

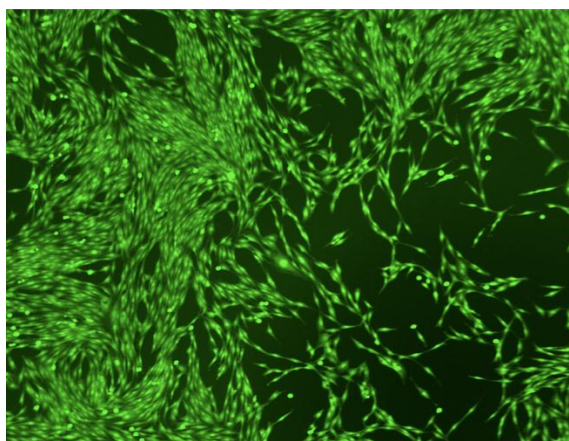


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών “Βιολογία Συστημάτων”

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Στόχευση του μεταγραφικού παράγοντα MYC ως θεραπεία για την αντιμετώπιση ποικίλων ειδών καρκίνου»



Αλεξάνδρα Ε. Δημητρίου

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Πολυδεύκης Χατζόπουλος

Αθήνα, 2019

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Στόχευση του μεταγραφικού παράγοντα MYC ως θεραπεία για την αντιμετώπιση ποικίλων ειδών καρκίνου»

“Targeting transcriptional factor MYC as a strategy for cancer treatment”

Αλεξάνδρα Ε. Δημητρίου

Επιβλέπων : Καθ. Πολυδεύκης Χατζόπουλος

Εξεταστική Επιτροπή:

Καθηγητής **Πολυδεύκης Χατζόπουλος** (επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής **Λεωνίδας Αλεξόπουλος** (μέλος)

Επίκουρος Καθηγητής **Γεράσιμος Δάρας** (μέλος)

Περίληψη

Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται προσπάθεια στόχευσης του μεταγραφικού παράγοντα MYC, ως θεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών ειδών καρκίνου. Βασικός σκοπός της εργασίας είναι η επιλογή του βέλτιστου μορίου μέσα από παράγωγα αντι-MYC ενώσεων και μέσα από βιοπληροφορικές αναλύσεις, το οποίο αναστέλλει την λειτουργία του παράγοντα MYC και που θα οδηγήσει σε κλινικές δοκιμές. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η απορρύθμιση του MYC είναι κοινό χαρακτηριστικό πολλών τύπων καρκίνου, όπως καρκίνος μαστού, ωοθηκών, ενδομητρίου, παχέως εντέρου, προστάτη, πνεύμονα, παγκρέατος, καρκίνωμα νεφρικών και επινεφρικών κυττάρων, καθώς και σε νευροβλαστώματα. Από έρευνες φαίνεται πως μία σύντομη καταστολή δύο ημερών, ή μερική μείωση (υποδιπλασιασμός) του MYC, μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη υποχώρηση του όγκου. Για τον έλεγχο των αντι-MYC μορίων χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές H01519 (MYC -/-) και TGR1 (MYC +/+) και έγινε επιλογή κατάλληλων καρκινικών κυτταρικών σειρών, ως προς την εξάρτησή τους από το MYC μόριο, με χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μεθόδου μικροσκοπίας φθορισμού υψηλής απόδοσης (high-content screening) για έλεγχο δραστηριότητας των αντι-MYC μορίων ως προς τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών και επιλογή των πιο υποσχόμενων για περαιτέρω μελέτες βιωσιμότητας και τοξικότητας. Ως υποψήφια φάρμακα, τα νέα παράγωγα θα εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα και ικανοποιητικές φυσικοχημικές/φαρμακολογικές ιδιότητες (βελτιστοποίηση). Από τις μελέτες και τα πειράματα στα παράγωγα της οδηγού-ενώσεως Amy22 και του Myc19, ανακαλύφθηκαν δώδεκα ενώσεις που μπορούν να δράσουν ανασταλτικά της λειτουργίας του MYC. Οι ενώσεις αυτές με ονομασία Amy1, Amy10, Amy20, Amy22*, Amy23, Amy24, Amy25, Amy28, D36, 90753, 102209, 645852 κρίθηκαν κατάλληλες για περαιτέρω *in vivo* ανάλυση, με απώτερο σκοπό την εισαγωγή τους σε κλινικές μελέτες. Το δεύτερο μέρος της διπλωματικής αφορά στην αναζήτηση αντι-καρκινικής δράσης σε ήδη εγκεκριμένα φάρμακα ή γνωστές ενώσεις, μέσα από ανάπτυξη ειδικής πλατφόρμας όπου κατατάσσει κατά προτεραιότητα ενώσεις που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν προς τα κάτω τη δραστηριότητα μεταγραφικών παραγόντων. Πιο αναλυτικά, ως υποσχόμενα φάρμακα για περαιτέρω αναλύσεις, βρέθηκαν να είναι το Amiodarone, το Clomifene και το Pimozide.

Λέξεις-κλειδιά: MYC, καρκίνος, αντι-MYC, ανακάλυψη φαρμάκων, βιοπληροφορική

Abstract

This project aims to targeting the transcriptional factor MYC, as a strategy for cancer treatment. The main purpose is to choose the optimal molecule/drug -between derivatives of anti-MYC compounds and through bioinformatics analyses- which inhibits the function of the oncogenic MYC molecule and that will lead to clinical trials. It is important to emphasize that the deregulation of MYC is a common feature of many types of cancer, such as breast cancer, ovarian, endometrial, colon, prostate, lung, pancreas, renal and adrenal cell carcinoma, and neuroblastomas. Researches show that a short two-day suppression or partial reduction of MYC, could lead to prolonged tumor regression. For compound screening, parental subclone cell lines H01519 (MYC -/-) and TGR1 (MYC +/+) were used, as well as dependent/independent cancer cell lines based on bioinformatics analysis. For this purpose, high-content screening analysis was developed, to test the activity of anti-MYC molecules measuring the viability of cancer cell lines after treatment and, then, the most promising ones were selected for further viability and toxicity tests. As potential compounds/drugs, the new derivatives will exhibit high potency and satisfactory physicochemical/pharmacological properties (optimization). The results show that twelve compounds, derivatives of Amy22 and on Myc19, can act as promising inhibitors of MYC molecule. These compounds, named as Amy1, Amy10, Amy20, Amy22*, Amy23, Amy24, Amy25, Amy28, D36, 90753, 102209, 645852, were considered potential drug candidates for further in vivo analysis, with ultimate goal their introduction in clinical trials. The second part of the thesis aims to identify anti-cancer (anti-MYC) activity in already approved drugs or known compounds, by developing a special platform which prioritize compounds that have the ability to modulate and decrease the activity of transcriptional factors. More specifically, AMIODARONE, CLOMIFENE and PIMOZIDE were found to be the most promising drugs for further examination and analyses.

Key-Words: MYC, cancer, anti-MYC, drug discovery, bioinformatics

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Βιολογία Συστημάτων» του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και είναι αποτέλεσμα εκτενούς αναζήτησης και έρευνας.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, οι οποίοι διαδραμάτισαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της. Πρώτα από όλα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διπλωματικής μου, Δρ. Λεωνίδα Αλεξόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή της σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, στον τομέα Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτόματου Ελέγχου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ στο εργαστήριό του με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο που ανταποκρίνεται απολύτως στα επιστημονικά μου ενδιαφέροντα, καθώς και για την εμπιστοσύνη, την υποστήριξη και την εκτίμηση που μου έδειξε. Οι συμβουλές του ανεκτίμητες, με βοήθησαν να εμπλουτίσω και να εμβαθύνω στο θέμα μου. Αποτελεί μεγάλη τιμή για εμένα η συμμετοχή του στην παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους καθηγητές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο, Καθηγητή του τμήματος Βιοτεχνολογίας, τομέα Μοριακής Βιολογίας και Δρ. Γεράσιμο Δάρα, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοτεχνολογίας, τομέα Μοριακής Βιολογίας, οι οποίοι με εμπιστεύτηκαν και, μέσα από την πολυδιάστατη επιστημονική τους σκέψη, τα πλούσια πνευματικά προσόντα, και τις εξόχως εποικοδομητικές συζητήσεις στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος, μου μεταλαμπάδευσαν πολύτιμες γνώσεις και, ως εκ τούτου, συνέβαλαν τα μέγιστα στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Υποψήφια Διδάκτορα του τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, Δανάη Ζαρείφη, για την ουσιαστική, άμεση και πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διπλωματικής, το χρόνο που τόσο απλόχερα διέθεσε, καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και τις πολύτιμες υποδείξεις της.

Επιθυμώ, επιπλέον, να ευχαριστήσω θερμά τον Υποψήφιο Διδάκτορα Χρήστο Φώτη, μέλος του τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών του ΕΜΠ, ο οποίος στάθηκε αρωγός σε κάθε στάδιο της ερευνητικής μου διαδρομής, για την όλη συνδρομή του, την έμπρακτη υποστήριξη, την προθυμία του να με βοηθήσει και την ενθάρρυνσή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου.

Δεν θα μπορούσα να μην κάνω μνεία στους συναδέλφους μου ερευνητές/στα υπόλοιπα μέλη της ομάδας, οι οποίοι υπήρξαν συνοδοιπόροι στις ερευνητικές μου προσπάθειες προς την αποπεράτωση της διπλωματικής μου εργασίας. Βελτίωναν τη κάθε ημέρα συμβάλλοντας με το δικό τους ξεχωριστό τρόπο και έκαναν το ταξίδι της έρευνας μία ευχάριστη εμπειρία.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ με ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, οι οποίοι βρίσκονται δίπλα μου σε κάθε μου βήμα, σε κάθε στάδιο της ζωής μου, ένθερμοι υποστηρικτές των επιλογών μου. Τους ευχαριστώ για την αγάπη, την αμέριστη συμπαράσταση και την πίστη τους σε μένα όλα αυτά τα χρόνια.

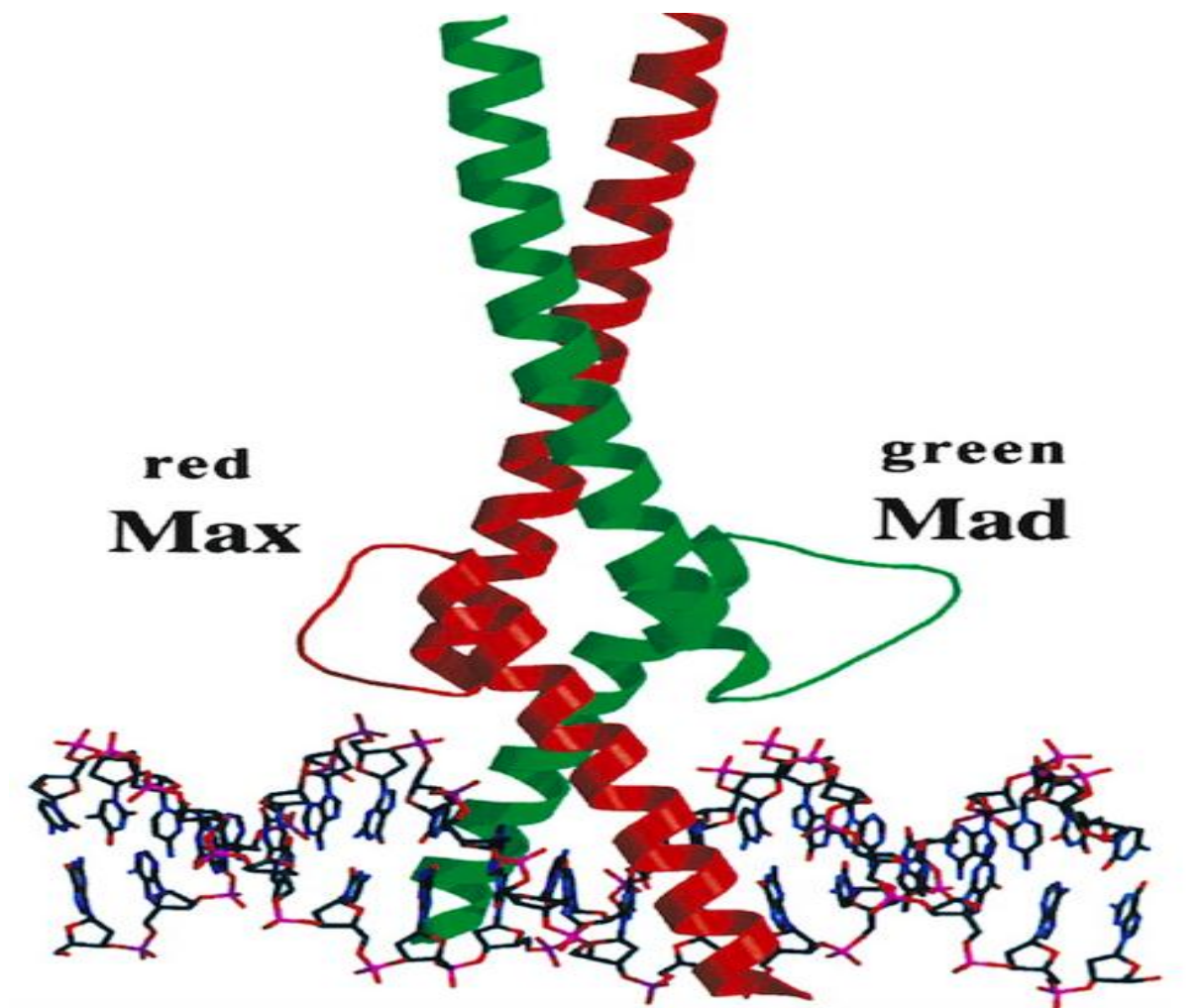
Περιεχόμενα

- Εισαγωγικά στοιχεία για την ογκο-πρωτεΐνη MYC.....	10
- Μηχανισμοί απορρύθμισης του MYC.....	16
- Γονίδια-στόχοι του c-MYC.....	21
- Ο παράγοντας MYC στο κύτταρο-Λειτουργίες.....	24
- Συμβολή του παράγοντα MYC στην ογκογένεση.....	31
- Καταστολή του παράγοντα MYC - Αναστολή της ογκογένεσης	35
- Στρατηγικές για αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα c-MYC.....	40
- Συμβολή της της Βιοπληροφορικής στην ανακάλυψη φαρμάκων.....	53
- Στόχος της εργασίας.....	56
- Υλικά και Μέθοδοι.....	58
- Αποτελέσματα.....	65
- Συζήτηση.....	77
- Βιβλιογραφία.....	82

Εισαγωγικά στοιχεία για την ογκο-πρωτεΐνη MYC

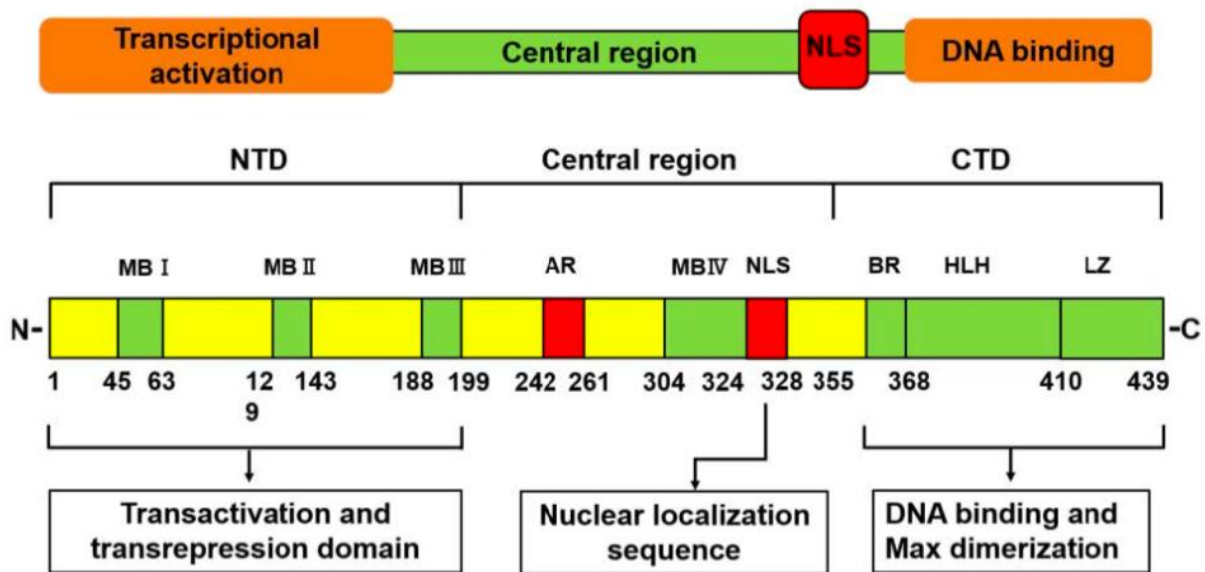
Τα γονίδια Myc είναι μία οικογένεια ρυθμιστικών γονιδίων και πρωτο-ογκογονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής. Η οικογένεια Myc αποτελείται από τρία ανθρώπινα γονίδια: c-myc, l-myc (MYCL) και n-myc (MYCN) (Sovana Adhikary and Martin Eilers, 2005). Το c-myc (όπου αναφέρεται ως MYC) ήταν το πρώτο γονίδιο που ανακαλύφθηκε σε αυτή την οικογένεια, λόγω της ομολογίας με το ιικό γονίδιο v-myc. Οι Myc ογκοπρωτεΐνες ανήκουν σε μια οικογένεια αποκαλούμενων "υπερ-μεταγραφικοί παράγοντες", οι οποίοι δυνητικά μπορούν να ρυθμίζουν τη μεταγραφή τουλάχιστον του 15% γονιδίων του συνολικού γονιδιώματος (Natalie Meyer and Linda Z. Penn, 2008). Πιο συγκεκριμένα, η ανακάλυψη ότι η πρωτεΐνη c-Myc περιέχει ένα N-τερματικό άκρο που καθίσταται ενεργό από την bHLH (basic helix-loop-helix) MAX πρωτεΐνη για να δεσμεύσει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, καθιέρωσε και τον κύριο ρόλο της στην μεταγραφή (Troy A. Baudino and John L. Cleveland, 2001, Oster et al., 2002).

Ο ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας MYC-MAX έχει τεκμηριωθεί ότι μπορεί δεσμεύεται σε κάποιες περιοχές DNA (Εικόνα 1), γνωστές ως E-κουτιά (5'-CACGTG-3'), με υψηλή συγγένεια, ή και σε άλλες θέσεις με χαμηλότερη συγγένεια (Elmar Wolf et al., 2014). Η σύνδεση MYC με αλληλουχίες υποκινητών γονιδίων αναστέλλουν τις μεταγραφικώς ανεσταλμένες RNA πολυμεράσες και καταλύουν την μεταγραφική επιμήκυνση (Peter B. Rahl et al., 2010). Έχει προταθεί ότι ο MYC είναι ένας γενικός μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενισχύει την έκφραση γονιδίων που έχουν ήδη εκφραστεί σε βασικό επίπεδο, φαινομενικά χωρίς κάποια ειδικότητα (μοντέλο "γενικής ενίσχυσης") (Charles Y. Lin 2012, David Levens 2013, Zuqin Nie et al., 2012). Το γενικό μοντέλο ενίσχυσης, ωστόσο, δεν λαμβάνει υπόψη την ικανότητα του MYC να καταστέλλει γονίδια, όπως εκείνα που ενεργοποιούνται από τον παράγοντα μεταγραφής MIZ-1 (Elmar Wolf et al., 2014). Συνεπώς, σε αντίθεση με αυτή τη γενική άποψη του μοντέλου της 'γενικής ενίσχυσης', είναι η υπόθεση ότι οι στόχοι του MYC υπαγορεύονται σε μεγάλο βαθμό από την προσβασιμότητα χρωματοσίνης (Ernesto Guccione et al., 2006), η οποία επιτρέπει στο MYC να δεσμεύει τα γονίδια-στόχους και να συνεργάζεται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την ενεργοποίηση ή την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης επιλεκτικά ('Επιλεκτική ενίσχυση') (Chi V. Dang 2014, Arianna Sabo et al., 2014). Αυτό σημαίνει ότι, ο βαθμός με τον οποίο ο MYC διεγείρει την έκφραση ενός γονιδίου, εξαρτάται από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες δεσμευμένους στο γονίδιο και / ή σε κοντινούς ενισχυτές.



Εικόνα 1

Δομή του ετεροδιμερούς MYC-MAX δεσμευμένο στο DNA (Satish K. Nair et al., 2003)



Εικόνα 2

Δομές πρωτεϊνών της οικογένειας Myc (A). Οι πρωτεΐνες Myc των θηλαστικών αποτελούνται από μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, μια κεντρική περιοχή, μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μια περιοχή που εμπλέκεται στη δέσμευση του DNA. Δομές ανθρώπινης πρωτεΐνης c-Myc (B). Η N-τερματική περιοχή διενεργοποίησης (NTD) περιλαμβάνει τρεις διατηρημένες περιοχές που ονομάζονται Myc box-I, II και III (MBI, MBII και MBIII) και την όξινη περιοχή (AR). Τα MBI και MBII είναι απαραίτητα για μεταγραφική και κυτταρο-μετασχηματιστική δραστηριότητα Myc, καθώς επίσης και την στρατολόγηση του Myc για ενεργοποίηση. Το MBIII ρυθμίζει την καταστολή της μεταγραφής. Στην κεντρική περιοχή, το MBIV εμπλέκεται στην απόπτωση, τον μετασχηματισμό και τη ρύθμιση της δέσμευσης του DNA. Ο τομέας Ο-τερματικού (CTD) περιλαμβάνει τους βασικούς τομείς, τον έλικα-βρόγχο-έλικα και τον τομέα «φερμουάρ» λευκίνης (b-HLH-LZ) που είναι απαραίτητος για το διμερισμό του Myc με την πρωτεΐνη MAX (Mohamet Elbadawy et al., 2019).

Δύο πρόσφατες μελέτες παρέχουν αποδείξεις τόσο για επιλεκτική έκφραση γονιδιακής έκφρασης που προάγει την κυτταρική ανάπτυξη, όσο και για την άμεση καταστολή γονιδίων από τον MYC (Arianna Sabo et al., 2014, Susanne Walz et al., 2014). Καθώς τα κύτταρα που δεν διαιρούνται ελέγχουν αυστηρά την έκφραση των μεταβολικών ενζύμων για να προσαρμόσουν το μεταβολισμό για την ομοιόστασή τους, είναι λογικό ότι η ενεργοποίηση

του MYC θα ενισχύσει επιλεκτικά πολλά μεταβολικά γονίδια που απαιτούνται για τα δομικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους. Από την άλλη πλευρά, τα γονίδια που εμπλέκονται στις μη πολλαπλασιαστικές κυτταρικές λειτουργίες και στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου που οδηγείται από το MIZ-1, θα κατασταλούν από το MYC. Συλλογικά, οι μελέτες υποδηλώνουν ότι ο MYC δεσμεύει το DNA για να προάγει την γονιδιακή έκφραση, με ενεργοποίηση των ανασταλμένων RNA πολυμερασών. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίον ο MYC δεσμεύει το DNA και ενεργοποιεί ή καταστέλλει την γονιδιακή έκφραση, επηρεάζεται από την προσβασιμότητα της χρωματίνης που χαρακτηρίζεται από παράγοντες όπως το WDR5, το οποίο πρόσφατα αποδείχτηκε απαραίτητο για την αναγνώριση γονιδίων-στόχων από τον MYC (Lance R. Thomas et al., 2015). Πράγματι, πρόσφατο άρθρο υποδηλώνει ότι το μοτίβο E-κουτιού (E-box) σε κλειστή χρωματίνη μπορεί να είναι προσιτό στον MYC, ο οποίος χρησιμοποιεί μία μερικώς ξεδιπλωμένη περιοχή δέσμευσης DNA και υποβοηθείται από άλλους παράγοντες (Abdenour Soufi et al., 2015).

Όταν ο MYC συνδέεται με τον Max, τα μέλη της Mad οικογένειας δεσμεύουν αλληλουχίες E-box και ανταγωνίζονται τη σύνδεση του c-Myc / Max ετεροδιμερούς. Τα διμερή Mad / Max καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων με την προσέλκυση του συν-κατασταλτικού συμπλόκου που τροποποιεί τη χρωματίνη (Sin3, N-CoR) και των αποακετυλασών ιστονίνης τάξης I, HDAC1 και 2 στους υποκινητές γονιδίων-στόχων. Η πρόσληψη αυτού του συμπλέγματος έχει ως αποτέλεσμα την αποακετυλίωση ουρών στις ιστόνες και μια κλειστή διαμόρφωση χρωματίνης, αποτρέποντας έτσι τη μεταγραφική ενεργοποίηση που λαμβάνει χώρα μέσω των E-boxes (Donalt E. Ayer et al., 1995).

Η υπερέκφραση του MYC μπορεί όπως φαίνεται να ρυθμίσει τροποποιητές χρωματίνης για περαιτέρω μεταβολή της προσβασιμότητας της χρωματίνης, όπως υποδηλώνεται από την επαγωγή με τη MYC-μεσολαβούμενη επαγωγή του συμπλέγματος EZH2. Επιπρόσθετα, τα υψηλά επίπεδα απορυθμισμένων ογκογόνων MYC διαταράσσουν περαιτέρω τη μεταγραφή, αφού δεσμεύονται/εισβάλλουν σε αλληλουχίες ενισχυτών, προκαλώντας μη γραμμική ενίσχυση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου και οδηγώντας σε συσσώρευση βιομάζας σε καρκινικά κύτταρα (Arianna Sabo et al., 2014, Susanne Walz et al., 2014).

Ανεξάρτητα από την ακριβή λειτουργία του MYC στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μελέτες μέχρι σήμερα υποστηρίζουν την άποψη ότι η ενεργοποίηση του MYC οδηγεί σε ένα γονιδιωματικό προγραμματισμό που προάγει τη βιογένεση του ριβοσώματος, την κυτταρική ανάπτυξη και, εν συνεχεία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η c-Myc ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της στρατολόγησης ακετυλασών ιστονών, πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη χρωματίνη, βασικών μεταγραφικών παραγόντων και, τέλος, με DNA μεθυλοτρανσφεράσες (Paula C. Fernandez et al., 2015, Brenda C. O'Connell et al., 2013). Ως εκ τούτου, οι στόχοι c-Myc μπορούν να ταξινομηθούν σε ξεχωριστές υποομάδες, των οποίων η ρύθμιση μπορεί να περιλαμβάνει μερικούς, ή όλους τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το c-Myc επηρεάζει τη μεταγραφή.

Η γονιδιακή ενίσχυση του MYC είναι ο συχνότερα παρατηρούμενος δείκτης της απορρύθμισης του MYC στον καρκίνο. Σε λέμφωμα Β-λεμφοκυττάρων, η συχνότητα μετασηματισμών του c-Myc είναι 33,3% σε επίπεδο DNA και 16,1% στο επίπεδο της πρωτεΐνης (Xu-Monette et al., 2016, Daisuke Ennishi et al., 2019). Η βάση δεδομένων του Atlas Genome Atlas (TCGA) δείχνει ότι το 28% όλων των ασθενών με καρκίνο έχουν τις γενετικές ανωμαλίες σε τουλάχιστον μία πρωτεΐνη της οικογένεια Myc, που αποτελείται από c-Myc, n-Myc και l-Myc (Schaub et al., 2018).

Είναι σημαντικό λοιπόν να τονιστεί ότι η απορρύθμιση του MYC είναι κοινό χαρακτηριστικό πολλών τύπων καρκίνου, όπως καρκίνος μαστού, ωοθηκών, ενδομητρίου, παχέως εντέρου, προστάτη, πνεύμονα, παγκρέατος, καρκίνωμα νεφρικών και επινεφρικών κυττάρων, καθώς και σε νευροβλαστώματα.

Μηχανισμοί απορρύθμισης του MYC στον καρκίνο

Η ογκογόνος ενεργοποίηση του MYC εντάσσεται σε κυρίως τρεις μηχανισμούς: μεταλλαξογένεση εισαγωγής, μετατόπιση χρωμοσωμάτων και ενίσχυση γονιδίων. Μία σημαντική εξέλιξη κατά την τελευταία δεκαετία ήταν η συνειδητοποίηση ότι η απορρύθμιση του MYC δεν οφείλεται κυρίως σε γενετικές μεταλλάξεις. Ο MYC μπορεί να απορρυθμιστεί από οποιονδήποτε από τους διάφορους μηχανισμούς που στοχεύουν στην έκφραση ή/και στη δραστηριότητά του, είτε άμεσα, είτε έμμεσα. Αυτές οι νέες πληροφορίες υποδεικνύουν ότι η απορρύθμιση του MYC στην επίπτωση του ανθρώπινου καρκίνου είναι υψηλότερη από ό, τι θεωρούταν προηγουμένως και δεν περιορίζεται σε μετατοπίσεις και ενισχύσεις της θέσης του MYC.

Μεταλλαξογένεση εισαγωγής.

