομής των υγιών και καρκινικών δειγμάτων.

Τέλος, στο τελευταίο διάγραμμα παρατηρείται η διακεκομμένη γραμμή που ορίζει και σε αυτή την περίπτωση το σημείο αναφοράς. Συνεπώς, φαίνεται ότι στα υγιή δείγματα, λίγα είναι αυτά που εμφανίζουν τιμές έκφρασης πάνω από το threshold, άρα είναι λίγα και τα false positive δείγματα. Στα καρκινικά κύτταρα, ομοίως, λίγα είναι αυτά που εμφανίζουν τιμές έκφρασης κάτω από το σημείο threshold, άρα είναι λίγα και τα false negative δείγματα.

Στη συνέχεια, από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, επιλέξαμε τα 4 γονίδια από τα υπερεκφραζόμενα και 4 από τα υποεκφραζόμενα τα οποία εμφάνισαν τιμές $AUC \geq 0.95$, καθώς και αυξημένες τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας.

MCM2

Value	Limit
Sensitivity	0.868
Specificity	0.930
AUC	0.961

TPX2

Value	Limit
Sensitivity	0.861
Specificity	0.950
AUC	0.969

WDHD1

Value	Limit
Sensitivity	0.882
Specificity	0.921
AUC	0.961

CHEK1

Value	Limit
Sensitivity	0.858
Specificity	0.946
AUC	0.964

Εικόνα 15: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων έπειτα από ανάλυση ROC για τα υπερεκφραζόμενα γονίδια MCM2, TPX2, WDHD1 και CHEK1.

ADAMTS13		ING4	
Value	Limit	Value	Limit
Sensitivity	0.900	Sensitivity	0.855
Specificity	0.839	Specificity	0.918
AUC	0.939	AUC	0.952
ITGA10		MT1X	
Value	Limit	Value	Limit
Sensitivity	0.851	Sensitivity	0.851
Specificity	0.916	Specificity	0.892
AUC	0.927	AUC	0.928

Εικόνα 16: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων έπειτα από ανάλυση ROC για τα υποεκφραζόμενα γονίδια ADAMTS13, ING4, ITGA10 και MT1X.

Τα παραπάνω γονίδια επιλέχθηκαν καθώς μετά την ολοκλήρωση της ROC ανάλυσης εμφάνισαν μεγαλύτερη τιμή AUC, ευαισθησίας και ειδικότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια που αναλύθηκαν. Υψηλή τιμή AUC αποδεικνύει ότι η υπόθεση που κάναμε είναι αληθής. Υψηλή ευαισθησία σημαίνει ότι στα καρκινικά δείγματα τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα είναι λίγα, ενώ υψηλή ειδικότητα σημαίνει ότι ο όρος 1-ειδικότητα είναι αυξημένος, άρα στα φυσιολογικά κύτταρα τα ψευδώς θετικά είναι μειωμένα.

4.6 Σχεδιασμός sgRNAs με στόχο την απενεργοποίηση ενός επιλεγμένου γονιδίου με CRISPR

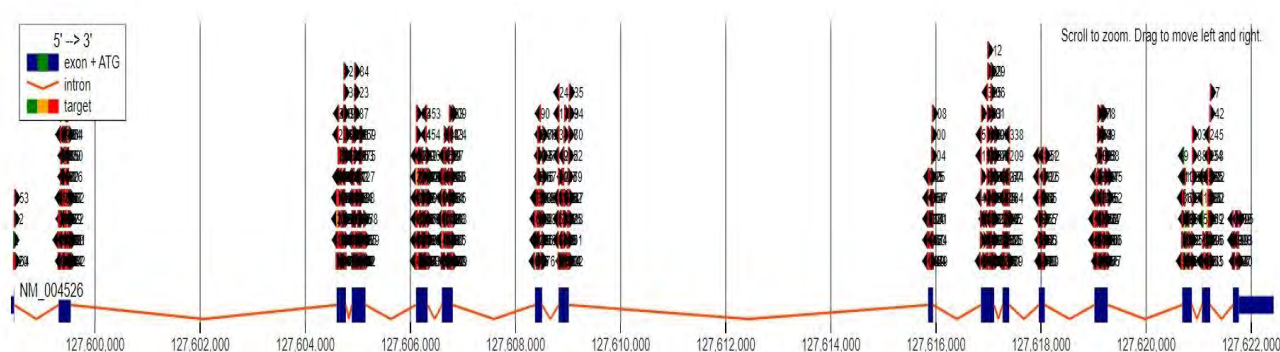
Έπειτα από την εκτίμηση διαγνωστικού δυναμικού, επιλέχθηκε το γονίδιο MCM2 ως ο βέλτιστος διαγνωστικός στόχος, για το οποίο πραγματοποιήθηκε υπολογιστική ανάλυση με σκοπό την εύρεση κατάλληλων sgRNA αλληλουχιών με στόχο την μελλοντική απενεργοποίηση του με CRISPR προσεγγίσεις.

Στην **Εικόνα 17**, απεικονίζονται τα αποτελέσματα του σχεδιασμού sgRNAs για το γονίδιο MCM2. Παρατηρείται ότι τα sgRNAs εντοπίζονται στα εξόνια, που αποτελούν τα μπλε κουτάκια όπως φαίνονται στην **Εικόνα 17**. Επίσης, η αποτελεσματικότητα των οδηγών RNAs είναι αρκετά υψηλή, κάτι που προδιαθέτει για αυξημένη πειραματική επιτυχία ως προς την επεξεργασία του DNA στις συγκεκριμένες θέσεις, ενώ η αυτοσυμπληρωματικότητα που δεν είναι τόσο υψηλή αντιπροσωπεύει

συμπληρωματικές περιοχές στο οδηγό RNA, οι οποίες εμποδίζουν την αποτελεσματικότητα λόγω αναδίπλωσης RNA. Για καθένα από τα πιθανά στοχευμένα οδηγά RNAs που παρουσιάστηκαν στα αποτελέσματα, μπορούμε να βρούμε την πιθανότητα μη ειδικής στόχευσης (off-targeting) του sgRNA και με άλλες περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος εκτός της επιθυμητής θέσης-στόχου.

Πρόκληση αποτελεί η επιλογή εκείνων των οδηγών RNAs που εμφανίζουν έως και κανένα off-targeting, προκειμένου να διευκολυνθεί η επεξεργασία της αλληλουχίας στο επιθυμητό σημείο.

MCM2



Εικόνα 17: Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο MCM2 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξώνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
257	TGTCATCCTAGCCAACCACGTGG	chr3:127608906	+	55	3	0	0	1	12	79.38
1	CGAGTCCATGATCCGATGGCGG	chr3:127620733	+	60	2	0	0	0	0	76.80
168	AGCGCCCTCCTGAAACACAGGGG	chr3:127617955	-	60	2	0	0	0	9	76.71

Εικόνα 18: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9. Παρουσιάζεται η θέση στόχος εντός της αρχιτεκτονικής του γονιδίου MCM2, η γονιδιωματική θέση, το ποσοστό που περιέχει η αλληλουχία αυτή σε GC, καθώς και η αποδοτικότητα της αλληλουχίας.

