



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Επαναστόχευση φαρμάκων με τη χρήση δεδομένων  
υπογραφών διαφορικής γονιδιακής έκφρασης κυττάρων  
κακοήθους μελανώματος.**

Εκπόνηση στο Εργαστήριο Βιοιατρικών Συστημάτων, Σχολή Μηχανολόγων  
Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ιωάννης Κ. Σκαλίδης

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (επιβλέπων)

Αθήνα 2019

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Επαναστόχευση φαρμάκων με τη χρήση δεδομένων  
υπογραφών διαφορικής γονιδιακής έκφρασης κυττάρων  
κακοήθους μελανώματος.**

**Drug repositioning via the use of differential gene expression  
signature data in malignant melanoma cells.**

Εκπόνηση στο Εργαστήριο Βιοιατρικών Συστημάτων, Σχολή Μηχανολόγων  
Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ιωάννης Κ. Σκαλίδης

**Τριμελής Επιτροπή:**

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (επιβλέπων)

Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Αναπ. Καθηγητής

Λάμπρου Νικόλαος, Καθηγητής

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοιατρικών Συστημάτων, της σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αλεξόπουλο, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ σε ένα εργαστήριο πλήρως εξοπλισμένο, καθώς και για όλα τα μέσα που μου προσφέρθηκαν για την υλοποίηση της διατριβής μου, την υποψήφια διδάκτορα Ζαρέιφη Δανάη για την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, τον Κωνσταντίνο Νταγιάντα για την άψογη συνεργασία και βοήθεια του, όπως και τον διδάκτορα Jan Rožanc για τις χρήσιμες συμβουλές του και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για όλη τη βοήθεια και τη στήριξη που μου παρείχαν

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Βιοτεχνολογίας Χατζόπουλο Πολυδεύκη για την ευκαιρία πραγματοποίησης του παρόντος μεταπτυχιακού όπως και τον καθηγητή Λάμπρου Νικόλαο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης μου.

# Περίληψη

Το κακοήθες μελάνωμα είναι ένας τύπος καρκίνου που προκύπτει από τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα του δέρματος που είναι κυρίως υπεύθυνα για την παραγωγή της χρωστικής μελανίνης. Τα τελευταία χρόνια, τα περιστατικά μελάνωματος έχουν σημειώσει σημαντική αύξηση στην εμφάνιση, ειδικά στους πληθυσμούς δυτικών χωρών. Η έγκαιρη ανίχνευση μπορεί να αντιμετωπιστεί με χειρουργική εκτομή, αλλά η καθυστερημένη ανίχνευση κακοήθους μεταστατικού μελάνωματος παρουσιάζει πολύ κακή πρόγνωση, καθώς έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στις υπάρχουσες θεραπείες, κυρίως λόγω της ιδιαίτερης και περίπλοκης βιολογίας της.

Πρόσφατες μελέτες έχουν συνβάλλει σημαντικά στην καλύτερη κατανόησή της υποκείμενης παθολογίας του κακοήθους μελάνωματος και αυτή η γνώση μπορεί να αξιοποιηθεί προκειμένου να σχεδιαστούν νέες και πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Δυστυχώς, η ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών θεραπειών απαιτεί σημαντικό χρόνο και πόρους, με το μέσο κόστος έρευνας και ανάπτυξης, όπως και χρονικού περιθωρίου από την ανακάλυψη φαρμάκων και τον σχεδιασμό έως την κλινική εφαρμογή, συνεχώς να αυξάνεται.

Σε αυτό το μέτωπο, η επαναστόχευση φαρμάκων προσφέρει μια ταχύτερη επιλογή για την ανακάλυψη φαρμάκων, χρησιμοποιώντας υπολογιστικές προσεγγίσεις και διαθέσιμα δεδομένα, προκειμένου να εντοπίσει νέους στόχους και να εκχωρήσει νέους θεραπευτικούς ρόλους σε ήδη αναπτυγμένες και εγκεκριμένες φαρμακολογικές ενώσεις.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιούνται μοριακές υπογραφές που προσδιορίζονται μέσω ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης που προέρχονται από δεδομένα από πολλαπλές κυτταρικές σειρές μελάνωματος, προκειμένου να ομαδοποιηθούν με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους και να δημιουργηθεί μια λίστα πιθανών ενώσεων που θα μπορούσαν να αντιστρέψουν αυτές τις υπογραφές, οι οποίες μπορούν επίσης να εξηγηθούν ως αναστροφή του καρκινικού φαινοτύπου, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο. Ένας εκπρόσωπος από κάθε ομάδα κυτταρικών γραμμών μελάνωματος εκτέθηκε σε φαρμακευτικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ως πιθανοί στόχοι για επαναστόχευση φαρμάκου. Οι ενώσεις εξετάστηκαν επίσης σε ζεύγη προκειμένου να προσδιοριστεί εάν μπορεί να αξιοποιηθεί ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα. Η επιτυχία μετρήθηκε μέσω προσδιορισμού βιωσιμότητας των κυττάρων και μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανακαλύφθηκε ένας επαναστοχευμένος συνδυασμός φαρμάκων που παρουσιάζει πολλά υποσχόμενα χαρακτηριστικά, αποδεικνύοντας ότι αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος να προταθούν ήδη υπάρχοντα φάρμακα ως θεραπείες για νέες ασθένειες.

**Επιστημονική περιοχή:** Βιοπληροφορική, Κυτταρική Βιολογία, Βιολογία Καρκίνου

**Λέξεις κλειδιά:** Μελάνωμα, Καρκίνος, Επαναστόχευση Φαρμάκου, Γονιδιακή Υπογραφή

# Abstract

Malignant melanoma is a type of cancer that arises from melanocytes, the skin cells that are mainly responsible for the production of pigment. In recent years, melanoma cases have seen a significant increase in occurrence, especially in western populations. Early detection can be managed by surgical incision, but late detection of malignant metastatic melanoma has a very poor prognosis since it has been proved to be highly resistant to existing treatments, mainly because of its peculiar and complex biology.

Novel studies have contributed immensely to our better understanding of the underlying pathology of malignant melanoma and this knowledge can be leveraged in order to design new and more effective therapies. Unfortunately, development of novel pharmacological treatments is extremely time and resource consuming, with the average cost of R&D and time period, from drug discovery and design to clinical application, to be increasing.

On this front, drug repositioning offers a fastest route to drug discovery, by employing computational approaches and available data, in order to identify new targets and assign new therapeutic roles to already-developed and approved pharmacological compounds.

In this project, molecular signatures identified through gene expression analysis on data from multiple melanoma cell lines are used, in order to cluster cell lines based on their particular characteristics and create a list of possible compounds that could reverse these signatures, which can also be explained as reversing the cancer phenotype, inducing cell death. A representative from each melanoma cell line cluster was exposed to pharmaceutical compounds that were identified as potential targets for drug repositioning. The compounds were also tested in pairs in order to identify whether a synergistic effect can be leveraged. The success was measured via cell viability assays and after statistical analysis of the results we discovered a repositioned drug combination that exhibits promising features, proving that this approach can be an effective way to propose already existing drugs as treatments for new diseases.

**Field of Study:** Bioinformatics, Cellular Biology, Cancer Biology

**Keywords:** Melanoma, Cancer, Drug Repositioning, Gene Signature

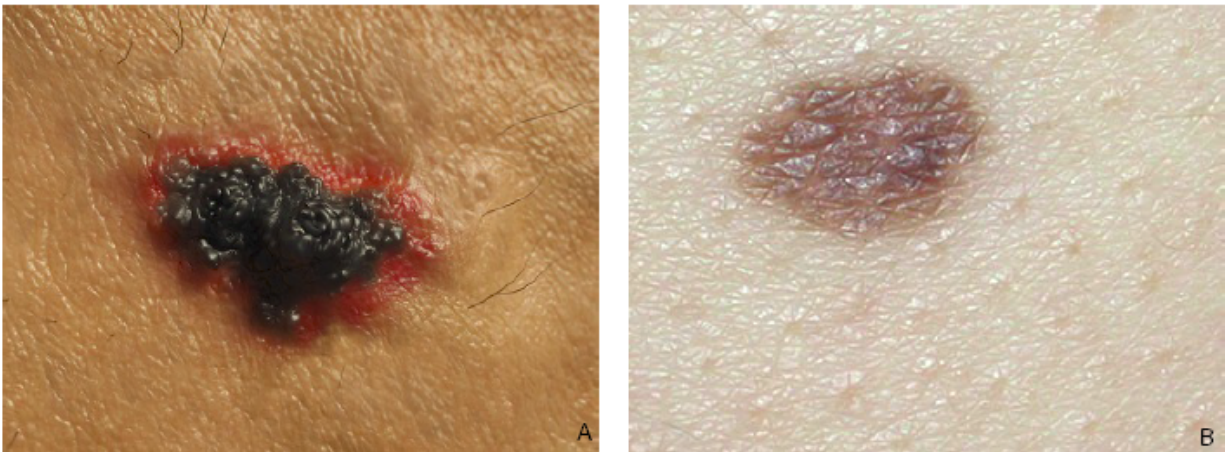
## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Ορισμός.....	1
1.2. Επιδημιολογία.....	2
1.3. Περιβαλλοντικοί / Γενετικοί παράγοντες κινδύνου.....	3
1.3.1. Ηλιακή Έκθεση.....	3
1.3.2. Χρωματισμός δέρματος.....	4
1.3.3. Γενετικό υπόβαθρο.....	4
1.4. Κύρια Σηματοδοτικά μονοπάτια.....	6
1.4.1. Τα μονοπάτια PI3K-Akt και Ras-ERK.....	7
1.4.2. Το μονοπάτι MAPK-JNK-p38.....	11
1.5. Διάγνωση.....	15
1.5.1. Διαγνωστικές τεχνικές απεικόνισης.....	16
1.5.2. Μοριακές διαγνωστικές τεχνικές.....	18
1.6. Θεραπείες.....	19
1.7. Επαναστόχευση φαρμάκων.....	24
2. Σκοπός της Έρευνας.....	26
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
3.1. Συλλογή Δεδομένων.....	27
3.2. Επαναστόχευση φαρμάκων.....	28
3.3. Εύρεση πιθανών στόχων προς επαναστόχευση στη βιβλιοθήκη φαρμακολογικών ουσιών LOPAC.....	29
3.4. Εργαστηριακά Πρωτόκολλα.....	31
3.5. Πειραματικός σχεδιασμός.....	35
4. Αποτελέσματα.....	36
4.1. Επαναστόχευση φαρμάκων με cMap.....	36
4.2. Κυτταρική Βιωσιμότητα.....	43
5. Συμπεράσματα.....	46
6. Βιβλιογραφία.....	47
7. Παράρτημα.....	51

# 1. Εισαγωγή

## 1.1.Ορισμός

Ως μελάνωμα χαρακτηρίζουμε ένα κακοήθη όγκο μελανοκυττάρων, τα οποία είναι κύτταρα που δημιουργούν την χρωστική μελανίνη και προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία. Αν και τα περισσότερα μελανώματα εμφανίζονται στο δέρμα, μπορεί επίσης να προκύψουν στις βλεννογόνες επιφάνειες ή σε άλλες θέσεις στις οποίες μεταναστεύουν κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας κατά την εμβρυογένεση, συμπεριλαμβανομένης και της κοιλιακής οδού.

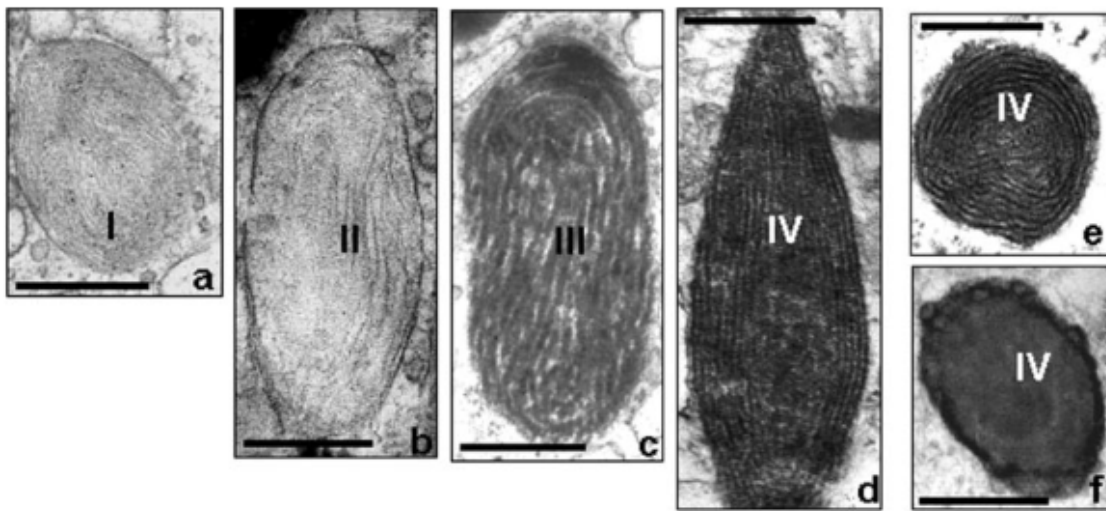


Εικόνα 1: (A) Μελανωματικός σπίλος, (B) Φυσιολογικός σπίλος

Πιο συγκεκριμένα, τα μελανοκύτταρα είναι εξειδικευμένα χρωστικά κύτταρα που εντοπίζονται κυρίως στο δέρμα και τα μάτια, όπου παράγουν μελανίνες, της χρωστικές ουσίες που ευθύνονται για το χρώμα του δέρματος και των μαλλιών. Τα δερματικά μελανοκύτταρα προέρχονται από πολύ κινητικά προγονικά νευρικά-ακρολοφώματα που μεταναστεύουν στο δέρμα κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στο δέρμα, τα μελανοκύτταρα παραμένουν στο βασικό στρώμα της επιδερμίδας και της θύλακες των τριχών και η ομοιόσταση της ρυθμίζεται από τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα.