Η λευχαιματογένεση που επάγεται από τον ρετροϊό της μυελοκυτταρικής νόσου οξείας μεταμόρφωσης (MC29), οφείλεται σε μεταγωγή ρετροϊού και δημιουργία χιμαιρικού v-gag-myc. Ο νεοπλασματικός μηχανισμός των ρετροϊών ξετυλίχθηκε σε μελέτες του ιού της λευκής ορνίτιδας (ALV). Ανάλυση του DNA και του RNA από όγκους που προκαλούνται από ALV (avian leucosis virus-ιός λευκώσεως των πτηνών) υποστήριξε την υπόθεση ότι η ενσωμάτωση του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή θα μπορούσε να ενεργοποιήσει 'λανθασμένα' ένα κοντινό κυτταρικό ογκογονίδιο. Το 1981, ο B. Neel και οι συνάδελφοί του κατέδειξαν την ύπαρξη χιμαιρικών ιών-RNA και έδειξαν ότι οι περιοχές ικής εισαγωγής ήταν εμφανείς σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα, αποδίδοντας παρόμοια υβριδικά μόρια RNA σε πτηνά που είχαν μολυνθεί ανεξάρτητα. Συμπληρωματικό DNA από πέντε από τα ικά ογκογόνα που ήταν γνωστά τότε, συμπεριλαμβανομένου του myc, υβριδοποιήθηκε στο RNA λεμφώματος πτηνών, επιτρέποντας την ταυτοποίηση αυξημένων επιπέδων μεταγραφών MYC συντηγμένων με προϊικές αλληλουχίες στους όγκους. Το MYC ήταν το πρώτο κυτταρικό ογκογονίδιο που αποδεικνύεται ότι ενεργοποιείται μέσω της εισαγωγής του ρετροϊκού υποκινητή. Αυτά, μαζί με άλλα αποτελέσματα, υποδηλώνουν ότι οι ερευνητές είχαν αποκαλύψει μια εκπληκτική πραγματικότητα: ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός θα μπορούσε να προκύψει από την ενεργοποίηση ενός μη μεταλλαγμένου κυτταρικού γονιδίου. Βάσει αυτής της πρωτοποριακής εργασίας με Myc, η μεταλλαξογένεση εισαγωγής έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως εργαλείο για την ανακάλυψη πολλών κυτταρικών ογκογονιδίων (Natalie Meyer and Linda Z. Penn 2008).

Χρωμοσωμική μετατόπιση.

Η μοριακή ανάλυση των πλασμακοκυττάρων ποντικού αποκάλυψε ότι η παραγωγή του mRNA του Myc προέκυψε από ανασυνδασμό μεταξύ της θέσης της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (Ig) και του Myc ογκογονιδίου. Έχουν αναγνωριστεί χρωμοσωμικές μετατοπίσεις σε ανθρώπινες κακοήθειες, αλλά μέχρις ότου το ανθρώπινο MYC εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 8, δεν υπήρχε άμεσος βιολογικός ρόλος για αυτές τις αναδιατάξεις. Στο λέμφωμα Burkitt, τα χρωμοσώματα 14, 2 ή 22, τα οποία φέρουν τα γονίδια Ig βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας, μετατοπίζονται στο χρωμόσωμα 8. Ο τύπος MYC εμπλέκεται σε αυτές τις μετατοπίσεις, οδηγώντας στην πρόταση ότι η ανταλλαγή θέσεων του MYC με τους Ig τύπους ήταν υπεύθυνη για τα λεμφώματα. Στην περίπτωση του MYC, η υπερέκφραση ενός μη μεταλλαγμένου γονιδίου φαίνεται να είναι επαρκής για την παραγωγή όγκου. Εκτεταμένη ανάλυση του λεμφώματος burkitts και των σημείων διακοπής μετασχηματισμού των πλασμοκυττάρων, καθώς και της κωδικοποιημένης περιοχής του ενεργοποιημένου αλληλόμορφου, έχει προωθήσει την βαθύτερη κατανόηση για τη ρύθμιση του MYC. Η ενεργοποίηση του ανθρώπινου MYC, ως αποτέλεσμα χρωμοσωμικών μετατοπίσεων, είναι επίσης κοινή στους αιματοποιητικούς όγκους (Natalie Meyer and Linda Z. Penn 2008).

Ενισχύσεις.

Οι μετατοπίσεις που παρατηρούνται στις κακοήθειες των B-κυττάρων έχουν καθιερώσει το γεγονός ότι η απορρύθμιση του MYC που παρατηρείται σε πολλούς τύπους καρκίνου, μπορεί να οφείλεται και στην αλλαγή της δραστηριότητας του ενισχυτή. Το γονίδιο MYC βρίσκεται μέσα σε μια περιοχή "έρημο γονιδίου" στο χρωμόσωμα 8q24, που εντοπίζεται σε μια έκταση 2 Mb του γονιδιώματος που είναι αξιοσημείωτη για τη σχετική συχνότητα αλληλουχιών που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Οι περιοχές αυτές έχουν την ικανότητα να δρουν ως ενισχυτές ειδικά για τον MYC, με αποτέλεσμα τη συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασής του. Περαιτέρω δεδομένα έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση ενδογενών ενισχυτών, μέσω γονιδιακής επανάληψης ή επιγενετικών μηχανισμών, αποτελεί έναν άλλο τρόπο για την απορρύθμιση της έκφρασης του MYC.

Μονο- νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και μεταγραφή του MYC

Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) έχουν δείξει ότι οι πολυμορφισμοί απλού νουκλεοτιδίου (SNP) συχνά χαρτογραφούνται σε μη κωδικοποιημένες ρυθμιστικές θέσεις στο γονιδίωμα. Αυτό περιλαμβάνει τις περιοχές ενισχυτών και σε μερικές περιπτώσεις τα SNPs έχουν εμπλακεί στην αλλαγή της δραστηριότητας του ενισχυτή (Wright et al., 2010). Αρκετά SNPs που σχετίζονται με τον καρκίνο έχουν χαρτογραφηθεί στον τόπο 8q24 και επηρεάζουν την προδιάθεση του καρκίνου σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του παχέος εντέρου και του προστάτη (Ahmadiyeh et al., 2010). Ένα παράδειγμα αποτελεί το αλληλίο κινδύνου rs6983267, που φαίνεται πως σχετίζεται σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου και του προστάτη, με την παραλλαγή G να οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο σε σύγκριση με το αλληλόμορφο αναφοράς (Haiman et al., 2007). Αυτή η παραλλαγή είναι περίπου 335 kb ανάντι του MYC και αποδείχθηκε ότι συμπεριφέρεται ως ένας ενισχυτής μεγάλης εμβέλειας που επηρεάζει τη μεταγραφή του MYC ως αποτέλεσμα της αλλαγής της ειδικής δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής του μονοπατιού WNT, TCF4. Ένα άλλο SNP, rs55705857-G, το οποίο βρέθηκε πρόσφατα ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο σε μεταλλαγμένα γλοιώματα IDH1 / 2, τοποθετείται εντός μιας απλής τομολογικής περιοχής χρωματίνης με το MYC και αυξάνει τη δραστηριότητα του μεταγραφικού δικτύου του MYC, σε σύγκριση με το αλληλόμορφο αναφοράς.

Αρκετοί ακόμα ενισχυτές έχουν εμπλακεί σε κακοήθειες. Για παράδειγμα, ο Lin και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν έναν ειδικό ενισχυτή μεδουλοβλαστώματος 90 kb ανάντι του MYC (Line et al., 2016), και, παρόμοια, μια περιοχή 400 έως 500 kb ανάντι του MYC που φαίνεται να αποτελεί ειδικός υπέρ-ενισχυτής καρκίνου του παχέος εντέρου. Η ανίχνευση της αλλαγής της δραστηριότητας του ενισχυτή στον καρκίνο έχει, επίσης, προχωρήσει με την ενσωμάτωση μη κωδικοποιημένων αλλοιώσεων και επιγενετικών τροποποιήσεων του ενισχυτή (Zhang et al., 2016). Σε μια πρόσφατη μελέτη, μη κωδικοποιημένες ενισχύσεις ταυτοποιήθηκαν 450 kb και 800 kb κατάντη του MYC, στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και στον καρκίνο της μήτρας αντίστοιχα. Αυτές οι ενισχύσεις κατέληξαν στο σχηματισμό μιας μεγαλύτερης περιοχής ενισχυτή, όπου χαρακτηρίστηκε από υπερακετυλίωση H3K27, με αποτέλεσμα αυξημένη μεταγραφή του MYC. Επιπλέον, ένας εναλλακτικός τρόπος για την απορρύθμιση του ενισχυτή είναι η διαφορική μεθυλίωση αυτών των ρυθμιστικών περιοχών.

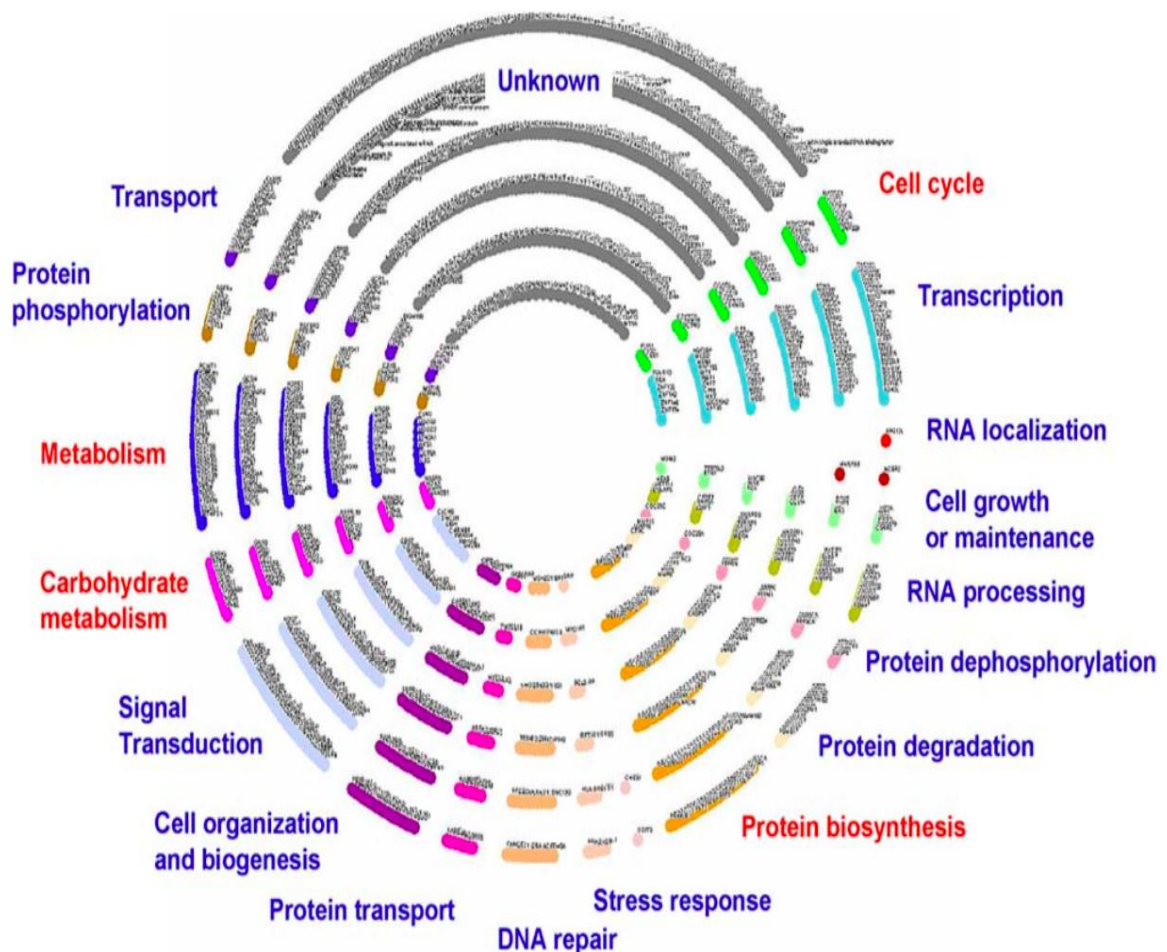
Η μεθυλίωση του DNA γενικά σχετίζεται με μεταγραφική καταστολή και η υπομεθυλίωση ενός ειδικού ενισχυτή του παχέος εντέρου αναγνωρίστηκε να οδηγεί σε ενεργοποίηση ενισχυτών, οδηγώντας σε απορρύθμιση της μεταγραφής MYC (Heyn et al., 2016). Εκτός από τη σύνθετη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου του παράγοντα MYC, και η πρωτεΐνη υποβάλλεται επίσης σε αυστηρή ρύθμιση. Ο MYC γενικά θεωρείται ότι είναι μια σύντομη πρωτεΐνη ημίσειας ζωής και έχουν εντοπιστεί αρκετοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση ή σταθεροποίησή του, σε απόκριση σε κατάλληλα συμβάντα σηματοδότησης. Στον καρκίνο, αυτές οι οδοί μπορούν να τροποποιηθούν, οδηγώντας σε μια ανώμαλη σταθεροποίηση του MYC, ή ο ίδιος ο MYC μπορεί να υποβληθεί σε σημειακές μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένες οδούς κυκλοφορίας πρωτεϊνών (Delmore et al., 2011).

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αλλαγή της πρωτεΐνης MYC

Μέχρι σήμερα, μία οδός έχει χαρακτηριστεί εκτεταμένα ως σταθεροποιητική σταθερότητα πρωτεΐνης MYC. Το MYC πρώτα φωσφορυλιώνεται στη σερίνη-62 (pS62) από μια εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 1 (CDK1), ή από εξωκυτταρική κινάση (ERK), μεταξύ άλλων κινασών, ακολουθούμενη από φωσφορυλίωση θρεονίνης-58 (T58) από κινάση συνθετάσης γλυκογόνου (GSK3) (Gregory et al., 2003). Ακολούθως, η προλυλική ισομεράση PIN1 ισομερίζει το κατάλοιπο προλίνης 57 από την cis στην trans διαμόρφωση, επιτρέποντας την αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A) του pS62 (Elizabeth Yeh et al., 2004). Η φωσφορυλίωση του T58 αναγνωρίζεται, στη συνέχεια, από την λιγάση E3 FBXW7, η οποία ουβικυτιλιώνει το MYC και το στοχεύει για αποικοδόμηση. Πολλές αποουβικυτιλιάσες έχουν αναφερθεί ότι δρουν σε αντίθεση με το FBXW7 και σταθεροποιούν το MYC, συγκεκριμένα η USP28, η USP36 και η USP37 (J. Pan et al., 2014). Πιο πρόσφατα, το USP22 έχει, επίσης, αναφερθεί ότι ρυθμίζει τη σταθερότητα του MYC. Σύμφωνα με την ογκογονική δράση του MYC, πολλοί από αυτούς τους ρυθμιστές του MYC έχουν χαρακτηριστεί είτε ως ογκογονίδια, όπως USP28, είτε ως καταστολείς όγκων, για παράδειγμα FBXW7 (Akhoondi et al., 2007). Ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης έγκειται στις τρεις ισομορφές του FBXW7 και στον εντοπισμό τους. Το FBXW7α βρίσκεται στον πυρήνα, μαζί με το USP28, ενώ τα FBXW7γ και USP36 βρίσκονται κυρίως στην σφαιρική δομή μέσα τον πυρήνα (nucleolus). Το FBXW7β βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και δεν αλληλεπιδρά με το MYC.

Γονίδια-στόχοι του c-MYC

Χιλιάδες γονίδια-στόχοι του c-Myc ταυτοποιήθηκαν με πολλές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της SAGE (Menssen and Hermeking., 2002), της μικροσυστοιχία DNA (Coller et al., 2000) και μεθόδων υβριδισμού (Lewis et al., 1997). Ο κατάλογος των γονιδίων που ελέγχει η πρωτεΐνη c-Myc περιλαμβάνει γονίδια που εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε σημαντική κυτταρική λειτουργία (Εικόνα 4). Εκτός από εκείνα τα γονίδια που ρυθμίζονται θετικά από c-Myc, η μεταγραφική δραστηριότητα άλλων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της κυκλίνης D1 και της καρβοξυπεπτιδάσης D, καταστέλλεται από το σύμπλοκο c-Myc-Max ή c-Myc μόνο (Philipp et al., 1994).



Εικόνα 4

Κατανομή στόχων Myc: Χίλιοι πεντακόσιοι εξήντα ένας Myc στόχοι (μικροί κύκλοι) από το <http://www.mycancergene.org> εμφανίζονται σε ομόκεντρους δακτυλίους από το λογισμικό OSPREY (<http://www.biodata.mshri.on.ca/osprey/servlet/Index>) με χρωματισμένες και επισημασμένες λειτουργικές ομάδες. Οι ομάδες GO (gene ontology) που επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα υπερεκπροσωπούνται στατιστικά, όπως καθορίζεται από την ανάλυση EASE (www.david.niaid.nih.gov/david/ease.htm).

Ο παράγοντας MYC στο κύτταρο - Λειτουργίες

Κυτταρικός κύκλος και διαφοροποίηση.

Είναι ξεκάθαρο, πλέον, ότι ο MYC παίζει μοναδικό και κρίσιμο ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε κύτταρα με ενεργοποιημένο MYC, η φάση G1 συχνά γίνεται μικρότερη, καθώς τα κύτταρα εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και ο MYC είναι απαραίτητος για την μετάβαση από τη φάση G0/G1 έως την S. Έρευνες από πολλές ομάδες τα τελευταία 15 χρόνια, αποκάλυψαν τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από το MYC. Ο MYC καταργεί τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται σε σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (για παράδειγμα GADD45 και GADD153) και αναστέλλει τη λειτουργία των αναστολέων της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης (CDK), είτε μέσω άμεσης καταστολής της γονιδιακής μεταγραφής, είτε έμμεσα, μέσω αποικοδόμησης. Ο MYC προάγει επίσης την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, με την ενεργοποίηση της κυκλίνης D1, της κυκλίνης D2, της κυκλίνης E1 και της κυκλίνης A2, καθώς και του CDK4, του κύκλου κυτταρικής διαίρεσης 25A (CDC25A), του E2F1 και του E2F2 (Meyer and Penn., 2008).

Αν και η εκτοπική έκφραση του MYC μπορεί να εμποδίσει δραματικά τη διαφοροποίηση πολλών διαφορετικών τύπων κυττάρων, μπορεί επίσης και να διεγείρει την κυτταρική διαφοροποίηση. Αρκετές ομάδες έχουν καταδείξει ότι απαιτείται μείωση της ρύθμισης του MYC, ώστε τα κύτταρα να βγουν από τον κυτταρικό κύκλο και να υποστούν διαφοροποίηση. Αυτό το σημαντικό σημείο της ρύθμισης υποβοηθείται, περαιτέρω, από την τα μέλη της οικογένειας Mxd. Ο MYC φαίνεται να ρυθμίζει τη μοίρα των κυττάρων. Ο ρόλος της έκφρασής του κατά την κανονική ανάπτυξη σχετίζεται με την πολλαπλασιαστική ικανότητα και την κυτταρική μετανάστευση. Η απώλεια της έκφρασης του MYC σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα, οδηγεί σε εντυπωσιακούς φαινότυπους (Meyer and Penn., 2008).

Κυτταρική ανάπτυξη, γονιδιωματική αστάθεια και αγγειογένεση.

Κατά το δεύτερο μισό της δεκαετίας του 1990, αποκαλύφθηκε ότι ο παράγοντας MYC διαθέτει τρία νέα χαρακτηριστικά που προάγουν την ογκογένεση: ρύθμιση του μεγέθους των κυττάρων, μεταβολή της γονιδιωματικής σταθερότητας και ενεργοποίηση της αγγειογένεσης. Η ικανότητα του MYC να προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων (προκαλώντας διπλασιασμό των κυττάρων σε μάζα και μέγεθος), παρουσιάστηκε σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Ο MYC επιτρέπει την κυτταρική ανάπτυξη, παρέχοντας στο κύτταρο

μια άφθονη προσφορά βασικών δομικών στοιχείων, καθώς και αύξηση του κυτταρικού μεταβολισμού και της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ο MYC ενεργοποιεί πολλά γονίδια-στόχους που έχουν διάφορους ρόλους, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη ριβοσωματική και μιτοχονδριακή βιογένεση και τη σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Είναι ενδιαφέρον ότι οι αναλύσεις μικρο-συστοιχιών δείχνουν ότι αυτοί είναι καθολικοί στόχοι, που συνήθως ρυθμίζονται από τον MYC σε μια ευρεία ποικιλία τύπων κυττάρων (Meyer and Penn., 2008).

Η δεύτερη αναφερόμενη δεξιότητα του MYC περιγράφηκε αρχικά από τους S. Mai και συνεργάτες, οι οποίοι έδειξαν ότι παρατηρείται ειδική γονιδιακή ενίσχυση σε υψηλή συχνότητα σε κύτταρα με απορρυθμισμένο MYC. Πρόσθετες έρευνες δείχνουν ότι ο MYC μπορεί να συμβάλλει και σε χρωμοσωμική αστάθεια. Ωστόσο, ο ρόλος και ο βαθμός στον οποίο ο MYC συμβάλλει στη γονιδιωματική αστάθεια, αποτελεί αντικείμενο συζήτησης και αντιπαράθεσης. Χαρακτηριστικό της ογκογένεσης, που μπορεί σαφώς να συσχετιστεί με την απορρύθμιση του MYC, είναι η αποδιοργάνωση του γονιδιώματος (Meyer and Penn., 2008).

Η ικανότητα του MYC να προάγει τον αγγειογόνο μετασχηματισμό (angiogenic switch) είναι μία μη αυτόνομη κυτταρική δραστηριότητα, που αποκαλύφθηκε επίσης στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Ο A. Thomas-Tikhonenko, με πειράματα *in vivo*, έδειξε ότι η απορρύθμιση του MYC οδηγεί σε αγγειογένεση. Ο S. Pelengaris και η G. Evan έχουν δείξει ότι, σε παγκρεατικά κύτταρα, η αυξημένη έκφραση του MYC και η απελευθέρωση της ιντερλευκίνης 1β (IL1β), είναι καθοριστικής σημασίας για την έναρξη της αγγειογένεσης (Meyer and Penn., 2008).

Κατηγορία	Περιγραφή λειτουργίας	Παραδείγματα υπεύθυνων γονιδίων
Κυτταρικός κύκλος	Ενεργοποίηση του μονοπατιού MYC-ER οδηγεί τα κύτταρα να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο.	Cyclin D2, CDK4 (επαγωγικό); p21, p15, GADD45 (κατασταλτικό)
Διαφοροποίηση	Η απορρύθμιση του MYC σταματάει τη διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών συστημάτων. Επιταχύνει την επιδερμική διαφοροποίηση.	CEBP

Κυτταρική ανάπτυξη, μεταβολισμός και πρωτεϊνική σύνθεση	Τα επίπεδα έκφρασης του MYC συσχετίζονται με το μέγεθος του σώματος λόγω της ρύθμισης του μεγέθους του κυττάρου και του αριθμού των κυττάρων.	Lactate dehydrogenase, CAD, ODC, ριβοσωμικές πρωτείνες, EIF4E, EIF2A
Κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση	Ο MYC οδηγεί στην ογκογένεση εν μέρει επιτρέποντας την μη εξαρτώμενη από την προσκόλληση, ανάπτυξη.	N-cadherin, integrins
Αγγειογένεση	Ο MYC προκαλεί αγγειογένεση σε ένα ευρύ φάσμα ιστών.	IL1β, miR-17-92 microRNA cluster, thrombospondin
ROS, σπασίματα DNA και χρωμοσωμική αστάθεια	Το MYC μπορεί να συμβάλει στην αστάθεια, να προκαλέσει συσσώρευση τελομερών και να αυξήσει την παραγωγή ROS.	MAD2, TOP1, BUBR1, cyclin B1, MT-MCI
Αυτοανανέωση ή/και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων	Η εκτοπική έκφραση του MYC μπορεί να ενισχύσει τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα.	Αναμένεται να προσδιοριστούν. Πιθανά γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την αθανатоποίηση, την προσκόλληση και τη μετανάστευση.
Μετασχηματισμός	Ο MYC μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση <i>in vivo</i> .	Πολλοί στόχοι πιστεύεται ότι συμβάλλουν στον μετασχηματισμό.

Πίνακας 1:

Βασικές κατηγορίες που εμπλέκεται ο μεταφραστικός παράγοντας MYC.

Απόπτωση:

Τα "εν δυνάμει" καρκινικά κύτταρα πρέπει να αποφεύγουν την απόπτωση προκειμένου να προκύψουν όγκοι. Η εξάπλωση των μετασχηματισμένων κυττάρων επιτυγχάνεται με αυξημένο δείκτη πολλαπλασιασμού και με μειωμένο αποπτωτικό ρυθμό. Πριν από 10

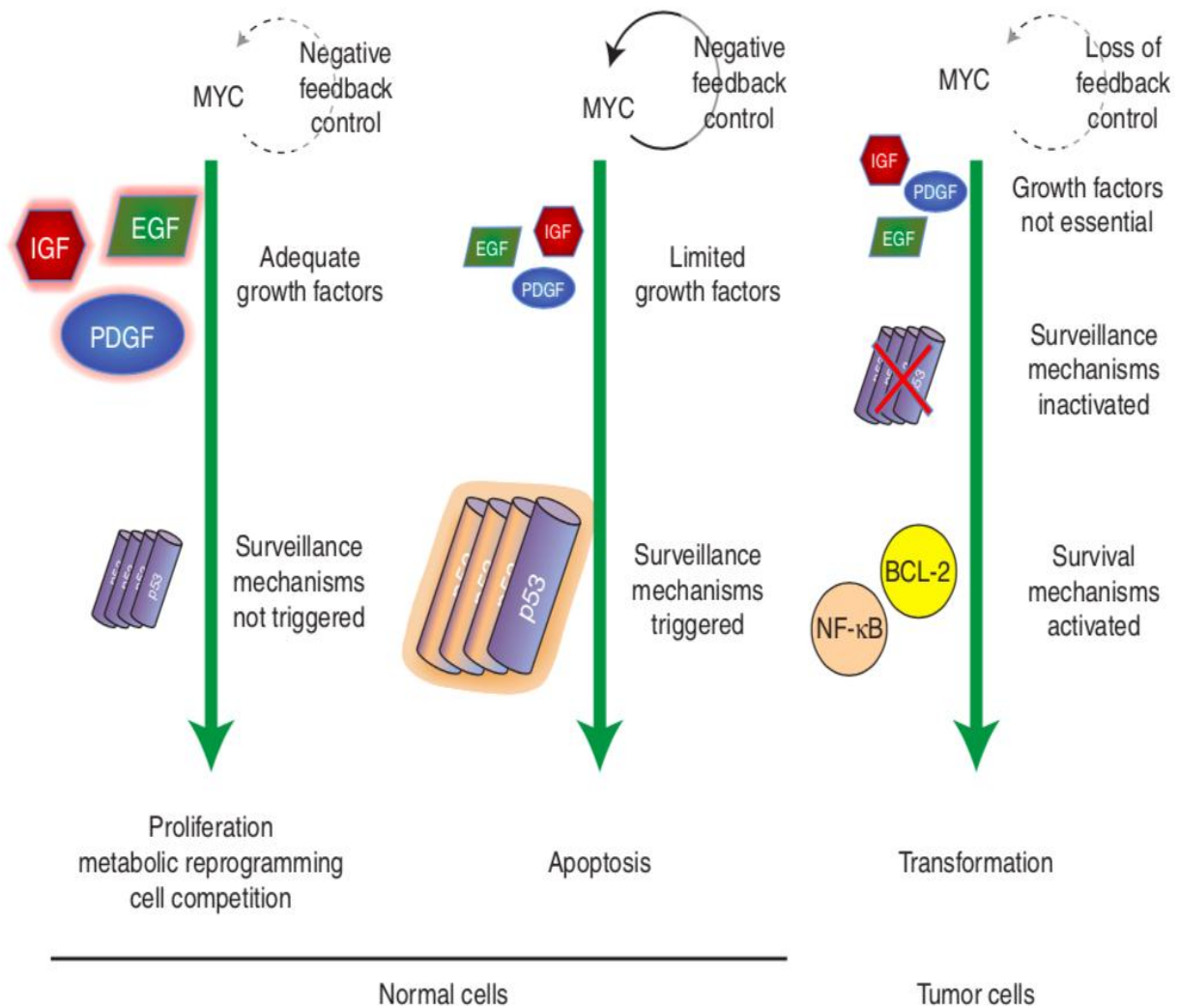
χρόνια, αρκετά εργαστήρια έκαναν μια ενδιαφέρουσα ανακάλυψη: οι ογκοπρωτεΐνες, όπως η c-MYC - ισχυρός επαγωγέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού - αποδείχθηκε ότι έχουν αποπτωτική δραστηριότητα. Φαίνεται πως η επαγωγή του κυτταρικού κύκλου ευαισθητοποιεί το κύτταρο στην απόπτωση: κυτταρικές πολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές οδοί συζεύγνυνται. Εντούτοις, η αποπτωτική οδός καταστέλλεται από αντι-αποπτωτικά σήματα που παρέχονται από κατάλληλους παράγοντες επιβίωσης. Οπότε, το αποτέλεσμα αυτών των αντιφατικών διαδικασιών θα εξαρτηθεί από τη διαθεσιμότητα των παραγόντων επιβίωσης (Stella Pelengaris and Mike Khan 2003).