Στο Παράρτημα 3 εμφανίζονται τα αποτελέσματα για τα υπόλοιπα γονίδια που επιλέχθηκαν να αναλυθούν με σύστημα CRISPR-Cas9.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί από τις πιο συχνές κακοήθειες και κατατάσσεται στην πέμπτη θέση παγκοσμίως σε σειρά συχνότερης εμφάνισης. Η υψηλή θνησιμότητα που εμφανίζει ο γαστρικός καρκίνος οφείλεται στο γεγονός ότι οι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε προχωρημένα στάδια, ενώ στα αρχικά στάδια είναι συνήθως ασυμπτωματικοί. Στις κύριες μεθόδους ανίχνευσης και θεραπείας του γαστρικού καρκίνου ανήκει η ενδοσκόπηση. Η ενδοσκόπηση βοηθά στην έγκυρη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου, καθώς ανιχνεύει τον όγκο ακόμη και στα αρχικά στάδια, όταν πραγματοποιείται προληπτικά. Ωστόσο, η ενδοσκόπηση αποτελεί μία επεμβατική, χρονοβόρα και ακριβή μέθοδος.⁶⁶

Οι κύριες ενδοσκοπικές μέθοδοι αποτελούν η ενδοσκόπηση στο ορατό φάσμα, μεγεθυντική ενδοσκόπηση με απεικόνιση στενής ζώνης (ME-NBI) και η χρωμοενδοσκόπηση.⁷⁰ Η ενδοσκόπηση στο ορατό φάσμα αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην ανίχνευση γαστρικού καρκίνου. Η χρωμοενδοσκόπηση αποτελεί μία τεχνική η οποία με τη βοήθεια μεθόδων χρώσης ενισχύονται τα χαρακτηριστικά των αλλοιώσεων στο εσωτερικό του στομάχου ή άλλων οργάνων. Η μέθοδος αυτή σχετίζεται με τη μέθοδο ενδοσκόπησης στο ορατό φάσμα, με τη διαφορά ότι προστίθενται ειδικές ουσίες χρώσης, είτε με ψεκασμό είτε με προσθήκη των ουσιών στο νερό, προκειμένου να γίνουν διακριτές οι αλλαγές των αλλοιώσεων και των βλεννογόνων.⁷¹ Η μεγεθυντική ενδοσκόπηση με απεικόνιση στενής ζώνης (ME-NBI) χρησιμοποιεί την διαφορετική απορρόφηση των μηκών κύματος του φωτός ώστε να ενισχύσει την οπτική αντίληψη. Έτσι, διακρίνονται με λεπτομέρεια διάφορες αλλοιώσεις που ενδέχεται να έχουν υποστεί ιστοί και όργανα.⁷²

Επιπρόσθετα, μία σημαντική τεχνική διάγνωσης γαστρικού καρκίνου αποτελεί και το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS), το οποίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή του γαστρικού τοιχώματος προς αναγνώρισης παθήσεων, το βάθος διήθησης του καρκίνου καθώς και την πιθανή μετάσταση.⁷³

Για τους παραπάνω λόγους, οι επιστήμονες ξεκίνησαν την εύρεση διαφορετικών μεθόδων με σκοπό την ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου, από τα αρχικά στάδια εμφάνισής του, όπως η αναζήτηση μοριακών βιοδεικτών αναπτύσσοντας έτσι νέα διαγνωστικά εργαλεία και θεραπευτικές προσεγγίσεις.⁶⁷ Οι βιοδείκτες υποδεικνύουν την παρουσία του γαστρικού καρκίνου ή τις αλλαγές στον οργανισμό που μπορεί να

συσχετίζονται με τη νόσο.⁶⁶ Το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται σε κωδικοποιητικά και μη κωδικοποιητικά RNAs καθώς και στα miRNAs, τα οποία είναι μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs και η έκφρασή τους φαίνεται να διαταράσσεται με την εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου. Τα microRNAs αποτελούνται από 21-23 νουκλεοτίδια, τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Στο πλαίσιο του καρκίνου, τα miRNAs μπορούν να διαδραματίσουν διπλό ρόλο ως ογκογονίδια ή ως γονίδια καταστολής όγκων, ανάλογα με τον στόχο τους.⁶⁸ Ορισμένα miRNAs μπορούν να ενισχύσουν τον καρκίνο επιτρέποντας την υπερβολική έκφραση ογκογονιδίων, ενώ άλλα μπορεί να λειτουργούν ως καταστολείς των καρκινογόνων διεργασιών.⁶⁹

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε με σκοπό την βιοπληροφορική και τη στατιστική ανάλυση τόσο υπερεκφραζόμενων όσο και υποεκφραζόμενων μακρών, κωδικοποιητικών και μη RNA, έτσι ώστε να βρεθούν οι πιο εξειδικευμένοι διαγνωστικοί μοριακοί βιοδείκτες που θα ανιχνεύουν τον γαστρικό καρκίνο από το πρώιμο στάδιο εμφάνισής του. Έτσι, προέκυψαν οχτώ γονίδια, η έκφραση των οποίων επηρεάζεται από την ύπαρξη γαστρικού καρκίνου. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται μία σύντομη περιγραφή της λειτουργίας των επιλεγόμενων γονιδίων βιβλιογραφικά.

Γονίδιο	Λειτουργία γονιδίου
MCM2	Το γονίδιο αυτό συσχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, η υπερέκφραση του οποίου φαίνεται να παίζει ρόλο στον καρκίνο
TPX2	Βοηθά στην συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου κατά τη διαδικασία της μίτωσης και η υπερέκφρασή του προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ⁷⁸
WDHD1	Βοηθάει στην αντιγραφή και στη διαίρεση του DNA των κυττάρων και η υψηλή έκφρασή του σχετίζεται με την καρκινογένεση ⁷⁹
CHEK1	Βοηθάει στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε περίπτωση βλάβης, ⁸⁰ ενώ η υπερέκφρασή του οποίου έχει συσχετιστεί με την αντοχή σε θεραπείες κατά του καρκίνου ⁸¹
ADAMTS13	Μπορεί να συνδεθεί με ρυθμιστικούς παράγοντες επηρεάζοντας την κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση.

	Η υπερέκφραση, η μετάλλαξη και η αποσιώπησή του υποδεικνύει την εμφάνιση καρκίνου ⁸²
ING4	Συμμετέχει σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η καταστολή του γονιδίου επηρεάζει ορισμένους τύπους καρκίνου ⁸³
ITGA10	Συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση καθώς και στη σηματοδότηση μέσω της κυτταρικής επιφάνειας. Φαίνεται να αλλάζει τιμές έκφρασης παρουσία γαστρικού καρκίνου ⁸⁴
MT1X	Εμπλέκεται στη διατήρηση της ομοιόστασης, στην αποτοξίνωση, στην προστασία από βλάβες του DNA, στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής δεξαμενής, στη φλεγμονή και στη ρύθμιση του καρκίνου ⁸⁵ Φαίνεται ότι το γονίδιο αυτό υπορρυθμίζεται σε δείγματα γαστρικού καρκίνου ⁸⁶

Συγκριτικά με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν δύο ευρέως γνωστοί βιοχημικοί δείκτες, ο Carcinoembryonic Antigen (CEA) και ο cancer antigen 19-9 (CA 19-9).⁷⁴ Η ευαισθησία του CEA είναι 30% με τιμή AUC=0.734, ενώ η ευαισθησία του CA 19-9 είναι 42% με τιμή AUC=0.679⁷⁵

Ενώ φαίνεται ότι οι βιοχημικοί δείκτες αυτοί να μπορούν να διακρίνουν την παθολογική κατάσταση του γαστρικού καρκίνου από τη φυσιολογική, παρουσιάζουν παρόμοια ποσοστά ευαισθησίας και τιμές Area Under the Curve (AUC) και σε της τύπους καρκίνου, ειδικής στους καρκίνους του οισοφάγου και του εντέρου.⁷⁵