Σε απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV), τα κερατινοκύτταρα εκκρίνουν παράγοντες που ρυθμίζουν την επιβίωση των μελανοκυττάρων, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την κινητικότητα, διεγείροντας μελανοκύτταρα για την παραγωγή μελανίνης και με αποτέλεσμα την απόκριση σκούρισης του δέρματος. [1] Από αυτό μπορούμε εύκολα να συμπεράνουμε πως τα

μελανοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την προστασία του δέρματος από τη ζημιογόνο επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, άρα και στην προστασία από τον καρκίνο του δέρματος.



Εικόνα 2: Απεικόνιση της μελανογένεσης (a-f) σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. (Slominski, 2004)

## 1.2.Επιδημιολογία

Το δερματικό μελάνωμα είναι ο πιο κοινός από τους υπότυπους μελανώματος, αποτελώντας περίπου το 90% των περιπτώσεων. Γενικότερα, το μελάνωμα είναι ο 19<sup>ος</sup> πιο κοινός τύπος καρκίνου που συναντάται σε ασθενείς παγκοσμίως, με συχνότητα εμφάνισης να κυμαίνεται μεταξύ 2,8 και 3,1 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα του παγκόσμιου πληθυσμού. Προφανώς, υπάρχει σημαντική απόκλιση σε αυτούς τους αριθμούς ανά τον κόσμο, με την Αυστραλία να βρίσκεται στη πρώτη θέση παγκοσμίως, με 37 εμφανίσεις μελανώματος σε ασθενείς ανά 100.000 άτομα, και την Κεντρική-Νότια Ασία στη τελευταία θέση του πίνακα με συχνότητα εμφάνισης 0.2 ανά 100.000 άτομα.[2] Η σημαντική αυτή διαφοροποίηση οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των φυλετικών φαινοτύπων δέρματος, όπως και στην διάρκεια έκθεσης στον ήλιο, ο οποίος μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικά οικολογικά αλλά και κοινωνικοοικονομικά κριτήρια. Για παράδειγμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, περίπου το 98% των περιπτώσεων μελανώματος εμφανίζονται σε άτομα με λευκό δέρμα.[3] Όσον αφορά τα κοινωνικοοικονομικά κριτήρια εμφάνισης μελανώματος, έχει δειχθεί ότι πληθυσμοί με υψηλότερη κοινωνικοοικονομική θέση (ΥΚΘ) παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης και μειωμένα ποσοστά θνησιμότητας μετά την εμφάνιση μελανώματος. Διάφορες επιλογές στον τρόπο ζωής, όπως έκθεση στον ήλιο λόγω επαγγέλματος, έκθεση στον ήλιο για καλλωπιστικούς λόγους καθώς και τεχνητό μαύρισμα είναι παράγοντες που αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης δερματικού μελανώματος και πιθανώς σχετίζονται με ΥΚΘ.[4]



Το 2012, 232.000 νέες περιπτώσεις μελανώματος και 55.000 θάνατοι καταγράφηκαν παγκοσμίως, καταλαμβάνοντας την 15η θέση μεταξύ των πιο κοινών καρκίνων παγκοσμίως.[5] Πιο αναλυτικά, στην Ευρώπη παρατηρούνται σημαντικά χαμηλότεροι αριθμοί περιστατικών σε σχέση με την Αυστραλία και τις Ηνωμένες Πολιτείες, αλλά ακόμα και μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών, ο αριθμός περιστατικών διαφέρει αρκετά. Στην Ελβετία παρατηρούνται οι υψηλότεροι αριθμοί περιστατικών, με περίπου 19,2 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα και στην Ελλάδα οι χαμηλότεροι, με 2,2 περιπτώσεις κατά μέσο όρο ανά 100.000 άτομα.[6]

Τα περιστατικά κακοήθους μελανώματος αυξάνονται σταθερά τα τελευταία χρόνια, μετατρέποντας το σε σημαντικό κοινωνικοοικονομικό πρόβλημα, αφού μέσα στον τελευταίο αιώνα από μια πάρα πολύ σπάνια μορφή καρκίνου έχει καταλήξει να υπάρχει πιθανότητα εμφάνισης του 1 στις 50 στους πληθυσμούς του δυτικού κόσμου. Εκτός αυτού, σε αντίθεση με συμπαγείς όγκους, είναι ίσως ο τύπος καρκίνου που εμφανίζεται και πιο συχνά σε μικρές ηλικίες, αφού η μέση ηλικία διάγνωσης του μελανώματος είναι τα 57 χρόνια, με μέγιστη πιθανότητα εμφάνισης μεταξύ 25 και 50 ετών.[7]

### 1.3. Περιβαλλοντικοί / Γενετικοί παράγοντες κινδύνου

#### 1.3.1. Ηλιακή Έκθεση

Στις μέρες μας, το μελάνωμα θεωρείται μια πολυπαραγοντική ασθένεια, η οποία οφείλεται σε αλληλεπίδραση μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων και της του γενετικού υπόβαθρου του κάθε ασθενή.

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία είναι πιθανώς η πιο σημαντική. Η ηλιακή ακτινοβολία αποτελείται από αρκετά επιμέρους φάσματα ακτινοβολίας, μεταξύ τους το υπέρυθρο, το ορατό φάσμα, και το υπεριώδες. Η υπεριώδης ακτινοβολία που εκπέμπει ο ήλιος χωρίζεται σε 3 διαφορετικά φάσματα μήκους κύματος. Αρχικά, έχουμε την υπεριώδη C (UVC), με μήκος κύματος μεταξύ 100 και 280 nm. Η UVC απορροφάται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από την ατμόσφαιρα της Γης άρα πολύ λίγη φτάνει μέχρι την επιφάνεια της. Η UVC παρουσιάζει μικροβιοκτόνες ιδιότητες. Στη συνέχεια έχουμε την υπεριώδη B (UVB), με μήκος κύματος μεταξύ 280 και 315 nm. Και εδώ, ένα σημαντικό μέρος της απορροφάται από την ατμόσφαιρα, αλλά όση φτάνει στην επιφάνεια προκαλεί σημαντικές βλάβες στο DNA και ηλιακά εγκαύματα. Τέλος, υπάρχει και η υπεριώδης A (UVA), με μήκος κύματος 315 έως 400 nm. Ενώ στο παρελθόν θεωρούνταν μη επιβλαβής, και γι' αυτό χρησιμοποιείται για τεχνητό ηλιακό μαύρισμα όπως και για θεραπεία ενάντια στη ψωρίαση, σήμερα γνωρίζουμε πως η UVA προκαλεί και αυτή βλάβες στο DNA έμμεσα, μέσω δημιουργίας ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Λόγω λοιπόν της επιβλαβούς επίδρασης των UVA και UVB ακτινοβολιών στο DNA, η έκθεση στον ήλιο θεωρείται ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας εμφάνισης κακοήθους μελανώματος. Έχει δειχθεί άμεση συσχέτιση μεταξύ διαλείπουσας έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και την πιθανότητα εμφάνισης μελανώματος.[8] Ρόλο παίζει επίσης και το ιστορικό ηλιακών εγκαυμάτων του ασθενή, με όσους είχαν αυξημένα περιστατικά στην παιδική ηλικία να έχουν στο μέλλον αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μελανώματος.[9]

### 1.3.2. Χρωματισμός δέρματος

Παρόλο που η διαδικασία με την οποία η μελανίνη που παράγεται από τα μελανοκύτταρα προστατεύει το δέρμα από κακοήθεις αλλαγές, είναι ξεκάθαρο ότι ο χρωματισμός και ο τόνος του δέρματος παίζει σημαντικό ρόλο στον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος. Εντονότερος χρωματισμός δέρματος, όπως και η ευκολία στο μαύρισμα είναι σχετιζόμενα χαρακτηριστικά με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης μελανώματος. Η προστασία που αποδίδουν τα αυξημένα ποσοστά μελανίνης στο δέρμα καθώς και οι σκουρότεροι χρωματισμοί δέρματος διαπιστώνεται από τις αντίθετες περιπτώσεις, δηλαδή αυτές όπου το άτομο φέρει αυξημένο ρίσκο εμφάνισης μελανώματος λόγω ξανθών / ερυθρών χρωματισμών.

Οι παραλλαγές του γονιδίου MC1R, γονίδιο το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση του υποδοχέα της επιφάνειας των μελανοκυττάρων και του οποίου η ενεργοποίηση σηματοδοτεί την παραγωγή χρωστικών, είναι αυτές που επιτρέπουν την ποικιλομορφία στους διαφόρους φαινότυπους που παρατηρούνται στον χρωματισμό του δέρματος των ανθρώπων. Παραλλαγές όπως άτομα με λευκό δέρμα ή κόκκινα μαλλιά παρατηρούνται λόγω χαμηλής παραγωγής μελανίνης, η οποία συνδυάζεται με υψηλότερη παραγωγή φαιομελανίνης. Η φαιομελανίνη μπορεί να λειτουργήσει και ως φωτοευαισθητοποιητής, επάγοντας τη παραγωγή ROS, κάνοντας την αυξημένη παραγωγή της έναν παράγοντα αυξημένου κινδύνου εμφάνισης μελανώματος.[10]

### 1.3.3. Γενετικό υπόβαθρο

Παρόλο που αρκετοί περιβαλλοντικοί και φαινοτυπικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του μελανώματος, το γενετικό υπόβαθρο του ασθενή παίζει και αυτό σημαντικό ρόλο. Αρκετές μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα έχουν ταυτοποιήσει έναν ολοένα και αυξανόμενο αριθμό γονιδίων τα οποία μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης μελανώματος σε συνδυασμό με τους περιβαλλοντικούς ή φαινοτυπικούς παράγοντες κινδύνου.

### 1.3.3.1. CDKN2A

Το γονίδιο του αναστολέα 2A της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης (CDKN2A) ήταν το πρώτο γονίδιο που συσχετίστηκε με την εμφάνιση μελανώματος και είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση μελανώματος στις περισσότερες από τις ευάλωτες σε μελάνωμα οικογένειες.[11] Το γονίδιο κωδικοποιεί δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, τις p16 και p14, οι οποίες παίζουν λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.[12] Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι στη περίπτωση του p16 παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss-of-function) κατανοημένες σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης, ενώ στη περίπτωση του p14 συνήθως είναι ολόκληρη διαγραφή του γονιδίου. Σε πληθυσμιακή μελέτη που έγινε σε ελληνικό νοσοκομείο, 5% των περιπτώσεων μελανώματος φέραν μεταλλαγή στο CDKN2A.[13]

### 1.3.3.2. CDK4

Μετά τη ταυτοποίηση του CDKN2A, το επόμενο γονίδιο που βρέθηκε να παίζει ρόλο στην εμφάνιση μελανώματος ήταν το CDK4, το οποίο κωδικοποιεί την εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 4, μια πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στον κυτταρικό κύκλο, και ειδικότερα στη προώθηση της φάσης G1.[14] Οι μεταλλάξεις συμβαίνουν στο κομμάτι του γονιδίου που κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης του αναστολέα p16, μειώνοντας την αναστολή της ενεργότητας της, άρα επάγοντας τη προώθηση του κυτταρικού κύκλου. Γενικότερα, ο φαινότυπος των ατόμων που φέρουν μεταλλαγή στο συγκεκριμένο γονίδιο, είναι αρκετά όμοιος με αυτών που παρουσιάζουν μεταλλαγή στο CDKN2A.