Ενδεικτικά, η διέγερση της απόπτωσης από το c-MYC μπορεί να προκύψει μέσω συσσώρευσης αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) μέσω αναστολής του NF-κB, με συνέπειες, είτε την απόπτωση, είτε τη διακοπή ανάπτυξης του κυττάρου.

Η έκφραση του c-MYC ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε ένα ευρύ φάσμα προ-αποπτωτικών ερεθισμάτων - όπως η υποξία και η βλάβη του DNA - καθώς, επίσης, ενισχύει και την ευαισθησία στη σηματοδότηση, μέσω των υποδοχέων θανάτου CD95, TNF και TRAIL. Η πρώτη κατανόηση του ρόλου του c-MYCs στην απόπτωση προέκυψε από μελέτες που έδειξαν ότι το c-MYC θα μπορούσε να προκαλέσει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, κάτι που ευαισθητοποιεί τα κύτταρα να οδηγηθούν στην απόπτωση. Αφού απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c συνδέεται με μια άλλη πρωτεΐνη, που ονομάζεται παράγοντας αποπτωτικής πρωτεάσης ενεργοποίησης 1 (APAF-1), για τη δημιουργία του αποπτωσώματος, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την προκασπάση-9. Στη συνέχεια, η κασπάση-9 ενεργοποιεί έναν καταρράκτη από άλλες κασπάσες, γεγονός που οδηγεί στην αποσυναρμολόγηση και το θάνατο των κυττάρων (Stella Pelengaris and Mike Khan 2003).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 εμφανίστηκαν πρόσφατα ως θεμελιώδεις ρυθμιστές της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης (MOMP), που είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως οι Bcl-2 και Bcl-xL, βρίσκονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και καταστέλλουν την απόπτωση, παρεμποδίζοντας το MOMP, πιθανώς μέσω της δέσμησης του ενεργοποιημένου BAX (προαγωγέας της αποδέσμησης του κυτοχρώματος c) ή/και μέσω της σύνδεσης με το APAF-1, για να αποφευχθεί η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 (Εικόνα 5). Η ισορροπία των αντι- και προ-αποπτωτικών μορίων που υπάρχουν μέσα σε ένα ενεργοποιημένο c-MYC κύτταρο θα καθορίζει αν θα ζήσει ή θα πεθάνει. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που συνδέει

το c-MYC και την απόπτωση, είναι η έμμεση ενεργοποίηση του P53 μέσω του ARF. Είναι σαφές ότι ο μηχανισμός απόπτωσης που προκαλείται από MYC εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, καθώς και από θέση του ιστού και, επιπλέον, μπορεί να τροποποιείται από την παρουσία ή απουσία επιπλέον μεταλλάξεων σε άλλα προ- και αντι-αποπτωτικά γονίδια (Stella Pelengaris and Mike Khan 2003).



Εικόνα 5

Αποπτωτικές οδοί σηματοδότησης σε φυσιολογικά και κακοήθη κύτταρα. Οι θεμελιώδεις διαφορές στις οδούς σηματοδότησης που συνδέονται με τον MYC, διακρίνουν φυσιολογικά και κακοήθη κύτταρα (Αριστερά). Σε φυσιολογικά κύτταρα των οποίων το περιβάλλον έχει επαρκή θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες, δεν ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιτήρησης,

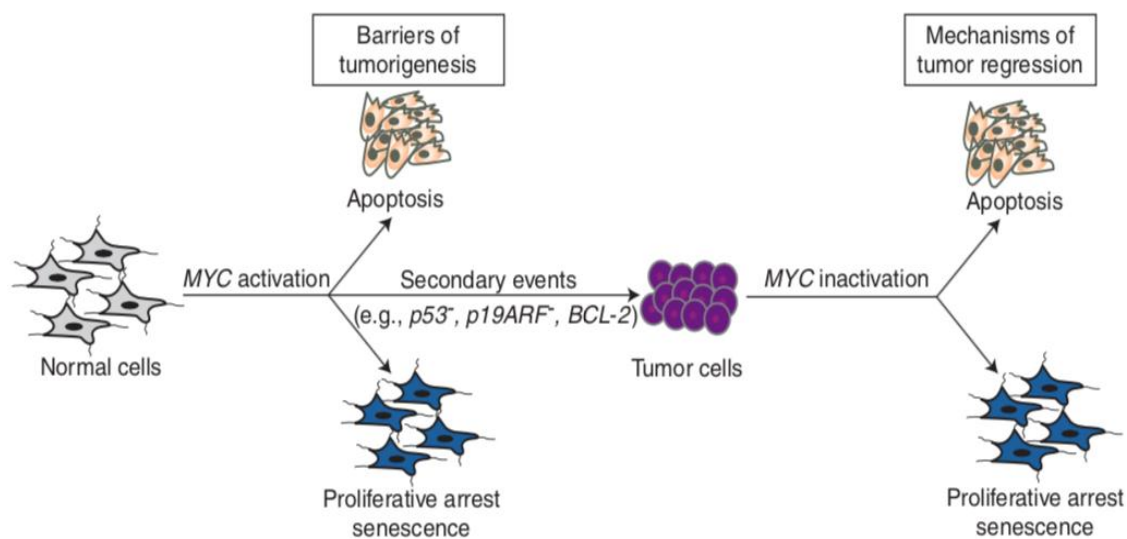
όπως η ενεργοποίηση του p53. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην έλλειψη ροής μονοπατιών σηματοδότησης στρες και, εν μέρει, στην αρνητική αυτορρύθμιση που δεν επιτρέπει στα αυξημένα επίπεδα του MYC να ενεργοποιήσουν περαιτέρω την έκφραση του MYC. Η έκφραση MYC μπορεί να ενεργοποιήσει την οδό ογκογονικού στρες που σηματοδοτεί μέσω της οδού p14ARF/MDM2 για να διεγείρει την μεσολαβούμενη από την p53 απόπτωση. Ωστόσο, τα επίπεδα MYC σε φυσιολογικά κύτταρα συνήθως δεν φθάνουν σε αρκετά υψηλά επίπεδα, ώστε να ενεργοποιήσουν τον καταστολέα όγκου p14ARF (Κέντρο). Όταν οι αυξητικοί παράγοντες είναι περιοριστικοί, τα κύτταρα με υψηλά επίπεδα MYC βιώνουν ενεργοποίηση μηχανισμών επιτήρησης, όπως επαγωγή p53. Αυτές οι αλλαγές καταλήγουν τελικά σε απόπτωση, ως μέσο εξάλειψης των αρχικών καρκινικών κυττάρων από τον οργανισμό (Δεξιά). Τα κύτταρα όγκου έχουν αυξημένο MYC γενικά ως αποτέλεσμα χρωμοσωμικής μετατόπισης, ενίσχυσης γονιδίου MYC, ή αυξημένης σηματοδοσίας WNT. Με την απώλεια των μηχανισμών επιτήρησης (π.χ. μετάλλαξη p14ARF ή p53, υπερέκφραση MDM2) ή/και με αύξηση των σημάτων προ-επιβίωσης (π.χ. μεταβολές της οδού BCL-2 και NF-kB), τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να ανεχθούν τα αυξημένα επίπεδα του παράγοντα MYC και να αποφύγουν την απόπτωση (Steven B. McMahon et al., 2014).

Συμβολή του παράγοντα MYC στην ογκογένεση

Το MYC είναι ένα από τα πιο ισχυρά ογκογονίδια, όπως παρατηρήθηκε με πολλές *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες κυτταρικού μετασχηματισμού. Ωστόσο, μόνο η ενεργοποίηση του MYC δεν μπορεί να προκαλέσει ογκογένεση. Πράγματι, όταν παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι το MYC προκάλεσε νεοπλασματικό "μετασχηματισμό", αυτό ανιχνεύθηκε μόνο σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές που θεωρήθηκαν ότι έχουν αποκτήσει και άλλες γενετικές τροποποιήσεις. Επομένως, αν και είναι ένα από τα συνηθέστερα ενεργοποιημένα ογκογονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση των ανθρώπινων καρκίνων, η υπερέκφραση MYC μόνο, είναι εκπληκτικά ανίκανη να επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή νεοπλασματικό μετασχηματισμό των περισσότερων φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων (Gabay et al., 2014).

Η υπερέκφραση MYC έχει παρατηρηθεί να ενισχύει την αντιγραφή του DNA και την είσοδο στη φάση S. Πράγματι, ο παράγοντας MYC αποτελεί μέρος του συμπλέγματος διπλασιασμού. Ωστόσο, από μόνος του ο παράγοντας MYC δεν μπορεί να προκαλέσει μιτωτική κυτταρική διαίρεση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο MYC προκαλεί την ανάπτυξη και τον διπλασιασμό του DNA σε φυσιολογικά κύτταρα, αλλά δεν μπορούν να διπλασιαστούν. Αντίθετα, αυτά τα κύτταρα γίνονται πολυπλοειδή. Επιπλέον, η υπερέκφραση του MYC μπορεί να επιβάλει την αναπαραγωγή, με τρόπο που έχει ως αποτέλεσμα σπασίματα στο DNA. Αυτό φαίνεται να είναι συνέπεια πολλών μηχανισμών. Ο MYC μπορεί να μπλοκάρει άμεσα την επιδιόρθωση της διπλής έλικας του DNA ή/και να αυξήσει την οξειδωτική βλάβη, προκαλώντας βλάβη στο DNA. Έτσι, η απορρύθμιση του MYC από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη κυτταρική διαίρεση (Gabay et al., 2014).

Οι συνέπειες της υπερέκφρασης του MYC σε ένα φυσιολογικό κύτταρο εξαρτώνται επίσης από επιγενετικά και γενετικά πλαίσια. Η υπερέκφραση του MYC στο εμβρυϊκό ήπαρ προκαλεί κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ σε ήπαρ ενήλικα προάγει την κυτταρική ανάπτυξη χωρίς μιτωτική διαίρεση που σχετίζεται με την πολυπλοϊδία. Φαίνεται, επίσης, ότι η απώλεια του καταστολέα όγκου p53 συνεργάζεται με τον MYC για την πρόκληση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ογκογένεσης σε ενήλικα ηπατοκύτταρα. Έτσι, το κυτταρικό πλαίσιο και οι ειδικές γενετικές ανωμαλίες, μπορούν να επιτρέψουν στον MYC να διεγείρει ευκολότερα τον πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση (Gabay et al., 2014).



Εικόνα 6

Η έναρξη και η συντήρηση του καρκίνου που προκαλείται από το MYC. Ο MYC προκαλεί ογκογένεση, με την αποφυγή πολλαπλών μηχανισμών ελέγχου καταστολέων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και/ή της γήρανσης. Στην καταστολή του MYC, αυτά τα εμπόδια αποκαθίστανται, επιτρέποντας τη συνεχή υποχώρηση του όγκου (Gabay et al., 2014).

Είναι γνωστό, πλέον, ότι ο MYC συνεργάζεται με πολλά άλλα ογκογονικά συμβάντα για την έναρξη της ογκογένεσης. Πολλά ογκογονίδια που καταργούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και που είναι κρίσιμα για τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της αποπτώσεως, ή/και της γήρανσης, συχνά συνεργάζονται με τον MYC για να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό, καθώς και μετασχηματισμό. Τα παραδείγματα περιλαμβάνουν την υπερέκφραση του BCL-2, την απώλεια του p53, ή την απώλεια του p19ARF (Εικόνα 6). Είναι πλέον γνωστό ότι τα φυσιολογικά κύτταρα παρουσιάζουν πολλαπλούς "ενδογενείς" μηχανισμούς καταστολής όγκων που προλαμβάνουν κακοήγη μετασχηματισμό από μεμονωμένα ογκογονίδια, όπως το MYC (Gabay et al., 2014).

Η εξέταση των συνεπειών της ενεργοποίησης του MYC με τη χρήση *in vivo* μοντέλων, έχει εντοπίσει μηχανισμούς που επηρεάζουν την ικανότητα του MYC να οδηγεί σε ογκογένεση.

Έτσι, οι τοξίνες ή τα καρκινογόνα που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μπορούν να συνεργάζονται με τον MYC για να επάγουν ογκογένεση. Ομοίως, αυτοκρινείς μηχανισμοί που εμπλέκουν την έκφραση του παράγοντα μετασχηματισμού ανάπτυξης –α, καθώς και άλλων κυτταροκινών, είναι κρίσιμοι στην έναρξη και τη συντήρηση του όγκου. Τόσο η έμφυτη ανοσία, όσο και οι άμεσες αυτοκρινείς επιδράσεις, συμβάλλουν στην καταστολή της ογκογένεσης. Οι μεταβολές στο μικροπεριβάλλον μπορούν να δημιουργήσουν μια κατάσταση που είναι γενικότερα επιτρεπτή για την ογκογένεση. Έτσι, το τοπικό μικροπεριβάλλον μπορεί, επίσης, να συμβάλει στην ευαισθησία από την επαγόμενη από τον MYC νεοπλασία (Gabay et al., 2014).

Καταστολή του παράγοντα MYC - Αναστολή της ογκογένεσης

Από έρευνες φαίνεται πως μία σύντομη καταστολή δύο ημερών, ή μερική μείωση (υποδιπλασιασμός) του MYC, μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη υποχώρηση του όγκου. Η σύντομη καταστολή του MYC σχετίζεται με μία μη αναστρέψιμη αλλαγή στο κυτταρικό προγραμματισμό και, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι όγκοι δεν μπορούν να επανεμφανιστούν στην επανενεργοποίηση του MYC (Jain et al., 2002). Παρομοίως, ο υποδιπλασιασμός του επιπέδου του MYC ήταν επαρκής για να προκαλέσει υποχώρηση του όγκου (Shachaf and Felsner 2005). Αυτός ο φαινότυπος εμφανίζεται στο λέμφωμα και στο οστεοσάρκωμα (Jain et al., 2002, Giuriato et al., 2006) και όχι στους επιθηλιακούς όγκους, όπως ο ηπατοκυτταρικός, ή το καρκίνωμα του μαστού (Boxer et al., 2004, Shachaf et al., 2004). Σε οστεογονικό σάρκωμα, η καταστολή του MYC έχει ως αποτέλεσμα τελική κυτταρική διαφοροποίηση από οστεοβλάστες σε διαφοροποιημένα οστεοκύτταρα (τα οποία σχετίζονται με τον σχηματισμό οστού *in vivo*) (Jain et al., 2002).

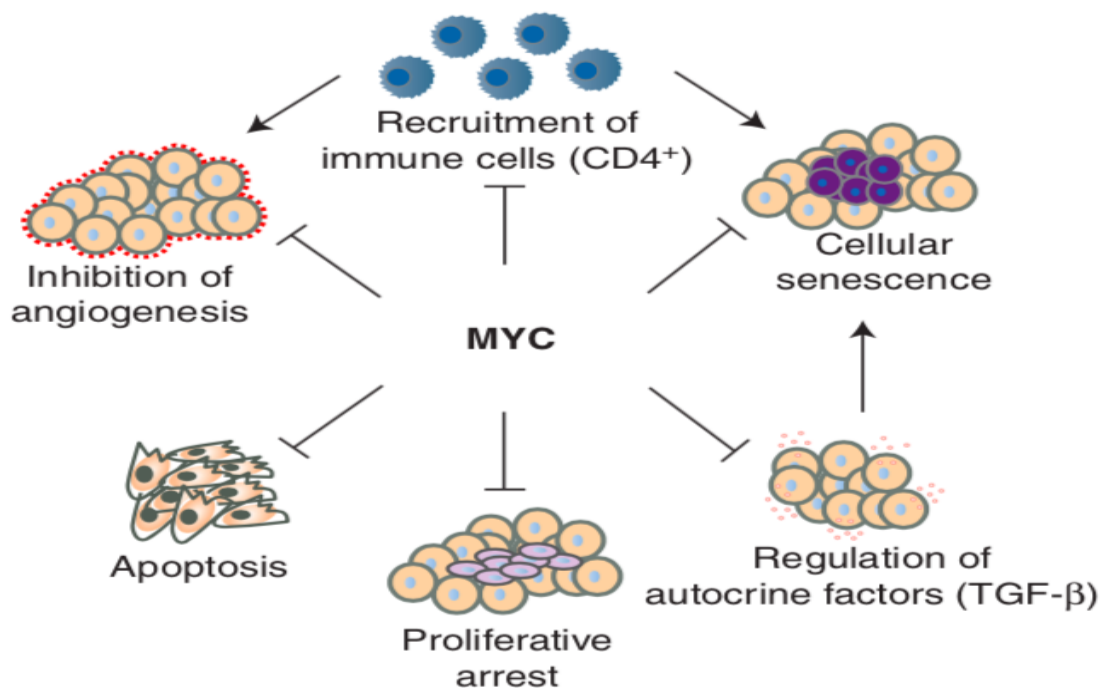
Η ανάλυση με Microarrays αποκάλυψε ότι η καταστολή του MYC σχετίζεται με μη αναστρέψιμες μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση, ως αποτέλεσμα της ανικανότητας του MYC να δεσμεύεται στους υποκινητές γονιδίων. Συγκεκριμένα, η καταστολή του MYC έχει ως αποτέλεσμα τη μόνιμη διακοπή των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση ριβοσώματος και τη σύνθεση πρωτεϊνών (Wu et al., 2008, van Riggelen et al., 2010).

Μερική καταστολή του MYC μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε παρατεταμένη οπισθοχώρηση του όγκου. Συγκεκριμένα, σε αυτή την περίπτωση, τα επίπεδα του MYC ήταν χαμηλότερα από εκείνα των κυτταρικών σειρών που προέρχονται από ανθρώπινο όγκο και, πάνω από αυτό, των πολλαπλασιασμένων φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων ή των μετασχηματισμένων λεμφοκυττάρων του ιού Epstein-Barr (Shachaf et al., 2008). Επομένως, φαίνεται να υπάρχει κατώφλι στο επίπεδο του MYC που απαιτείται για τη διατήρηση ενός κακοήθους φαινοτύπου (Shachaf et al., 2008). Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μια γενικότερη αλλαγή στη βιογένεση πρωτεϊνών, κάτι το οποίο είναι σημαντικό στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η καταστολή του MYC οδηγεί σε υποχώρηση του όγκου (Ruggero και Pandolfi 2003).

Η ενεργοποίηση του MYC σχετίζεται, επίσης, με τις γενικότερες μεταβολές στον ενεργειακό μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να κάνουν τους όγκους ιδιαίτερα ευαίσθητους στην αναστολή των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τον ενεργειακό μεταβολισμό (Dang et al., 2009, O'Shea και Ayer 2013). Ως εκ τούτου, η απορρύθμιση του

MYC που παρατηρείται σε πολλά καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε τουλάχιστον εν μέρει να σχετίζεται με οξείες αλλαγές στο μεταβολισμό. Η καταστολή του MYC μπορεί να προκαλέσει οπισθοχώρηση του όγκου, μέσω της διατάραξης της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να διατηρούν σταθερό τον μεταβολισμό τους, που είναι απαραίτητο για την επιβίωση, αλλά και μέσω άμεσης σήμανσης θανάτου (Dang 2013 O'Shea και Ayer 2013, Morrish και Hockenbery 2014).

Μία σημαντική συνέπεια αυτών των αποτελεσμάτων είναι ότι μπορεί να αρκεί η μερική ή/και σύντομη καταστολή της έκφρασης του MYC σε τουλάχιστον ορισμένους τύπους όγκου για να επέλθει μία σταθερή κλινική επίδραση στην ανθρώπινη ασθένεια (Εικόνα 7). Το ότι μία παροδική αναστολή του MYC είναι αποτελεσματική, μπορεί να οφείλεται και στην 'εξάρτηση' των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον MYC σε μοριακά μονοπάτια που υπαγορεύονται αμέσως μετά την απενεργοποίηση των ογκογονιδίων (Tran et al., 2011). Έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή φαίνεται να είναι κρίσιμο για την οπισθοχώρηση του όγκου κατά την απομάκρυνση του MYC.



Εικόνα 7

Η απενεργοποίηση του MYC προκαλεί οπισθοχώρηση του όγκου, τόσο μέσω κυτταρικού-αυτόνομου, όσο και μη κυτταρικού-αυτόνομου μηχανισμού. Η ενεργοποίηση του MYC οδηγεί σε ογκογένεση μέσω της καταστολής των κρίσιμων διασφαλίσεων, όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η γήρανση. Η ενεργοποίηση του MYC οδηγεί, επίσης, σε αλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα (Meital Gabay et al., 2014).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, λοιπόν, υπάρχουν πολλοί λόγοι να πιστεύουμε ότι η γενική στρατηγική για την παρεμπόδιση του Myc είναι εύλογη και ελκυστική και ότι τα πιθανά οφέλη για την επιδίωξη αυτής της προσέγγισης αντισταθμίζουν τις ανησυχίες και τα μειονεκτήματα. Τα κύρια επιχειρήματα για ανάπτυξη θεραπείας βασισμένης στον MYC αναλύονται παρακάτω:

Πρώτον, παρά τη γενική έλλειψη σε μεταλλάξεις που εμφανίζει η πρωτεΐνη Myc, οι περισσότεροι όγκοι είναι Myc εξαρτώμενοι. Για παράδειγμα, σε μια πρόσφατη έρευνα πάνω από 20 ανθρώπινων καρκίνων, η σύντομη απαλοιφή του MYC οδήγησε σε μία μόνιμη πολλαπλασιαστική παύση σε κάθε περίπτωση που εξετάστηκε (Wang et al., 2008). Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, τα ευρήματα που ελήφθησαν με μοντέλα *in vivo* υποδεικνύουν ότι η συνεχής έκφραση Myc είναι απαραίτητη για να υποστηρίξει τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα του όγκου (Felshler 2004, Jain et al., 2002) και ότι, τουλάχιστον σε μερικές περιπτώσεις, η αποκατάστασή του μπορεί στην πραγματικότητα να οδηγήσει σε μια φαινομενικά παράδοξη απόκριση στην απόπτωση. Ωστόσο, αυτό το εύρημα δεν είναι καθολικό και ορισμένοι τύποι των όγκων φαίνεται να χάνουν την εξάρτησή τους από την απορρυθμισμένη Myc (Boxer et al., 2004, Karlsoon et al., 2003). Ωστόσο, σε καμία από αυτές τις περιπτώσεις δεν έχει διαπιστωθεί η έλλειψη εξάρτησης από την ενδογενή πρωτεΐνη Myc. Συνολικά, αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν ότι σε κάποιο επίπεδο η αναστολή της Myc είναι πιθανό να αναστέλλει την πρόοδο του όγκου ή/και την επιβίωση.

Δεύτερον, η έκφραση Myc από φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να μην περιορίζει αναγκαστικά τη χρήση θεραπειών. Σε κάθε δεδομένη στιγμή, τα περισσότερα κανονικά κύτταρα είναι αδρανή και εκφράζουν ελάχιστα τον παράγοντα Myc, έτσι θεωρείται ότι μπορεί να μην υπόκεινται στις επιδράσεις των αναστολέων του Myc. Σε ολόκληρο το επίπεδο του οργανισμού, αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι οι τοξικότητα τέτοιων θεραπειών μιμούνται εκείνες των πιο τυποποιημένων, μη στοχευμένων παραγόντων και περιλαμβάνουν κυρίως

αιματοποιητικές και γαστρεντερικές επιδράσεις. Σύμφωνα με αυτή την ιδέα βρίσκουν τα ευρήματα των Soucek et al., οι οποίοι κατέστειλαν το ενδογενές Myc σε διαγονιδιακούς ποντικούς, που είχαν υποστεί μηχανική επεξεργασία για να αναπτύξουν K-ras^{G12D}-κατευθυνόμενο αδένωμα πνεύμονα (Soucek et al., 2008). Παρόλο που η αναμενόμενη πανκυτταροπενία, η επιδερμική αραίωση και η εντόστια φθορά εμφανίστηκαν αρκετά γρήγορα, τα αποτελέσματα αυτά ήταν αρκετά ανεκτά, δεν συνδέονταν με εμφανή τοξικότητα και, σε μεγάλο βαθμό, αντιστράφηκαν. Απροσδόκητα, τα ποντίκια εμφάνισαν μειωμένη συχνότητα αδενωμάτων, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι η αναστολή του MYC προκαλεί σχεδόν καθολική πολλαπλασιαστική παύση (Baaron et al., 2001, Wang et al., 2007).

Τρίτον, η παλαιότερη αντίληψη ότι οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μπορεί να είναι ανθεκτικές σε αναστολές μικρών μορίων, έχει σταδιακά απορριφθεί. Πράγματι, απλές υποκαταστάσεις αμινοξέων στην περιοχή διμερισμού του bHLH-ZIP του Myc θα μπορούσαν να εμποδίσουν την αλληλεπίδρασή του με το Max και να καταργήσουν την ενεργοποίηση της μεταγραφικής λειτουργίας, αλλά και τις άλλες ιδιότητες του MYC (Smith et al., 1990, Bello-Fernandez et al., 1993). Περαιτέρω θετικά αποτελέσματα για την επιτυχία των μικρών μορίων στην αναστολή του MYC, παρέχονται από τη διακοπή των αλληλεπιδράσεων TP53-HDM2 με νούτλινς 10 και την αναστολή των Bcl-2, Bcl-XL και Bcl-w από μιμητικά μικρά μόρια BH3 όπως το ABT-737 (Oltersdorf et al., 2005, Fendri et al., 2011).

Στρατηγικές για αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα

c-MYC

Για τη στόχευση του Myc έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές, τόσο άμεσες, όσο και έμμεσες. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην αξιοποίηση πολλαπλών ρυθμιστικών μηχανισμών του, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής του MYC και της σταθερότητας του mRNA, της σταθερότητας και της αποδόμησης της πρωτεΐνης Myc, καθώς και της δέσμευσης Myc σε άλλες πρωτεΐνες. Ορισμένες από αυτές τις προσεγγίσεις έχουν δώσει πρωτότυπους αναστολείς που έχουν εισαχθεί σε πρώιμες κλινικές δοκιμές (Jonathan R. Whitfiel et al., 2017). Παραδείγματα περιλαμβάνουν αναστολείς μεταγραφής MYC με άμεσους σταθεροποιητές G-quadruplex, αντιπαράλληλα ολιγονουκλεοτίδια που προκαλούν αποικοδόμηση του MYC mRNA, μη λειτουργική συρραφή του προ-mRNA του MYC, ή αναστολή μετάφρασης, καθώς και μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (Cheryl M. Koh et al., 2016, Jonathan R. Whitfiel et al., 2017). Έμμεση καταστολή του MYC μπορεί να επιτευχθεί, επίσης, μέσω αναστολής των ρυθμιστών της σταθερότητας και του κύκλου της πρωτεΐνης του Myc (π.χ. GSK3, Ras / Raf / MAPK, PP2A, FBW7, SKP2, hTERT), μέσω αναστολής των οδών που εμπλέκονται στη διαδικασία μετάφρασης του Myc (π.χ. MAPK, mTORC1 και FOXO3a), αλλά και αναστολέων της ανασύνδεσης της χρωματίνης και της μεταγραφής των πρωτεϊνών βρωμοδιαμίνης BET (Guillaume Andrieu et al., 2016). Στην τελευταία κατηγορία, η JQ1 ήταν η πρώτη αναφερθείσα ένωση που αναστέλλει το συνδεδεμένο με Myc ένζυμο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης Brd4 (Xiaoou Shi et al., 2018) , ακολουθούμενο από νέους αναστολείς BET, όπως το ZEN-3694, που εισήχθηκε σε κλινικές δοκιμές και κατέδειξε αποτελεσματικότητα σε μια ποικιλία συμπαγών όγκων και αιματολογικές κακοήθειες, και πιο πρόσφατα OTX015 (Céline Berthon et al., 2016) και TEN-010. Η έμμεση καταστολή της μεταγραφής του MYC και της αποσταθεροποίησης της πρωτεΐνης Myc στο ανθρώπινο λεμφικό Burkitt έχει επιτευχθεί πρόσφατα, με στόχευση του άξονα του Myc-HSP90 με αναστολείς HSP90 (δηλ., 17-AAG ή 17-DMAG) (Candace J. Poole et al., 2018). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί έμμεσες συνθετικά θανατηφόρες προσεγγίσεις. Η συνθετικά θανατηφόρος ένωση διυδροαρτεμισίνη βρέθηκε να ενεργοποιεί την Ser/Thr κινάση GSK3β, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και αποσταθεροποιεί την Myc (Jin-Jian Lu et al., 2010).

Στόχευση του παράγοντα MYC μέσω αναστολής της μεταγραφής:

Το BRD4 μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή μέσω της πρόσληψης του παράγοντα επιμήκυνσης θετικής μεταγραφής b (P-TEFb), ο οποίος φωσφορυλιώνει την καρβοξυτελική περιοχή της RNA πολυμεράσης II (pol II) στη θέση της υπερακετυλιωμένης χρωματίνης (Zhiyuan Yang et al., 2005).