Επιπλέον, ως σημαντικοί μη επεμβατικοί βιοδείκτες χρησιμοποιούνται τα miRNAs, τα οποία μπορούν να ανιχνεύσουν το γαστρικό καρκίνο από τα αρχικά στάδια εμφάνισης του. Στην κατηγορία αυτή των miRNAs ανήκουν ο miR-25 με ειδικότητα 100%, ευαισθησία 72% και $\text{cau} = 0.91$, όπως και οι miR-21, miR-25, miR-93 και miR-106b, οι οποίοι όταν εξετάζονται μαζί παρουσιάζουν ένα επίπεδο ειδικότητας 80% και ευαισθησίας 48% και τιμή AUC=0.67.⁷⁶

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί mRNAs στα σωματικά υγρά, με σκοπό της αξιολόγησής τους ως διαγνωστικοί βιοδείκτες για τον γαστρικό καρκίνο. Τέτοια mRNAs είναι

- το COL6A3, το οποίο εμφάνισε ευαισθησία 100% και ειδικότητα 46.2% με τιμή AUC=0.72,
- το SERPINH1 με ευαισθησία 58,9%, ειδικότητα 78,6% και AUC 0,698 καθώς και
- το PLEKHG1 με ευαισθησία 68,3%, ειδικότητα 100% και AUC 0,833.⁷⁷

Πρόκληση αποτελεί η εύρεση νέων μη επεμβατικών βιοδεικτών, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση γαστρικού καρκίνου. Για το λόγο αυτό, έγινε προσπάθεια εύρεσης τέτοιων βιοδεικτών, οι οποίοι βρίσκονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα και μπορούν να ανιχνευτούν στα σωματικά υγρά. Σύμφωνα με τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψαν οχτώ πιθανοί βιοδείκτες με υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και τιμές AUC, οι οποίοι αφορούν τόσο γονίδια που αυξάνουν τις τιμές έκφρασής τους παρουσία γαστρικού καρκίνου, όσο και γονίδια τα οποία εμφανίζουν μειωμένη έκφραση παρουσία γαστρικού καρκίνου. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται να γίνουν προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο καθοριστικός ρόλος των βιοδεικτών αυτών, στη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου, καθώς συμμετέχουν και σε άλλες βιολογικές διεργασίες του οργανισμού. Με την εύρεση των βιοδεικτών αυτών είναι εφικτή η κατασκευή διαγνωστικών εργαλείων που μπορεί να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη ή όχι της νόσου από το αρχικό στάδιο εμφάνισής της.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Wright NA, Poulsom R, Stamp G, et al. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1993;104(1):12–20.
- ² Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74–108.
- ³ Matsuda, T.; Saika, K. The 5-Year Relative Survival Rate of Stomach Cancer in the USA, Europe and Japan. *Jpn. J. Clin. Oncol*. 2013, **43**, 1157–1158
- ⁴ Kim, J.; Cho, Y.A.; Choi, W.J.; Jeong, S.H. Gene-diet interactions in gastric cancer risk: A systematic review. *World J. Gastroenterol*. 2014, **20**, 9600–9610.
- ⁵ Nomura AM, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Goodman MT, Stemmermann GN. Case-control study of diet and other risk factors for gastric cancer in Hawaii (United States). *Cancer Causes Control*. 2003;**14**(6):547–558.
- ⁶ Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, et al. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control*. 2008;**19**(7):689–701.
- ⁷ Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. *Int J Cancer*. 2000;**85**(3):340–346.
- ⁸ Ishaq, S.; Nunn, L. Helicobacter pylori and gastric cancer: A state of the art review. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 2015, **8**, S6–S14
- ⁹ Iizasa, H.; Nanbo, A.; Nishikawa, J.; Jinushi, M.; Yoshiyama, H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses* 2012, **4**, 3420–3439.
- ¹⁰ 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**, 31–49.
- ¹¹ Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, et al. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 1999;6:290-7
- ¹² Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. *Br J Cancer* 2001;84:400-5
- ¹³ 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* 64: 31-49, 1965.
- ¹⁴ Qiu MZ, Cai MY, Zhang DS, Wang ZQ, Wang DS, Li YH and Xu RH: Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *J Transl Med* 11: **58**, 2013.

- ¹⁵ Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M and Shinomura Y: Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer. *Digestion* 83: 241-249, 2011.
- ¹⁶ Fu DG: Epigenetic alterations in gastric cancer. *Mol Med Rep* 12: 3223-3230, 2015 (Review).
- ¹⁷ Guggenheim DE and Shah MA: Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Surg Oncol* 107: 230-236, 2013.
- ¹⁸ Take S, Mizuno M, Ishiki K, Yoshida T, Ohara N, Yokota K, Oguma K, Okada H and Yamamoto K: The long-term risk of gastric cancer after the successful eradication of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 46: 318-324, 2011
- ¹⁹ Pereyra L, Gómez EJ, Mella JM, Casas G, Bugari G, Cimmino D, Pedreira S and Boerr LA: Diffuse gastric cancer associated with Ménétrier's disease. *Acta Gastroenterol Latinoam* 41: 142-145, 2011
- ²⁰ Palestro G, Pellicano R, Fronda GR, Valente G, De Giuli M, Soldati T, Pugliese A, Taraglio S, Garino M, Campa D, 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* 11: 7131-7135, 2005.
- ²¹ Nardone G, Rocco A and Malfertheiner P: Review article: *Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment Pharmacol Ther* 20: 261-270, 2004
- ²² Van Cutsem, E., et al., Gastric cancer. *Lancet*, 2016. 388(10060): p. 2654-2664.
- ²³ Bing Hu,¹ Nassim El Hajj,² Scott Sittler,¹ Robert Barnes,¹ and Aurelia Meloni-Ehrig: Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology, *Journal of Gastrointestinal oncology* 2012 Sep; 3(3): 251–261
- ²⁴ Sun Hyung Kang, MD, PhD, Joo Seok Kim, MD, Hee Seok Moon, MD, PhD, Eaum Seok Lee, MD, PhD, Seok Hyun Kim, MD, PhD, Jae Kyu Sung, MD, PhD, Byung Seok Lee, MD, PhD, and Hyun Yong Jeong, MD, PhD, Signet ring cell carcinoma of early gastric cancer, is endoscopic treatment really risky?, *Medicine (Baltimore)*. 2017 Aug; 96(33): e7532.
- ²⁵ Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–209.
- ²⁶ Shibata D., Weiss L.M. Epstein–Barr virus–associated gastric adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 1992; **140**:769–774.
- ²⁷ Joanna Bocian¹, Danuta Januszkiewicz-Lew-ndowska, Epstein-Barr virus infection - life cycle, methods of diagnosis, associated diseases, 2011 May
- ²⁸ Cancer Genome Atlas Research Network Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014; 513:202–209.
- ²⁹ Halling, K. C. et al. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *The American journal of pathology* 155, 205-211, doi:10.1016/S0002-9440(10)65114-0 (1999).