### 1.3.3.3. BAP1

Το γονίδιο της BRCA1 συσχετισμένης πρωτεΐνης 1 (BAP1) αρχικά ταυτοποιήθηκε ως ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο παίζει ρόλο στο μελάνωμα. Γενικότερα το BAP1 έχει αναφερθεί πως ρυθμίζει την διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων, ενώ παράλληλα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο ως μέρος της απόκρισης των μελανοκυττάρων σε πιθανή ζημιά στο γενετικό τους υλικό, προωθώντας την επιδιόρθωση των θραύσεων διπλής έλικας. Πάντως, ενώ έχει επιβεβαιωθεί πως το δερματικό μελάνωμα είναι ένας από τους σχετιζόμενους φαινοτύπους του ογκολογικού φάσματος της BAP1 μεταλλάξης, δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί η συνεισφορά του σε πληθυσμιακό δείγμα δερματικού μελανώματος, ενώ φαίνεται πως μόνο 15% των φορέων μεταλλάξης στο BAP1 γονίδιο εμφανίζουν δερματικό μελάνωμα.[15]

#### 1.3.3.4. MITF

Η ανίχνευση ζημιάς στο δερματικό DNA από τα κερατινοκύτταρα τα οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή της ορμόνης διέγερσης μελανοκυττάρων (MSH). Η ορμόνη αυτή στη συνέχεια δεσμεύεται στον υποδοχέα της μελανοκορτίνης 1 στα μελανοκύτταρα και οδηγεί στην επαγωγή του γονιδίου που παράγει τον σχετιζόμενο με μικροφθαλμία μεταγραφικό παράγοντα (MITF), ο οποίος με τη σειρά του οδηγεί στην παύση της προώθησης του κυτταρικού κύκλου και την αύξηση της παραγωγής μελανίνης, προστατεύοντας το κύτταρο από περαιτέρω ζημιά στο DNA λόγω της υπερϊώδους ακτινοβολίας.[16] Ο MITF είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεταγραφής μιας σειράς γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και τη μελανογένεση. Αυτές οι λειτουργίες επιτρέπουν στον MITF να προωθεί τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των μελανοκυττάρων ενώ παράλληλα να αποτρέπει την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη τους. Απώλεια του MITF γονιδίου στα γαμετικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη εμβρύου χωρίς διαφοροποιημένα μελανοκύτταρα ενώ απώλεια του σε ήδη διαφοροποιημένα μελανοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη τους.[17]

#### 1.3.3.5. TERT

Μια νέα μεταλλαγή η οποία εμφανίζεται στον υποκινητή του γονιδίου της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (TERT) φαίνεται να σχετίζεται με το οικογενές δερματικό μελάνωμα.[18] Η συγκεκριμένη μεταλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία επιπλέον μοτίβων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, προκαλώντας διπλασιασμό του ρυθμού μεταγραφής του γονιδίου. Όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες οικογένειες που φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια που είναι συσχετισμένα με την εμφάνιση μελάνωματος, οι μεταλλάξεις αυτές φαίνεται να προκαλούν ανάπτυξη πολλαπλών τύπων καρκίνου, όπως των ωσθηκών, των νεφρών, του πνεύμονα και του στήθους.[18] Η πολυπλοκότητα αυτή φαίνεται πως μάλλον είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών μηχανισμών που συνδέουν την εμφάνιση καρκίνου με την διαφοροποίηση του μήκους των τελομερών. Μεγάλο μήκος τελομερών πιθανώς να αθανατοποιεί τα καρκινικά κύτταρα ενώ μικρό μήκος μπορεί να προκαλεί χρωμοσωμική αστάθεια. Και οι δύο περιπτώσεις ευνοούν την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και εξέλιξη καρκίνου αλλά ο προτιμώμενος μηχανισμός διαφέρει ανάλογα με τον διαφορετικό τύπο καρκίνου.[19]

### 1.4.Κύρια Σηματοδοτικά μονοπάτια

Η ανάπτυξη μελάνωματος, όπως και άλλων τύπων καρκίνου, εμπεριέχει διαδοχικές γενετικές και επιγενετικές μετατροπές οι οποίες επιτρέπουν στα κύτταρα που εμπλέκονται να διαφύγουν του ομοιοστατικού ελέγχου ο οποίος, όταν λειτουργεί σωστά, καταστέλλει την λανθασμένη

ανάπτυξη τους και αποτρέπει την επιβίωση των ανώμαλα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων πέρα από την καθορισμένη τους θέση. Οι περισσότεροι καρκίνοι ξεκινούν από κύτταρα του επιθηλιακού ιστού και εμφανίζονται ως καρκινώματα σε όργανα όπως το δέρμα, οι πνεύμονες, το στήθος, το συκώτι και το πάγκρεας. Προφανώς, καρκίνος μπορεί να εμφανιστεί και σε μη επιθηλιακά κύτταρα, όπως αυτά του νευρικού συστήματος και του αιμοποιητικού ιστού.

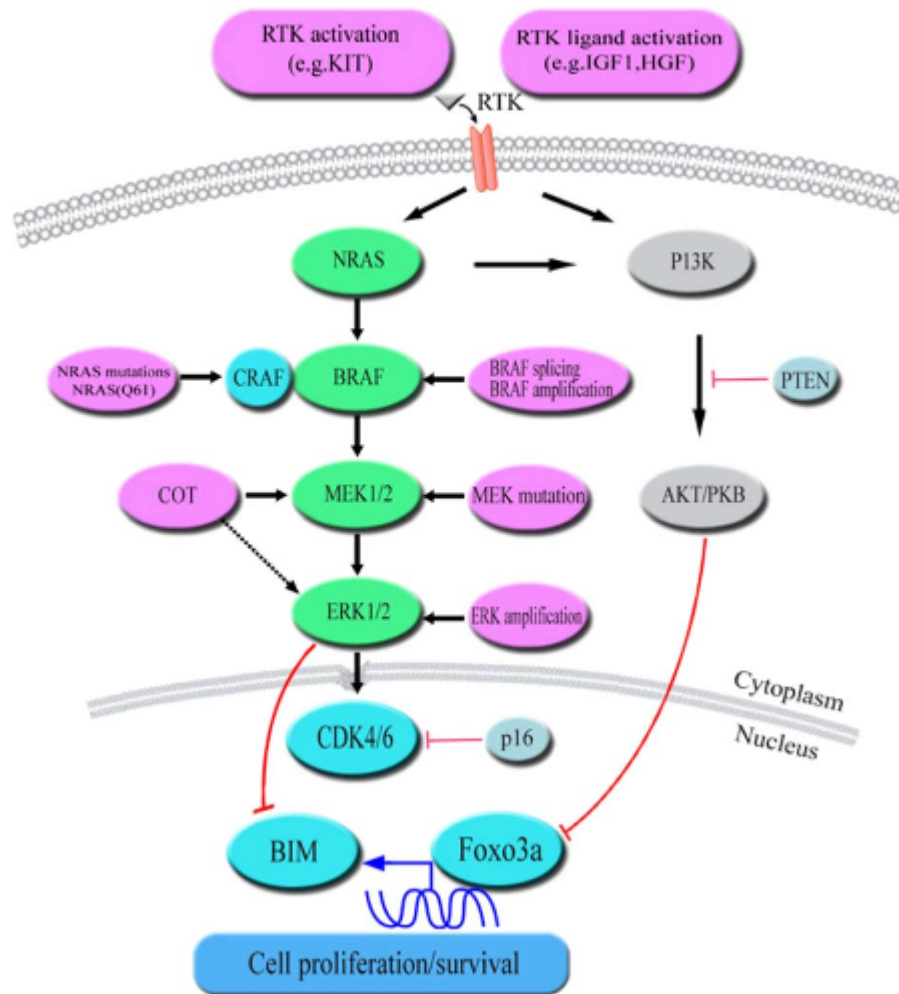
Στους συμπαγείς όγκους, αυτές οι μετατροπές συνήθως προωθούν την ανάπτυξη μιας σχετικά καλοήθους ομάδας αναπτυσσόμενων κυττάρων σε μια μάζα κυττάρων η οποία έχει μη φυσιολογική μορφολογία, κυτταρολογική εμφάνιση και κυτταρική οργάνωση. Αφότου ο όγκος διασταλεί, ο πυρήνας του χάνει την πρόσβαση του στο απαραίτητο για την κυτταρική αναπνοή οξυγόνο αλλά και στα θρεπτικά στοιχεία, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αγγειογένεσης για να αποκτήσει ξανά πρόσβαση σε αυτά. Συνεπώς, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν την ικανότητα να εισβάλλουν σε ιστούς πέραν των κανονικών ορίων τους, να εισέρχονται στην κανονική κυκλοφορία και να μεταφέρονται μέσω αυτής σε άλλα σημεία του σώματος και να εγκαθίστανται σε αυτά, δίνοντας τους μία από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες που χρειάζονται για να χαρακτηριστούν ως κακοήθειες.

Τα παραπάνω γραμμικά γεγονότα είναι μια πολύ απλοποιημένη περιγραφή της προόδου ενός καρκίνου και των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων των καρκινικών κυττάρων με το περιβάλλον τους. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, για την μετατροπή φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά και την εκκίνηση των γεγονότων της ογκογένεσης συνήθως χρειάζονται γενετικές ή επιγενετικές τροποποιήσεις σε κάποια γονίδια-δικλίδες. Παρόλα αυτά, στη συνέχεια, η προώθηση του καρκίνου εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την εκμετάλλευση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία θα τους προσδώσουν τα περαιτέρω χαρακτηριστικά τα οποία είναι απαραίτητα για τη συνέχεια, όπως την αντίσταση στην απόπτωση, συγκεκριμένες μεταβολικές μετατροπές, γενετική αστάθεια, την επαγωγή της αγγειογένεσης καθώς και την απόκτηση αυξημένης μεταναστευτικής ικανότητας. Παρακάτω αναλύονται μερικά από τα βασικότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος ενός ευκαρυωτικού κυττάρου, υπερενεργοποίηση των οποίων δίνει στα καρκινικά κύτταρα όλες αυτές τις «επιθυμητές» ιδιότητες.

#### 1.4.1. Τα μονοπάτια PI3K-Akt και Ras-ERK

Πολλά από τα γονίδια τα οποία εμφανίζουν συνήθως μεταλλάξεις σε διάφορους τύπους καρκίνου κωδικοποιούν τμήματα ή στοχεύουν την ενεργότητα των μονοπατιών PI3K-Akt και Ras-ERK, με κλασικότερο παράδειγμα στο μελάνωμα αυτό της μεταλλαγής του γονιδίου NRAS, το οποίο κωδικοποιεί μια GTPάση της οποίας η δράση παρέχει μόνιμη ενεργότητα στα μονοπάτια αυτά.[20] Φυσιολογικά, τα δύο αυτά διασυνδεδεμένα μονοπάτια εμφανίζουν παροδική ενεργοποίηση ως απόκριση σε σηματοδότηση από αυξητικούς παράγοντες ή κυτταροκίνες, καθώς και σε ενεργοποίηση των υποδοχέων συγκόλλησης ιντεγκρίνης, αλλά

γενετικές τροποποιήσεις μπορούν να οδηγήσουν σε μόνιμη ενεργοποίηση τους, ακόμα και απουσία αυξητικών παραγόντων.



Εικόνα 3: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K-Akt και Ras-ERK (Wang, 2013)

#### 1.4.1.1. Επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τα PI3K-Akt και Ras-ERK μονοπάτια σηματοδότησης είναι σημαντικοί ρυθμιστές της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης, άρα η συνεχής υπερενεργοποίησή τους μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη. Ένα μόριο-κλειδί του μονοπατιού Ras-ERK είναι το Myc, το οποίο φωσφορυλιώνεται από το ERK, οδηγώντας στην σταθεροποίησή του μέσω της αποφυγής της ουβικουιλίνωσης του, άρα αποφυγή της αποδόμησής του.[21] Το Myc επάγει τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό επάγοντας πολλαπλά γονίδια τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό, όπως αυτά που κωδικοποιούν κυκλίνες  $G_1/S$ , CDK γονίδια, καθώς και μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F που οδηγούν τον κυτταρικό κύκλο.[22] Επίσης, καταστέλλει την έκφραση αρκετών παραγόντων που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο, εμποδίζει την δραστηριότητα μεταγραφικών παραγόντων που προάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό αναβολικό μεταβολισμό.

Το ERK επίσης φωσφορυλιώνει και άλλους σημαντικούς για την κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, βοηθά στη σταθεροποίηση των προϊόντων της μεταγραφής του FOS, ενός ογκογονιδίου, τα οποία παίζουν ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη.[23] Άλλοι στόχοι του ERK για φωσφορυλίωση αποτελούν πολλές κινάσες (RSK, MSK, MNK) οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την προώθηση του κυτταρικού κύκλου και άλλων διαδικασιών όπως η μετάφραση, μέσω ρύθμισης μεταφραστικών παραγόντων (eIF3).