Αυτές οι μεταβολές οδηγούν στην απελευθέρωση της RNA pol II από την παύση στην περιοχή του υποκινητή, με αποτέλεσμα τελικά την μεταγραφική επιμήκυνση (Matija Peterlin et al., 2006). Η μεταγραφή του MYC βρίσκεται υπό ρύθμιση BRD4. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο JQ1, ένας ισχυρός αναστολέας του BRD4, ανταγωνίζεται το BRD4 για δέσμευση με ακετυλιωμένες λυσίνες και εκτοπίζει το BRD4 από τους παράγοντες στο ογκογονίδιο MYC (Jake E. Delmore et al., 2011, Panagis Filippakopoulos et al., 2010).

Έτσι, η αναστολή της BET με JQ1 έδειξε ισχυρά αντικαρκινικά αποτελέσματα αμφότερα *in vitro* και *in vivo* σε πολλαπλούς αιματοποιητικούς καρκίνους και παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (PDAC) που εμφανίζουν υπερέκφραση C-MYC (Mark A. Dawson et al., 2013, Pawel K Mazur et al., 2015). Τα νευροβλαστώματα και άλλοι καρκίνοι που οδηγούνται από MYCN είναι επίσης ευαίσθητοι σε αναστολείς BET. Ο GSK525762, ένας ειδικός αναστολέας BET, βρίσκεται σε αρχικές φάσεις κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία αυτών των αιματοποιητικών κακοηθειών και συμπαγών όγκων (ClinicalTrials.gov: NCT01943851, NCT03266159).

Σε αντίθεση με τις κλασσικές κυκλοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs) κυτταρικού κύκλου, οι οποίες είναι ευρέως υπεύθυνες για την μετάπτωση κυτταρικού κύκλου, τα CDK7 και CDK9 είναι CDKs που έχουν κρίσιμους ρόλους στην έναρξη και την επιμήκυνση της μεταγραφής. Η CDK7 είναι μια καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου μεταγραφικού παράγοντα ΠΗ (TFIIH) και η CDK9 είναι μια υπομονάδα κινάσης του P-TEFb. Αυτές οι δύο μεταγραφικές κινάσες φωσφορυλιώνουν συγκεκριμένα υπολείμματα σερίνης εντός του καρβοξυτελικού πεδίου του Pol II, διευκολύνοντας την αποτελεσματική έναρξη της μεταγραφής, την ελευθέρωση παύσης και την επιμήκυνση. Πολυάριθμες μελέτες αποδεικνύουν ότι η αναστολή των μεταγραφικών CDKs επηρεάζει κυρίως τη συσσώρευση των μεταγραφών που είναι κρίσιμοι για τον έλεγχο της ταυτότητας, της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Hui Chen et al., 2017).

Ένα γενικό χαρακτηριστικό της απορρύθμισης του MYC είναι η μεταγραφική ρύθμισή του από τους Super-Enhancers (SEs), συστάδες ενισχυτών που πυκνοκαταλύονται από παράγοντες μεταγραφής και ρυθμιστές χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένων των CDK7 και CDK9, καθιστώντας αυτήν την ομάδα κινασών ιδανικές υποψήφιες για την αναστολή του Myc. Η αναστολή των CDK7 και / ή CDK9 μειώνει ουσιαστικά την έκφραση του MYC, που συνοδεύει την εκτεταμένη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων στόχων Myc (Garcia-Cuellar et al., 2014). Η χορήγηση ειδικών αναστολέων έναντι CDK7 (THZ1) ή/και H CDK9 (PC585) προκάλεσε ισχυρά αντινεοπλασματικά αποτελέσματα σε T-λεμφοκυττάρων που υπερεκφράζουν τον MYC- οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, σε λευχαιμία ανάμικτης γενεάς, σε νευροβλαστωμάτα και σε καρκίνο του πνεύμονα (Nicholas Kwiatkowski et al., 2014).

Στόχευση του παράγοντα MYC μέσω αναστολής της μεταγραφής.

Το 2003, οι Yin et al. (Xiaoying Yin et al., 2003) χρησιμοποίησαν το σύστημα διπλής υβριδικής ζύμης για τη διαλογή 10.000 ενώσεων από την συνδυαστική βιβλιοθήκη Chembridge DIVERSet και προσδιόρισαν επτά αναστολείς χαμηλού μοριακού βάρους που παρεμπόδιζαν την αλληλεπίδραση Myc-Max στη διεπαφή στο HLHLZ και δεν καταδεικνύουν σημαντική κυτταρική τοξικότητα. Συγκεκριμένα, τρεις ενώσεις - 10058-F4, 10074-G5 και 10074-A4 - κατέδειξαν πλήρη εξειδίκευση προς το Myc-Max σύμπλεγμα. Αυτές οι ενώσεις αναστέλλουν συγκεκριμένα τη μεταγραφική δραστηριότητα Myc και μειώνουν την κυτταρική ανάπτυξη MYC-μετασηματισμένων ινοβλαστών αρουραίου.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας CPEB αποτελούν πρωτεΐνες που δεσμεύονται ειδικά σε αλληλουχίες RNA και ελέγχουν την επιμήκυνση της πολυ (A) ουράς και της επαγόμενης από πολυαδενυλίωσης μετάφρασης (Gonzalo Fernández-Miranda et al., 2012). Το CPEB δεσμεύει το στοιχείο πολυαδενυλίωσης κυτταροπλάσματος (CPE) που περιέχει την διατηρημένη αλληλουχία UUUUAU ή UUUUAAU τα 3'-UTRs των ανταποκρινόμενων mRNAs (Gonzalo Fernández-Miranda et al., 2012). Μια πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι το mRNA του c-MYC περιέχει CPEs που μπορούν να αναγνωριστούν από CPEB.41 Μηχανιστικά, το CPEB προσλαμβάνει Caf1 deadenylase μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Tob και αναστέλλει την έκφραση του c-Myc μέσω αποαδενυλίωσης και αποσύνθεσης του mRNA. Η έκφραση πρωτεϊνών της οικογένειας CPEB συχνά περιορίζεται

σε καρκίνους του ανθρώπου. Συνεπώς, οι φαρμακολογικές προσεγγίσεις που στοχεύουν στην επανενεργοποίηση της έκφρασης CPEB, θα οδηγούσαν σε αναστολή Myc σε καρκίνους που είναι MYC-εξαρτώμενοι.

Επιπλέον, έχειδειχτεί ότι η φαρμακολογική αναστολή της οδού PI3K / AKT / mTOR μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του Myc και εμφάνισε αξιοσημείωτη θεραπευτική αποτελεσματικότητα σε καρκίνους που είναι MYC-εξαρτώμενοι, όπως στο νευροβλάστωμα, στο καρκίνωμα του πνεύμονα, στον καρκίνο του μαστού και σε πολλαπλούς αιματοποιητικούς καρκίνους. Η οδός 3-κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) / AKT / mTOR συχνά μεταβάλλεται σε διάφορους καρκίνους (Bjornsti and Houghton et al., 2004).

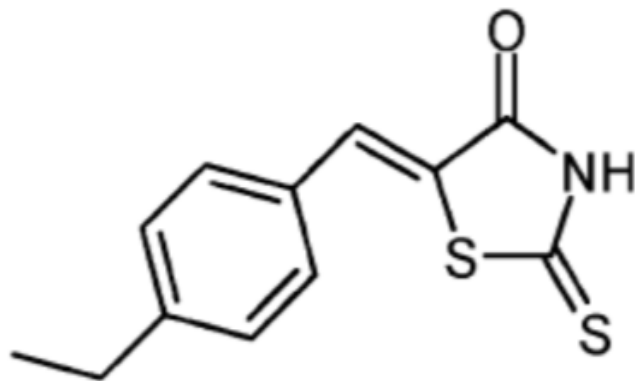
Άμεσοι αναστολείς αλληλεπίδρασης Myc-Max

Ο πρώτος αναφερόμενος αναστολέας της αλληλεπίδρασης Myc-Max, ΠΑ6B17, αναγνωρίστηκε από τους Berg et al. (2002) (Thorsten Berg et al., 2002) από μια βιβλιοθήκη περίπου 7000 πεπτιδομιμητικών ενώσεων που είχαν υποβληθεί σε διαλογή *in vitro* χρησιμοποιώντας την τεχνική μεταφοράς ενέργειας φθορισμού συντονισμού (FRET). Δυστυχώς, το ΠΑ6B17 αναστέλλει επίσης τον μετασχηματισμό που επάγεται από τον Jun, έναν σχετικό μεταγραφικό παράγοντα (bZip), γεγονός που υποδηλώνει έλλειψη εξειδίκευσης. Αυτή, μαζί με άλλες παρατηρήσεις, περιόρισαν την προοπτική του ΠΑ6B17 ως υποψήφιου φαρμάκου.

Το sAJM589 είναι ένα νέο, μικρό μόριο, αναστολέας του Myc, που αναγνωρίστηκε από τους Choi et al. (2017) (Seung H Choi et al., 2017). Το sAJM589 είναι ένας ισχυρός διαταράκτης του διμερισμού Myc-Max, ένας αναστολέας αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (PPI), με IC₅₀ 1,8 μM, 25 φορές ισχυρότερο από 10058-F4 (έπειτα από ανάλυση με προσδιορισμό PCA).

Μία ομάδα ερευνητών χρησιμοποίησε το μικρό μόριο αναστολέα του c-Myc, το 10058-F4 (Εικόνα 8), για να ελέγξει τα αποτελέσματα σε κύτταρα οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (ΟΜΛ). Το μόριο 10058-F4 εμπόδισε τη δέσμευση των διμερών c-Myc / Max στους στόχους του DNA, ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό λευχαιμίας και προκάλεσε την απόπτωση μέσω μιτοχondριακής οδού. Το 10058-F4 προκάλεσε επίσης μυελοειδή διαφοροποίηση των κυττάρων ΟΜΛ, πιθανώς μέσω διαμόρφωσης ειδικών παραγόντων μεταγραφής (Huang et

al., 2006). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως ο αναστολέας του c-Myc μπορεί να αντιπροσωπεύσει μια νέα θεραπεία για την οξεία μυελοειδή λευχαιμία.



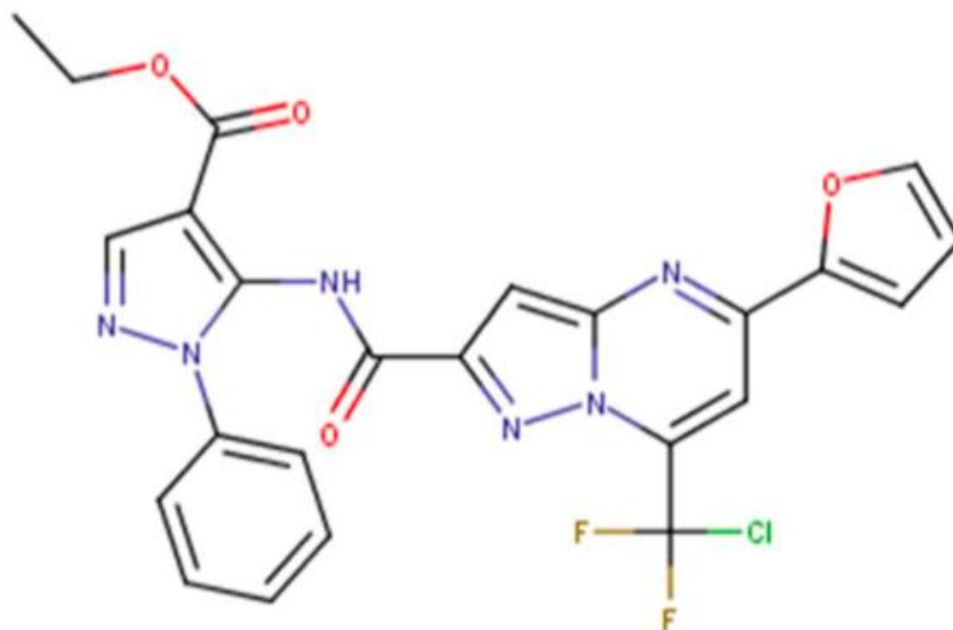
10058-F4

Εικόνα 8

Δομή της ένωσης 10058-F4.

Ένας ακόμα αναστολέας του Myc-Max συμπλόκου, ο Mycro3 (Εικόνα 9) έδειξε βελτιωμένη φαρμακοκινητική, βιοδιαθεσιμότητα και συνολική *in vivo* δραστηριότητα και απέδειξε αποτελεσματικότητα σε μοντέλα ποντικού παγκρέατος και μαστού. Συγκεκριμένα, το Mycro3 αναστέλλει ισχυρά τον εξαρτώμενο από τον Myc πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος U-20S (μείωση κατά 70%), ενώ δεν έχει επίδραση στη κυτταρική σειρά PC-12 όπου έχει απαλοιφή του Max (Carabet et al., 2018).

Mycro3



Εικόνα 9

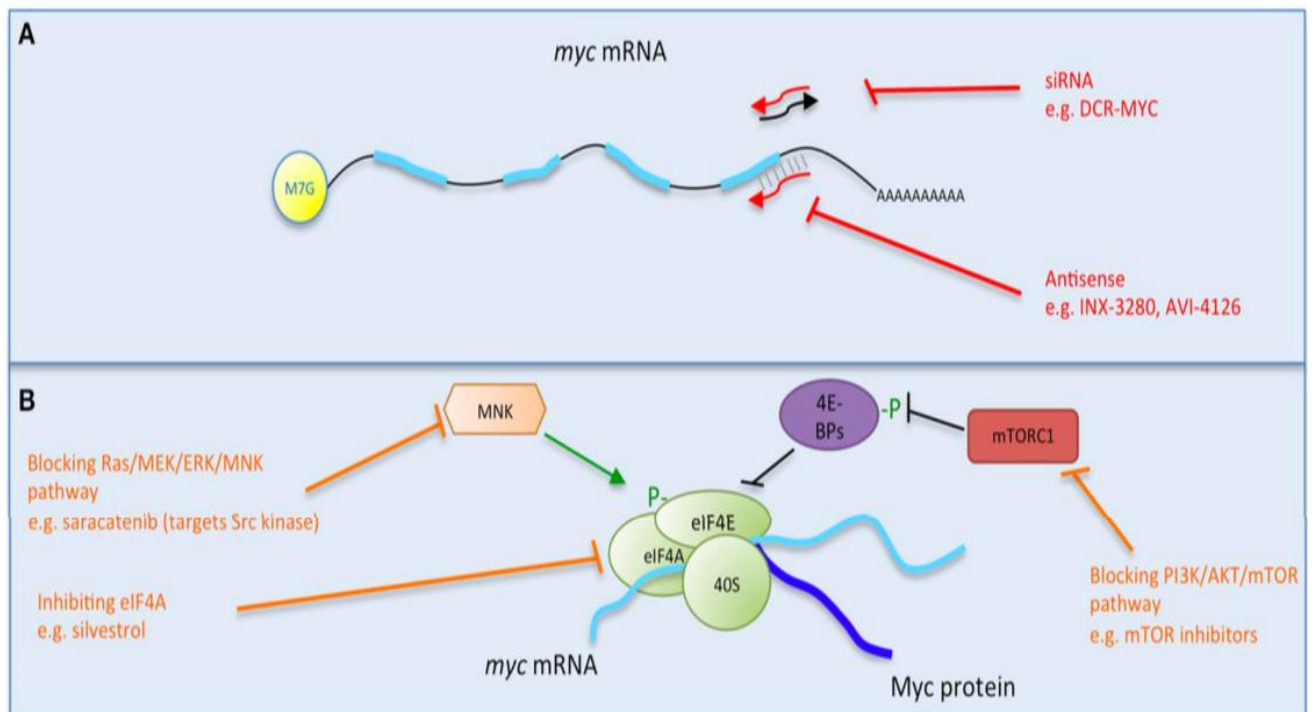
Χημική δομή του μορίου Mycro3. (Carabet et al., 2018)

Πολύ πρόσφατα, μία ομάδα στο ΙΒΕΑΑ, απέδειξε ότι το Amy22 μόριο, έχει ενδιαφέροντα αποτελέσματα, δοκιμασμένα επιτυχώς σε προκλινικές μελέτες χρησιμοποιώντας πλεονεκτικά μοντέλα ποντικών που υπερεκφράζουν το MYC και έχουν αναπτύξει όγκους, πράγμα που καθιστά δυνατή την ταχεία αξιολόγηση του μορίου. Επιπλέον, για τον έλεγχο της δράσης του, χρησιμοποιήθηκαν ξενομοσχεύματα που προέρχονται από ασθενείς (PDXs), ενώ έχουν αξιολογηθεί συνδυαστικά αντι-Myc θεραπευτικά φάρμακα που αναστέλλουν άλλες συνεργαζόμενες ογκογονικές οδούς.

Σε τελευταίες αναφορές με στόχο τη στόχευση του Myc-Max συμπλόκου, οι Castell et al. (2018) αναγνώρισαν έναν νέο μικρό μόριο αναστολέα, το MYCMI-6 (NSC354961), από μια βιβλιοθήκη ενώσεων του 1990 από το NCI / DTP Open Chemical Repository, χρησιμοποιώντας τη διμερή συμπληρωματικότητα φθορισμού (BiFC). Το MYCMI-6 επέδειξε ισχυρή επιλεκτική αναστολή, τόσο του c-Myc-Max, όσο και του N-Myc-Max PPI *in vitro* σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις. Ίσως η μεγαλύτερη αξία της ανακάλυψης των Castell

et al. (Alina Castell et al., 2018) είναι τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των επιδράσεων της χορήγησης του MYCMI-6 με ημερήσια ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε δόση 20 mg / kg *in vivo*, όπου το MYCMI-6 προκάλεσε μαζική απόπτωση και μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου και ελάττωση της πυκνότητας του μικροαγγειακού όγκου.

Ένας άλλος ευρέως γνωστός αναστολέας, ο Omomyc, ένα μεταλλαγμένο πεπτιδίο έλικας-βρόχου-έλικας, που καθιστά το Myc ένα μεταγραφικά ανίκανο σύμπλοκο, αποτρέπει την επαγόμενη από Myc ογκογένεση σε μοντέλα πολλαπλών όγκων ποντικού (Daniela Annibali et al., 2014).



Εικόνα 10

Πολλαπλές στρατηγικές για στόχευση Myc: παρεμβολή στο mRNA του myc. Αναφέρονται άμεσοι (κόκκινοι) και έμμεσοι (πορτοκαλί) αναστολείς που σχετίζονται με το πώς παρεμβαίνουν στο mRNA του myc. (A) Αποικοδόμηση του mRNA του myc. (B) Αποτροπή της μετάφρασης myc. Περιγράφονται ορισμένα παραδείγματα (Whitfield et al., 2017).

Ενώσεις που αναστέλλουν συγκεκριμένα τη σύνδεση Myc σε DNA.

Άλλα μικρά μόρια αναστολείς, όπως το MYRA-A και το NSC308848, έχουν επιτύχει υψηλή επιλεκτικότητα στη στόχευση της δέσμησης του Myc / Max συμπλόκου στο DNA και στην εμπόδιση συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων με το DNA (Mo και Henriksson, 2006).

Ορισμένα φυσικώς απαντώμενα μόρια έχουν, επίσης,δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν άμεσα με το ετεροδιμερές Myc / Max. Τα τριτερπενοειδή (celastrol και celastrol) δεσμεύονται και μεταβάλλουν την τεταρτοταγή δομή του προ-σχηματισθέντος διμερούς και καταργούν τη δέσμηση του DNA (Wang et al., 2015). Το KSI-3716 επίσης αναστέλει τη δέσμηση Myc/Max στο DNA (Jeong et al., 2014)).

Όπως έχει δειχθεί σε παλαιότερες μελέτες, τα μικρά μόρια, παρά την καλή συγγένεια με τον στόχο τους *in vitro*, συχνά εμφανίζουν έλλειψη εκλεκτικότητας στα *in vivo* πειράματα. Προκειμένου να προσπαθήσουμε να ξεπεραστεί αυτό το ζήτημα, αναπτύχθηκαν συνθετικά «μιμητικά» α-Helix με βάση το διφαινύλιο (Jung et al., 2015). Αυτά έχουν αυξημένη επιφάνεια αλληλεπίδρασης και αναγνωρίζουν διμερή Myc / Max (όχι ελεύθερα Myc) και διαταράσσουν την δέσμηση τους DNA.

Στόχευση της σταθερότητας του MYC

Μελέτες φανερώνουν ότι η αποικοδόμηση του MYC επηρεάζεται έντονα από τη φωσφορυλίωση σερίνης και θρεονίνης. Οι βιοχημικές και λειτουργικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης 62 (pSer62), με δραστηριότητα κινάσης της οδού ERK, σταθεροποιεί το MYC και προάγει τον πολλαπλασιασμό. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 58 (pThr58) από την GSK-3b αποσταθεροποιεί τον MYC. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται μεταλλάξεις στο Thr58 στο λέμφωμα Burkitt, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του MYC. Έτσι, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στην αναστολή της οδού MEK-ERK, ή οι προσπάθειες για την παρεμπόδιση της GSK-3b, όπως η αναστολή της σηματοδότησης της PI3K-AKT, μπορεί να ρυθμίσουν ευνοϊκά τη σταθερότητα του MYC για θεραπευτικό όφελος. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε όγκους με αυξημένη σηματοδότηση MEK-ERK (ενεργοποιημένο με KRAS ή EGFR), ή απώλεια φωσφατάσης και τενσίνης (PTEN). Η πρωτεΐνη PP2A λειτουργεί ως ετεροτριμερικό ενζύμου για έμμεση και άμεση ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης MYC. Έχει υποθεθεί ότι το pSer62 είναι ένας άμεσος στόχος του PP2A, οπότε η απώλεια του PP2A προάγει τη σταθερότητα του MYC. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν φαρμακευτικές ενώσεις που στοχεύουν το PP2A.

Οι Polo-like kinases (PLKs) περιλαμβάνουν μια οικογένεια πέντε πρωτεϊνικών κινασών σερίνης / θρεονίνης που ελέγχουν πολλές κρίσιμες βιολογικές διεργασίες. Χρησιμοποιώντας ως συστήματα μοντέλων MYCN-ενισχυμένα νευροβλαστώματα και καρκινώματα πνεύμονα, αποδείχθηκε πρόσφατα ότι οι PLK1 και Myc δημιουργούν έναν θετικό βρόχο ενεργοποίησης που είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της αμοιβαίας υψηλής έκφρασης, οδηγώντας σε Myc-εξαρτώμενη μεταγραφική ενίσχυση και επιθετική εξέλιξη του όγκου. Αναστολείς του PLK1, όπως το BI6727 ή το BI2356, οδηγούν σε ισχυρή απόπτωση τα κύτταρα του όγκου που υπερεκφράζουν Myc και ενισχύουν συνεργατικά τις θεραπευτικές δράσεις των ανταγωνιστών του BCL-2. Αυτά τα ευρήματα επικυρώνουν τους αναστολείς της PLK1, μόνα τους ή με τους αναστολείς του BCL-2, ως δυνητικά αποτελεσματική θεραπευτική για καρκίνους που υπερεκφράζουν Myc (Chen et al., 2018).

Η σταθερότητα Myc ελέγχεται αυστηρά από το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Μετά την φωσφορυλίωση στο Thr58, ο Myc πολυ-ουβικιτιλιώνεται από την λιγάση E3 FBW7 και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Οι πρωτεΐνες FBW7α και FBW7γ είναι υπεύθυνες για την εκλεκτική αποικοδόμηση του ενδογενούς Myc σε ανθρώπινα κύτταρα. Αρκετά ένζυμα απο-ουβικιτινιλίωσης εμπλέκονται στη σταθεροποίηση του Myc. Η USP28 έδειξε ότι δεσμεύει το c-Myc μέσω αλληλεπίδρασης με την FBW7α και ανταγωνίζεται τις δραστηριότητες της λιγάσης της E3 στον πυρήνα, οδηγώντας σε σταθεροποίηση του Myc και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου. Παρόμοια, η USP36 απο-ουβικιτινιλιώνει και σταθεροποιεί το c-Myc, μέσω αλληλεπιδράσεων με την FBW7γ στον πυρήνα. Η στόχευση αυτών των πρωτεϊνών (USP28, USP36) θα μπορούσε να προκαλέσει Myc αποσταθεροποίηση και καταστολή όγκων.

Έμμεση στόχευση με συνθετική θνησιμότητα.

Περιγράφεται ως "χρησιμοποιώντας την πίσω πόρτα για να στοχεύσετε τον Myc" (Evan, 2012)' σε αυτή την έμμεση προσέγγιση οι στόχοι είναι οι κυτταρικές αλλαγές, που προκύπτουν ως συνέπεια της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων των πρωτεϊνών και των οδών που απαιτούνται για την επιβίωση των κυττάρων που εξαρτώνται από ογκογονίδια (Wang et al., 2004). Αυτές οι μελέτες βασίζονται στην έννοια της συνθετικής θνησιμότητας, όπου η διαταραχή δύο ή περισσότερων γονιδίων σε συνδυασμό, αλλά όχι μόνο του ενός γονιδίου, οδηγεί σε ένα σημαντικό επιβλαβή φαινότυπο, όπως μειωμένος πολλαπλασιασμός, ή ο αυξημένος κυτταρικός θάνατος.

Η Myc-μεσολαβούμενη συνθετική θνησιμότητα περιγράφηκε αρχικά ότι επάγεται από το TRAIL και τους DR5-αγωνιστές, εκμεταλλευόμενοι την εγγενή ικανότητα του Myc να εκκινεί κύτταρα σε αποπτωτικά ερεθίσματα.

Πιο πρόσφατα, το SAE1/2 ταυτοποιήθηκε σε μια οθόνη γονιδιώματος παρεμβολής RNA για την αναζήτηση συνθετικά θανατηφόρων γονιδίων Myc. Αυτό το ένζυμο SUMOylation απαιτείται για την σωστή λειτουργία του μιτωτικού άξονα και αποδείχθηκε απαραίτητο για την ογκογένεση που προκαλείται από το Myc, καθώς η αναστολή του ενζύμου προκάλεσε μιτωτική καταστροφή σε Myc-ενεργοποιημένα κύτταρα (Kessler et al., 2012). Η αναγνώριση των αναστολέων SUMO είναι σε εξέλιξη (Kumar et al., 2016).

Ορισμένες άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι η αναστολή των CDKs είναι, επίσης, συνθετικά θανατηφόρα με τον Myc. Η κλινική αναστολή της CDK2 οδηγεί εμβρυϊκούς ινοβλάστες με απορυθμισμένο MYC σε γήρας, ενώ η αφαίρεση του CDK2 προκαλεί γήρανση στα B-κύτταρα μετά από ενεργοποίηση Myc, καθυστερώντας την λεμφωμαγένεση (Campaner et al., 2010). Δεδομένου ότι η λειτουργία του CDK2 αντισταθμίζεται από άλλα CDKs σε φυσιολογικά κύτταρα (Ortega et al., 2003), αυτό υποδηλώνει ότι η εκλεκτική στόχευσή του θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά, τουλάχιστον σε MYC-εξαρτώμενους όγκους.

Η αναστολή CDK1 είναι, επίσης, ωφέλιμη θεραπεία για όγκους που υπερεκφράζουν τον Myc: ο αναστολέας CDK1 purvalanol A επάγει σημαντική απόπτωση σε κύτταρα που υπερεκφράζουν Myc, αλλά όχι σε κύτταρα που εκφράζουν άλλα ογκογόνα. Παρατείνει την επιβίωση σε διαγονιδιακά ποντίκια Em-myc και μοντέλα αλλομοσχέυματος λεμφώματος (Goga et al., 2007).

Τέλος, παρατηρήθηκε συνθετική θνησιμότητα με το CDK9. Η φαρμακολογική αναστολή ή καταστροφή από το shRNA είχε αντι ογκογονική δράση τόσο στα κύτταρα, όσο και στα μοντέλα ποντικών του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. (Huang et al., 2014).

Δεδομένου ότι αρκετοί αναστολείς CDK βρίσκονται σήμερα σε κλινικές δοκιμές (Lapenna και Giordano, 2009), υπάρχει σαφής αξία στην ανάλυση των αποτελεσμάτων λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη δυνητική συνθετική θνησιμότητα Myc.