- ³⁰ Upasana Shokal and Prakash C. Sharma, Implication of microsatellite instability in human gastric cancers, *Indian J Med Res.* 2012 May; 135(5): 599–613.
- ³¹ Elisabetta Puliga ^{a b}, Simona Corso ^{a b}, Filippo Pietrantonio ^c, Silvia Giordano ^{a b}, Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows, March 2021
- ³² The Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014; 513(7517):202-209.
- ³³ Kankeu Fonkoua, L. & Yee, N. S. Molecular Characterization of Gastric Carcinoma: Therapeutic Implications for Biomarkers and Targets. *Biomedicines* 6, doi:10.3390/biomedicines6010032 (2018).
- ³⁴ Riquelme, I., et al., Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway driven targeted therapy. *Oncotarget*, 2015. 6(28): p. 24750-79.
- ³⁵ Geigl J.B., Obenaus A.C., Schwarzbraun T., Speicher M.R. Defining “Chromosomal Instability” *Trends Genet.* 2008; 24:64–69
- ³⁶ Castellanos G., Valbuena D.S., Pérez E., Villegas V.E., Rondón-Lagos M. Chromosomal Instability as Enabling Feature and Central Hallmark of Breast Cancer. *Breast Cancer.* 2023; 15:189–211.
- ³⁷ de Manzoni G., Tomezzoli A., Di Leo A., Moore P.S., Talamini G., Scarpa A. Clinical Significance of Mutator Phenotype and Chromosome 17p and 18q Allelic Loss in Gastric Cancer. *Br. J. Surg.* 2001; 88:419–425.
- ³⁸ Tsunehiro Takahashi, Yoshiro Saikawa,* and Yuko Kitagawa, Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment, *Cancers (Basel).* 2013 Mar; 5(1): 48–63.
- ³⁹ Burbidge S, Mahadya K, Naik K. The role of CT and staging laparoscopy in the staging of gastric cancer. *Clin Radiol.* 2013; **68**: 251–5.
- ⁴⁰ Tasuku Matsuoka and Masakazu Yashiro, Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective, *World J Gastroenterol.* 2018 Jul 14; 24(26): 2818–2832.
- ⁴¹ WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001.
- ⁴² FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US), 2016, accessed 22 September 2017
- ⁴³ Robert M Califf, Biomarker definitions and their applications, *Exp Biol Med (Maywood).* 2018 Feb; 243(3): 213–221.
- ⁴⁴ Virinder Kaur Sarhadi¹ and Gemma Armengol, Molecular Biomarkers in Cancer, *Biomolecules.* 2022 Aug; 12(8): 1021.

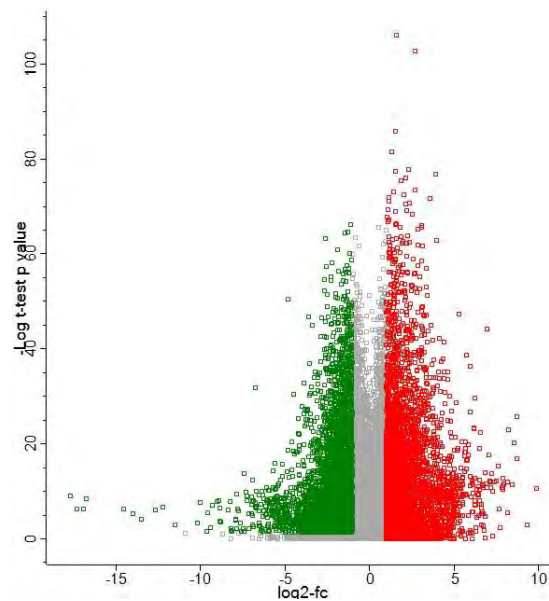
- ⁴⁵ Hamashima C. Current issues and future perspectives of gastric cancer screening. *World J Gastroenterol*. 2014;20(38):13767–74.
- ⁴⁶ Liu L, Pang H, He Q, Pan B, Sun X, Shan J, et al. A novel strategy to identify candidate diagnostic and prognostic biomarkers for gastric cancer. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):335.
- ⁴⁷ Jiang P, Liu XS. Big data mining yields novel insights on cancer. *Nat Genet*. 2015;47(2):103–4.
- ⁴⁸ Liu X, et al. Identification of potential key genes associated with the pathogenesis and prognosis of gastric cancer based on integrated bioinformatics analysis. *Front Genet*. 2018; 9:265.
- ⁴⁹ Francis Sahngun Nahm, Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians, *Korean J Anesthesiol*. 2022 Feb; 75(1): 25–36.
- ⁵⁰ Tatiana Cristina Figueira Polo¹ and Hélio Amante Miot, Use of ROC curves in clinical and experimental studies, *J Vasc Bras*. 2020; 19: e20200186.
- ⁵¹ Charpentier E., Marraffini L.A. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr Opin Microbiol*. 2014; 19:114–119
- ⁵² Deveau H., Garneau J.E., Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol*. 2010; 64:475–493
- ⁵³ Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9:467–477
- ⁵⁴ Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551–2561 (2005).
- ⁵⁵ Mei Y, Wang Y, Chen H, Sun ZS, Da JX. Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *J Genet Genomics*. 2016;43(2):63–75. doi: 10.1016/j.jgg.2016.01.001
- ⁵⁶ Shao M, Xu T, Chen C. The big bang of genome editing technology: development and application of the CRISPR/CAS9 system in disease animal models. *Sci Press Zool Res*. 2016;37(2):1–11
- ⁵⁷ Misganaw Asmamaw 1 and Belay Zawdie, Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics*. 2021; 15: 353–361.
- ⁵⁸ Cai L, Fisher AL, Huang H, Xie Z. CRISPR-mediated genome editing and human Diseases. *Genes Dis*. 2016;3(4):244–251. doi: 10.1016/j.gendis.2016.07.003
- ⁵⁹ Misganaw Asmamaw 1 and Belay Zawdie, Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing, *Biologics*. 2021; 15: 353–361.
- ⁶⁰ Strich JR, Chertow DS. CRISPR-cas biology and its application to infectious diseases. *J Clin Microbiol*. 2018;57(4):1307–1318. doi: 10.1128/jcm.01307-18

- ⁶¹ Hsu P, Lander E, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *PMC*. 2014;157(6):1262–1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010
- ⁶² Adhikari P, Poudel M. CRISPR-Cas9 in agriculture: approaches, applications, future perspectives, and associated challenges. *Malaysian J Halal Res*. 2020;3(1):6–16. doi: 10.2478/mjhr-2020-0002
- ⁶³ Tessa G. Montague, José M. Cruz, James A. Gagnon, George M. Church, Eivind Valen, CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing, *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue W1, 1 July 2014, Pages W401–W407
- ⁶⁴ Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma, The Cancer Genome Atlas Research Network, *Nature* volume 513, pages202–209 (2014). Available at <https://www.nature.com/articles/nature13480#citeas>
- ⁶⁵ Xiaoqiang Quan,^{1,2} Yi Ding,¹ Ruo Feng,¹ Xiaoyan Zhu,¹ and Qinxian Zhang¹, Expression profile of cytokines in gastric cancer patients using proteomic antibody microarray, *Oncol Lett*. 2017 Dec; 14(6): 7360–7366.
- ⁶⁶ Cristina Herrera-Pariente,¹ Sheyla Montori,² Joan Llach,¹ Alex Bofill,¹ Eduardo Albeniz,^{2,3} and Leticia Moreira¹, Dakeun Lee, Academic Editor, Biomarkers for Gastric Cancer Screening and Early Diagnosis, *Biomedicines*. 2021 Oct; 9(10): 1448.
- ⁶⁷ Hideyuki Ishiguro, Masahiro Kimura, and Hiromitsu Takeyama, Role of microRNAs in gastric cancer, *World J Gastroenterol*. 2014 May 21; 20(19): 5694–5699.
- ⁶⁸ Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431:350–355
- ⁶⁹ Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007; 302:1–12
- ⁷⁰ Mary Raina Angeli Fujiyoshi,* Haruhiro Inoue, Yusuke Fujiyoshi, Yohei Nishikawa, Akiko Toshimori, Yuto Shimamura, Mayo Tanabe, Haruo Ikeda, and Manabu Onimaru, Endoscopic Classifications of Early Gastric Cancer: A Literature Review, *Cancers (Basel)*. 2022 Jan; 14(1): 100.
- ⁷¹ Rajvinder Singh, Keng Hoong Chiam, Florencia Leiria, Leonardo Zorron Cheng Tao Pu, Kun Cheong Choi, and Mariana Militz, Chromoendoscopy: role in modern endoscopic imaging, *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2020; 5: 39.
- ⁷² Kaltenbach, T., Sano, Y., Friedland, S., & Soetikno, R. (2008). American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technology Assessment on Image-Enhanced Endoscopy. *Gastroenterology*, 134(1), 327–340
- ⁷³ Linlin Zhu, Jinyu Qin, Jin Wang, Tianjiao Guo, Zijing Wang, and Jinlin Yang, Early Gastric Cancer: Current Advances of Endoscopic Diagnosis and Treatment, *Gastroenterol Res Pract*. 2016; 2016: 9638041.