Η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K-Akt ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορα επίπεδα. Το Akt ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου μέσω ελέγχου του mTORC1. Το mTORC1 φωσφορυλιώνει στη συνέχεια τη πρωτεΐνη δέσμευσης του eIF4, η οποία αποδεσμεύει τον παράγοντα δέσμευσης της καλύπτρας eIF4E, και επιτρέποντας του να δεσμεύσει mRNA, επάγοντας έτσι αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση, η οποία είναι κρίσιμη για την ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της προώθησης του κυτταρικού κύκλου.[24]

#### *1.4.1.2. Επίδραση στην κυτταρική επιβίωση*

Όσον αφορά την αντίσταση στην απόπτωση, δηλαδή την κυτταρική επιβίωση, και εδώ τα μονοπάτια σηματοδότησης PI3K-Akt και Ras-ERK παίζουν κρίσιμο ρόλο. Γενικότερα, ο κυτταρικός θάνατος λειτουργεί ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός ο οποίος συνήθως ελέγχει το μέγεθος ενός κυτταρικού πληθυσμού. Είναι προφανές λοιπόν ότι μπορεί να λειτουργήσει ως ένας αποτελεσματικός μηχανισμός άμυνας έναντι της εμφάνισης καρκινικών κυττάρων ο οποίος θα ενεργοποιηθεί στην αρχή της διαδικασίας της ογκογένεσης, όπου παρατηρείται πολύ μεγάλη αύξηση των σημάτων πολλαπλασιασμού η οποία με τη σειρά της συνεισφέρει στην δημιουργία κυτταρικού στρες λόγω του επαγόμενου ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, της μεταφοράς «ξένων» κυτταρικών πληθυσμών σε διαφορετικά σημεία στον οργανισμό κ.α.. Άρα, μπορεί κανείς να συμπεράνει πως μεταλλαγές οι οποίες διακόπτουν τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος θανάτου θα είναι κρίσιμες για την επιβίωση και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K-Akt και Ras-ERK ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο με αρκετούς τρόπους. Η Akt διαμεσολαβεί η ίδια σε αρκετά βήματα της σηματοδότησης απόπτωσης μέσω υποδοχέων σημάτων θανάτου. Φωσφορυλιώνει αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες (όπως ο



FoxO3A) μεταφέροντας τους στο κυταρρόπλασμα, άρα αποτρέποντας τη μεταγραφή προαποπτωτικών παραγόντων. Η Akt επίσης ενεργοποιεί τον NF-κΒ, ο οποίος ρυθμίζει αρκετούς παράγοντες επιβίωσης, μέσα στους οποίους βρίσκονται αρκετοί αντιαποπτωτικοί παράγοντες (π.χ. Bcl2, Mcl1). Τέλος, η Akt επάγει την ουβικουτίνωση και συνεπώς την αποδόμηση του p53, καταστέλλοντας έτσι την επαγόμενη από p53 απόπτωση. Από την άλλη, ο ERK φωσφορυλιώνει έναν από τους βασικούς αναστολείς του NF-κΒ, τον IκΒα, σημαδεύοντας τον ως στόχο για αποδόμηση.[25]

#### *1.4.1.3. Επίδραση στον κυτταρικό μεταβολισμό*

Γενικότερα, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη πρέπει να συντονίζονται πάντα με τις αντίστοιχες μεταβολικές διεργασίες οι οποίες εμπλέκονται στη σύνθεση των απαραίτητων μακρομορίων τα οποία συμμετέχουν σε αυτές. Άρα, τα μονοπάτια αναπτυξιακών παραγόντων τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο ρυθμίζοντας όχι μόνο την ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων αλλά και των καρκινικών, επεμβαίνουν στα μεταβολικά μονοπάτια με σκοπό να διαβεβαιώσουν ότι οι αυξημένες ανάγκες σε διαφορετικά μακρομόρια λόγω των διεργασιών ανάπτυξης/πολλαπλασιασμού θα καλυφθούν.[26] Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, καθώς και η απώλεια λειτουργίας σε ογκοκατασταλτικούς παράγοντες μπορεί να ρυθμίσει άμεσα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, ακόμα και απουσία φυσιολογικών αυξητικών παραγόντων, πετυχαίνοντας παρόμοιες μεταβολές στον κυτταρικό μεταβολισμό.

Είναι αναμενόμενο, ότι ως κύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο ρυθμό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού, τα καρκινικά κύτταρα θα έχουν σημαντικά αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια σε σχέση με τα φυσιολογικά, κάτι που αντικατοπτρίζεται και στον συχνότερο στόχο τροποποιήσεων του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού, την πρόσληψη γλυκόζης και την αύξηση του ρυθμού γλυκόλυσης.

Η προτίμηση που δείχνουν τα καρκινικά κύτταρα στην γλυκόλυση, παρά τα μειονεκτήματα που έχει αν συγκριθεί με την αυξημένη αποδοτικότητα στην παραγωγή ενέργειας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, έχει διαφορετική χρησιμότητα. Επιτρέπει στα κύτταρα να ανακατευθύνουν τις ανθρακικές αλυσίδες που προκύπτουν από τη γλυκόλυση σε άλλες αναβολικές διεργασίες, όπως το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, ένα μονοπάτι που οδηγεί με τη σειρά του σε νουκλεοτιδική σύνθεση ή το μονοπάτι σύνθεσης σερίνης/γλυκίνης, το οποίο συνθέτει αρκετά αμινοξέα, καθώς και άλλα συστατικά του μονοπατιού σύνθεσης πυριμιδινών. Η αυξημένη παραγωγή πυριμιδινών οδηγεί στην σύνθεση της S-αδενοσυμεθειονίνης η οποία παίζει κύριο ρόλο ως δότης μεθυλομάδων με σκοπό τη μεθυλίωση του DNA, RNA, διάφορων πρωτεϊνών καθώς και νευροδιαβιβαστών. Εκτός αυτού, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν επίσης αυξημένη πρόσληψη γλουταμίνης η οποία ανακατευθύνεται για γλουταμινόλυση, με σκοπό τη στήριξη ενός ποσοστού οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την βιοσύνθεση πρωτεϊνών, λιπιδίων



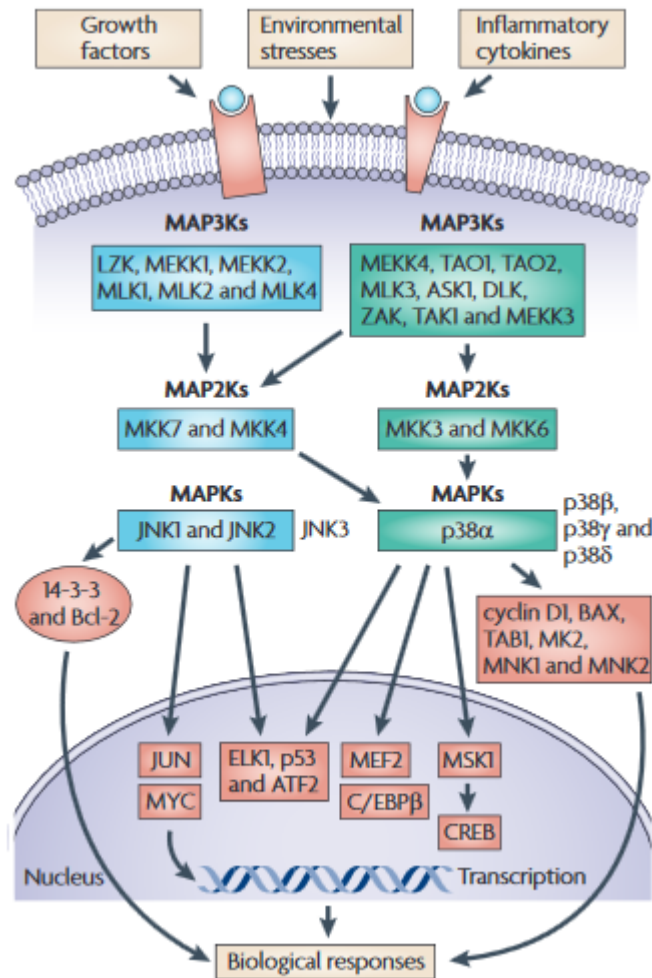
και νουκλεϊκών οξέων. Τέλος, ρυθμίζουν θετικά την παραγωγή λιπιδίων ανακατευθύνοντας κίτρικό οξύ από τον κύκλο του Krebs με τελικό στόχο τη διαδικασία σύνθεσης λιπαρών οξέων.

Το μονοπάτι PI3K-Akt στοχεύει αρκετά υποστρώματα τα οποία προωθούν τις παραπάνω μεταβολικές μετατροπές. Αρχικά, η Akt ρυθμίζει τη μεταφορά γλυκόζης, καθώς και την λειτουργία της εξωκίνησης, αυξάνοντας έτσι τη γλυκόλυση, τη παραγωγή νουκλεοτιδίων και αμινοξέων τα οποία είναι απαραίτητα για τη κυτταρική ανάπτυξη.[27] Επίσης, η Akt, φωσφορυλιώνει διάφορους άλλους στόχους οι οποίοι προωθούν τη γλυκόλυση (εξωκίνηση II, 6-φωσφοφρούκτο-2-κινάση, φρουκτο-2,6-διφωσφατάση).

Από την άλλη πλευρά, το μονοπάτι Ras-ERK επηρεάζει τον μεταβολισμό κυρίως μέσω του Myc, το οποίο ως κρίσιμος μεταγραφικός παράγοντας, επηρεάζει την πρόσληψη γλυκόζης, τη γλυκόλυση καθώς και το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών.[28]

#### 1.4.2. Το μονοπάτι MAPK-JNK-p38

Οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK) είναι κομμάτια ορισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία είναι κρίσιμα στη μεταφορά εξωτερικών ερεθισμάτων και τη μετατροπή τους σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων. Στο μελάνωμα, είναι πολύ συχνό φαινόμενο η μεταλλαγή στο γονίδιο BRAF, το οποίο κωδικοποιεί μια MAPK κινάση, συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση του μονοπατιού.[29] Δύο από τα κυριότερα MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια, τα Jun N-τελικής κινάσης (JNK) και p38-MAPK, τα οποία ονομάζονται και σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούμενα από κινάσες που συσχετίζονται με αποκρίσεις σε στρες, βρίσκονται πολύ συχνά απορρυθμισμένα σε αρκετά είδη καρκίνων. Οι JNK και p38-MAPK ενεργοποιούνται από περιβαλλοντικό και παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή καθώς και στην ομοίωση των ιστών, αφού ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, επιβίωση και τη μετανάστευση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων.[30-32] Οι λειτουργίες των JNK και p38-MAPK στην ανάπτυξη καρκίνου είναι αρκετά περίπλοκες, το οποίο είναι και επακόλουθο των πολλών και σημαντικών κυτταρικών διεργασιών που ρυθμίζουν. Στη περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, αυτά τα δύο μονοπάτια τροποποιούνται και χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στην προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την επιβίωση και εξάπλωση τους.[33] Παρακάτω, θα γίνει μια περίληψη του πως τα δυο αυτά μονοπάτια συμβάλλουν σε αυτές τις διεργασίες, καθώς και του γενικότερου σηματοδοτικού τους ρόλου στον καρκίνο.



Εικόνα 4: Ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK-JNK-p38 (Wagner, 2009)

#### 1.4.2.1. Σηματοδότηση μέσω JNK και p38-MAPK

Οι JNK πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια (MAPK8,9,10) τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα τρεις διαφορετικές JNK πρωτεΐνες (JNK1,2,3 αντίστοιχα), ενώ το μεταξύ τους εναλλακτικό μάτισμα δίνει τουλάχιστον δέκα ακόμα ισομορφές τους. Παρόλο που υπάρχουν αρκετά υποστρώματα των JNK, το να βρεθούν ακριβώς τα μοριακά δίκτυα τα οποία ρυθμίζουν είναι αρκετά δύσκολο.[31] Ένας κρίσιμος στόχος των JNK είναι ο μεταγραφικός παράγοντας AP1, ο οποίος αποτελείται από μέλη των οικογενειών Jun και Fos πρωτεϊνών. Οι ογκογονικές λειτουργίες των JNK βασίζονται κυρίως στην ικανότητα τους να φωσφορυλιώνουν την JUN και να ενεργοποιούν τον AP1. Το μονοπάτι JNK/JUN ρυθμίζει ένα αρκετά μεγάλο πλήθος γονιδίων-στόχων τα οποία εμπεριέχουν αλληλουχίες δέσμευσης του AP1, ενώ μέσα σε αυτά υπάρχουν γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την επιβίωση και απόπτωση, μεταλλοπρωτεϊνάσες και πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών. Επίσης, παράγοντες όπως η ένταση

του σήματος και η επικοινωνία μεταξύ των διαφορετικών ισομορφών των JNK είναι σημαντικοί για την επίδραση της ενεργοποίησης των JNK στην ανάπτυξη όγκων.[34]

Οι p38 MAPK πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τέσσερα διαφορετικά γονίδια (MAPK14,11,12,13) τα οποία κωδικοποιούν τέσσερις διαφορετικές πρωτεΐνες (p38α,β,γ,δ αντίστοιχα), ενώ φαίνεται να υπάρχουν ακόμα δύο ισομορφές του MAPK14 οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα. Οι α και β είναι οι πιο κοινές, ενώ φαίνεται να έχουν και αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες, με την α να έχει τον πιο ενεργό ρόλο σε όλες τις σχετιζόμενες διεργασίες. Οι γ και δ εκφράζονται πιο περιορισμένα και ο ρόλος τους στη σηματοδότηση μέσω p38 MAPK δεν είναι ακόμα ξεκάθαρα καθορισμένος.[35] Οι p38 MAPK ενεργοποιούνται συνήθως από τις MKK3,6 κινάσες οι οποίες βρίσκονται ανοδικά του μονοπατιού όπως και από αυτοφωσφορυλίωση. Οι δύο κύριοι στόχοι πρωτεϊνών οι οποίοι ρυθμίζονται μέσω φωσφορυλίωσης από τις p38 MAPK είναι μεταγραφικοί παράγοντες (μέσα στους οποίους συμπεριλαμβάνονται οι p53 και ο ATF2) και διάφορες κινάσες (στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και οι MAPK2, MSK1, MNK1/2).[35] Έχει δειχθεί ότι η p38α μπορεί να έχει ογκογονικές λειτουργίες οι οποίες επιτελούνται από την εμπλοκή της σε διεργασίες-κλειδιά στην προώθηση και ανάπτυξη καρκίνου, όπως η φλεγμονή, η αγγειογένεση και η μετάσταση.