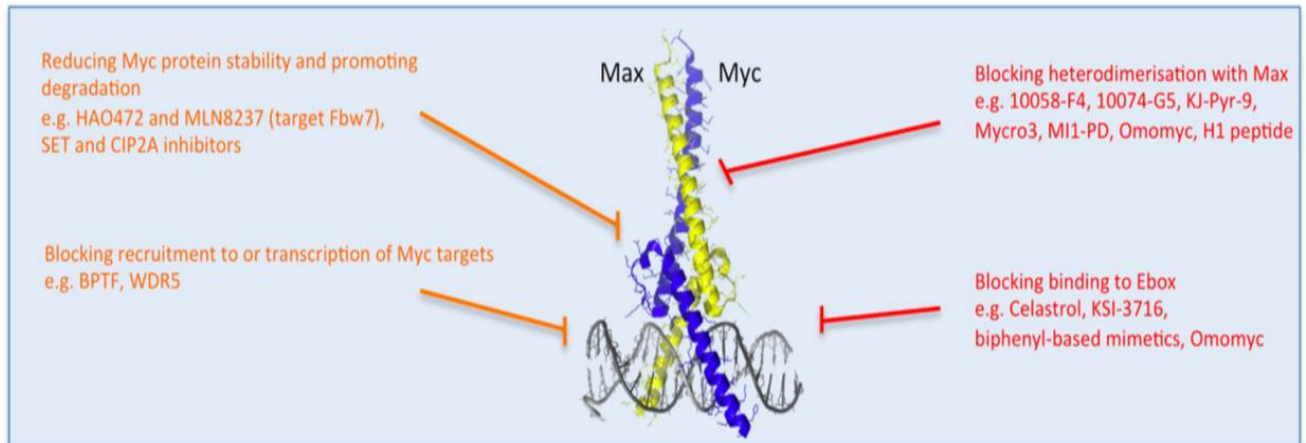
Το Myc έχει δειχθεί ότι ελέγχει πολλαπλές πλευρές της μεταγραφής και συν-μεταγραφής, καθώς και του μεταβολισμού του RNA, συμπεριλαμβανομένου του ματίσματος, της σταθερότητας του mRNA και της αποτελεσματικότητας της μετάφρασης (Koh et al., 2016).

Στο πλαίσιο της μετάφρασης, ο Myc είναι ικανός να ρυθμίζει την ριβοσωματική βιογένεση (RiBi), μέσω της συντονισμένης ρύθμισης και των τριών πολυμεράσεων RNA: Pol I, Pol II και Pol III. Η επιλεκτική αναστολή της Pol I έχει προταθεί ως μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση σε καρκίνους που εξαρτώνται από το Myc (Poortinga κ.ά., 2015), καθώς ο Myc υποτίθεται ότι προάγει τα κύτταρα σε πυρηνικό στρες. Αξιοσημείωτο είναι ότι, παρά τον κίνδυνο που συνδέεται με μία τέτοια αναστολή, ένας αναστολέας της Pol I (CX-5461, Drygin et al., 2011) έχει πρόσφατα δείξει επαρκή ασφάλεια στις κλινικές δοκιμές Φάσης I σε ασθενείς με λέμφωμα και λευχαιμία και τώρα βρίσκεται σε μελέτη Φάσης I / II σε στερεές κακοήθειες (αν και δεν περιορίζεται μόνο στους καρκίνους που προκαλούνται από Myc).

Συνθετική θνησιμότητα για αναστολή του MYC έχει παρατηρηθεί με διάφορους άλλους τρόπους σε μοντέλα όγκου ποντικού, για παράδειγμα με ARK5 (Liu et al., 2012), PIM κινάση (Horiuchi et al., 2016), microRNA-206 που δρα αναστέλλοντας την MAP3K13 (Han et al., 2016) Aurora κινάσες και MondoA (Carroll et al., 2015). Το MondoA είχε προηγουμένως συνδεθεί με τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης, ενώ η υπερέκφραση του Myc σε κύτταρα θηλαστικών καθιστά τους όγκους εθισμένους σε ορισμένες μεταβολικές οδούς (Yuneva et al., 2007). Αυτό οδήγησε στην ταυτοποίηση των Myc συνθετικών θανατηφόρων μεταβολικών γονιδίων που εμπλέκονται στη γλυκόλυση (ALDOA και PDK1) και στη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων (CTPS) (Toyoshima et al., 2012), τη βιοσύνθεση πουρίνης (PFAS και CAD), τη trans-sulphuration (CBS), τη μιτοχονδριακή μεταγραφή (TFAM), τη γλυκόλυση (ENO3) και τη λιπογένεση (FASN και SCD) και γλουταμίνη / γλουταμικό (SLC1A4 και SLC25A6) (Carroll et al., 2015).

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι ο παράγοντας Myc συμβάλλει στις μεταβολικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα (Dang, 2012). Η αναστολή διάφορων μεταβολικών στόχων, όπως το LDHA και η γλουταμινάση, μείωσε την ανάπτυξη του όγκου και την εκτεταμένη επιβίωση σε Myc-εξαρτώμενα και Myc-επαγωγίμα μοντέλα καρκίνου (Hsieh and Dang, 2016).

Συνεπώς, αυτή η έμμεση στρατηγική, έχει ήδη προσφέρει μια σειρά πρόσθετων θεραπευτικών στόχων και το γεγονός ότι ο Myc σχετίζεται αιτιωδώς με τους περισσότερους καρκίνους του ανθρώπου, υποδηλώνει ότι αυτή η προσέγγιση απαιτεί περαιτέρω κλινική έρευνα.



Εικόνα 11

Πολλαπλές στρατηγικές για τη στόχευση Myc: μείωση της σταθερότητας και της λειτουργίας Myc. Αναφέρονται άμεσοι (κόκκινοι) και έμμεσοι (πορτοκαλί) αναστολείς, που σχετίζονται με τον τρόπο που επηρεάζουν τη σταθερότητα ή τη δέσμευση του Myc στους συνεργάτες του ή στο DNA. Άλλες προσεγγίσεις παρεμποδίζουν την εξαρτώμενη από Myc μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Περιγράφονται ορισμένα παραδείγματα κάθε στρατηγικής αναστολέα (Whitfield et al., 2017).

Συμβολή της Βιοπληροφορικής στην ανακάλυψη φαρμάκων

Η βιοπληροφορική ανάλυση μπορεί, όχι μόνο να επιταχύνει την αποκάλυψη νέων φαρμάκων, αλλά επίσης να διευκολύνει στον χαρακτηρισμό των παρενεργειών και να προβλέψει την αντοχή στα φάρμακα. Δεδομένα υψηλής απόδοσης, όπως δεδομένα γονιδιωματικής, επιγενετικής, αρχιτεκτονικής γονιδιώματος, κρυσταλλικών δομών, μεταγραφικού, πρωτεϊνωματικού και ριβοσωματικού προφίλ, έχουν όλα συμβάλει σημαντικά στην ανακάλυψη και στην αναπροσαρμογή φαρμάκων. Η συσσώρευση δομών πρωτεΐνης και RNA, καθώς και η ανάπτυξη μοντέλων ομολογίας και προσομοίωσης πρωτεϊνικών δομών, σε συνδυασμό με βάσεις δεδομένων μικρών και μεγάλων μορίων και μεταβολητών, προετοίμασαν το δρόμο για πιο ρεαλιστικά πειράματα πρόσδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πιο στοχευμένο screening.

Η σημαντική πρόοδος σε υπολογιστικές τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων, όπως οι προσομοιώσεις εικονικής διαλογής (Virtual Screening-VS) και μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics-MD), οδήγησε και στον αποτελεσματικότερο σχεδιασμό μικρών μορίων αναστολέων για μια ποικιλία βιολογικών στόχων. Το 2016, οι Yu et al. [25] παρείχαν ένα πρώτο επιτυχημένο παράδειγμα υπολογιστικής προσέγγισης, που περιλάμβανε μια ολοκληρωμένη MD δειγματοληψία, μίας εγγενώς διαταραγμένης περιοχής Myc, η οποία παρήγαγε ένα σύνολο αποτελεσμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση της θέσης δέσμευσης του *in silico*. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 201.939 ενώσεις από τις βιβλιοθήκες SPECS και DCSD, καθώς και ένας αριθμός επιλεγμένων αναλόγων του 10074-A4, για το VS χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Glide docking σε τυπική λειτουργία ακριβείας (SP) [127,128]. Το 5% των «καλύτερων» ενώσεων που δεσμεύονταν σε διαφορετικές κοιλοότητες του Myc επελέγησαν για περαιτέρω ανάλυση, και 250 ενώσεις από βιβλιοθήκες και 23 ανάλογα 10074-A4 επελέγησαν για πειραματικές δοκιμές. Δύο κατηγορίες ενώσεων επιλέχθηκαν: (1) ενώσεις «υψηλής διαμορφωτικής ειδικότητας» όπου η καλύτερη βαθμολογία σύνδεσης (docking score) μεταξύ των τριών αναγνωρισμένων κοιλοτήτων ήταν μικρότερη από -6 και οι άλλες δύο ήταν μεγαλύτερες από -4 και (2) ενώσεις πολλαπλής διαμορφωτικής συγγένειας, όπου οι διαφορές των τριών βαθμολογιών ήταν μικρότερες από 2 και τουλάχιστον μία από τις τρεις βαθμολογίες πρόσδεσης ήταν μικρότερη από -5. Από τις 273 ενώσεις προέκυψαν επτά δραστικές ουσίες PKUMDL-YC-1101, -1201-1205 και -1301), όλες δε συνδέονται με το Myc με διαφορετικές συγγένειες, όπως προσδιορίζεται από το SPR (Surface Plasmon Resonance).

Το 2018, ο Yao και οι συνεργάτες του ανέφεραν ακόμη έναν νέο αναστολέα, τον 7594-0035, που στοχεύει συγκεκριμένα το Myc για την πιθανή θεραπεία ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος (MM), όπου η αντίσταση στη θεραπεία πρώτης γραμμής συσχετίστηκε με Myc [131,132]. Η ένωση 7594-0035 έχει ταυτοποιηθεί από τη βάση δεδομένων ChemDiv, μια εμπορικά διαθέσιμη βιβλιοθήκη μικρών μορίων που περιέχει περισσότερα από ένα εκατομμύριο καταχωρήσεις, μέσω VS και χρησιμοποιώντας την δημοσιευμένη κρυσταλλική δομή του Myc-Max που έχει συμπλοκοποιηθεί με DNA [75] (PDB ID: 1NKP).

Πρόσφατα, μια άλλη ομάδα εφάρμοσε μια νέα τεχνική -βασισμένη σε πληροφορική ανάλυση- ανακάλυψης φαρμάκων (CADD) για τον εντοπισμό των αναστολέων Myc-Max ως πιθανής θεραπείας για τον καρκίνο του προστάτη (ΚΠ). Στον ΚΠ, τρία παραλλάγματα του Myc ενισχύονται συχνότερα και εμπλέκονται στην παθογένεση και την εξέλιξη σε όλο το φάσμα της, από το εντοπισμένο αδενοκαρκίνωμα (L-Myc) έως τους πιο προχωρημένους και ανθεκτικούς σε θεραπεία υποτύπους - ανθεκτικό στον c-Myc- και τον νευροενδοκρινικό φαινότυπο (N-Myc) [137-144]. Χρησιμοποίησαν την κρυσταλλογραφημένη δομή του MYC-MAX συμπλέγματος συνδεδεμένο με το DNA και την ZINC βιβλιοθήκη, και ανακάλυψαν μια πολλά υποσχόμενη ένωση, την VPC-70063.

Μία ενδιαφέρουσα στρατηγική για τη μείωση της δραστηριότητας Myc-Max που μπορεί να υλοποιηθεί με υπολογιστικές τεχνικές, είναι η ανεύρεση παραγόντων που σταθεροποιούν το ομοδιμερισμό του Max (Max-Max σύμπλοκο) κι έτσι η ελαχιστοποίηση της διαθεσιμότητας του Max, για το σχηματισμό του Myc-Max συμπλόκου. Το 2009 ο Jiang και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν ουσίες-σταθεροποιητές του Max-Max που μεταβάλλουν τη λειτουργία Myc-Max, εμποδίζοντας τη δέσμευση του τελευταίου σε θέσεις δέσμευσης του DNA.

Στόχος της εργασίας

Ο κύριος στόχος της εργασίας είναι η επιλογή του βέλτιστου μορίου που αναστέλλει την λειτουργία του παράγοντα MYC, με σκοπό αυτό να οδηγήσει/χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές. Στο πλαίσιο αυτό θα επιδιωχθεί η ανακάλυψη νέων παραγώγων της οδηγού-ενώσεως Amy22, που έχει αποδειχθεί από την ομάδα του ΠΒΕΑΑ ότι καταστέλλει την δράση της ογκοπρωτεΐνης MYC *in vivo*, και της ενώσεως Myc19, που μέχρι στιγμής έχει βρεθεί ότι επιτυγχάνει το ίδιο *in vitro*. Ως υποψήφια φάρμακα, τα νέα παράγωγα θα εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα και ικανοποιητικές φυσικοχημικές/φαρμακολογικές ιδιότητες (βελτιστοποίηση).

Για τον σκοπό αυτό, θα χρησιμοποιηθούν μεθοδολογίες αιχμής μοριακών προσομοιώσεων για την υπολογιστική αξιολόγηση (*in silico screening*) μεγάλων χημειοθικών και την εύρεση παραγώγων. Τα νέα μόρια που θα προκύψουν θα αξιολογηθούν *in vitro* με βιοχημικές αναλύσεις και με μεθόδους βιολογίας συστημάτων για τον τρόπο δράσης τους σε πολλές κυτταρικές σειρές διαφόρων τύπων και θα βελτιστοποιηθούν περαιτέρω σε μία ανατροφοδοτούμενη διαδικασία χημικής σύνθεσης → φαρμακολογικής / τοξικολογικής /σηματοδοτικής αξιολόγησης και →σχέσεων δομής-δράσης. Παράλληλα θα εξεταστεί *in vitro* αν η υπερέκφραση MYC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αποτελεσματικότητας της δράσης του μορίου. Η τελική επιλογή μορίων θα πραγματοποιηθεί με προκλινικές μελέτες *in vivo*, χρησιμοποιώντας ποντίκια-μοντέλα MYC-εξαρτημένου καρκίνου.

Επιπλέον, στόχος της εργασίας αποτελεί ο έλεγχος ενώσεων που έχουν προκύψει από ανάπτυξη πλατφόρμας για την ιεράρχηση ενώσεων βάσει της δραστηριότητας μεταγραφικών παραγόντων και, συγκεκριμένα, του c-MYC. Για το χαρακτηρισμό των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος βιωσιμότητας resazurin και τα πιο υποσχόμενα μόρια θα προχωρήσουν για *in vivo* μελέτες.

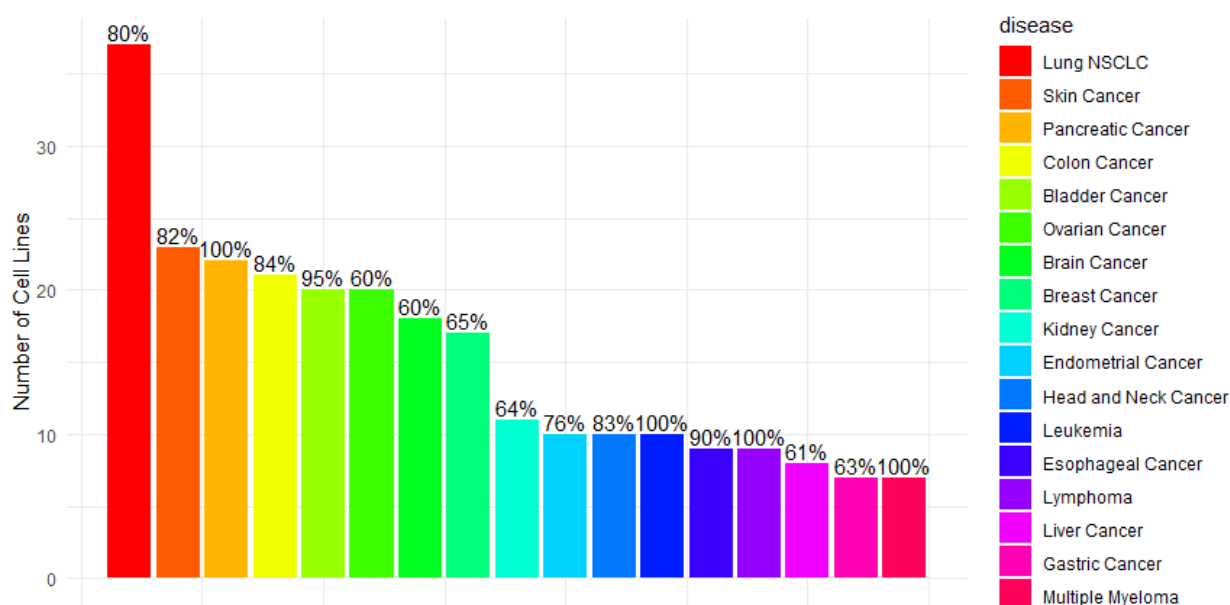
Υλικά και μέθοδοι

1) Επιλογή κατάλληλων καρκινικών κυτταρικών σειρών για την αξιολόγηση αντι-MYC μορίων με χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής.

Για την αξιολόγηση των αντι-MYC μορίων επιλέχθηκαν οι αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές ινοβλαστών αρουραίων TGR1 (Accession number: CVCL_T955) και H01519 (Accession number: CVCL_0311). Οι δυο αυτές σειρές προέρχονται από την ίδια πατρική σειρά, αλλά διαφέρουν ως προς την έκφραση του MYC, με τα TGR1 να έχουν γονότυπο myc(+/+) ενώ τα H01519 myc(-/-).

Η επιλογή ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών για τα πειράματα αυτά έγινε με χρήση της βάσης δεδομένων DepMap (<https://depmap.org/portal/depmap/>). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το σετ δεδομένων Avana, το οποίο περιέχει τα εκτιμώμενα επίπεδα εξάρτησης κυτταρικής βιωσιμότητας 391 κυτταρικών σειρών σε σχέση με την έκφραση γονιδίων, βάσει μετρήσεων γονιδιακής έκφρασης μετά από CRISPR-Cas9 essentiality/loss-of-function πειραματικού ελέγχου για κάθε γονίδιο από τη βιβλιοθήκη sgRNA Avana. Η εξάρτηση της κυτταρικής βιωσιμότητας από την έκφραση ενός γονιδίου, υπολογίζεται από την sgRNA εξάλειψη του γονιδίου αυτού, καθώς και από τον αριθμό αντιγράφων του, διορθωμένη για τα ψευδώς αληθινά αποτελέσματα που προέρχονται από τα γονιδιακώς-ανεξάρτητα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα της αποκοπής του DNA μέσω CRISPR-Cas9. Για το σκοπό των συγκεκριμένων πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από εξάλειψη του MYC ογκογονιδίου (Εικόνα 12). Οι 391 κυτταρικές σειρές που περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ δεδομένων, κατατάχθηκαν σε φθίνουσα σειρά εξάρτησης της βιωσιμότητας τους από το MYC γονίδιο, βάσει κριτηρίων.

MYC dependent Cell Lines per Cancer type



Ceres cut-off score for Dependency : -1.2

The percentage above the bars denotes the number of MYC dependent cell lines per disease over the total number of cell lines for that disease in the dataset.

Εικόνα 12

Το ποσοστό πάνω από την ράβδο αντιπροσωπεύει τον αριθμό των εξαρτώμενων από το MYC κυτταρικών σειρών ανά τύπο καρκίνου σε σχέση με τον ολικό αριθμό κυτταρικών σειρών αυτής της νόσου στο σετ δεδομένων.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12, η πλειοψηφία των διαθέσιμων καρκινικών κυτταρικών σειρών εμφανίζουν υψηλή εξάρτηση από το MYC γονίδιο, το οποίο υπογραμμίζει τη σημαντικότητα του MYC ως θεραπευτικό στόχο για μεγάλο αριθμό τύπων καρκίνου.

- 2) Ανάπτυξη μεθόδου μικροσκοπίας φθορισμού υψηλής απόδοσης (*high content screening*) για έλεγχο δραστηριότητας των αντι-MYC μορίων ως προς την βιωσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών και επιλογή των πιο υποσχόμενων για περαιτέρω μελέτες βιωσιμότητας και τοξικότητας

Οι τέσσερις κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν παραπάνω, TGR1 myc(+/+), H01519 myc(-/-), WM115 (MYC-dependent) και FOCUS (MYC-independent), χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μίας μεθόδου μικροσκοπίας φθορισμού υψηλής απόδοσης (high content screening), για έλεγχο δραστηριότητας των αντι-MYC μορίων ως προς την βιωσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών. Έγινε η υπόθεση πως:

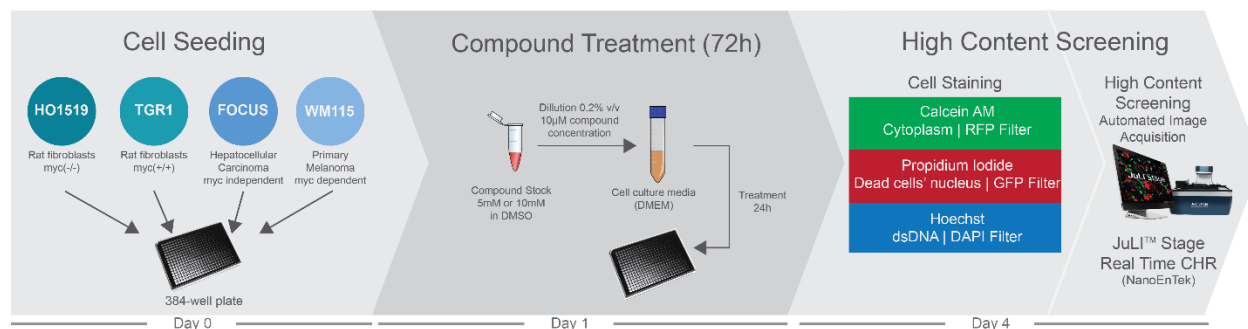
- Αν ένα μόριο μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των TGR1 κυττάρων, ενώ δεν μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των H01519, μπορεί να καταταχθεί στην κατηγορία των υποσχόμενων αντι-MYC μορίων.
- Αν ένα μόριο μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των TGR1 και των WM115, ενώ δεν μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των H01519 ή/και των FOCUS, μπορεί να καταταχθεί στην κατηγορία των υποσχόμενων αντι-MYC μορίων.
- Αν ένα μόριο μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των FOCUS ή/και των WM115, μπορεί να καταταχθεί στην κατηγορία των μορίων με πιθανή αντι-καρκινική δράση πιθανώς ανεξάρτητη από το MYC.

Οι κυτταρικές σειρές επιστρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 384 θέσεων (384-well plates) για 24 ώρες και, στη συνέχεια, έγινε κατεργασία αυτών με τα αντι-MYC μόρια, καθώς και με τον c-myc αναστολέα 10058-F4 για 72 ώρες.

Για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά το πέρας των 72 ωρών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μικροσκοπίας φθορισμού LIVE/DEAD Imaging Assay. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται τρεις φθορίζουσες χρωστικές:

- Hoechst 33342, η οποία είναι μια κυτταρικά διαπερατή μπλέ χρωστική, η οποία προσδένεται στη διπλή αλυσίδα του DNA, διεγείρεται από υπεριώδη ακτινοβολία και εκπέμπει μπλε φθορισμό στα 460 με 490 nm (Thermofisher.com, 2019).
- Calcein AM, μία πράσινη χρωστική, η οποία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη ως μη-φθορίζων μόριο και μετατρέπεται σε φθορίζων από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες (Thermofisher.com, 2019).
- Propidium Iodide (PI), μια κόκκινη χρωστική, η οποία δεν είναι διαπερατή από την κυτταρική μεμβράνη, αλλά προσδένεται στο DNA των νεκρών κυττάρων και ο φθορισμός της αυξάνει 20-30 φορές (Thermofisher.com, 2019).

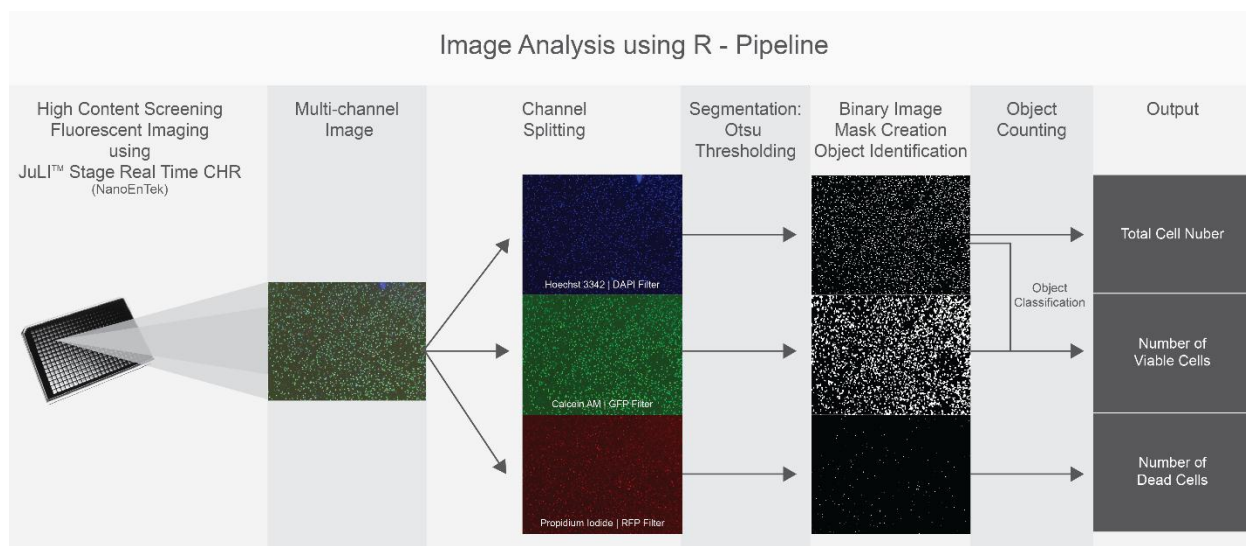
Το μικροσκόπιο φθορισμού υψηλής απόδοσης JuLi™ Stage Real Time Cell History Recorder (NanoEnTek) χρησιμοποιήθηκε με ρύθμιση αυτόματης λήψης φωτογραφιών (Εικόνα 13).



Εικόνα 13

Σχηματική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας που αναπτύχθηκε για τον έλεγχο της δραστηριότητας των αντι-MYC μορίων ως προς την βιωσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Οι φωτογραφίες αυτές αναλύθηκαν με τη βοήθεια της γλώσσας προγραμματισμού R και το πακέτο εντολών EBImage. Εν συντομία, οι εικόνες μετατράπηκαν σε κλίμακα grayscale και εφαρμόστηκε το κατώφλι Otsu, ώστε να αναγνωριστούν τα αντικείμενα προς μελέτη (πυρήνας, κυτταρόπλασμα, πυρήνας νεκρών κυττάρων). Στη συνέχεια, κάθε εικόνα μετατράπηκε σε διαδική και δημιουργήθηκε η μάσκα των αντικειμένων. Τα αντικείμενα αυτά μετρήθηκαν και έγινε εξαγωγή των δεδομένων σε επεξεργάσιμο αρχείο (Εικόνα 14).



Εικόνα 14

Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανάλυσης εικόνων.

Από τη διαδικασία ανάλυσης εικόνων, υπολογίζεται και λαμβάνεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ως %Alive για κάθε εικόνα. Κάθε μέτρηση %Alive κανονικοποιείται με βάση τον αριθμό των κυττάρων στην ομάδα θετικού ελέγχου (κύτταρα με θρεπτικό υλικό, DMEM) σύμφωνα με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$CellNumberChange (CNC) = \%Alive * MEDIAN(Number_of_cells_in_DMEM_image)$$

- 3) Μέθοδος Resazurin για περαιτέρω έλεγχο δραστηριότητας των αντι-MYC μορίων ως προς την βιωσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών και επιλογή των πιο υποσχόμενων για περαιτέρω μελέτες βιωσιμότητας και τοξικότητας

Η μέθοδος βιωσιμότητας resazurin είναι μια ανάλυση φθορισμού, που ανιχνεύει την κυτταρική μεταβολική δραστηριότητα. Το μπλε μη φθορίζον αντιδραστήριο resazurin ανάγεται σε έντονη φθορίζουσα resorufin από ένζυμα αφυδρογονάσης σε μεταβολικώς δραστικά κύτταρα. Αυτή η μετατροπή εμφανίζεται μόνο σε βιώσιμα κύτταρα και έτσι η ποσότητα της παραγόμενης resorufin είναι ανάλογη προς τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων στο δείγμα. Η σχηματιζόμενη resorufin στη δοκιμασία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί

με μέτρηση των σχετικών μονάδων φθορισμού χρησιμοποιώντας φθορίζον μικροπλακίδιο (Ex=530-570 nm, Em=590-620 nm).

Σε 96άρα πλάκα κυτταροκαλλιιεργειών, γίνεται επίστρωση των κυττάρων και μετά από 24 ώρες προσθέτουμε την αντι-MYC ένωση. Αναμονή για ακόμη 24h και, εν συνεχεία, προσθέτουμε το resazurin σε τελική συγκέντρωση 4mg/ml. Η πλάκα επωάζεται για 2 ώρες σε 37°C, σε κλίβανο με συγκέντρωση CO₂ 5%. Εν συνεχεία μετράται ο φθορισμός σε μήκος κύματος διέγερσης 530/25 nm και κύματος εκπομπής 590/35 nm.