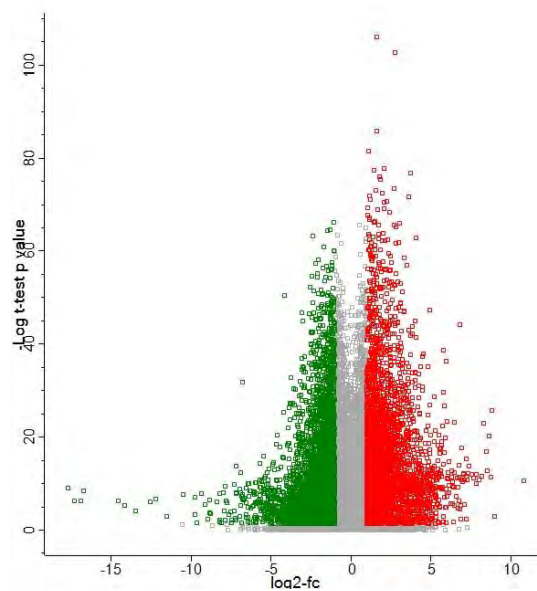
- ⁷⁴ Nakamura, S., M. Kanda, and Y. Kodera, Incorporating molecular biomarkers into clinical practice for gastric cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2019. 19(9): p. 757-771.
- ⁷⁵ Bagaria, B., et al., Comparative study of CEA and CA19-9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination (ROC curve analysis). *Cancer Biol Med*, 2013. 10(3): p. 148-57.
- ⁷⁶ Pegah Larki, Alireza Ahadi,1 Ali zare,1 Shahriar Tarighi,2 Mahrokh Zaheri,3 Mojgan Sour,3 Mohammad Reza Zali,3 Hamid Ghaedi,1 and Mir Davood Omrani, Up-Regulation of miR-21, miR-25, miR-93, and miR-106b in Gastric Cancer, *Iran Biomed J*. 2018 Nov; 22(6): 367–373.
- ⁷⁷ Wei Cao, Dan Zhou, Weiwei Tang, Hanxiang An and Yun Zhang, Discovery of plasma messenger RNA as novel biomarker for gastric cancer identified through bioinformatics analysis and clinical validation, *PeerJ*. 2019; 7: e7025.
- ⁷⁸ Chang H, Wang J, Tian Y, Xu J, Gou X, Cheng J. The TPX2 gene is a promising diagnostic and therapeutic target for cervical cancer. *Oncol Rep* 2012; 27:1353-9
- ⁷⁹ Liu B., Hu Y., Qin L., Peng X. B., Huang Y. X. MicroRNA-494-dependent WDHD1 inhibition suppresses epithelial-mesenchymal transition, tumor growth and metastasis in cholangiocarcinoma. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2019; **51**(3):397–411.
- ⁸⁰ Adewale Oluwaseun Fadaka, Olalekan Olanrewaju Bakare, Nicole Remalialh Samantha Sibuyi and Ashwil Klein, Gene Expression Alterations and Molecular Analysis of CHEK1 in Solid Tumors, *Cancers (Basel)*. 2020 Mar; 12(3): 662.
- ⁸¹ Liao, Q. et al. A preliminary study on the radiation-resistance mechanism in ovarian cancer. *J Cancer Res Ther* **9**, 22–4 (2013).
- ⁸² S. Cal and C. López-Otín, “ADAMTS proteases and cancer,” *Matrix Biology*, vol. 44–46, pp. 77–85, 2015.
- ⁸³ Yang Du, Yan Cheng, and Guanfang Su, The essential role of tumor suppressor gene ING4 in various human cancers and non-neoplastic disorders, *Biosci Rep*. 2019 Jan 31; 39(1): BSR20180773.
- ⁸⁴ Qingzhi Lan, Peng Wan, Shan Tian, Weiguo Dong, Mining TCGA database for genes of prognostic value in gastric cancer microenvironment, *Wiley* 18 June 2020
- ⁸⁵ M. Ryvolova, V. Adam, and R. Kizek, “Analysis of metallothionein by capillary electrophoresis,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1226, pp. 31–42, 2012.
- ⁸⁶ Mingfu Tong, Wenquan Lu, Hao Liu, Jian Wu, Mingzuo Jiang, Xin Wang, Jianyu Hao, and Daiming Fa, Evaluation of MT Family Isoforms as Potential Biomarker for Predicting Progression and Prognosis in Gastric Cancer, *Prevention and Early Detection of Gastrointestinal Cancers*, Volume 2019 | Article ID 2957821 ,17 Jul 2019

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

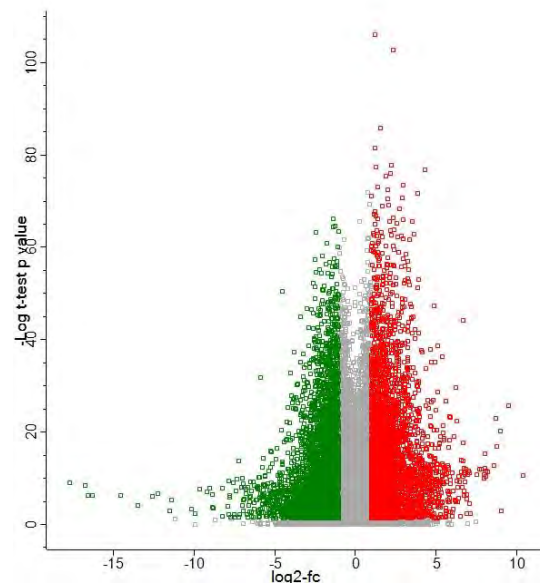
7.1 Παράρτημα 1-Διαγράμματα volcano plots



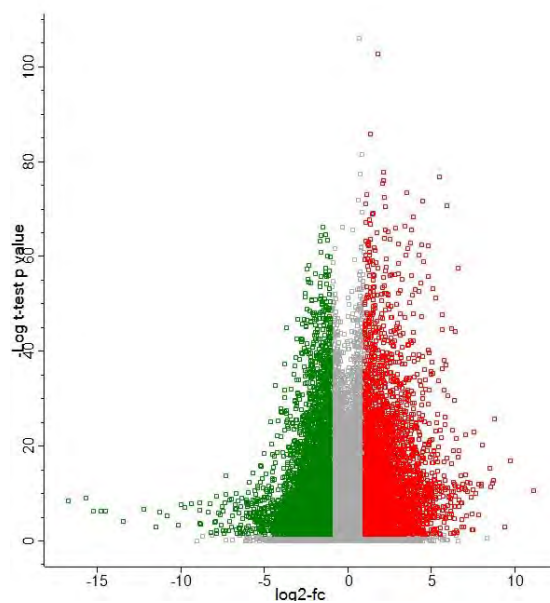
Εικόνα 19:Διάγραμμα volcano plot με απεικόνιση των αυξορρυθμιζόμενων και μειορρυθμιζόμενων γονιδίων σε δείγματα Stage II έναντι φυσιολογικών δειγμάτων.