#### *1.4.2.2. Επίδραση των JNK και p38-MAPK μονοπατιών στην επιβίωση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό*

Ο μη προγραμματισμένος πολλαπλασιασμός είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων και τα μονοπάτια JNK και p38-MAPK ρυθμίζουν την προώθηση του κυτταρικού κύκλου σε διαφορετικά σημεία της μετάβασης του ελέγχοντας μηχανισμούς οι οποίοι είναι είτε εξαρτημένοι είτε ανεξάρτητοι από την μεταγραφή. Και τα δύο μονοπάτια ρυθμίζουν τα κυτταρικά προγράμματα επιβίωσης και διαφοροποίησης, έχοντας σημαντική επίδραση στην εμφάνιση και ανάπτυξη διαφορετικών τύπων καρκίνου.

Αναλόγως το ερέθισμα και την διάρκεια ενεργοποίησης των JNK, η κυτταρική απόκριση μπορεί να είναι αρκετά διαφορετική, από την επαγωγή απόπτωσης, έως την αύξηση της επιβίωσης και την προώθηση του πολλαπλασιασμού. Λόγω της διαφορετικής αλληλεπίδρασης των διαφορετικών JNK (1,2,3) με τον στόχο τους JUN (ο οποίος είναι γνωστός ρυθμιστής της προώθησης του κυτταρικού κύκλου), οι κινάσες αυτές έχουν αντίστοιχα και διαφορετικές επιδράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.[31] Απώλεια των JNK1,2 έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ή μειωμένη φωσφορυλίωση του AP1 το οποίο με τη σειρά του επιδρά στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, θετικά ή αρνητικά αντίστοιχα.[36] Φαίνεται επίσης πως το JNK/JUN μονοπάτι λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του p53 ογκοκατασταλτικού παράγοντα, φαινόμενο το οποίο εξηγεί περαιτέρω τον ογκογονικό ρόλο του ενεργοποιημένου JNK σε διάφορα καρκινικά μοντέλα.

Οι πρό- ή αντί- αποπτωτικές δράσεις του JNK φαίνεται να εξαρτώνται όχι μόνο από το ερέθισμα ή τον κυτταρικό τύπο, αλλά επίσης και από την ένταση του σήματος.[37] Ενώ η παροδική ενεργοποίηση του JNK φαίνεται να προωθεί την κυτταρική επιβίωση, ενεργοποίηση διαρκείας οδηγεί σε απόπτωση μέσω σηματοδότησης από τον παράγοντα TNFα. Όσον αφορά την κυτταρική διαφοροποίηση, δεν γνωρίζουμε αρκετά για το πως αυτή ρυθμίζεται από τον JNK. Κατά την ανάπτυξη, οι JNK φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων.[34]

Η p38α μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά την προώθηση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις μετάβασης G1/S και G2/M με διαφορετικούς μηχανισμούς οι οποίοι περιλαμβάνουν την αρνητική ρύθμιση των κυκλίνων, τη θετική ρύθμιση των CDK αναστολέων και την τροποποίηση του ογκοκαταστολέα p53.[38] Οι p38-MAPK επίσης μπορούν να ενεργοποιήσουν την πρόωρη γήρανση πρωτογενών κυττάρων, έναν μηχανισμό που λειτουργεί ως δικλίδα ασφαλείας ενάντια στον καρκινικό πολλαπλασιασμό, μέσω επαγωγής φωσφορυλίωσης του p53. Αυτό το φαινόμενο προκύπτει μέσω της αρνητικής ρύθμισης του JNK/JUN μονοπατιού, άρα θετική ρύθμισή του μπορεί να το αντιστρέψει. Ο αντιφατικός ρόλος του p38 πιθανώς οφείλεται σε διαφορετικά επίπεδα ενεργότητας κινάσων οι οποίες εμπλέκονται στο μονοπάτι που ελέγχει, καθώς και στην επίδραση του σε γειτονικά εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια.[32] Αρκετές μελέτες έχουν επίσης επισημάνει τον ρόλο που παίζει η p38α στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της επαγωγής της κυτταρικής διαφοροποίησης ή της χρήσης αντιαποπτωτικών σημάτων φλεγμονής, όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), χαρακτηριστικό που επιπλέον προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα και αντίσταση σε διάφορους φαρμακολογικούς παράγοντες.[39] Επιπλέον, η p38α μπορεί να προωθήσει την κυτταρική επιβίωση είτε μέσω ρύθμισης των προγραμμάτων αυτοφαγίας είτε μέσω έμμεσης αύξησης της ενεργότητας της β-κατενίνης, ενός κύριου κομματιού του μονοπατιού Wnt.[40]

#### *1.4.2.3. Επίδραση των JNK και p38-MAPK μονοπατιών στη φλεγμονή και μετάσταση*

Η χρόνια φλεγμονή είναι ένας από τους πιο ισχυρούς προωθητές του καρκίνου, ενώ έχει συνδεθεί σε πολλές μελέτες με αύξηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων και την επαγωγή αγγειογένεσης και εισβολής των καρκινικών κυττάρων σε διαφορετικούς ιστούς.[41] Τα μονοπάτια των JNK και p38-MAPK παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης και ενεργότητας μεσολαβητών της φλεγμονής όπως διάφορες κυτταροκίνες και πρωτεάσες οι οποίες επηρεάζουν την προώθηση του καρκίνου.

Το μονοπάτι JNK έχει συνδεθεί με την έκφραση κυτταροκινών που ελέγχουν τη φλεγμονή και τον καρκίνο, αν και σε μικρότερη έκταση από τη MPK p38.[34] Η ενεργοποίηση της JNK μέσω ενός αρκετά περίπλοκου σηματοδοτικού μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή των AP1 και NF-κB με επακόλουθη την προώθηση της επιβίωσης. Τέλος, η ενεργοποίηση της JNK

φαίνεται να συνδέεται με την απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) στο στρες, η οποία φαίνεται να παίζει ρόλο στην προώθηση του καρκίνου.[42]

Η p38α έχει βασικό ρόλο στην παραγωγή πολλών κυτταροκινών, όπως του TNFα, IL-1 και IL-6, οι οποίες έχουν προ-φλεγμονώδη, προ-επιβιωτικά και αγγειογονικά αποτελέσματα.[43] Η p38α μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση κυτταροκινών τροποποιώντας διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο NF-κΒ ή στο μετα-μεταγραφικό στάδιο ρυθμίζοντας τη σταθερότητα των mRNA και προωθώντας τη μετάφραση πρωτεϊνών. Επίσης, η p38α επηρεάζει άμεσα τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση ανεξάρτητα από τον ρόλο που παίζει στη φλεγμονή. Ελέγχει την έκφραση αρκετών μεταλλοπρωτεασών όπως η MMP1,3,13 οι οποίες με τη σειρά τους ελέγχουν την τροποποίηση αλλά και αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας από μεταστατικά καρκινικά κύτταρα, καθώς και του ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης Α (VEGFA), ενός ισχυρού επαγωγέα της κυτταρικής επιβίωσης και αγγειογένεσης.[44]

## 1.5. Διάγνωση

Όπως και με τα περισσότερα είδη καρκίνου, έτσι και στο μελάνωμα, η έγκαιρη διάγνωση του είναι η καλύτερη στρατηγική για τη αύξηση των ποσοστών επιβίωσης ασθενών που διαγιγνώσκονται με αυτό. Για το σκοπό αυτό, οι κλινικοί ιατροί μπορούν να χρησιμοποιήσουν δυο διαφορετικές κατηγορίες εργαλείων διάγνωσης. Το πρώτο εργαλείο είναι η μακροσκοπική *in vivo* διάγνωση, στην οποία τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει μεγάλα τεχνολογικά άλματα όσον αφορά τις τεχνικές απεικόνισης και ανάλυσης εικόνας και πια χρησιμοποιούνται με σκοπό τη βελτίωση της έγκαιρης διάγνωσης. Το δεύτερο εργαλείο είναι η μοριακή διάγνωση των μεταλλάξεων-οδηγών του μελανώματος (οι κυριότερες από τις οποίες αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.3.3). Η έγκαιρη και έγκυρη ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που κρύβονται πίσω από την κάθε περίπτωση μελανώματος είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό των ασθενών σε κατηγορίες με σκοπό τον σχεδιασμό μιας αποτελεσματικής αγωγής ή γενικότερου πλάνου θεραπείας. Και εδώ, η εξέλιξη των τεχνολογιών μοριακής διάγνωσης τα τελευταία χρόνια, καθώς και οι εξελίξεις στην ταυτοποίηση των μεταλλαγών οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου μας επιτρέπουν να έχουμε καλύτερη κατανόηση της παθογένειας που παρουσιάζεται, όπως επίσης και την βελτίωση των αποφάσεων που λαμβάνονται σχετικά με τον τρόπο θεραπείας του κάθε ασθενή. Παρακάτω θα αναλυθούν κάποιες από τις τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται στις δύο αυτές κατηγορίες διάγνωσης.

### 1.5.1. Διαγνωστικές τεχνικές απεικόνισης

Ο ρόλος των τεχνικών απεικόνισης ως εργαλεία αρχικής διάγνωσης και αξιολόγησης μιας ασθένειας είναι ήδη καθιερωμένος σε αρκετούς τομείς της κλινικής ιατρικής, όπως η γαστροεντερολογία, η καρδιολογία και η νευρολογία. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η αξονική τομογραφία (CT), η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για πολλούς διαφορετικούς τύπους διάγνωσης. Παρόλα αυτά, οι δερματολόγοι πρόσφατα εισήγαγαν τέτοιου τύπου εργαλεία στις διαγνωστικές διαδικασίες που ακολουθούν, όχι μόνο για τον εντοπισμό περιπτώσεων καρκίνου του δέρματος, αλλά και για άλλες ασθένειες. Η δερματοσκοπία είναι η πιο ραγδαία αναπτυσσόμενη μέθοδος απεικόνισης του δέρματος, τόσο που έχει πια εδραιωθεί ως μέρος της αρχικής εξέτασης για πολλούς πιθανούς ασθενείς. Στον τομέα αυτό, αρκετές νέες τεχνολογίες έχουν στρατολογηθεί για την συμπλήρωση και επιβεβαίωση της παραδοσιακής εξέτασης δια γυμνού οφθαλμού.[45]

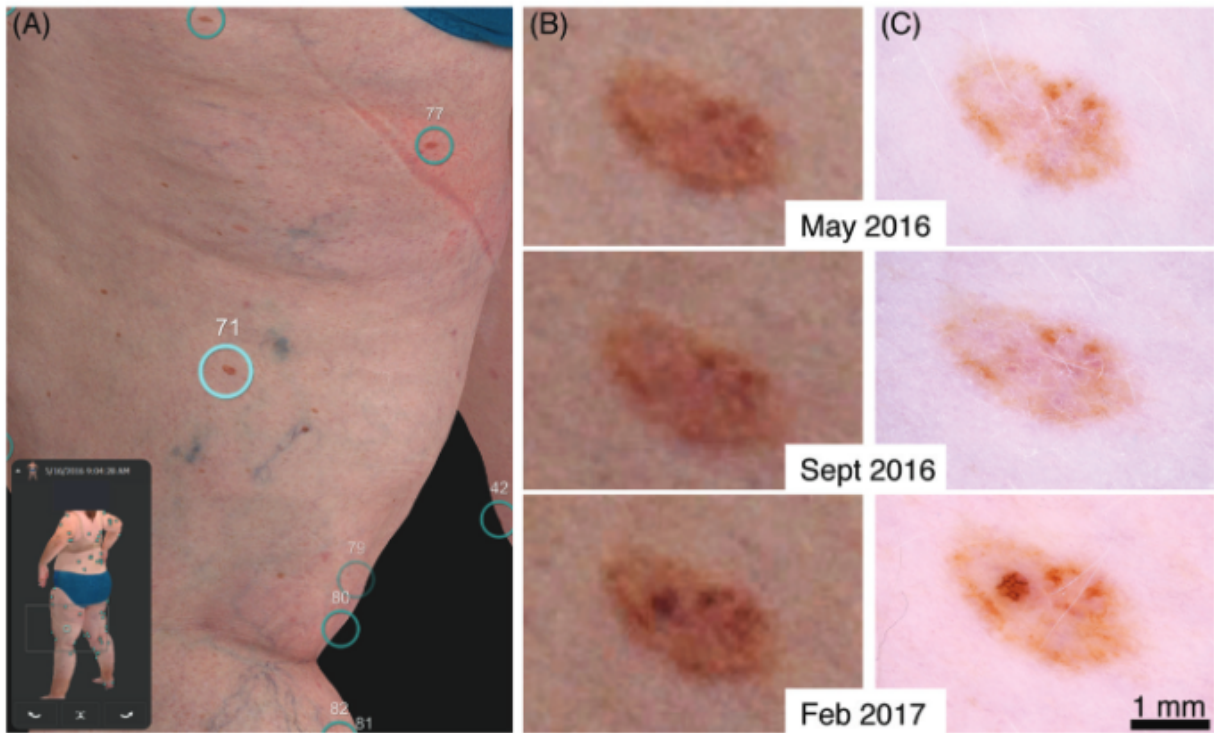
#### 1.5.1.1. Συνολική Φωτογράφιση Σώματος (2D/3D)

Εδώ και αρκετά χρόνια, γίνεται ευρεία χρήση της τεχνικής της συνολικής φωτογράφισης σώματος με σκοπό την παρακολούθηση ασθενών που εμφανίζουν στο δέρμα τους δυσπλαστικούς σπίλους.[46] Πολλαπλές κλινικές φωτογραφίες δύο διαστάσεων (2D) χρησιμεύουν ως σημείο αναφοράς για την εξέλιξη ύποπτων σπίλων οι οποίοι φέρουν χαρακτηριστικά εμφάνισης δερματικού μελανώματος, αυξάνοντας την πιθανότητα έγκαιρης διάγνωσης. Για να επιτευχθεί αυτό μετريέται η σχετική μεταβολή ενός σπίλου σε σχέση με το χρωματισμό του, το κράσπεδο του, τη συνολική του επιφάνεια καθώς και άλλες εμφανείς δυσπλασίες, από το ένα χρονικό σημείο φωτογράφισης στο επόμενο. Σημαντικό ρόλο παίζει εδώ η συνέπεια του ασθενή για την συμμόρφωση και παρουσία του για επόμενες εξετάσεις στα καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Επίσης, η χρήση του σωστού εξοπλισμού απεικόνισης (κάμερα, οθόνη, κλπ.) βοηθά στην ακρίβεια της μεθόδου, ενώ δεν πρέπει να παραλείπεται η προμήθεια του ασθενή με το οπτικό υλικό που θα παραχθεί, ώστε να του δίνεται η δυνατότητα να παρακολουθεί παράλληλα ο ίδιος την εξέλιξη των ύποπτων σπίλων στο μεσοδιάστημα μεταξύ των προγραμματισμένων εξετάσεων.

Πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί η εξέλιξη της συνολικής φωτογράφισης σώματος από την απεικόνιση δυο διαστάσεων σε αυτή των τριών (3D), η οποία δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης ενός τρισδιάστατου μοντέλου του ασθενή. Σε αυτό το μοντέλο αναπαρίσταται η συνολική επιφάνεια του σώματος του ασθενή, ενώ είναι πολύ ακριβές στην αναπαράσταση κυρτών επιφανειών οι οποίες δεν απεικονίζονται σωστά σε διδιάστατες εικόνες. Η απεικόνιση γίνεται



με σύστημα πολλαπλών καμερών και επιτρέπει την παρατήρηση του μοντέλου από 360°, ενώ σε αυτό μπορούν να προστεθούν μέσω του ειδικού λογισμικού και πιο λεπτομερείς απεικονίσεις ατομικών σπύλων για καλύτερη ανάλυση. Η συγκεκριμένη τεχνική φαίνεται να αυξάνει την ακρίβεια και την ταχύτητα των διαγνώσεων, ενώ επιτρέπει παράλληλα και την διάγνωση από απόσταση, μειώνοντας παράλληλα το άγχος των ασθενών.[47]



Εικόνα 5: Παρακολούθηση εξέλιξης μη μελανωματικών σπύλων με τη χρήση τρισδιάστατης απεικόνισης. (Rayner, 2018)

#### 1.5.1.2. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ είναι μια τεχνολογία απεικόνισης η οποία επιτρέπει την εξέταση της επιδερμίδας και της δερμίδας του ασθενούς *in vivo*, χωρίς την ανάγκη για επέμβαση, παρέχοντας παράλληλα διακριτικό όριο συγκρίσιμο με εργαστηριακές τεχνικές ιστολογίας.[48] Συγκριτικά με ιστολογικές τεχνικές, είναι πιο γρήγορη, μη παρεμβατική, φτηνότερη και γίνεται σε πραγματικό χρόνο, ενώ μπορούν να ερευνηθούν πολλαπλά σημεία του σώματος τα οποία παρουσιάζουν ύποπτα για μελάνωμα χαρακτηριστικά σε μια μόνο συνεδρία. Παράλληλα, οι εικόνες που δίνει η τεχνική μπορούν να συνδυαστούν ή να συγκριθούν με άλλες οι οποίες έχουν προκύψει από πιο παραδοσιακές τεχνικές

δερματοσκοπίας με σκοπό την αύξηση της ακρίβειας της διάγνωσης. Τα μελανοκύτταρα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους στη χρωστική μελανίνη διευκολύνουν την λήψη εικόνων λόγω της αντίθεσης (contrast) που δίνουν, η οποία είναι απαραίτητη στη συνεστιακή μικροσκοπία, ενώ αν δεν είναι αρκετή, η τεχνική μπορεί να συμπληρωθεί με τη χρήση φθορίζοντων χρωστικών διαφορετικών χρωμάτων με σκοπό την παροχή αυξημένης αντίθεσης, η οποία δίνει τη δυνατότητα παρατήρησης πολύ εξειδικευμένων δομών.

### 1.5.2. Μοριακές διαγνωστικές τεχνικές

Αρκετές γενετικές μεταλλαγές και γονιδιακές ανωμαλίες έχουν εμπλακεί στην παθογένεση του μελανώματος. Οι περισσότερες από τις ταυτοποιημένες αλλαγές αφορούν σημειακές μεταλλαγές, ενώ άλλες είναι γενομικές ανωμαλίες όπως απώλειες ετεροζυγωτίας σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, ενίσχυση άλλων ή επιγενετική σίωπηση. Σωματικές γενετικές και γενομικές μετατροπές σε γονίδια όπως τα NRAS, BRAF και MAP2K1/2 είναι γνωστό πως αποτελούν βασικούς παράγοντες για την παθογένεση του μελανώματος. Άλλα γονίδια φέρουν κληρονομήσιμες μεταλλαγές στο οικογενές μελάνωμα αλλά ταυτόχρονα και σωματικές μεταλλαγές, όπως τα MITF, CDKN2A και CDK4. Κάποιοι από τους ρόλους αυτών των μεταλλαγών έχουν καθοριστεί αρκετά ξεκάθαρα ενώ κάποιοι άλλοι παραμένουν υπό μελέτη. Η ταυτοποίηση λοιπόν της σειράς μεταλλαγών που καθορίζουν το γενετικό υπόβαθρο του κάθε ασθενή με μελάνωμα είναι πολύ χρήσιμη αφού μας επιτρέπει να καθορίσουμε το γενετικό προφίλ του όγκου βοηθώντας παράλληλα στην λήψη σωστών αποφάσεων κατά τον σχεδιασμό της θεραπείας. Ο εντοπισμός και ταυτοποίηση αυτών των μεταλλαγών μπορεί να γίνεται τόσο σε ζωντανά δείγματα ιστού όσο και σε μονιμοποιημένα σε παραφίνη τα οποία αποκτούνται μέσω βιοψίας. Οι παρακάτω τεχνικές επιτρέπουν τον εντοπισμό σωματικών μεταλλαγών ενώ κάθε τεχνική χρησιμοποιείται για να εντοπιστεί διαφορετικός τύπος μεταλλαγής.[49]

#### 1.5.2.1. Αλληλούχιση DNA

Η άμεση αλληλούχιση ενός δείγματος DNA μπορεί να εντοπίσει όλες τις σημειακές μεταλλαγές σε ένα δεδομένο μήκος DNA. Ανάλογα με την τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί, το μήκος DNA που θα ερευνηθεί μπορεί να είναι από 30-500 βάσεις με τη χρήση Pyrosequencing ή κλασικής αλληλούχισης Sanger ώστε να φτάσει στο μήκος ενός ολόκληρου εξωνίου.[50] Συνήθως χρησιμοποιούνται εκκινητές οι οποίοι έχουν προσχεδιαστεί για την ανίχνευση και αλληλούχιση των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην εκάστοτε παθολογία της ασθένειας.



### 1.5.2.2. Υβριδισμός φθορισμού *in situ* (FISH)

Μεγάλες γενομικές αλλαγές μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση *in situ* φθορίζοντα υβριδισμού (FISH). Η τεχνική FISH επιτρέπει την ανίχνευση πολύ μεγάλων ενισχύσεων, διαγραφών, και ανακατατάξεων του γονιδιώματος όγκων σε αλληλουχίες μεγαλύτερες των 100.000 βάσεων.[51] Έως τώρα δεν έχει βρει σημαντική εφαρμογή στον χαρακτηρισμό κακοήθους μελανώματος, παρόλα αυτά δείχνει να έχει ελπιδοφόρα αποτελέσματα ως συμπληρωματική μέθοδος κατά την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο ενός ασθενή.[52]

### 1.5.2.3. Παράλληλη αλληλούχιση πολλαπλών στόχων

Με την έλευση των τεχνικών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) δίνεται η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τεχνικές μαζικής παράλληλης αλληλούχισης πολλαπλών στόχων σε ολόκληρο το γονιδίωμα του όγκου. Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν την ταυτόχρονη αλληλούχιση μεγάλου αριθμού γονιδίων-στόχων και τον καθορισμό των μεταλλαγών, γενετικών τροποποιήσεων και αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων. Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς παράγει μεγάλη ποσότητα δεδομένων σχετικά με την ακολουθία καθώς και πληροφορίες που πρέπει να προεπεξεργαστούν και στη συνέχεια να αναλυθούν. Η ανάλυση αυτών των δεδομένων είναι ένα συνεχώς εξελισσόμενο πεδίο. Παράλληλα, η αλληλούχιση του συνόλου του γονιδιώματος του όγκου μπορεί, εκτός από το να ταυτοποιήσει τις ήδη υπάρχουσες μεταλλαγές που έχουν συμβάλει στη δημιουργία του, να μας δώσει νέα δεδομένα σχετικά με προηγούμενως άγνωστες μεταλλαγές που συμμετέχουν στη παθολογία του μελανώματος.[53]

## 1.6.Θεραπεία

Τα τελευταία χρόνια αρκετές θεραπείες έχουν εγκριθεί από τον αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA). Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του όγκου, την θέση, το στάδιο και το γενετικό του προφίλ, οι θεραπευτικές επιλογές που έχουν στη διάθεση τους οι κλινικοί ιατροί είναι χειρουργική εκτομή, χημειοθεραπεία, ραδιοθεραπεία, ανοσοθεραπεία ή στοχευμένη θεραπεία.

### 1.6.1. Χειρουργική εκτομή

Για ασθενείς που εμφανίζουν από στάδιο I έως στάδιο III μελάνωμα, η χειρουργική επέμβαση είναι ο κύριος τρόπος θεραπείας που επιλέγεται.[54] Ανάλογα τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου εφαρμόζεται και διαφορετική μέθοδος. Επίσης, είναι σύνηθες φαινόμενο να χρησιμοποιούνται παράλληλες μέθοδοι θεραπείας, όπως η ανοσοθεραπεία για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση που ο ασθενής παρουσιάζει μεταστάσεις, και αυτές υπόκεινται σε μεταστεκτομή, ενώ και σε αυτό το στάδιο συνήθως η χειρουργική επέμβαση συνδυάζεται με χημειοθεραπεία.

### 1.6.2. Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία αποτελούσε στο παρελθόν την πρώτη επιλογή για την θεραπεία του μελανώματος όταν βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Χημειοθεραπευτικοί συνδυασμοί φαρμάκων έχουν δοκιμαστεί ευρέως με σκοπό την βελτίωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς, παρόλα αυτά η συνολική επιβίωση των ασθενών δεν παρουσιάζει αυξημένα ποσοστά.[55] Παρόλο που σε μεγάλο βαθμό έχει πια αντικατασταθεί από εναλλακτικές επιλογές, η χημειοθεραπεία παραμένει μια σημαντική συμπληρωματική θεραπεία στην αντιμετώπιση του μελανώματος. Παρακάτω θα εξεταστούν κάποιες από τις χημειοθεραπευτικές επιλογές φαρμάκων που χρησιμοποιούνται.