4) Πλατφόρμα για την ιεράρχηση των ενώσεων βάσει της δραστηριότητας μεταγραφικού παράγοντα

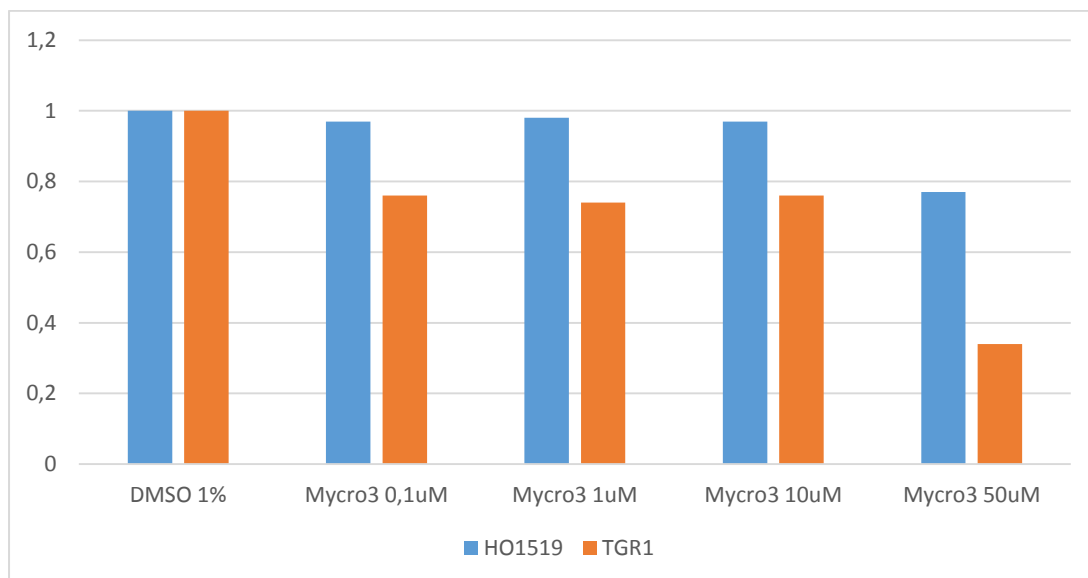
Η αποτελεσματική ιεράρχηση ενώσεων διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανακάλυψη υποσχόμενων υπονήφιων φαρμάκων σε πρώιμα στάδια της ανακάλυψης φαρμάκων. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας μεταγραφικών παραγόντων έχει ανοίξει έναν νέο δρόμο για τον εντοπισμό ενώσεων που αναστέλλουν μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτή η πρόσφατα αναπτυχθείσα πλατφόρμα, από την ομάδα εξειδικευμένων προγραμματιστών του εργαστηρίου μας, χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση ενώσεων που παρεμποδίζουν έμμεσα τη δραστηριότητα του Myc, πρωτοογκογονιδίου που ελέγχει τους βασικούς μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου.

Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης L1000 από 70 κυτταρικές σειρές που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 18000 διαφορετικές ενώσεις και 8170 shRNAs ελήφθησαν από την τελευταία έκδοση του CMAP. Μετά την προεπεξεργασία, την ομαλοποίηση και τη συσσωμάτωση των αντιγράφων υπογραφής, το τελικό σύνολο δεδομένων περιείχε 118121 μοναδικά υψηλής ποιότητας μεταγραφικά προφίλ, από τα οποία προέκυψε η δραστικότητα των 175 TF, χρησιμοποιώντας τα ρυθμιστικά VIPER και DoRothEA. Η ανάλυση οδού για κάθε προφίλ πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας fgsea, αξιοποιώντας τις οδούς KEGG, ως βάση προηγούμενης γνώσης. Οι ενώσεις κατατάχθηκαν κατά προτεραιότητα, με βάση την ικανότητά τους να ρυθμίζουν προς τα κάτω τη δραστικότητα του TF, επηρεάζοντας παράλληλα παρόμοιες οδούς με τα KD του γονιδίου.

Αποτελέσματα

Η ένωση MYCro3 μειώνει τη βιωσιμότητα των ινοβλαστών TGR1 myc(+/+), σε σχέση με τους αντίστοιχους ινοβλάστες που έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου.

Έχει αποδειχθεί από τη βιβλιογραφία, ότι η ένωση MYCro3 έχει αντι-καρκινική δράση, παρεμποδίζοντας άμεσα τη δημιουργία του συμπλέγματος MYC/MAX/DNA, αναστέλλοντας την πρωτεϊνική αλληλεπίδραση του MYC με το MAX. Στο συγκεκριμένο πείραμα γίνεται έλεγχος των κυτταρικών σειρών TGR1 myc(+/-) και HO1519 myc(-/-) με τη μέθοδο Resazurin για την δραστηριότητα αντι-MYC μορίου. Σκοπός του πειράματος είναι να διαπιστώσουμε τις διαφορές στη βιωσιμότητα των κυτταροσειρών που οφείλονται στις διαφορές στον γονότυπό τους. Χρησιμοποιώντας την ένωση MYCro3, αναμένουμε ότι η κατεργασία της θα επηρεάζει περισσότερο τη βιωσιμότητα των TGR1 myc(+/-) κυττάρων και λιγότερο των HO1519 myc(-/-). Τα κύτταρα εκτέθηκαν στην ένωση για 24h. Από την εικόνα, συγκρίνοντας τις επί τοις εκατό τιμές βιωσιμότητας, παρατηρούμε ότι, όπως είχε υποθεθεί, η ένωση MYCro3, μειώνει περισσότερο τον πληθυσμό των κυττάρων που εκφράζουν τον παράγοντα MYC από τους αντίστοιχους ινοβλάστες που έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου, στις ίδιες τιμές συγκέντρωσης της MYCro3 (Εικόνα 15).



Εικόνα 15

Έλεγχος βιωσιμότητας των ινοβλαστών TGR1 myc(+/+) και HO1519(-/-) μετά από έκθεσή τους στην αντι-MYC ένωση MYCro3. Παρατηρείται ότι η κυτταροσειρά HO1519 είναι πιο ανθεκτική στη δράση της MYCro3 ένωσης.

Αποσαφήνιση κατάλληλων καρκινικών κυτταρικών σειρών για την αξιολόγηση αντί-MYC μορίων, με τη χρήση εργαλείων πληροφορικής.

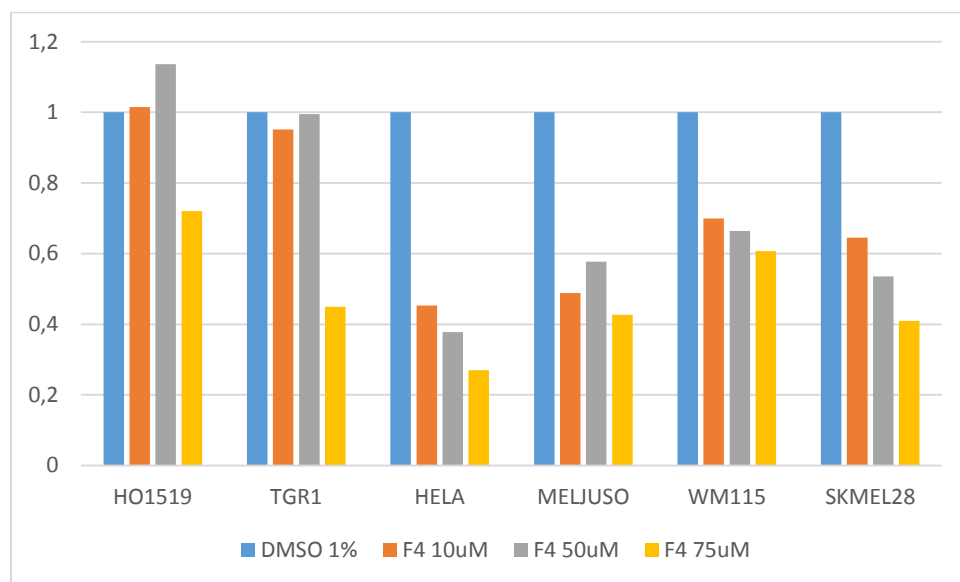
Για την αξιολόγηση των αντι-MYC μορίων επιλέχθηκαν οι αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές ινοβλαστών αρουραίων TGR1 (Accession number: CVCL_T955) και HO1519 (Accession number: CVCL_0311). Οι δυο αυτές σειρές προέρχονται από την ίδια πατρική σειρά, αλλά διαφέρουν ως προς την έκφραση του MYC, με τα TGR1 να έχουν γονότυπο myc(+/+), ενώ τα HO1519 myc(-/-).

Με βάση τα αποτελέσματα από το DerMap, επιλέχθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά μελανώματος WM115 (Accession number: CVCL_0040) με MYC-CERES dependency Score -2.3304 ως υψηλά εξαρτώμενη από το MYC ογκογονίδιο, και η κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος FOCUS (Accession number: CVCL_7955) με MYC-CERES dependency Score -0.3004 ως μη εξαρτώμενη από το MYC ογκογονίδιο.

Μία επιπλέον μικρή ένωση, η 10058-F4 μειώνει τη βιωσιμότητα των ινοβλαστών TGR1 myc(+/+) και των καρκινικών σειρών HELA, MELJUSO, WM115, SKMEL28 σε σχέση με τους ινοβλάστες που έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου (HO1519).

Έχει αποδειχθεί από τη βιβλιογραφία ότι η ένωση 10058-F4 έχει αντι-καρκινική δράση, παρεμποδίζοντας άμεσα τη δημιουργία του συμπλέγματος MYC/MAX/DNA, αναστέλλοντας την πρωτεϊνική αλληλεπίδραση του MYC με το MAX. Πραγματοποιήθηκε πείραμα Resazurin για την αποσαφήνιση της καταλληλότητας των καρκινικών κυτταρικών σειρών που αναδείχθηκαν από *in silico* πειράματα. Αναμένουμε, λοιπόν, η κατεργασία με την ένωση 10058-F4 να επηρεάζει περισσότερο τη βιωσιμότητα των TGR1 myc(+/+), WM15, HELA, MELJUSO, SKMEL28 κυτταρικών σειρών, καθώς και λιγότερο των

HO1519 myc(-/-). Από την εικόνα (Εικόνα 16), συγκρίνοντας τις επί τοις εκατό τιμές βιωσιμότητας, παρατηρούμε ότι, όπως είχε υποθεθεί, η ένωση 10058-F4, μειώνει περισσότερο τον πληθυσμό των κυττάρων που εκφράζουν τον παράγοντα MYC και λιγότερο των ινοβλαστών που έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου, στις ίδιες τιμές συγκέντρωσης της ένωσης.



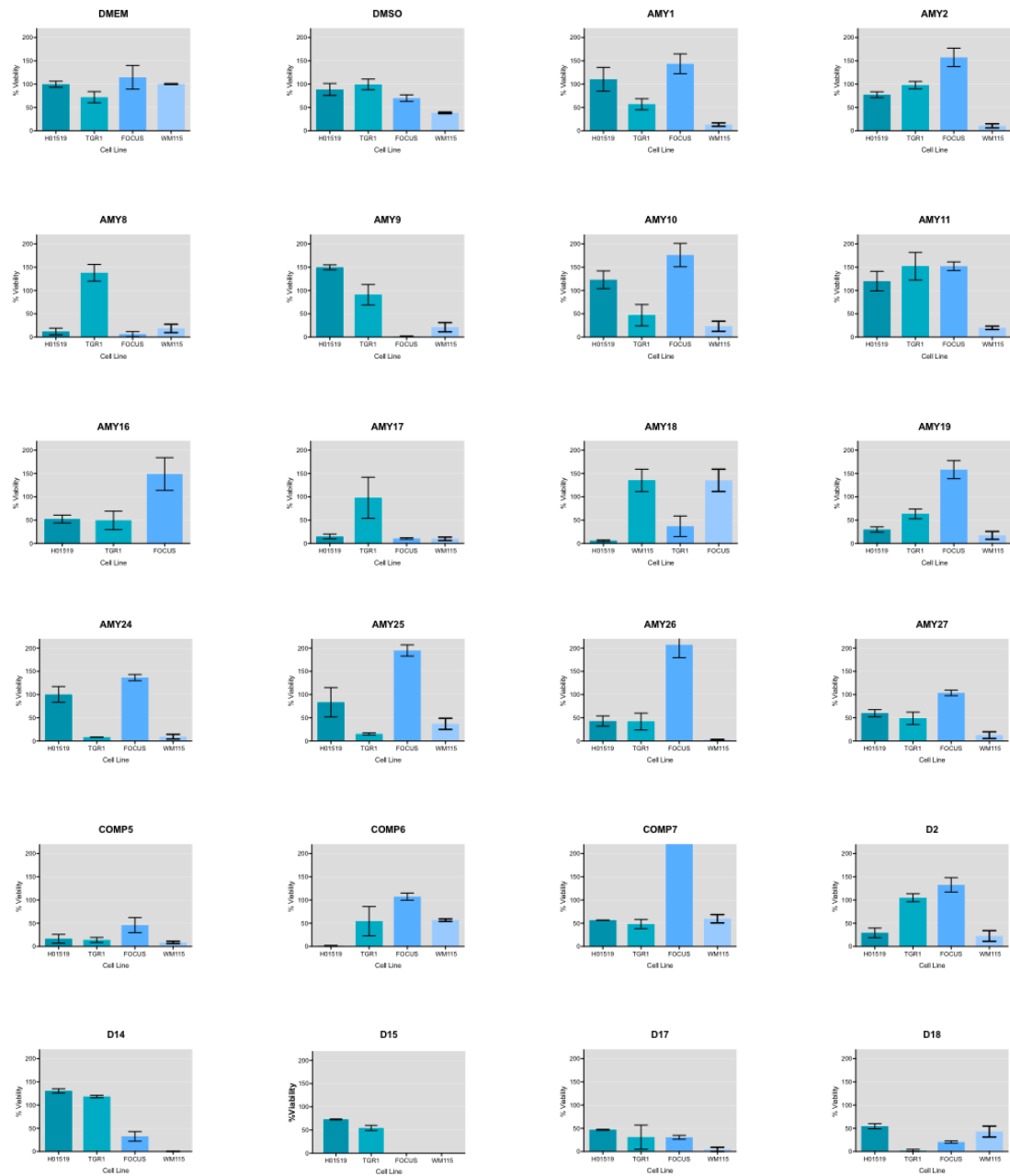
Εικόνα 16

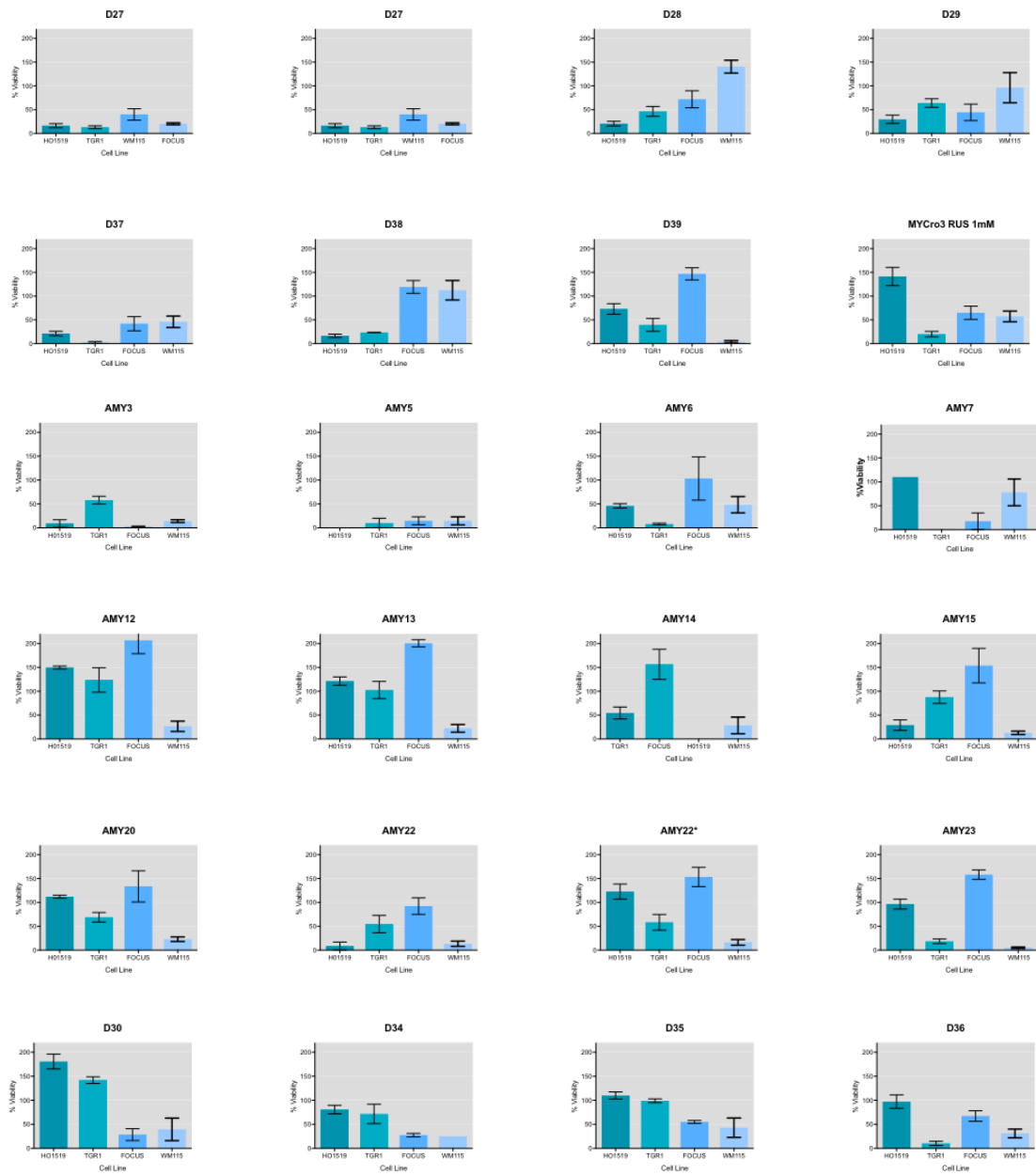
Έλεγχος βιωσιμότητας ινοβλαστών TGR1 και καρκινικών σειρών με τη μέθοσο Resazurin, μετά από έκθεσή τους στην αντι-MYC ένωση 10058-F4. Παρατηρείται ότι η κυτταροσειρά HO1519 είναι πιο ανθεκτική στην δράση της 10058-F4 σε σχέση με τις άλλες κυτταρικές σειρές που ελέχθησαν.

Έλεγχος δραστηριότητας αντί-MYC μορίων ως προς την βιωσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών και επιλογή των πιο υποσχόμενων για περαιτέρω μελέτες βιωσιμότητας και τοξικότητας.

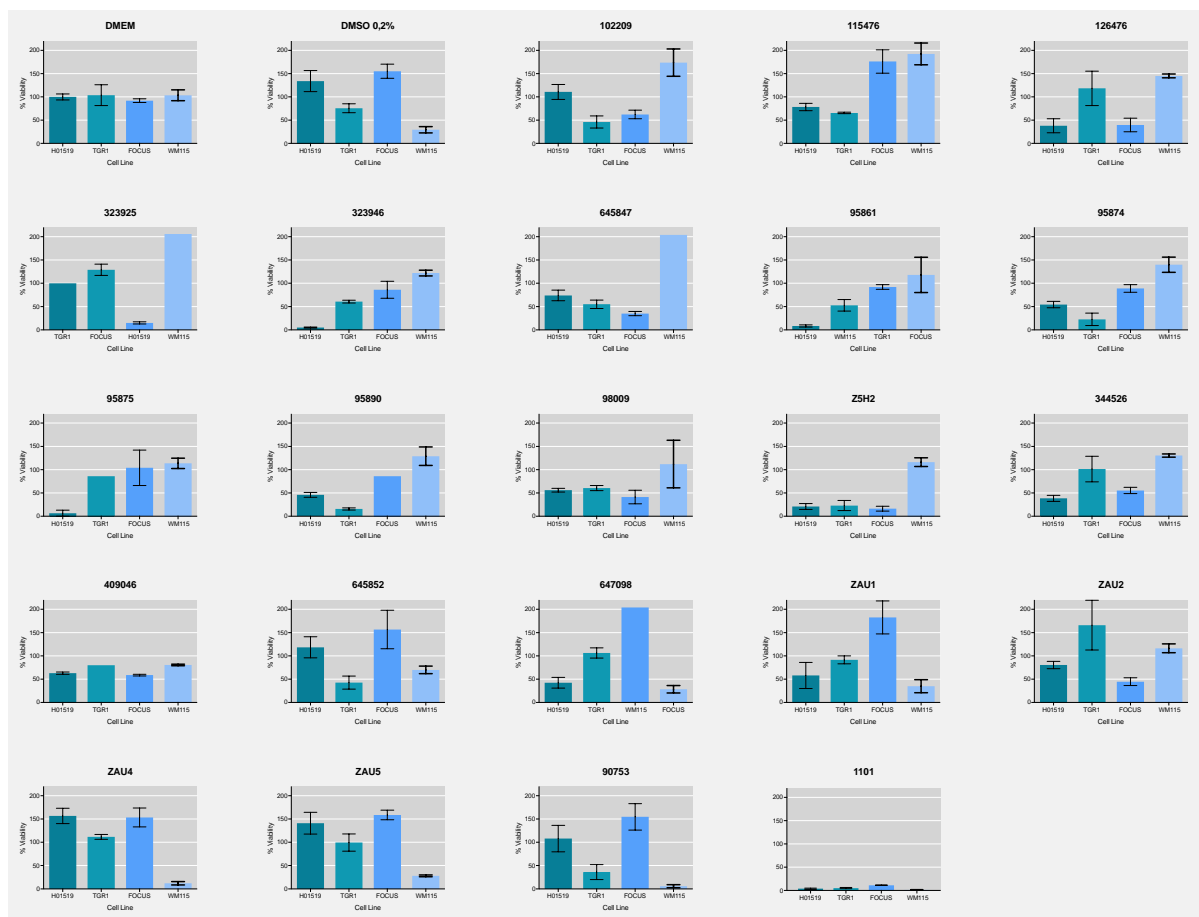
Οι κυτταρικές σειρές TGR1, HO1519, WM115 και FOCUS επιστρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 384 θέσεων (384-well plates) για 24 ώρες και, στη συνέχεια, έγινε κατεργασία με τα αντι-MYC μόρια για 72 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η επί τοις εκατό βιωσιμότητα

των κυττάρων με τη μέθοδο του Image analysis. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 17α, 17β).





Εικόνα 17^α



Εικόνα 17β

Εικόνες 17^α, 17β

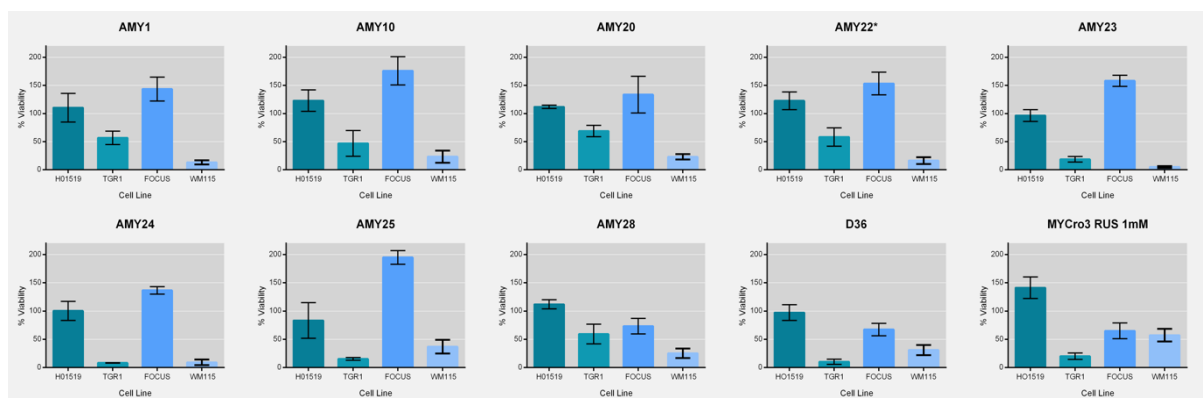
Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος μικροσκοπίας φθορισμού υψηλής απόδοσης (*high content screening*) για έλεγχο δραστηριότητας των αντι-MYC μορίων ως προς την βιωσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών και επιλογή των πιο υποσχόμενων για περαιτέρω μελέτες βιωσιμότητας και τοξικότητας.

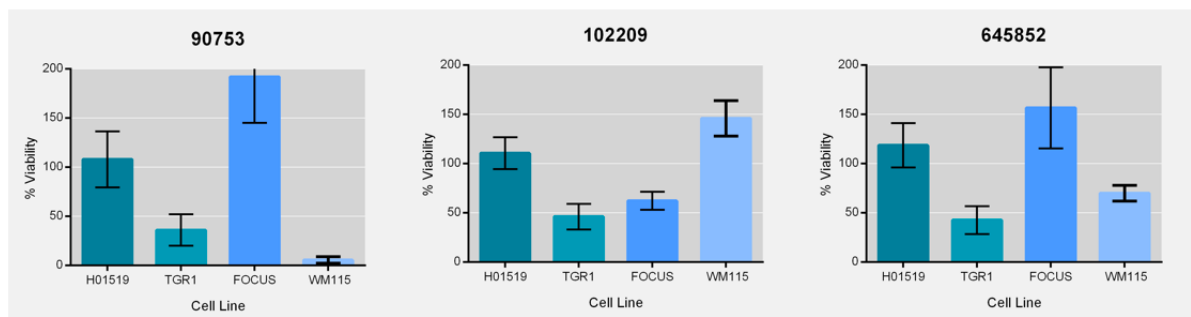
Το AMY1, Amy10, Amy20, Amy22*, Amy23, Amy24, Amy25, Amy28, D36, 90753, 102209, 645852 είναι τα αντι-MYC μόρια που κρίθηκαν πιο υποσχόμενα για περαιτέρω in-vitro και in-vivo μελέτες.

Μπορεί να υποτεθεί ότι:

- Εάν μια ένωση μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων TGR1 ΚΑΙ δεν μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα του H01519, μπορεί να ταξινομηθεί ως πολλά υποσχόμενη ένωση που σχετίζεται με το c-MYC.
- Εφόσον μία ένωση μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων TGR1 ΚΑΙ FOCUS ΚΑΙ/Η WM115 ΚΑΙ δεν μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα του H01519 μπορεί να χαρακτηριστεί ως πολλά υποσχόμενη ένωση.
- Εάν μία ένωση μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων FOCUS ή των WM115, μπορεί να ταξινομηθεί ως ένωση με πιθανή αντικαρκινική δραστηριότητα αλλά δεν σχετίζεται με το c-myc.

Amy1, Amy10, Amy20, Amy22*, Amy23, Amy24, Amy25, Amy28, D36, 90753, 102209, 645852 είναι τα αντι-MYC μόρια που κρίθηκαν πιο υποσχόμενα για περαιτέρω in-vitro και in-vivo μελέτες (Εικόνα 18).



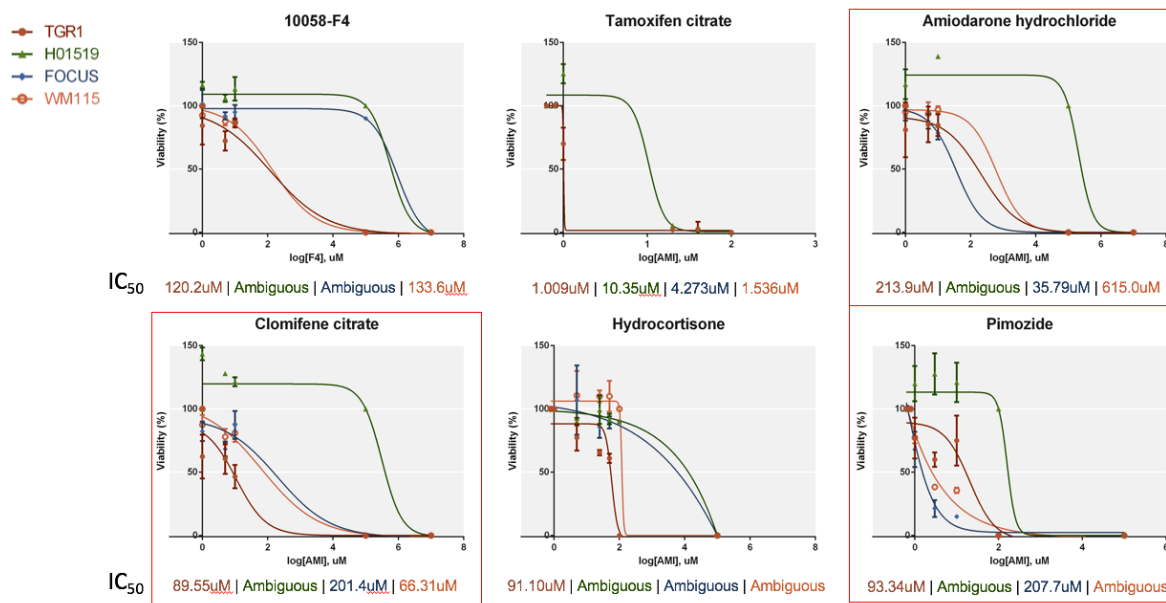


Εικόνα 18

Από τη μέθοδο μικροσκοπίας φθορισμού υψηλής φάνηκε ότι τα παραπάνω μόρια πληρούν τα κριτήρια για να θεωρηθεί ότι αναστέλλεται ο μεταγραφικός παράγοντας *c-MYC*.