Εικόνα 20:Διάγραμμα volcano plot με απεικόνιση των αυξορρυθμιζόμενων και μειορρυθμιζόμενων γονιδίων σε δείγματα Stage III έναντι φυσιολογικών δειγμάτων.

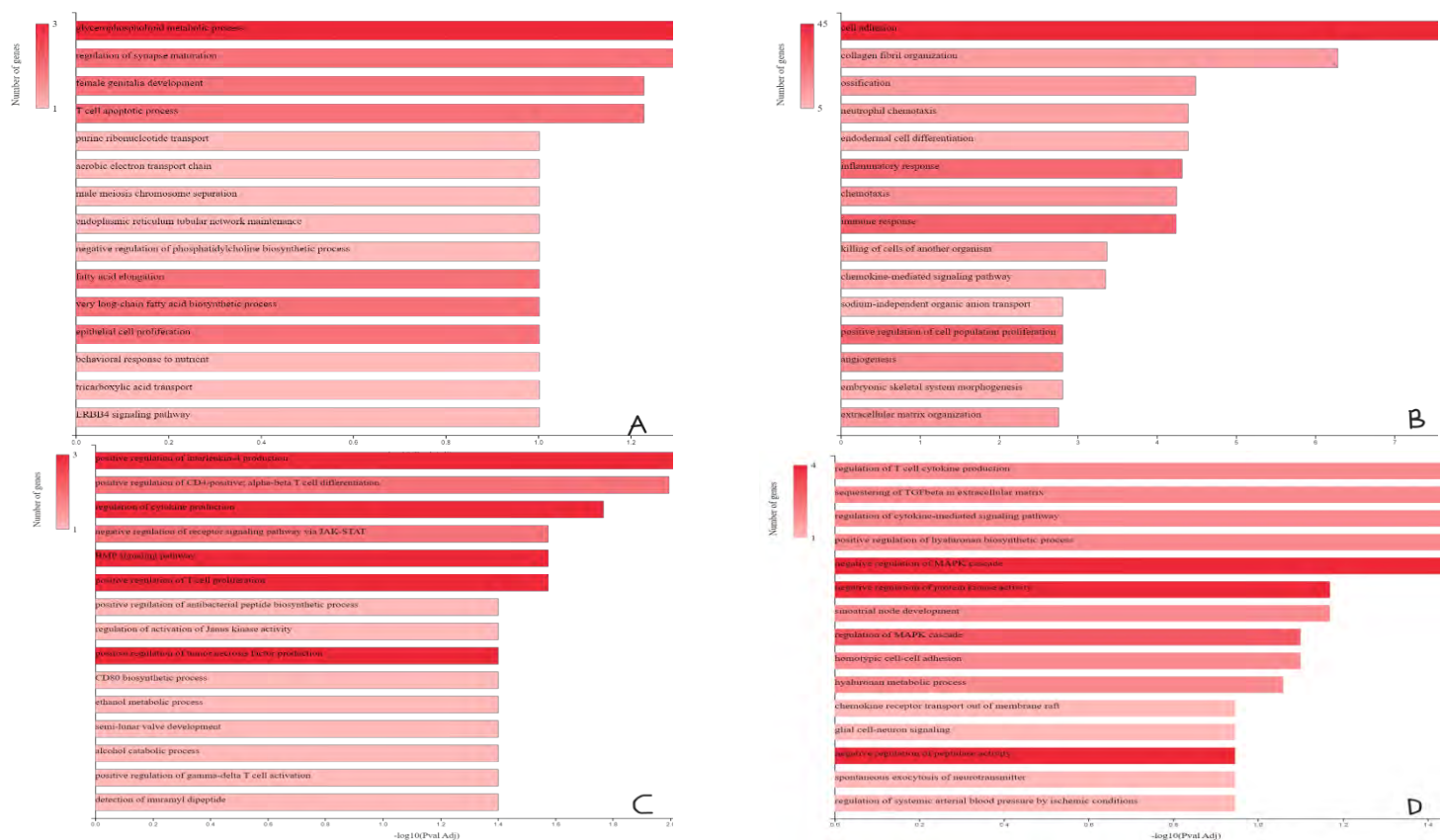


Εικόνα 21:Διάγραμμα volcano plot με απεικόνιση των αυξορρυθμιζόμενων και μειορρυθμιζόμενων γονιδίων σε δείγματα Stage IV έναντι φυσιολογικών δειγμάτων.

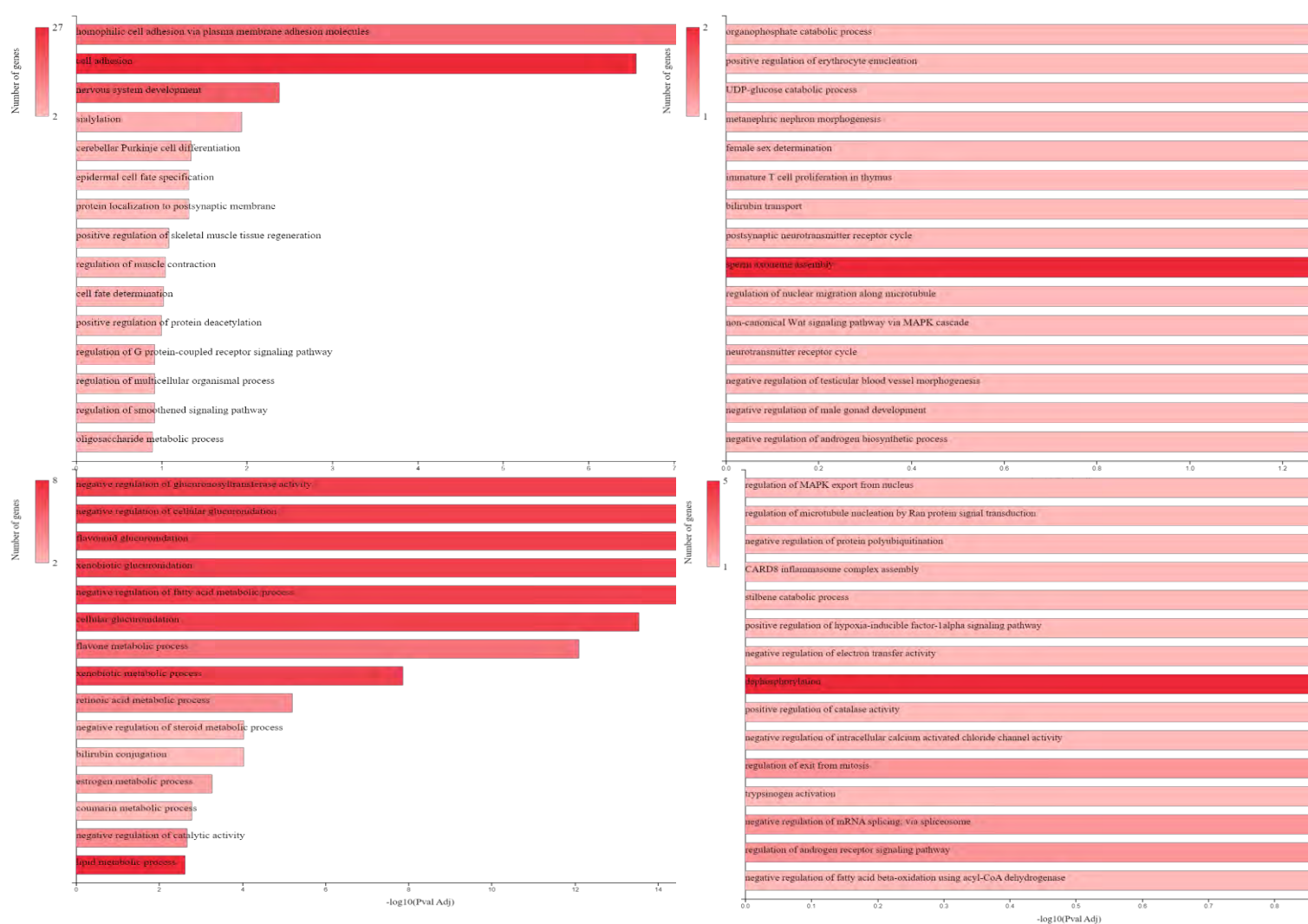


Εικόνα 22:Διάγραμμα volcano plot με απεικόνιση των αυξορρυθμιζόμενων και μειορρυθμιζόμενων γονιδίων σε δείγματα Stage N/A έναντι φυσιολογικών δειγμάτων