#### 1.6.2.1. Dacarbazine

Το Dacarbazine, ένας αλκυλιωτικός παράγοντας, είναι η βασικότερη επιλογή χημειοθεραπευτικού φαρμάκου που χρησιμοποιείται στο μεταστατικό μελάνωμα. Παρόλο που δεν εμφάνισε ποτέ αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα, αποτελούσε έως σχετικά πρόσφατα την κύρια επιλογή από τη στιγμή που άλλα φάρμακα από μόνα τους, ή σε συνδυασμό, δεν εμφάνιζαν βελτιωμένα αποτελέσματα σε σχέση με αυτό. Ακόμα όμως χρησιμοποιείται ως συγκριτικός παράγοντας σε κλινικές δοκιμές ή σε συνδυασμό με νέα, υπό μελέτη, χημειοθεραπευτικά φάρμακα.[56]

#### 1.6.2.2. Temozolomide

Το Temozolomide (TMZ), είναι ένα φάρμακο που λαμβάνεται δια του στόματος, αποτελεί προφάρμακο του ενεργού μεταβολίτη του Dacarbazine και χρησιμοποιείται στην θεραπεία του

προχωρημένου μελανώματος. Συγκριτικά με το Dacarbazine, το TMZ εμφανίζει μια μικρή αύξηση στα ποσοστά επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της ασθένειας (progression-free survival) των ασθενών χωρίς όμως να εμφανίζει διαφορές στη συνολική επιβίωση τους.[57]

### 1.6.3. Ανοσοθεραπεία

Στις αντι-καρκινικές αποκρίσεις, τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα όγκο-ειδικά αντιγόνα, ενεργοποιούνται και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται, αποκτώντας την ικανότητα να καταστρέφουν κύτταρα που τα εκφράζουν. Εκτός από τα διεγερτικά και ανασταλτικά μονοπάτια σηματοδότησης που περιορίζουν τις αντικαρκινικές αποκρίσεις των T κυττάρων, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ξεφύγουν από την ανίχνευση των T κυττάρων, καθώς συνήθως δεν εκφράζουν μόρια B7.[58]

Ογκο-διεισδυτικά λεμφοκύτταρα μπορούν να εκκινήσουν ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, κάτι το οποίο έχει συνδεθεί με θετική έκβαση και αυξημένα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς με κακοήθες μελάνωμα.[41] Εφορμώντας από αυτήν την παρατήρηση, η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια ελκυστική επιλογή θεραπείας ασθενών που εμφανίζουν μελάνωμα σε προχωρημένο στάδιο. Γενικότερα, τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ φλεγμονής και καρκίνου ερευνώνται ακόμα και τώρα με τελικό στόχο την ταυτοποίηση μορίων τα οποία είτε να μπορούν να μας δώσουν έγκαιρες πληροφορίες για τη διάγνωση ή να αποτελέσουν τα ίδια στόχους για μελλοντικές θεραπείες. Τα τελευταία χρόνια, η ολοένα και αυξανόμενη γνώση μας πάνω στην παθοφυσιολογία του καρκίνου και η κατανόηση του ρόλου που παίζει το ανοσοποιητικό σύστημα στην εξέλιξη του έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διάφορων ανοσοθεραπειών, κάποιες από τις οποίες αναλύονται εδώ.

#### 1.6.3.1. Ιντερφερόνη α

Οι ιντερφερόνες είναι κυτταροκίνες οι οποίες εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα. Οι σηματοδοτικές αυτές πρωτεΐνες έχει δειχθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω ενεργοποίησης πολλών διαφορετικών τύπων λεμφοκυττάρων όπως T και B κυττάρων, NK και δενδριτικών, ενώ παράλληλα εμφανίζουν αντιαγγειογονική, αντιπολλαπλασιαστική και αντιογκογονική δράση.[59] Στο μελάνωμα, η ιντερφερόνη α παρουσιάζει σημαντική ανοσοτροποποιητική δράση με αντιογκογονικά αποτελέσματα, επάγοντας την αύξηση της παραγωγής του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I σε κύτταρα μελανώματος αλλά και ανοσοκύτταρα, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων.[60]

### 1.6.3.2. Ιντερλευκίνη-2

Η ιντερλευκίνη-2 είναι μια κυτταροκίνη η οποία έχει την ικανότητα να αυξάνει τη δραστηριότητα των τελεστικών και ρυθμιστικών T-κυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει πως υψηλή δόση ιντερλευκίνης-2 έχει αντιογκογονική δράση και ο FDA έχει εγκρίνει τη χρήση της στη θεραπεία του μεταστατικού μελανώματος. Η χρήση της, όπως και στην περίπτωση της ιντερφερόνης, είναι πολύ συχνή σε κλινικές δοκιμές σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, άλλες ανοσοθεραπείες και στοχευμένες θεραπείες.[61]

### 1.6.3.3. Αποκλεισμός σχετιζόμενου με κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αντιγόνου 4 (CTLA-4)

Το Ipilimumab, το οποίο εγκρίθηκε από το FDA για τη θεραπεία προχωρημένου μελανώματος το 2011, είναι ένα αντι-CTLA-4 αντίσωμα. Το CTLA-4 είναι ένας υποδοχέας ανασταλτικού σημείου ελέγχου ο οποίος εμποδίζει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και επάγει ανοσολογική ανοχή. Τα αντι-CTLA-4 αντισώματα λειτουργούν σαν ανταγωνιστές, εμποδίζοντας την αναστολική δράση, παράλληλα επάγοντας την παραγωγή προ-φλεγμονοδών κυτταροκινών από τα T-κύτταρα και ενισχύοντας την παραγωγή T-κυττάρων και την εισχώρησή τους στους ανταποκρινόμενους όγκους.[62]

### 1.6.4. Στοχευμένη θεραπεία

Περίπου το 70% των ασθενών που εμφανίζουν δερματικό μελάνωμα εμφανίζουν μεταλλαγές σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μόρια που συμμετέχουν σε κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια. Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 1.4, αυτές οι μεταλλαγές παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση κακοηθούς φαινότυπου και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μελανώματος. Η στοχευμένη θεραπεία χρησιμοποιεί μικρά μόρια-αναστολείς τα οποία στοχεύουν τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας.[63]

#### 1.6.4.1. Αναστολείς BRAF

Τα τελευταία χρόνια, νέες μοριακές προσεγγίσεις αναπτύσσονται με σκοπό την στόχευση μεταλλαγών οι οποίες κρύβονται πίσω από την εμφάνιση μελανώματος. Η BRAF είναι μια κινάση σερίνης-θρεονίνης κλειδί στο σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK κινασών και περίπου 50% των περιπτώσεων δερματικού μελανώματος το οποίο δεν έχει προκύψει από πολυετή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία εμφανίζει μετάλλαξη στο γονίδιο που την κωδικοποιεί.[64] Μεταλλαγές στο BRAF γονίδιο έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού με αποτέλεσμα τον αυξημένο πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.[54] Η συνηθέστερη μετάλλαξη του γονιδίου BRAF εμφανίζεται στη θέση που κωδικοποιεί για το αμινοξύ 600, στο οποίο λόγω της μετάλλαξης η βαλίνη που βρίσκεται κανονικά στη θέση αυτή αντικαθίσταται από γλουταμικό οξύ (BRAF<sup>V600E</sup>) ή σε πιο σπάνιες περιπτώσεις από λυσίνη (BRAF<sup>V600K</sup>).

Μέχρι τώρα έχουν αναπτυχθεί δύο κύριοι αναστολείς της μεταλλαγμένης BRAF πρωτεΐνης, το Vemurafenib και το Dabrafenib για την αντιμετώπιση του μεταστατικού κακοήθους μελανώματος, εμφανίζοντας αρκετά υψηλούς δείκτες επιβίωσης των ασθενών, είτε συνολικά είτε χωρίς εξέλιξη της νόσου.[65] Όντας μια στοχευμένη θεραπεία, οι ασθενείς μπορούν να επιλεγθούν για χορήγηση της αφότου γίνει έλεγχος στο γενετικό προφίλ του όγκου τους για να ταυτοποιηθεί η σωστή μεταλλαγή. Επίσης, όπως και σε άλλες περιπτώσεις, μπορεί να συνδυαστεί με άλλες θεραπείες παράλληλα για βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων όπως χημειοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία. Πολλές φορές αυτό προτιμάται, αφού οι όγκοι πολύ συχνά μετά από ένα διάστημα αγωγής εμφανίζουν ανθεκτικότητα στους αναστολείς BRAF, συνήθως ενεργοποιώντας εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια για να πετύχουν την επιβίωση τους.

#### 1.6.4.2. Αναστολείς MEK

Η στόχευση σηματοδοτικών τελεστών καταρροϊκά της θέσης των μεταλλαγμένων ογκογονιδίων είναι μια πολύ χρήσιμη στρατηγική που χρησιμοποιείται για να προσπεραστεί η αντίσταση που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα, όπως στην περίπτωση του BRAF στο μελάνωμα. Η MEK είναι ένας στόχος καταρροϊκά του μονοπατιού του BRAF. Αναστολή του MEK έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής σηματοδότησης που ενεργοποιείται μέσω αυξητικών παραγόντων, άρα παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου. Το Trametinib, ένας αναστολέας των MEK1/2 εμφανίζει αντι-ογκολογική δράση και έχει εγκριθεί εδώ και μερικά χρόνια ως θεραπεία στην περίπτωση του μεταστατικού κακοήθους μελανώματος, ενώ παρουσιάζει σημαντικά βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με χημειοθεραπείες.[66] Πρόσφατα έγινε έλεγχος συνδυαστικής χρήσης του με το Dabrafenib σε κλινικές δοκιμές και τα αποτελέσματα ήταν αρκετά καλά ώστε να πάρει έγκριση ο συγκεκριμένος συνδυασμός από τον FDA.[67]

## 1.7.Επαναστόχευση φαρμάκων

Ενώ κάθε χρόνο ολοένα και λιγότερα φάρμακα παίρνουν την τελική έγκριση για ευρεία χρήση, το κόστος για την έρευνα και ανάπτυξη τους ολοένα και μεγαλώνει.[68] Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα είναι πως όσο πιο εξειδικευμένο είναι το φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση μιας συγκεκριμένης ασθένειας, τόσο πιο συχνή είναι και η εμφάνιση αντίστασης σε αυτό, φέρνοντας στο προσκήνιο την ανάγκη για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και θεραπειών τα οποία θα το αντικαταστήσουν. Η επαναστόχευση φαρμάκων, είναι μια νέα προσέγγιση η οποία προσπαθεί να δώσει μια λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα.[69] Η βασική ιδέα είναι η εύρεση νέων χρήσεων για φάρμακα τα οποία είτε βρίσκονται στην αγορά και χρησιμοποιούνται, είτε έχουν αποτύχει στις κλινικές δοκιμές για την ασθένεια για την οποία αρχικά προορίζονταν. Για τα φάρμακα αυτά ήδη είναι γνωστό το φαρμακοκινητικό τους προφίλ, καθώς και ο μηχανισμός λειτουργίας τους, οι στόχοι τους και οι παρενέργειες τους. Οι γνώσεις αυτές μπορούν να επιταχύνουν τα αρχικά στάδια δοκιμών για την έγκριση ενός φαρμάκου για συγκεκριμένη θεραπεία μειώνοντας τα ρίσκα και τα κόστη που εμπεριέχονται σε αυτές.

Τα τελευταία χρόνια η Βιολογία Συστημάτων συνεχίζει να εξελίσσεται και να δίνει απαντήσεις σε θεμελιώδη προβλήματα της βιολογίας οι οποίες βρίσκουν πρακτική χρήση στην ιατρική και στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων.[70] Η βασισμένη σε δίκτυα υπολογιστική βιολογία συστημάτων μελετά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιομορίων και εντείνει τη προσοχή στα χαρακτηριστικά δικτύων που παρουσιάζουν.

Η επαναστόχευση φαρμάκων μπορεί να στηριχθεί σε δύο βασικά δεδομένα. Πρώτον, οι σύνθετες ασθένειες προκαλούνται γενικά από τις συλλογικές μεταβολές στη λειτουργία πολλών συσχετισμένων γονιδίων. Η δυσλειτουργία αυτών των γονιδίων θα επεκταθεί στη διεργασία την οποία ελέγχουν και θα διαταράξει ορισμένες βιολογικές διεργασίες λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων, οδηγώντας στην εμφάνιση ασθενειών. Δεύτερον, με τη μεσολάβηση της δέσμευσης του στόχου από ένα φάρμακο, ορισμένες βιολογικές διεργασίες θα διαταράσσονται λόγω της δράσης του. Συνεπώς, οι συνήθεις βιολογικές διεργασίες που διαταράσσονται κατά την εμφάνιση της ασθένειας ή λόγω της χορήγησης του φαρμάκου μπορεί να μας δώσουν ισχυρές ενδείξεις για πιθανή επαναστόχευση του φαρμάκου.[71] Τα τελευταία χρόνια λόγω της εξέλιξης των τεχνολογιών που εφαρμόζονται στην ερευνητική βιολογία παρατηρείται η συσσώρευση δεδομένων υψηλής απόδοσης (high-throughput) η οποία κάνει εφικτή την ανακατασκευή δικτύων αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιομορίων και κυτταρικών πληθυσμών.

Για την εφαρμογή όμως της συγκεκριμένης μεθόδου, απαιτούνται σημαντικές γνώσεις βιοπληροφορικής όπως και μοριακής βιολογίας πάνω στην ασθένεια υπό μελέτη, κάτι που προϋποθέτει τη συνεργασία επιστημόνων από διαφορετικούς κλάδους καθώς και την ύπαρξη των κατάλληλων πόρων για τη διεξαγωγή τέτοιων τύπων πειραμάτων. Το εργαστήριο Εμβιομηχανικής Συστημάτων του Τμήματος Μηχανολογίας του Εθνικού Μετσόβιου

Πολυτεχνείου στελεχώνεται από επιστήμονες οι οποίοι εξειδικεύονται και στους δύο επιστημονικούς κλάδους, ενώ παράλληλα διαθέτει τους πόρους για την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθοδολογίας.

## 2. Σκοπός της Έρευνας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης είναι η χρήση των δεδομένων που προέκυψαν από τη δημιουργία ενός πάνελ κυτταρικών σειρών μελανώματος, η ανάλυση του με σκοπό την ανακάλυψη υποψήφιων φαρμάκων με δυνητικά θεραπευτική δράση και η πειραματική επαλήθευση των πιθανών υποψηφίων φαρμάκων προς επαναστόχευση σε κυτταρικές σειρές μελανώματος.