In silico και *in vitro* αναλύσεις αναδεικνύουν ότι τα φάρμακα **Amiodarone hydrochloride**, **clomifene citrate** και **Pimozide** αποτελούν πιθανά αντι-καρκινικά φάρμακα, αναστέλλοντας μονοπάτια που επηρεάζει ο *c-MYC*.

Η *in silico* μετα-ανάλυση από 539 hits αποκάλυψε εμπλουτισμό αυτών με πιθανά αντι-καρκινικά φάρμακα. Πειραματικά, οι κυτταρικές σειρές H01519 (MYC - / -) και TGR1 (MYC + / +), καθώς και οι WM115 και FOCUS, MYC εξαρτώμενες/ανεξάρτητες αντίστοιχα -με βάση την ανάλυση στο DerMap από 558 κυτταρικές σειρές- επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις από 5 hits και έναν άμεσο αναστολέα του Myc, το 10058-F4, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, για τον έλεγχο των πιθανών αντι-MYC μορίων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Reszurin για την κατασκευή καμπύλων βιωσιμότητας. Τα *in vitro* αποτελέσματα έδειξαν ότι τέσσερις στις πέντε ενώσεις εμφάνισαν μία σημαντική διαφορά στο IC50 μεταξύ εξαρτώμενων από MYC και ανεξάρτητων κυτταρικών σειρών, παρομοίως με το 10058-F4, επαληθεύοντας ότι αυτές οι ενώσεις μπορούν να δράσουν ως έμμεσοι αναστολείς Myc.

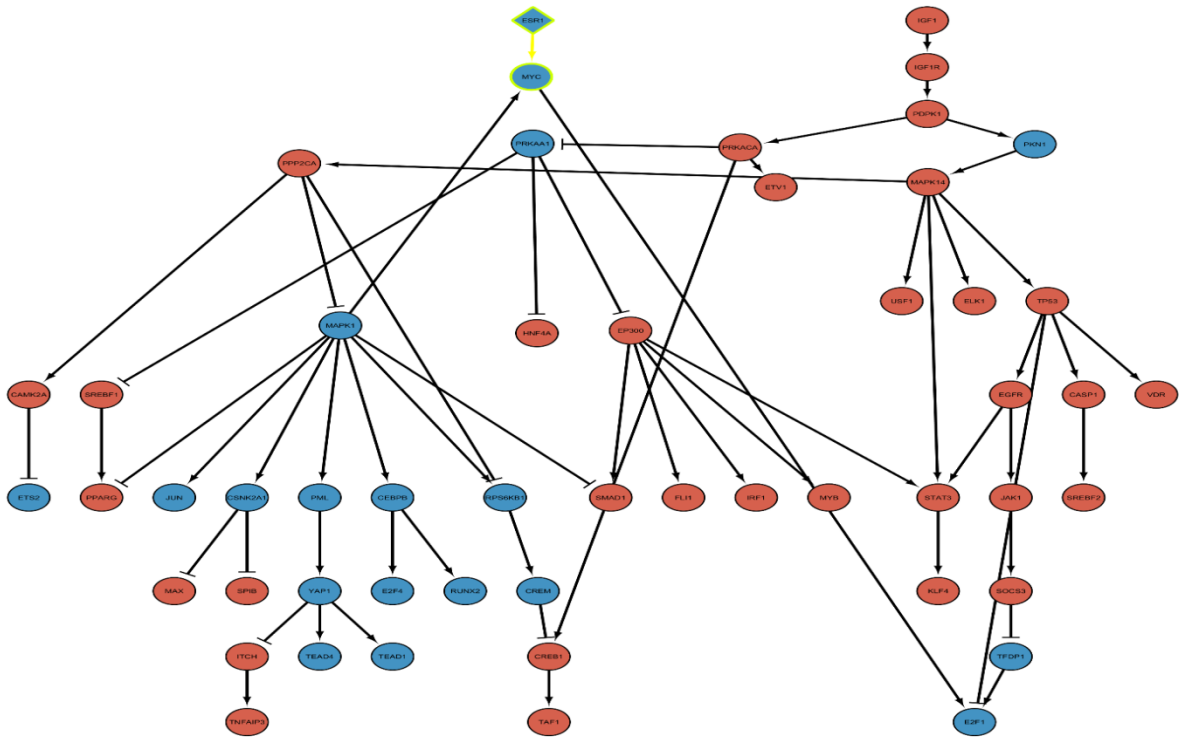
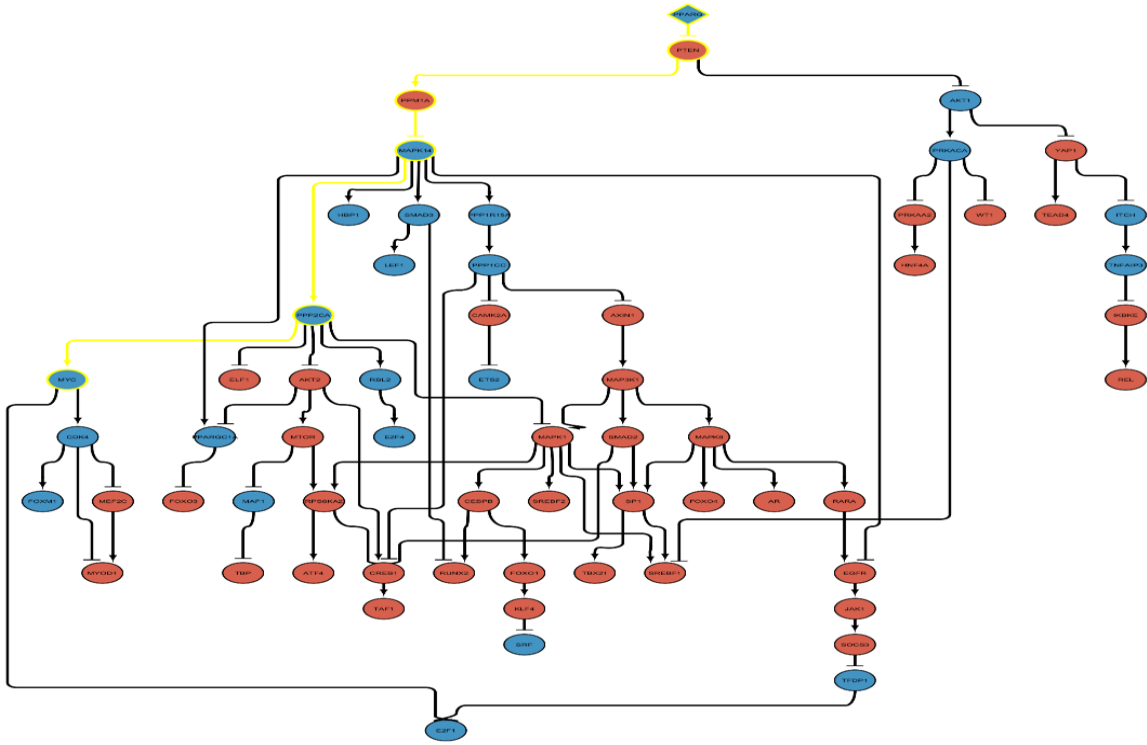


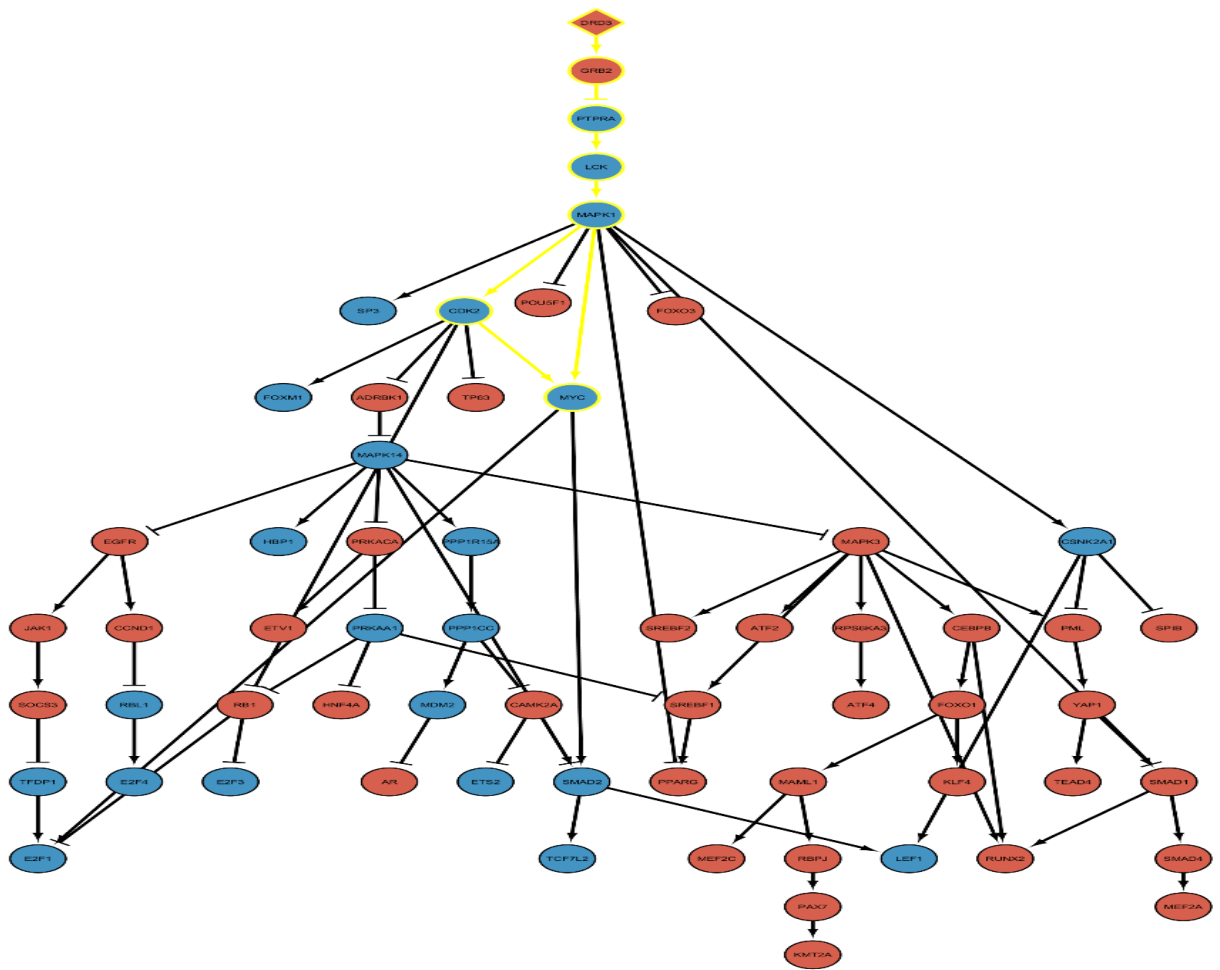
Εικόνα 19

Έλεγχος βιωσιμότητας των τεσσάρων κυτταρικών σειρών H01519, TGR1, FOCUS, WM115 με τη μέθοδο Resazurin.

Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των ενώσεων από την *in silico* ανάλυση.

Για τα προτεινόμενα δίκτυα σηματοδότησης χρησιμοποιήθηκαν τα CARNIVAL και OmniPath εργαλεία ανάλυσης. Μπορεί να υποθεθεί ότι το AMIODARONE ρυθμίζει ανασταλτικά τη δράση του MYC μέσω MAPK14 και PPP2CA μονοπατιών, το CLOMIFENE μέσω ESR1 και MAPK1, και το PIMOZIDE μέσω MAPK1 και CDK2 μονοπατιών.





Εικόνα 20

Εύρεση πιθανών μονοπατιών αναστολής του παράγοντα MYC από τα αντι-καρκινικά φάρμακα που βρέθηκαν από *in silico* αναλύσεις.

Συζήτηση

Ο παράγοντας μεταγραφής Myc ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που προάγουν την κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη. Η απορρύθμιση του Myc σχετίζεται στενά με πολλούς τύπους καρκίνου, καθιστώντας τον ένα φαινομενικά ελκυστικό στόχο για θεραπευτική αναστολή. Η έκφρασή του εκτιμάται ότι είναι αυξημένη ή απορυθμισμένη σε ποσοστό μέχρι 70% των ανθρώπινων καρκίνων. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του MYC έχουν συνδεθεί με τον επιθετικό καρκίνο του προστάτη στον άνθρωπο και τον τριπλό αρνητικό καρκίνο του μαστού (Gurel et al., 2008, Palaskas et al., 2011). Τα πειραματικά μοντέλα της μεσολαβούμενης από Myc ογκογένεσης υποδηλώνουν ότι οι καθιερωμένοι όγκοι είναι εξαρτημένοι από τον Myc και ότι η μη ρυθμισμένη έκφρασή του, έχει ως αποτέλεσμα εξάρτηση του κυττάρου όχι μόνο στο Myc, αλλά και σε θρεπτικά συστατικά. Αυτές οι μεταβολές που προκαλούνται από τον Myc παρέχουν μια μοναδική ευκαιρία για νέες θεραπευτικές στρατηγικές.

Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ μελών του δικτύου που εμπλέκεται ο μεταγραφικός παράγοντας Myc, είναι δυνητικοί στόχοι μικρών μορίων αναστολέων και σταθεροποιητών. Διάφορες στρατηγικές διαλογής έχουν εντοπίσει αρκετές ενώσεις-οδηγούς που αναστέλλουν τη δράση του MYC είτε άμεσα, είτε έμμεσα. Για τον καλύτερο χαρακτηρισμό των ενώσεων, έχουν προσδιοριστεί ειδικές θέσεις δέσμησης και έχουν τεκμηριωθεί μοριακοί μηχανισμοί δράσης του. Αυτή η γνώση της αλληλεπίδρασης μικρού μορίου-πρωτεΐνης εφαρμόζεται, επί του παρόντος, σε πολύ στοχοθετημένες προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση νέων ενώσεων με βελτιωμένη ισχύ. Μία ανησυχία είναι το εάν η ανάπτυξη αντι-MYC φαρμάκων θα επηρεάσει και τη βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων του οργανισμού. Από πειράματα δείχθηκε ότι κάθε δεδομένη στιγμή, τα περισσότερα κανονικά κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Myc, κι έτσι μπορεί να μην υπόκεινται στα ανασταλτικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με αυτή την ιδέα είναι τα ευρήματα των Soucek et al., τα οποία κατέστειλαν το ενδογενές Myc, μέσω της ρυθμισμένης με τετρακυκλίνη παροδικής έκφρασης μίας ανασταλτικής πρωτεΐνης (ΑΠ) του Myc σε διαγονιδιακούς ποντικούς που είχαν υποστεί μηχανική επεξεργασία για να αναπτύξουν K-ras^{G12D} αναιμία του πνεύμονα. Παρόλο που η αναμενόμενη πανκυτταροπενία, επιδερμική αραίωση και εντόσθια φθορά εμφανίστηκαν αρκετά γρήγορα κατά την έκφραση της ΑΠ-Myc, τα αποτελέσματα αυτά ήταν αρκετά ανεκτά, δεν συνδέονταν με εμφανή τοξικότητα και σε μεγάλο βαθμό αντιστράφηκαν, ακόμη και όταν η έκφραση της ΑΠ-Myc επέμεινε για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Απροσδόκητα, τα ποντίκια εμφάνισαν μειωμένη συχνότητα αδενομιωμάτων, σύμφωνα με την ιδέα ότι οι περισσότερες ογκογόνες σηματοδοτικές / πολλαπλασιαστικές οδοί είναι πιθανό να οφείλονται στο Myc και ότι η αναστολή του προκαλεί σχεδόν καθολική πολλαπλασιαστική αναστολή.

Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται προσπάθεια στόχευσης του μεταγραφικού παράγοντα MYC, ως θεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών ειδών καρκίνου. Για το σκοπό αυτό, η ομάδα μας συνεργάστηκε με εργαστήρια του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) για την επιλογή του βέλτιστου μορίου που αναστέλλει τη λειτουργία του παράγοντα MYC και που θα οδηγήσει σε κλινικές μελέτες. Στο πλαίσιο αυτό, δημιουργήθηκαν παράγωγα της οδηγού-ένωσης Amy22 που έχει ήδη αποδειχθεί ότι καταστέλλει τη δράση του MYC *in vivo*, καθώς και της ένωσης Myc19 που επιτυγχάνει το ίδιο *in vitro*. Τα υπονήφια νέα φάρμακα θα εμφανίζουν υψηλότερη δραστηριότητα και πιο ικανοποιητικές φυσικοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Το πρώτο βήμα για την επίτευξη αυτού του στόχου είναι η εύρεση κατάλληλων κυτταρικών σειρών, όπου θα αξιολογηθούν τα αντι-MYC μόρια. Αρχικά, επιλέχθηκαν οι αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές TGR1 myc (+/+) και HO1519 myc (-/-). Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι», έγινε περαιτέρω επιλογή ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών που εξαρτώνται από το MYC, έτσι ώστε να δημιουργηθούν καταλληλότερες *in vitro* συνθήκες για ανάλυση των μορίων. Με τη χρήση της βάσης δεδομένων DerMap και την ανάλυση των σετ δεδομένων Avara, αναδείχθηκαν οι εξαρτώμενες από MYC κυτταρικές σειρές. Με τη μέθοδο Resazurin αποδείχθηκε ότι τα αποτελέσματα από την *in silico* ανάλυση συμφωνούν με τα *in vitro* πειράματα και, εν συνεχεία, επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά μελανώματος WM115 και η κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος FOCUS ως μη εξαρτώμενη από το MYC ογκογονίδιο. Λόγω του όγκου των αντι-MYC μορίων παρουσιάστηκε η ανάγκη ανάπτυξης μιας γρήγορης και αποτελεσματικής μεθόδου για τη διαλογή των αντι-MYC μορίων. Η ομάδα μας δημιούργησε τη μέθοδο μικροσκοπίας φθορισμού υψηλής απόδοσης, όπου μπορούν να ελεγχθούν ακόμα και τριάντα φάρμακα σε τρεις ημέρες. Για καλύτερη αποτελεσματικότητα, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων για 72 ώρες, οπότε το συνολικό πείραμα για μία 384άρα πλάκα διήρκησε πέντε (5) ημέρες. Από τις μελέτες και τα πειράματα στα παραγώγων της οδηγού-ένωσης Amy22 και του Myc19, ανακαλύψαμε δώδεκα ενώσεις που μπορούν να δράσουν ανασταλτικά της λειτουργίας του MYC. Οι ενώσεις αυτές με ονομασία **Amy1, Amy10, Amy20, Amy22*, Amy23, Amy24, Amy25,**

Amy28, D36, 90753, 102209, 645852 κρίθηκαν κατάλληλες για περαιτέρω *in vivo* ανάλυση με απώτερο σκοπό την εισαγωγή τους σε κλινικές μελέτες.

Το δεύτερο μέρος της διπλωματικής, ήταν η αναζήτηση αντι-καρκινικής δράσης σε ήδη εγκεκριμένα φάρμακα, μέσα από ανάπτυξη ειδικής πλατφόρμας όπου κατατάσσει κατά προτεραιότητα ενώσεις που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν προς τα κάτω τη δραστηριότητα μεταγραφικών παραγόντων. Με δεδομένα γονιδιακής έκφρασης από τη βιβλιοθήκη του CMAP, έγινε κατάταξη των πιο σημαντικών μονοπατιών που επηρεάζει η απουσία του μεταγραφικού παράγοντα MYC. Εν συνεχεία, από τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης που είχε η επίδραση των φαρμάκων στις διάφορες κυτταροσειρές, βρέθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που αλλάζουν και συγκρίθηκαν με τα σημαντικά μονοπάτια που επηρεάζει η αναστολή του MYC. Τα φάρμακα που έδειχναν να έχουν κοινό προφίλ με τα knockdowns του MYC, επιλέχθηκαν για *in vitro* ανάλυση. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς οι 4 στις 5 ενώσεις ενώσεις που ελέγχθηκαν από τη μέθοδο Resazurin, πληρούσαν τα αρχικά μας κριτήρια για να χαρακτηριστούν αντι-MYC.

Πιο αναλυτικά, ως υποσχόμενα φάρμακα για περαιτέρω αναλύσεις, βρέθηκαν να είναι το AMIODARONE, το CLOMIFENE και το PIMOZIDE. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι το AMIODARONE είναι ένα φάρμακο κατά της αρρυθμίας, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία και πρόληψη ορισμένων τύπων ακανόνιστων καρδιακών παλμών. Αυτό περιλαμβάνει κοιλιακή ταχυκαρδία (VT), κοιλιακή μαρμαρυγή (VF) καθώς και κοιλιακή μαρμαρυγή και παροξυσμική υπερκοιλιακή ταχυκαρδία.

<https://www.drugs.com/monograph/amiodarone-hydrochloride.html>

Από την ανάλυση των εργαλείων ανάλυσης CARNIVAL και OmniPath φαίνεται πως ένα δυνητικό μονοπάτι που μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή του MYC είναι μέσω των MAPK14 και PPP2CA μονοπατιών. Το CLOMIFENE είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της στειρότητας σε γυναίκες που δεν έχουν ωορρηξία, ή πάσχουν από το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών <https://www.drugs.com/monograph/clomiphene-citrate.html>. Το συγκεκριμένο φάρμακο πιθανώς να παρεμποδίζει το MYC μέσω του ESR1 και του MAPK1 μονοπατιού. Τέλος, το PIMOZIDE, ένα αντιψυχωτικό φάρμακο, μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία του καρκίνου. Σε παρόμοιο συμπέρασμα κατέληξε πρόσφατα και η ομάδα του Dakir et al., όπου δημοσίευσε πως το PIMOZIDE μπορεί να αποτελέσει θεραπεία του καρκίνου του μαστού μετά από *in vivo* πειράματα, επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης του cMYC.

Ο βασικός σκοπός της εργασίας, λοιπόν, που είναι η επιλογή του βέλτιστου μορίου μέσα από παράγωγα αντι-MYC ενώσεων και μέσα από βιοπληροφορικές αναλύσεις, το οποίο αναστέλλει την λειτουργία του παράγοντα MYC και που θα οδηγήσει σε κλινικές δοκιμές, επιτεύχθηκε. Μια από τις νέες προκλήσεις που αντιμετωπίζει η φαρμακευτική βιομηχανία είναι πώς η περαιτέρω επένδυση σε βιοπληροφορικούς πόρους θα επιταχύνει της ανακάλυψη φαρμάκων. Οι προσεγγίσεις περιλαμβάνουν: την ανάπτυξη βάσεων δεδομένων και αποθηκών δεδομένων που μπορούν να αρχειοθετήσουν, τη διατήρηση και την ενσωμάτωση μεγάλων ποσοτήτων ανακαλυφθέντων φαρμάκων και βιοϊατρικών δεδομένων, την ανάπτυξη ισχυρών αλγορίθμων για την ανάλυση μεγάλων και σύνθετων συνόλων δεδομένων και την ανάπτυξη εργαλείων που θα επιτρέπουν την πειραματική ανακάλυψη φαρμάκων για επιστήμονες με εύκολη πρόσβαση και ερμηνεία αυτών των δεδομένων (Parnell et al., 2011). Αυτού του είδους οι προσπάθειες θα επιτρέψουν την καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη γονιδιωματική και άλλες «omic» προσεγγίσεις για να ταξινομήσουμε τις ασθένειες, να βελτιώσουμε τις διαγνώσεις και να ανοίξουμε το δρόμο σε νέα, καινοτόμα φάρμακα.

Βιβλιογραφία

- Adhikary, Sovana, and Martin Eilers. “Transcriptional Regulation and Transformation by Myc Proteins.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, no. 8 (August 2005): 635–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1703>.
- Ahmadiyeh, N., M. M. Pomerantz, C. Grisanzio, P. Herman, L. Jia, V. Almendro, H. H. He, et al. “8q24 Prostate, Breast, and Colon Cancer Risk Loci Show Tissue-Specific Long-Range Interaction with MYC.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, no. 21 (May 25, 2010): 9742–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910668107>.
- Akhoondi, Shahab, Dahui Sun, Natalie von der Lehr, Sophia Apostolidou, Kathleen Klotz, Alena Maljukova, Diana Cepeda, et al. “*FBXW7/HCDC4* Is a General Tumor Suppressor in Human Cancer.” *Cancer Research* 67, no. 19 (October 1, 2007): 9006–12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1320>.
- Andrieu, Guillaume, Anna C. Belkina, and Gerald V. Denis. “Clinical Trials for BET Inhibitors Run Ahead of the Science.” *Drug Discovery Today: Technologies* 19 (March 2016): 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.06.004>.
- Ayer, Donald E, Quentin A Lawrence, and Robert N Eisenman. “Mad-Max Transcriptional Repression Is Mediated by Ternary Complex Formation with Mammalian Homologs of Yeast Repressor Sin3.” *Cell* 80, no. 5 (March 1995): 767–76. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90355-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90355-0).
- Baudino, T. A., and J. L. Cleveland. “The Max Network Gone Mad.” *Molecular and Cellular Biology* 21, no. 3 (February 1, 2001): 691–702. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.691-702.2001>.
- Bazarov, Alex V, Susumu Adachi, Sheng-Feng Li, Maria K Mateyak, Shan Wei, and John M Sedivy. “A Modest Reduction in C-Myc Expression Has Minimal Effects on Cell Growth and Apoptosis But Dramatically Reduces Susceptibility to Ras and Raf Transformation,” n.d., 10.

Bello-Fernandez, C., G. Packham, and J. L. Cleveland. “The Ornithine Decarboxylase Gene Is a Transcriptional Target of C-Myc.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, no. 16 (August 15, 1993): 7804–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7804>.

Berg, Thorsten, Steven B. Cohen, Joel Desharnais, Corinna Sonderegger, Daniel J. Maslyar, Joel Goldberg, Dale L. Boger, and Peter K. Vogt. “Small-Molecule Antagonists of Myc/Max Dimerization Inhibit Myc-Induced Transformation of Chicken Embryo Fibroblasts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, no. 6 (March 19, 2002): 3830–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.062036999>.

Berthon, Céline, Emmanuel Raffoux, Xavier Thomas, Norbert Vey, Carlos Gomez-Roca, Karen Yee, David Christopher Taussig, et al. “Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Acute Leukaemia: A Dose-Escalation, Phase 1 Study.” *The Lancet Haematology* 3, no. 4 (April 2016): e186–95. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00247-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00247-1).

Bjornsti, Mary-Ann, and Peter J. Houghton. “The Tor Pathway: A Target for Cancer Therapy.” *Nature Reviews Cancer* 4, no. 5 (May 2004): 335–48. <https://doi.org/10.1038/nrc1362>.

Boxer, Robert B., Joanne W. Jang, Louis Sintasath, and Lewis A. Chodosh. “Lack of Sustained Regression of C-MYC-Induced Mammary Adenocarcinomas Following Brief or Prolonged MYC Inactivation.” *Cancer Cell* 6, no. 6 (December 2004): 577–86. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.10.013>.

“Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Acute Leukaemia: A Dose-Escalation, Phase 1 Study.” *The Lancet Haematology* 3, no. 4 (April 2016): e186–95. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00247-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00247-1).

Bywater, Megan J., Richard B. Pearson, Grant A. McArthur, and Ross D. Hannan. “Dysregulation of the Basal RNA Polymerase Transcription Apparatus in Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 13, no. 5 (May 2013): 299–314. <https://doi.org/10.1038/nrc3496>.

Campaner, Stefano, Mirko Doni, Per Hydbring, Alessandro Verrecchia, Lucia Bianchi, Domenico Sardella, Thomas Schleker, et al. “Cdk2 Suppresses Cellular Senescence Induced by the C-Myc Oncogene.” *Nature Cell Biology* 12, no. 1 (January 2010): 54–59.

<https://doi.org/10.1038/ncb2004>.

Carabet, Lavinia, Paul Rennie, and Artem Cherkasov. “Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches.” *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 1 (December 29, 2018): 120.

<https://doi.org/10.3390/ijms20010120>.

Castell, Alina, Qinzi Yan, Karin Fawkner, Per Hydbring, Fan Zhang, Vasiliki Verschut, Marcela Franco, et al. “A Selective High Affinity MYC-Binding Compound Inhibits MYC:MAX Interaction and MYC-Dependent Tumor Cell Proliferation.” *Scientific Reports* 8, no. 1 (December 2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28107-4>.