7.2 Παράρτημα 2-Διαγράμματα οντολογίας



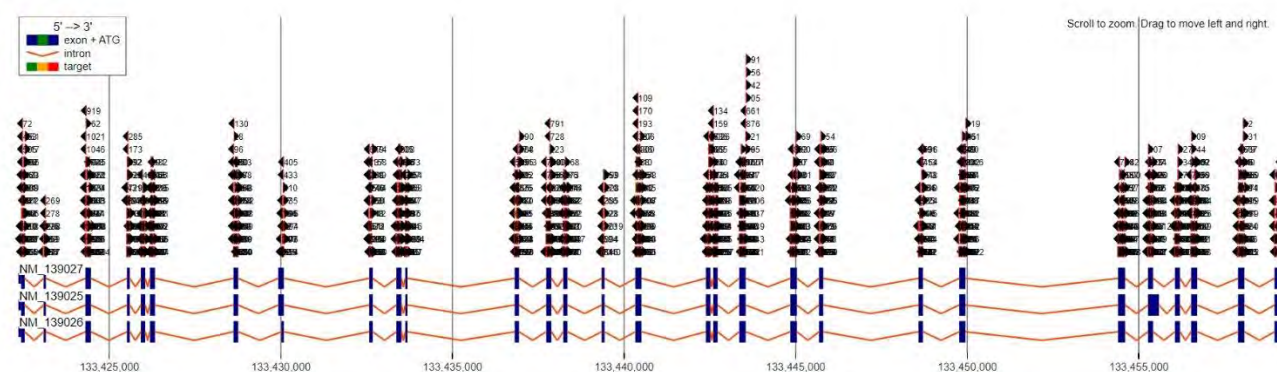
Εικόνα 23: Απεικόνιση των διαγραμμάτων οντολογίας των δειγμάτων των τεσσάρων σταδίων γαστρικού καρκίνου. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι μοναδικά για κάθε στάδιο και αυξορρυθμιζόμενα και παρατηρούνται οι 15 πιο σημαντικές βιολογικές διεργασίες που ενισχύονται με στατιστικό τρόπο λόγω εμπλοκής των υπό ανάλυση γονιδίων



Εικόνα 24: Απεικόνιση των διαγραμμάτων οντολογίας των δειγμάτων των τεσσάρων σταδίων γαστρικού καρκίνου. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι μοναδικά για κάθε στάδιο και μειορρυθμιζόμενα και παρατηρούνται οι 15 πιο σημαντικές βιολογικές διεργασίες που ενισχύονται με στατιστικό τρόπο λόγω εμπλοκής των υπό ανάλυση γονιδίων

7.3 Παράρτημα 3- Σύστημα CRISPR-Cas9

ADAMTS13

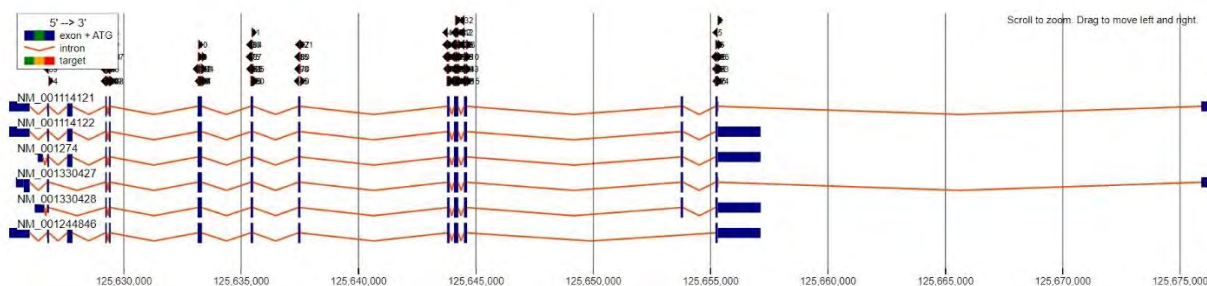


Εικόνα 25: Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο ADAMTS13 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξόνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
958	CTGGATGGAGGTGAGCACAGCGG	chr9:133454610	+	60	0	0	0	2	60	76.93
278	TACCTTTTAAGGGAGCACCAGGG	chr9:133423148	-	45	0	0	0	1	8	75.98
46	TGGTCGTGTCGAGTACAGAGTGG	chr9:133440426	+	55	0	0	0	0	3	75.32

Εικόνα 26: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο ADAMTS13.

CHEK1

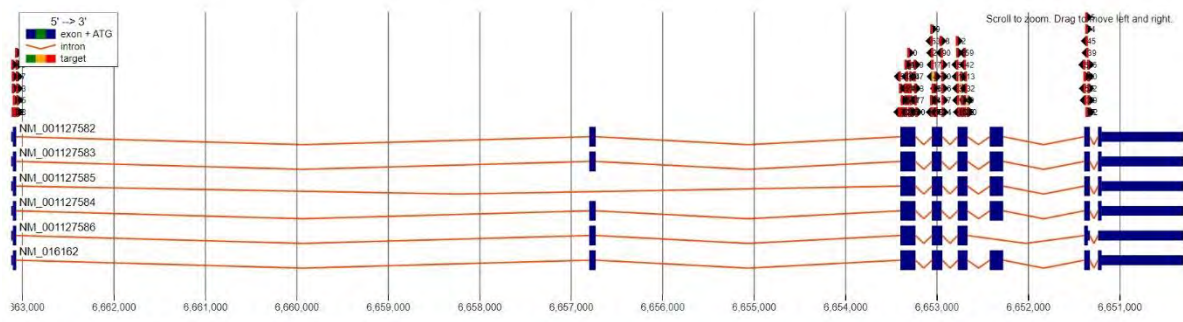


Εικόνα 27: Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο CHEK1 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξόνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
53	AAGATAATTCAGTTACCTAGAGG	chr11:125635527	-	30	1	0	0	0	12	74.41
105	GGTGTGTCAGAGTCTCCAGTGG	chr11:125643821	+	60	0	0	0	0	27	73.95
28	TGGTATTGGAATACTCACAGGG	chr11:125629402	+	35	0	0	0	0	9	73.78

Εικόνα 28:Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο CHEK1.