Choi, Seung H., Madhupriya Mahankali, Sang Jun Lee, Mitchell Hull, H. Michael Petrassi, Arnab K. Chatterjee, Peter G. Schultz, Katherine A. Jones, and Weijun Shen. “Targeted Disruption of Myc–Max Oncoprotein Complex by a Small Molecule.” *ACS Chemical Biology* 12, no. 11 (November 17, 2017): 2715–19. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00799>.

Coller, H. A., C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E. S. Lander, R. N. Eisenman, and T. R. Golub. “Expression Analysis with Oligonucleotide Microarrays Reveals That MYC Regulates Genes Involved in Growth, Cell Cycle, Signaling, and Adhesion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, no. 7 (March 28, 2000): 3260–65.

<https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3260>.

Cowling, Victoria H., and Michael D. Cole. “The Myc Transactivation Domain Promotes Global Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Independently of Direct DNA Binding.” *Molecular and Cellular Biology* 27, no. 6 (March 15, 2007): 2059–73.

<https://doi.org/10.1128/MCB.01828-06>.

- Dakir, EL-Habib, Adam Pickard, Kirtiman Srivastava, Cian M. McCrudden, Stephane R. Gross, Stephen Lloyd, Shu-Dong Zhang, et al. “The Anti-Psychotic Drug Pimozide Is a Novel Chemotherapeutic for Breast Cancer.” *Oncotarget* 9, no. 79 (October 9, 2018). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>.
- Dang, C. V., A. Le, and P. Gao. “MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities.” *Clinical Cancer Research* 15, no. 21 (November 1, 2009): 6479–83. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0889>.
- Dang, Chi V. “Fine-Tuned Amplification in Cells.” *Nature* 511, no. 7510 (July 2014): 417–18. <https://doi.org/10.1038/nature13518>.
- Dang, Chi V., Kathryn A. O’Donnell, Karen I. Zeller, Tam Nguyen, Rebecca C. Osthus, and Feng Li. “The C-Myc Target Gene Network.” *Seminars in Cancer Biology* 16, no. 4 (August 2006): 253–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.014>.
- Dawson, Mark A., Rab K. Prinjha, Antje Dittmann, George Giotopoulos, Marcus Bantscheff, Wai-In Chan, Samuel C. Robson, et al. “Inhibition of BET Recruitment to Chromatin as an Effective Treatment for MLL-Fusion Leukaemia.” *Nature* 478, no. 7370 (October 2011): 529–33. <https://doi.org/10.1038/nature10509>.
- Delmore, Jake E., Ghayas C. Issa, Madeleine E. Lemieux, Peter B. Rahl, Junwei Shi, Hannah M. Jacobs, Efstathios Kastritis, et al. “BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target C-Myc.” *Cell* 146, no. 6 (September 2011): 904–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>.
- Elbadawy, Mohamed, Tatsuya Usui, Hideyuki Yamawaki, and Kazuaki Sasaki. “Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 9 (May 11, 2019): 2340. <https://doi.org/10.3390/ijms20092340>.

- Ennishi, Daisuke, Anja Mottok, Susana Ben-Neriah, Hennady P. Shulha, Pedro Farinha, Fong Chun Chan, Barbara Meissner, et al. “Genetic Profiling of *MYC* and *BCL2* in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Determines Cell-of-Origin–Specific Clinical Impact.” *Blood* 129, no. 20 (May 18, 2017): 2760–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-747022>.
- Felsher, Dean W. “Reversibility of Oncogene-Induced Cancer.” *Current Opinion in Genetics & Development* 14, no. 1 (February 2004): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.12.008>.
- Fernández-Miranda, Gonzalo, and Raúl Méndez. “The CPEB-Family of Proteins, Translational Control in Senescence and Cancer.” *Ageing Research Reviews* 11, no. 4 (September 2012): 460–72. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.004>.
- Fernandez, P. C. “Genomic Targets of the Human C-Myc Protein.” *Genes & Development* 17, no. 9 (May 1, 2003): 1115–29. <https://doi.org/10.1101/gad.1067003>.
- Filippakopoulos, Panagis, Jun Qi, Sarah Picaud, Yao Shen, William B. Smith, Oleg Fedorov, Elizabeth M. Morse, et al. “Selective Inhibition of BET Bromodomains.” *Nature* 468, no. 7327 (December 2010): 1067–73. <https://doi.org/10.1038/nature09504>.
- Garcia-Cuellar, M-P, E Füller, E Mäthner, C Breitingner, K Hetzner, L Zeitlmann, A Borkhardt, and R K Slany. “Efficacy of Cyclin-Dependent-Kinase 9 Inhibitors in a Murine Model of Mixed-Lineage Leukemia.” *Leukemia* 28, no. 7 (July 2014): 1427–35. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.40>.
- Giuriato, S., S. Ryeom, A. C. Fan, P. Bachireddy, R. C. Lynch, M. J. Rioth, J. van Riggelen, et al. “Sustained Regression of Tumors upon *MYC* Inactivation Requires P53 or Thrombospondin-1 to Reverse the Angiogenic Switch.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 44 (October 31, 2006): 16266–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608017103>.
- Goga, Andrei, Dun Yang, Aaron D Tward, David O Morgan, and J Michael Bishop. “Inhibition of CDK1 as a Potential Therapy for Tumors Over-Expressing *MYC*.” *Nature Medicine* 13, no. 7 (July 2007): 820–27. <https://doi.org/10.1038/nm1606>.

Gregory, Mark A., Ying Qi, and Stephen R. Hann. "Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 Controls c-Myc Proteolysis and Subnuclear Localization." *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 51 (December 19, 2003): 51606–12.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M310722200>.

Guccione, Ernesto, Francesca Martinato, Giacomo Finocchiaro, Lucilla Luzi, Laura Tizzoni, Valentina Dall' Olio, Giuseppe Zardo, Clara Nervi, Loris Bernard, and Bruno Amati. "Myc-Binding-Site Recognition in the Human Genome Is Determined by Chromatin Context."

Nature Cell Biology 8, no. 7 (July 2006): 764–70. <https://doi.org/10.1038/ncb1434>.

Haiman, Christopher A, Loïc Le Marchand, Jennifer Yamamoto, Daniel O Stram, Xin Sheng, Laurence N Kolonel, Anna H Wu, David Reich, and Brian E Henderson. "A Common Genetic Risk Factor for Colorectal and Prostate Cancer." *Nature Genetics* 39, no. 8 (August 2007): 954–56.

<https://doi.org/10.1038/ng2098>.

Han, Han, Yuxing Chen, Li Cheng, Edward V. Prochownik, and Youjun Li. "MicroRNA-206 Impairs c-Myc-Driven Cancer in a Synthetic Lethal Manner by Directly Inhibiting MAP3K13." *Oncotarget* 7, no. 13 (March 29, 2016).

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7653>.

Horiuchi, Dai, Roman Camarda, Alicia Y Zhou, Christina Yau, Olga Momcilovic, Sanjeev Balakrishnan, Alexandra N Corella, et al. "PIM1 Kinase Inhibition as a Targeted Therapy against Triple-Negative Breast Tumors with Elevated MYC Expression." *Nature Medicine* 22, no. 11 (November 2016): 1321–29.

<https://doi.org/10.1038/nm.4213>.

Hsieh, Annie L., and Chi V. Dang. "MYC, Metabolic Synthetic Lethality, and Cancer." In *Metabolism in Cancer*, edited by Thorsten Cramer and Clemens A. Schmitt, 207:73–91.

Cham: Springer International Publishing, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42118-6_4.

- Huang, Chun-Hao, Amaia Lujambio, Johannes Zuber, Darjus F. Tschaharganeh, Michael G. Doran, Michael J. Evans, Thomas Kitzing, et al. “CDK9-Mediated Transcription Elongation Is Required for MYC Addiction in Hepatocellular Carcinoma.” *Genes & Development* 28, no. 16 (August 15, 2014): 1800–1814. <https://doi.org/10.1101/gad.244368.114>.
- Huang, Ming-Jer, Yuan-chih Cheng, Chien-Ru Liu, Shufan Lin, and H. Eugene Liu. “A Small-Molecule c-Myc Inhibitor, 10058-F4, Induces Cell-Cycle Arrest, Apoptosis, and Myeloid Differentiation of Human Acute Myeloid Leukemia.” *Experimental Hematology* 34, no. 11 (November 2006): 1480–89. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.06.019>.
- Hueber, A. “Requirement for the CD95 Receptor-Ligand Pathway in c-Myc-Induced Apoptosis.” *Science* 278, no. 5341 (November 14, 1997): 1305–9. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1305>.
- J. S. Lazo, S. J. Metallo, and E. V. Prochownik. “Improved Low Molecular Weight Myc-Max Inhibitors.” *Molecular Cancer Therapeutics* 6, no. 9 (September 1, 2007): 2399–2408. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0005>.
- Jain, M. “Sustained Loss of a Neoplastic Phenotype by Brief Inactivation of MYC.” *Science* 297, no. 5578 (July 5, 2002): 102–4. <https://doi.org/10.1126/science.1071489>.
- Jeong, Kyung-Chae, Kyung-Tae Kim, Hye-Hyun Seo, Seung-Pil Shin, Kyung-Ohk Ahn, Min-Ju Ji, Weon Seo Park, In-Hoo Kim, Sang-Jin Lee, and Ho Kyung Seo. “Intravesical Instillation of C-MYC Inhibitor KSI-3716 Suppresses Orthotopic Bladder Tumor Growth.” *Journal of Urology* 191, no. 2 (February 2014): 510–18. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.07.019>.
- Jung, Kwan-Young, Huabo Wang, Peter Teriete, Jeremy L. Yap, Lijia Chen, Maryanna E. Lanning, Angela Hu, et al. “Perturbation of the C-Myc–Max Protein–Protein Interaction via Synthetic α -Helix Mimetics.” *Journal of Medicinal Chemistry* 58, no. 7 (April 9, 2015): 3002–24. <https://doi.org/10.1021/jm501440q>.

Kalkat, Manpreet, Jason De Melo, Katherine Hickman, Corey Lourenco, Cornelia Redel, Diana Resetca, Aaliya Tamachi, William Tu, and Linda Penn. “MYC Deregulation in Primary Human Cancers.” *Genes* 8, no. 6 (May 25, 2017): 151.

<https://doi.org/10.3390/genes8060151>.

Karlsson, A. “Genomically Complex Lymphomas Undergo Sustained Tumor Regression upon MYC Inactivation Unless They Acquire Novel Chromosomal Translocations.” *Blood* 101, no. 7 (April 1, 2003): 2797–2803. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3091>.

Kessler, J. D., K. T. Kahle, T. Sun, K. L. Meerbrey, M. R. Schlabach, E. M. Schmitt, S. O. Skinner, et al. “A SUMOylation-Dependent Transcriptional Subprogram Is Required for Myc-Driven Tumorigenesis.” *Science* 335, no. 6066 (January 20, 2012): 348–53.

<https://doi.org/10.1126/science.1212728>.

Kiessling, Anke, Rita Wiesinger, Bianca Sperl, and Thorsten Berg. “Selective Inhibition of C-Myc/Max Dimerization by a Pyrazolo[1,5-a]Pyrimidine.” *ChemMedChem* 2, no. 5 (May 14, 2007): 627–30. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600294>.

Koh, Cheryl M., Arianna Sabò, and Ernesto Guccione. “Targeting MYC in Cancer Therapy: RNA Processing Offers New Opportunities.” *BioEssays* 38, no. 3 (March 2016): 266–75.

<https://doi.org/10.1002/bies.201500134>.

Kumar, Ashutosh, Akihiro Ito, Mikako Hirohama, Minoru Yoshida, and Kam Y.J. Zhang. “Identification of New SUMO Activating Enzyme 1 Inhibitors Using Virtual Screening and Scaffold Hopping.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26, no. 4 (February 2016): 1218–23. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.030>.

Kwiatkowski, Nicholas, Tinghu Zhang, Peter B. Rahl, Brian J. Abraham, Jessica Reddy, Scott B. Ficarro, Anahita Dastur, et al. “Targeting Transcription Regulation in Cancer with a Covalent CDK7 Inhibitor.” *Nature* 511, no. 7511 (July 2014): 616–20.

<https://doi.org/10.1038/nature13393>.

Levens, D. “Cellular MYC Economics: Balancing MYC Function with MYC Expression.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3, no. 11 (November 1, 2013): a014233–a014233.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014233>.

Lewis, B C, H Shim, Q Li, C S Wu, L A Lee, A Maity, and C V Dang. “Identification of Putative C-Myc-Responsive Genes: Characterization of Rcl, a Novel Growth-Related Gene.” *Molecular and Cellular Biology* 17, no. 9 (September 1997): 4967–78.
<https://doi.org/10.1128/MCB.17.9.4967>.

Lin, Charles Y., Jakob Lovén, Peter B. Rahl, Ronald M. Paranal, Christopher B. Burge, James E. Bradner, Tong Ihn Lee, and Richard A. Young. “Transcriptional Amplification in Tumor Cells with Elevated C-Myc.” *Cell* 151, no. 1 (September 2012): 56–67.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.026>.

Lin, Charles Y., Serap Erkek, Yiai Tong, Linlin Yin, Alexander J. Federation, Marc Zapatka, Parthiv Haldipur, et al. “Active Medulloblastoma Enhancers Reveal Subgroup-Specific Cellular Origins.” *Nature* 530, no. 7588 (February 2016): 57–62.
<https://doi.org/10.1038/nature16546>.

Lin, Chen-Ju, Zeina Nasr, Prem K. Premsrirut, John A. Porco, Yoshitaka Hippo, Scott W. Lowe, and Jerry Pelletier. “Targeting Synthetic Lethal Interactions between Myc and the EIF4F Complex Impedes Tumorigenesis.” *Cell Reports* 1, no. 4 (April 2012): 325–33.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.010>.

Liu, Lidan, Jannes Ulbrich, Judith Müller, Torsten Wüstefeld, Lukas Aeberhard, Theresia R. Kress, Nathiya Muthalagu, et al. “Deregulated MYC Expression Induces Dependence upon AMPK-Related Kinase 5.” *Nature* 483, no. 7391 (March 2012): 608–12.
<https://doi.org/10.1038/nature10927>.

Lu, Jin-Jian, Ling-Hua Meng, Uma T. Shankavaram, Cai-Hua Zhu, Lin-Jiang Tong, Guang Chen, Li-Ping Lin, John N. Weinstein, and Jian Ding. “Dihydroartemisinin Accelerates C-MYC Oncoprotein Degradation and Induces Apoptosis in c-MYC-Overexpressing Tumor Cells.” *Biochemical Pharmacology* 80, no. 1 (July 2010): 22–30.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.016>.

Martinou, Jean-Claude, and Douglas R. Green. “Breaking the Mitochondrial Barrier.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, no. 1 (January 2001): 63–67.

<https://doi.org/10.1038/35048069>.

McMahon, S. B. “MYC and the Control of Apoptosis.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4, no. 7 (July 1, 2014): a014407–a014407.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014407>.

Menssen, A., and H. Hermeking. “Characterization of the C-MYC-Regulated Transcriptome by SAGE: Identification and Analysis of c-MYC Target Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, no. 9 (April 30, 2002): 6274–79.

<https://doi.org/10.1073/pnas.082005599>.

Meyer, Natalie, and Linda Z. Penn. “Reflecting on 25 Years with MYC.” *Nature Reviews Cancer* 8, no. 12 (December 2008): 976–90. <https://doi.org/10.1038/nrc2231>.

Mo, H., and M. Henriksson. “Identification of Small Molecules That Induce Apoptosis in a Myc-Dependent Manner and Inhibit Myc-Driven Transformation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 16 (April 18, 2006): 6344–49.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0601418103>.

“Modelling Myc Inhibition as a Cancer Therapy.” *Nature* 455, no. 7213 (October 2008): 679–83.

<https://doi.org/10.1038/nature07260>.

- Morrish, F., and D. Hockenbery. "MYC and Mitochondrial Biogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4, no. 5 (May 1, 2014): a014225–a014225.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014225>.
- Nair, Satish K, and Stephen K Burley. "X-Ray Structures of Myc-Max and Mad-Max Recognizing DNA: Molecular Bases of Regulation by Proto-Oncogenic Transcription Factors," n.d., 13.
- Nie, Zuqin, Gangqing Hu, Gang Wei, Kairong Cui, Arito Yamane, Wolfgang Resch, Ruoning Wang, et al. "C-Myc Is a Universal Amplifier of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells." *Cell* 151, no. 1 (September 2012): 68–79.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.033>.
- O'Connell, Brenda C., Ann F. Cheung, Carl P. Simkevich, Wanny Tam, Xiaojia Ren, Maria K. Mateyak, and John M. Sedivy. "A Large Scale Genetic Analysis of C-Myc-Regulated Gene Expression Patterns." *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 14 (April 4, 2003): 12563–73.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210462200>.
- O'Shea, J. M., and D. E. Ayer. "Coordination of Nutrient Availability and Utilization by MAX- and MLX-Centered Transcription Networks." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3, no. 9 (September 1, 2013): a014258–a014258.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014258>.
- Ortega, Sagrario, Ignacio Prieto, Junko Odajima, Alberto Martín, Pierre Dubus, Rocio Sotillo, Jose Luis Barbero, Marcos Malumbres, and Mariano Barbacid. "Cyclin-Dependent Kinase 2 Is Essential for Meiosis but Not for Mitotic Cell Division in Mice." *Nature Genetics* 35, no. 1 (September 2003): 25–31. <https://doi.org/10.1038/ng1232>.
- Oster, Sara K, Cynthia S W Ho, Erinn L Soucie, and Linda Z Penn. "The Myc Oncogene: MarvelouslyY Complex" 84 (n.d.): 74.

- Parnell, Laurence D., Pierre Lindenbaum, Khader Shameer, Giovanni Marco Dall'Olio, Daniel C. Swan, Lars Juhl Jensen, Simon J. Cockell, et al. "BioStar: An Online Question & Answer Resource for the Bioinformatics Community." Edited by Philip E. Bourne. *PLoS Computational Biology* 7, no. 10 (October 27, 2011): e1002216. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002216>.
- Pan, J, Q Deng, C Jiang, X Wang, T Niu, H Li, T Chen, et al. "USP37 Directly Deubiquitinates and Stabilizes C-Myc in Lung Cancer." *Oncogene* 34, no. 30 (July 2015): 3957–67. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.327>.
- Pelengaris, Stella, Michael Khan, and Gerard I Evan. "Suppression of Myc-Induced Apoptosis in *ML* Cells Exposes Multiple Oncogenic Properties of Myc and Triggers Carcinogenic Progression," n.d., 14.
- Pelengaris, Stella, Mike Khan, and Gerard Evan. "C-MYC: More than Just a Matter of Life and Death." *Nature Reviews Cancer* 2, no. 10 (October 2002): 764–76. <https://doi.org/10.1038/nrc904>.
- Peterlin, B. Matija, and David H. Price. "Controlling the Elongation Phase of Transcription with P-TEFb." *Molecular Cell* 23, no. 3 (August 2006): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.014>.
- Petroni, Marialaura, Veronica Veschi, Alberto Gulino, and Giuseppe Giannini. "Molecular Mechanisms of MYCN-Dependent Apoptosis and the MDM2–P53 Pathway: An Achille's Heel to Be Exploited for the Therapy of MYCN-Amplified Neuroblastoma." *Frontiers in Oncology* 2 (2012). <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00141>.
- Philipp, Angelika, Andreas Schneider, Imre Vasrik, Kerstin Finke, Yue Xiong, David Beach, Kari Alitalo, and Martin Eilers. "Repression of Cyclin D1: A Novel Function of MYC." *MOL. CELL. BIOL.* 14 (1994): 12.

Poole, Candace, Wenli Zheng, Haesung Lee, Danielle Young, Atul Lodh, Ahmed Chadli, and Jan van Riggelen. “Targeting the MYC Oncogene in Burkitt Lymphoma through HSP90 Inhibition.” *Cancers* 10, no. 11 (November 16, 2018): 448.

<https://doi.org/10.3390/cancers10110448>.

Poortinga, G, L M Quinn, and R D Hannan. “Targeting RNA Polymerase I to Treat MYC-Driven Cancer.” *Oncogene* 34, no. 4 (January 2015): 403–12. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.13>.

Rahl, Peter B., Charles Y. Lin, Amy C. Seila, Ryan A. Flynn, Scott McCuine, Christopher B. Burge, Phillip A. Sharp, and Richard A. Young. “C-Myc Regulates Transcriptional Pause Release.” *Cell* 141, no. 3 (April 2010): 432–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.030>.

“Requirement for the CD95 Receptor-Ligand Pathway in c-Myc-Induced Apoptosis.” *Science* 278, no. 5341 (November 14, 1997): 1305–9. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1305>.

Riggelen, Jan van, Alper Yetil, and Dean W. Felsher. “MYC as a Regulator of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis.” *Nature Reviews Cancer* 10, no. 4 (April 2010): 301–9. <https://doi.org/10.1038/nrc2819>.

Ruggero, Davide, and Pier Paolo Pandolfi. “Does the Ribosome Translate Cancer?” *Nature Reviews Cancer* 3, no. 3 (March 2003): 179–92. <https://doi.org/10.1038/nrc1015>.

Sabò, Arianna, Theresia R. Kress, Mattia Pelizzola, Stefano de Pretis, Marcin M. Gorski, Alessandra Tesi, Marco J. Morelli, et al. “Selective Transcriptional Regulation by Myc in Cellular Growth Control and Lymphomagenesis.” *Nature* 511, no. 7510 (July 2014): 488–92. <https://doi.org/10.1038/nature13537>.

Schaub, Franz X., Varsha Dhankani, Ashton C. Berger, Mihir Trivedi, Anne B. Richardson, Reid Shaw, Wei Zhao, et al. “Pan-Cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas.” *Cell Systems* 6, no. 3 (March 2018): 282-300.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.03.003>.

- Shachaf, Catherine M, and Dean W Felsher. "Tumor Dormancy and MYC Inactivation: Pushing Cancer to the Brink of Normalcy." *Cancer Res*, 2005, 5.
- Shi, Xiaoyu, Chen Liu, Baoqing Liu, Juntao Chen, Xiaoying Wu, and Weihua Gong. "JQ1: A Novel Potential Therapeutic Target," 2018, 3.
- Smith, M J, D C Charron-Prochownik, and E V Prochownik. "The Leucine Zipper of C-Myc Is Required for Full Inhibition of Erythroleukemia Differentiation." *Molecular and Cellular Biology* 10, no. 10 (October 1990): 5333–39. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.10.5333>.
- Soucek, Laura, Jonathan Whitfield, Carla P. Martins, Andrew J. Finch, Daniel J. Murphy, Nicole M. Sodik, Anthony N. Karnezis, Lamorna Brown Swigart, Sergio Nasi, and Gerard I. Evan. "Modelling Myc Inhibition as a Cancer Therapy." *Nature* 455, no. 7213 (October 2008): 679–83. <https://doi.org/10.1038/nature07260>.
- Soufi, Abdenour, Greg Donahue, and Kenneth S. Zaret. "Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome." *Cell* 151, no. 5 (November 2012): 994–1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.045>.
- Soufi, Abdenour, Meilin Fernandez Garcia, Artur Jaroszewicz, Nebiyu Osman, Matteo Pellegrini, and Kenneth S. Zaret. "Pioneer Transcription Factors Target Partial DNA Motifs on Nucleosomes to Initiate Reprogramming." *Cell* 161, no. 3 (April 2015): 555–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.017>.
- "Strategies to Inhibit Myc and Their Clinical Applicability." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5 (February 23, 2017). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00010>.
- Tanaka, Hirokazu, Itaru Matsumura, Sachiko Ezoe, Yusuke Satoh, Toshiyuki Sakamaki, Chris Albanese, Takashi Machii, Richard G Pestell, and Yuzuru Kanakura. "E2F1 and C-Myc Potentiate Apoptosis through Inhibition of NF- κ B Activity That Facilitates MnSOD-Mediated ROS Elimination." *Molecular Cell*, n.d., 13.

“Targeting MYC in Cancer Therapy: RNA Processing Offers New Opportunities.” *BioEssays* 38, no. 3 (March 2016): 266–75. <https://doi.org/10.1002/bies.201500134>.

Thomas, Lance R., Qingguo Wang, Brian C. Grieb, Jason Phan, Audra M. Foshage, Qi Sun, Edward T. Olejniczak, et al. “Interaction with WDR5 Promotes Target Gene Recognition and Tumorigenesis by MYC.” *Molecular Cell* 58, no. 3 (May 2015): 440–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.028>.

Toyoshima, M., H. L. Howie, M. Imakura, R. M. Walsh, J. E. Annis, A. N. Chang, J. Frazier, et al. “Functional Genomics Identifies Therapeutic Targets for MYC-Driven Cancer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, no. 24 (June 12, 2012): 9545–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121119109>.

Walz, Susanne, Francesca Lorenzin, Jennifer Morton, Katrin E. Wiese, Björn von Eyss, Steffi Herold, Lukas Rycak, et al. “Activation and Repression by Oncogenic MYC Shape Tumour-Specific Gene Expression Profiles.” *Nature* 511, no. 7510 (July 2014): 483–87. <https://doi.org/10.1038/nature13473>.

Wang, H, S Mannava, V Grachtchouk, D Zhuang, M S Soengas, A V Gudkov, E V Prochownik, and M A Nikiforov. “C-Myc Depletion Inhibits Proliferation of Human Tumor Cells at Various Stages of the Cell Cycle.” *Oncogene* 27, no. 13 (March 2008): 1905–15. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210823>.

Wang, Huabo, Peter Teriete, Angela Hu, Dhanya Raveendra-Panickar, Kelsey Pendelton, John S. Lazo, Julie Eiseman, et al. “Direct Inhibition of C-Myc-Max Heterodimers by Celastrol and Celastrol-Inspired Triterpenoids.” *Oncotarget* 6, no. 32 (October 20, 2015). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6116>.

Whitfield, Jonathan R., Marie-Eve Beaulieu, and Laura Soucek. “Strategies to Inhibit Myc and Their Clinical Applicability.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5 (February 23, 2017). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00010>.

Wolf, Elmar, Charles Y. Lin, Martin Eilers, and David L. Levens. “Taming of the Beast: Shaping Myc-Dependent Amplification.” *Trends in Cell Biology* 25, no. 4 (April 2015): 241–48. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.006>.

Wright, J. B., S. J. Brown, and M. D. Cole. “Upregulation of C-MYC in Cis through a Large Chromatin Loop Linked to a Cancer Risk-Associated Single-Nucleotide Polymorphism in Colorectal Cancer Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 30, no. 6 (March 15, 2010): 1411–20. <https://doi.org/10.1128/MCB.01384-09>.

Wu, Chi-Hwa, Debashis Sahoo, Constadina Arvanitis, Nicole Bradon, David L. Dill, and Dean W. Felsher. “Combined Analysis of Murine and Human Microarrays and ChIP Analysis Reveals Genes Associated with the Ability of MYC To Maintain Tumorigenesis.” Edited by Vivian G. Cheung. *PLoS Genetics* 4, no. 6 (June 6, 2008): e1000090. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000090>.

Xu-Monette, Zijun Y., Qipan Deng, Ganiraju C. Manyam, Alexander Tzankov, Ling Li, Yi Xia, Xiao-xiao Wang, et al. “Clinical and Biologic Significance of *MYC* Genetic Mutations in *De Novo* Diffuse Large B-Cell Lymphoma.” *Clinical Cancer Research* 22, no. 14 (July 15, 2016): 3593–3605. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2296>.

Yang, Zhiyuan, Jasper H.N. Yik, Ruichuan Chen, Nanhai He, Moon Kyoo Jang, Keiko Ozato, and Qiang Zhou. “Recruitment of P-TEFb for Stimulation of Transcriptional Elongation by the Bromodomain Protein Brd4.” *Molecular Cell* 19, no. 4 (August 2005): 535–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.029>.

Yeh, Elizabeth, Melissa Cunningham, Hugh Arnold, Dawn Chasse, Teresa Monteith, Giovanni Ivaldi, William C. Hahn, et al. “A Signalling Pathway Controlling C-Myc Degradation That Impacts Oncogenic Transformation of Human Cells.” *Nature Cell Biology* 6, no. 4 (April 2004): 308–18. <https://doi.org/10.1038/ncb1110>.

Yin, Xiaoying, Christine Giap, John S Lazo, and Edward V Prochownik. “Low Molecular Weight Inhibitors of Myc–Max Interaction and Function.” *Oncogene* 22, no. 40 (September 2003): 6151–59. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206641>.

Zhang, Xiaoyang, Peter S Choi, Joshua M Francis, Marcin Imielinski, Hideo Watanabe, Andrew D Cherniack, and Matthew Meyerson. “Identification of Focally Amplified Lineage-Specific Super-Enhancers in Human Epithelial Cancers.” *Nature Genetics* 48, no. 2 (February 2016): 176–82. <https://doi.org/10.1038/ng.3470>.

Zindy, F., C. M. Eischen, D. H. Randle, T. Kamijo, J. L. Cleveland, C. J. Sherr, and M. F. Roussel. “Myc Signaling via the ARF Tumor Suppressor Regulates P53-Dependent Apoptosis and Immortalization.” *Genes & Development* 12, no. 15 (August 1, 1998): 2424–33. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2424>.