ING4

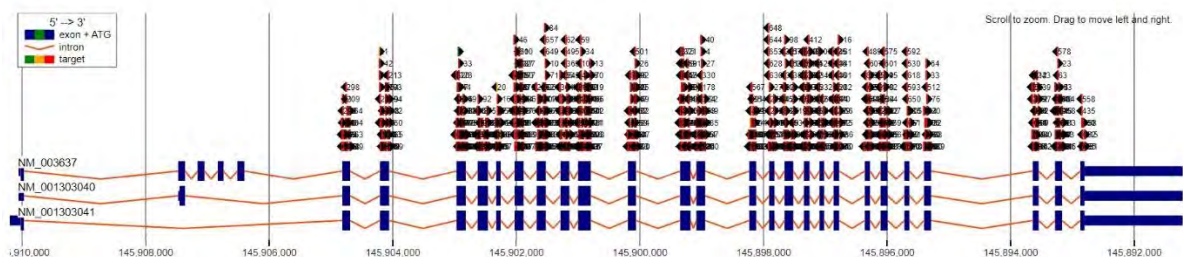


Εικόνα 29:Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο ING4 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξώνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
7	TTTGCTTCGAGATGGCTGCGGG	chr12:6663090	-	55	1	0	0	1	2	72.17
16	AGGTGGACAAACACATTCGCGG	chr12:6653030	-	50	0	0	0	1	5	70.04
54	CAGGTCTACAACAGAGACAGAGG	chr12:6653392	+	50	1	0	0	0	18	69.42

Εικόνα 30:Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο ING4.

ITGA10

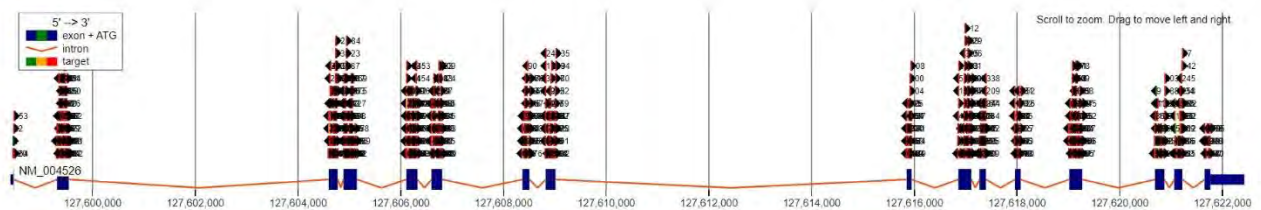


Εικόνα 31:Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο ITGA10 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξώνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
109	TCCTTGGTCACTACCTCCGGCGG	chr1:145902596	-	60	1	0	0	0	7	76.20
64	CTAGCAGAAAGGTCACCTAGGGG	chr1:145897072	+	50	3	0	0	0	5	75.52
460	TGCCATAAGAAAATCCTGAGG	chr1:145892830	-	45	0	0	0	3	20	74.70

Εικόνα 32:Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο ITGA10.

MCM2

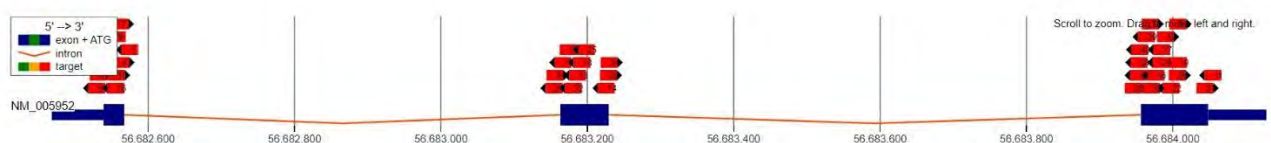


Εικόνα 33:Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο MCM2 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξόνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
257	TGTCATCCTAGCCAACACGTGG	chr3:127608906	+	55	3	0	0	1	12	79.38
1	CGAGTCCATGATCCGCATGGCGG	chr3:127620733	+	60	2	0	0	0	0	76.80
168	AGCGCCCTCCTGAAACACAGGGG	chr3:127617955	-	60	2	0	0	0	9	76.71

Εικόνα 34:Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο MCM2.

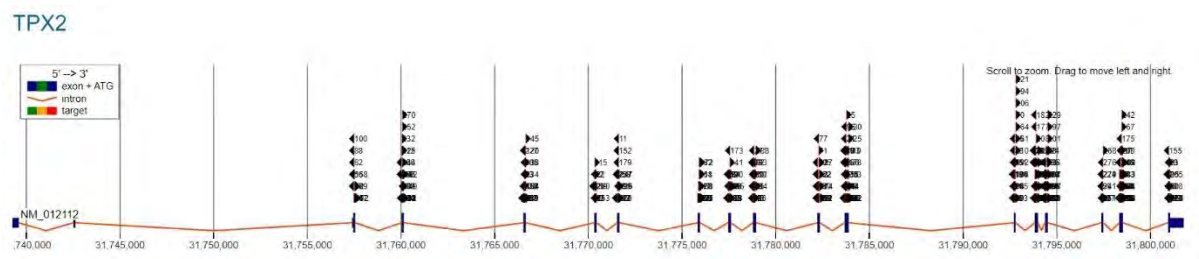
MT1X



Εικόνα 35:Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο MT1X βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξόνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
15	AGGCACAGGAGCCAACTGCAAGG	chr16:56683157	-	60	0	0	1	4	47	63.37
14	GCACTCACTCTTCTTGCAAGGAGG	chr16:56683216	-	55	0	7	3	3	15	61.59
21	CTGCAAGAAGAGTGAGTGCAGGG	chr16:56683220	+	50	1	0	7	5	40	59.29

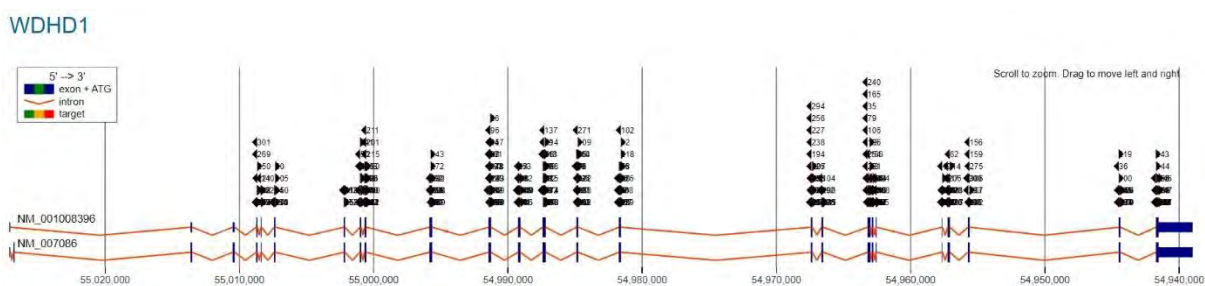
Εικόνα 36: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο MT1X.



Εικόνα 37: Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο TPX2 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξόνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
290	AGAATCAAGAAGAAAAAGAGG	chr20:31783840	+	30	0	0	0	13	176	75.88
72	ACAACATCCTAAGAACCAGGAGG	chr20:31777563	+	45	0	0	0	0	12	74.95
109	TTTTAAGCCCCAAATCCAGAGG	chr20:31793904	+	45	1	0	0	0	16	72.39

Εικόνα 38: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο TPX2.



Εικόνα 39: Απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και των θέσεων που το γονίδιο WDHD1 βρίσκεται στο γονιδίωμα. Με μπλε εμφανίζονται τα εξόνια και με κάθετες γραμμές τα ιντρόνια.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
40	GATCAGCAAGTTCCACACAACGG	chr14:54963124	+	45	0	0	0	1	5	78.76
43	CGAATTGACAGCAACCCAGGTGG	chr14:54962998	-	55	0	0	0	0	7	76.10
103	ACAGCAATACTGCTACAGAGTGG	chr14:54962829	-	45	1	0	0	0	12	75.44

Εικόνα 40: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με σύστημα CRISPR-Cas9 για το γονίδιο WDHD1.