Το εργαστήριο Εμβιομηχανικής Συστημάτων διαθέτει συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές μελανώματος πάνω στις οποίες στηρίχθηκε η δημιουργία του πάνελ, ενώ τα αρχικά δεδομένα που προέκυψαν από την υπολογιστική ανάλυση με σκοπό την εύρεση υποψήφιων φαρμάκων προς επαναστόχευση αναπροσαρμόστηκαν ώστε να συσχετιστούν με τα χημικά σκευάσματα τα οποία ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο. Τέλος, έγινε *in vitro* δοκιμή των φαρμάκων με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την δράση τους καθώς και με την αποτελεσματικότητα της υπολογιστικής μεθόδου.



### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1. Συλλογή Δεδομένων

Για την υπολογιστική μελέτη του μελανώματος έγινε συλλογή δεδομένων από τη βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus (GEO), στην οποία υπάρχουν αποθηκευμένα πάνω από 100.000 πειράματα, η πλειοψηφία των οποίων αποτελείται από πειράματα μικροσυστοιχιών. Το κάθε πείραμα αποθηκεύεται σε αυτή με μία συγκεκριμένη δομή, η οποία περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με:

- Το ίδιο το πείραμα
- Τη πλατφόρμα του πειράματος
- Τα γονίδια που παρακολουθούνται
- Τα δείγματα που συμπεριλαμβάνονται στο πείραμα.

Με αυτές τις πληροφορίες, από κάθε πείραμα επιλέγονται τα δείγματα και τα γονίδια τα οποία χρησιμοποιούνται στην τελική ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, τα αρχεία με τη δομή “sample” της GEO περιέχουν πληροφορίες σχετικά με ένα δείγμα από ένα συγκεκριμένο πείραμα. Ένα δείγμα μπορεί να είναι η μέτρηση της βιωσιμότητας μιας κυτταρικής σειράς όταν αυτή εκτεθεί σε ένα συγκεκριμένο φάρμακο. Κάθε δείγμα ανήκει σε ένα και μοναδικό πείραμα.

Η πιο πολύπλοκη μορφή δεδομένων της GEO είναι η “series”. Μια σειρά αποτελεί το σύνολο των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις διάφορων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε ένα “sample”, άρα ένα πείραμα μπορεί να αντιπροσωπευτεί απόλυτα από ένα “series”.

Από την βάση δεδομένων GEO έγινε επιλογή όλων των “series” οι οποίες περιέγραφαν πειράματα που έγιναν σε κύτταρα μελανώματος, όπως και σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα (που λειτουργούν ως control). Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων των καρκινικών κυττάρων μελανώματος καθώς και την διαφορική ανάλυση των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στο μελάνωμα. Η ανάλυση αυτή περιγράφεται στη διπλωματική του Κωνσταντίνου Νταγιάντα με τίτλο «*Ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης με χρήση Μπεϋζιανών μεθόδων και υπολογιστική κατηγοριοποίηση καρκινικών μελανωματικών δειγμάτων για επαναστόχευση φαρμάκων*», και τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατηγοριοποίηση των διαθέσιμων στο εργαστήριο κυτταρικών σειρών μελανώματος καθώς και την επαναστόχευση φαρμάκων σε αυτές.

## 3.2. Επαναστόχευση φαρμάκων

### 3.2.1. Θεωρητικό υπόβαθρο

Τα επεξεργασμένα δεδομένα σχετικά με την διαφορική έκφραση των γονιδίων τα οποία αντλήθηκαν από τη GEO και αντιστοιχούν στις μελανωματικές κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου (Νταγιάντας Κ, 2019) χρησιμοποιούνται ως εισαγωγή στο πρόγραμμα cMap.[72] Το λογισμικό είναι διαθέσιμο στον διαδικτυακό ιστότοπο <http://clue.io/>. Η ιδέα πάνω στην οποία στηρίζεται το cMap είναι πως κάθε κύτταρο, ανάλογα με τη κατάσταση του θα παρουσιάζει ένα διαφορετικό γονιδιακό προφίλ έκφρασης. Όταν δύο καταστάσεις είναι παρόμοιες, πχ. δυο διαφορετικά κύτταρα παρουσιάζουν το ίδιο προφίλ έκφρασης ενώ έχουν εκτεθεί στην ίδια ουσία, θεωρητικά μπορούμε να υποθέσουμε πως παρόλο που οι δύο ουσίες είναι διαφορετικές, η επίδραση που έχουν είναι η ίδια, άρα η μία μπορεί να αντικαταστήσει την άλλη, ή και να συνδυαστεί μαζί της για να βελτιώσουν συνεργιστικά τη δράση τους.

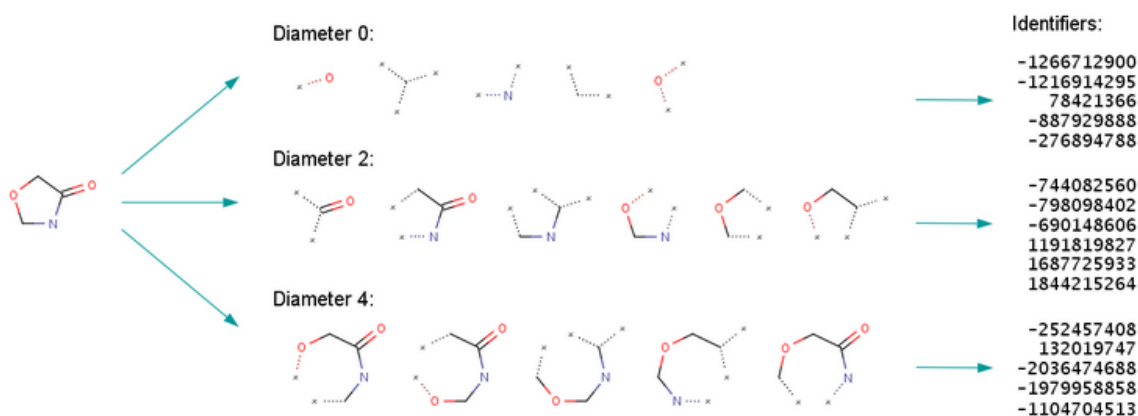
Το Broad Institute, έχει δημιουργήσει τη βάση δεδομένων Connectivity Map (cMap, <http://clue.io/>) η οποία περιέχει παραπάνω από 1,5 εκατομμύρια προφίλ γονιδιακής έκφρασης κυτταρικών σειρών όπως η A-375 η οποία χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία. Τα προφίλ αυτά έχουν προκύψει από πειράματα στα οποία έχει καταγραφεί η γονιδιακή έκφραση των κυττάρων μετά από έκθεση τους σε παραπάνω από 5000 μικρά μόρια (small compounds) και άλλα 3000 γενετικά αντιδρώντα (genetic reagents).

Όταν ο χρήστης της διαδικτυακής εφαρμογής δώσει τα δεδομένα έκφρασης ενός συγκεκριμένου γενετικού προφίλ, δηλαδή ποια γονίδια στη δεδομένη κυτταρική κατάσταση βρίσκονται υπερκεφρασμένα ή υποεκφρασμένα, το cMap τα συγκρίνει με τα ήδη αποθηκευμένα του προφίλ και επιστρέφει αυτά τα οποία έχουν ένα συγκεκριμένο αριθμό συσχέτισης με τα δεδομένα που του παρείχαμε. Αν ο συντελεστής συσχέτισης είναι +100 σημαίνει ότι τα δύο προφίλ έκφρασης (δηλαδή αυτό που έδωσε ο χρήστης και αυτό που επέστρεψε το πρόγραμμα) είναι τα ίδια, ενώ -100 δηλώνει αντίστροφη έκφραση. Το 0 υποδηλώνει αδυναμία συσχέτισης. Στην περίπτωση μελέτης του προφίλ ενός καρκινικού κυττάρου, σκορ από -95 έως -100 συσχετίζεται με αντιστροφή της έκφρασης. Άρα, αν το προφίλ με το οποίο συσχετίστηκε στη βάση δεδομένων ανήκει σε κάποιο πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε μια συγκεκριμένη ουσία, αυτή δυνητικά μπορεί να αντιστρέψει τη δράση του καρκινικού κυττάρου, δηλαδή να παρουσιάζει αντικαρκινική δράση.

### 3.3. Εύρεση πιθανών στόχων προς επαναστόχευση στη βιβλιοθήκη φαρμακολογικών ουσιών LOPAC

Στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής Συστημάτων υπάρχει στη διάθεση μας η βιβλιοθήκη φαρμακολογικών ουσιών LOPAC (LOPAC®1280-Small Scale – The Library of Pharmacologically Active Compounds, Sigma-Aldrich, LO4200), η οποία περιέχει 1280 φαρμακολογικά ενεργές ουσίες. Για την πειραματική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της υπολογιστικής ανάλυσης αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν οι ουσίες που εμπεριέχονται σε αυτή. Για να επιτευχθεί αυτό ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

Αρχικά, αντλήθηκαν δεδομένα σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά της κάθε ουσίας που βρίσκεται στη LOPAC από την DrugBank (<http://drugbank.ca/>) και την PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Το ίδιο έγινε και για όλες τις ουσίες οι οποίες προτάθηκαν από το cMap για αντιστροφή του προφίλ έκφρασης στις 3 ομάδες κυτταρικών σειρών μελανώματος του εργαστηρίου. Χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια η μέθοδος Extended Connectivity Fingerprint ECFP (<https://docs.chemaxon.com/display/docs/Extended+Connectivity+Fingerprint+ECFP>) [73] για τη μετατροπή των δομικών χαρακτηριστικών των ουσιών των 2 γκρουπ σε αλληλουχίες αναγνωριστικών ακέραιων αριθμών (integer identifiers) οι οποίοι στη συνέχεια μετατρέπονται σε πίνακες (bitmaps) που αποτελούνται από 1024 bits, ενώ κάθε bit αποτελεί ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό που μπορεί να έχει κάθε άτομο ενός μορίου (χημικό στοιχείο, θέση στο χώρο, απόσταση από κοντινότερο γείτονα κλπ.) και αναπαρίσταται σε δυαδικό σύστημα, με 0 ή 1.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της ετατροπής μιας χημικής δομής σε λίστα αναγνωριστικών ακαίρων αριθμών (identifiers).



### 3.4.Εργαστηριακά Πρωτόκολλα

#### 3.4.1. Παρασκευή θρεπτικού υλικού κυτταρικής καλλιέργειας

Ως θρεπτικό υλικού χρησιμοποιήθηκε το RPMI-1640 w/ L-Glutamate (Biosera, LM-R1638), στο οποίο έγινε προσθήκη 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biosera, FB-1001/500) και 1% P/S (Pennicylin/Streptomycin, Gibco Life Technologies, 15140122). Το συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

#### 3.4.2. Καλλιέργεια και διαχείριση κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές που επιλέχθηκαν προς χρήση αντιπροσωπεύουν τις ομάδες που δημιουργήθηκαν κατά την ομαδοποίηση των κυτταρικών σειρών μελανώματος που υπάρχουν διαθέσιμες στο εργαστήριο μας, διατηρούνται αποθηκευμένες σε υγρό άζωτο, σε κρυο-φιαλίδια στους -196°C και αποτελούνται από τις παρακάτω:

Όνομασία	Μεταλλαγή	
	BRAF	NRAS
A375	V600E	WT
WM115	V600D	WT
MEL-JUSO	WT	Q61L
MEWO	WT	WT

Πίνακας 1: Οι κυτταρικές σειρές μελανώματος που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες.

##### 3.4.2.1. Πρωτόκολλο τήξης

- Τα κύτταρα τήκονται μέσα στο κρυο-φιαλίδιο στο οποίο είναι ήδη αποθηκευμένα σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 37°C.
- Προσθήκη 1mL θρεπτικού μέσου για την πλήρη τήξη των κυττάρων.

- Ομογενοποίηση.
- Μεταφορά του συνολικού όγκου σε 15ml falcon
- Προσθήκη 3ml θρεπτικού μέσου
- Φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 1500 στροφες.
- Απόρριψη υπερκείμενου.
- Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1ml θρεπτικού μέσου.
- Μεταφορά του όγκου σε φλάσκα καλλιέργειας T25
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού μέσου
- Μεταφορά της φλάσκας σε επωαστήρα ελεγχόμενης ατμόσφαιρας, σε θερμοκρασία 37°C και 5% περιεκτικότητα CO<sub>2</sub>, σε στείρες συνθήκες.

Τα κύτταρα παραμένουν στη συνέχεια στον επωαστήρα για τουλάχιστον 2-3 μέρες, κατά τις οποίες ελέγχονται καθημερινά όσον αφορά το στάδιο ανάπτυξης τους, ενώ γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε 2 μέρες. Όταν τα κύτταρα καλύπτουν το 80%-90% της επιφάνειας της φλάσκας, γίνεται ανακαλλιέργεια σε φλάσκα μεγαλύτερου όγκου.

#### 3.4.2.2. Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας

- Απόρριψη θρεπτικού μέσου μέσω αναρρόφησης.
- Πλύση κυττάρων με 5ml PBS pH 7.4 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biosera, PM-B2092).
- Προσθήκη 3ml θρυψίνης.
- Επώαση των κυττάρων στους 37°C για 5 λεπτά.
- Έλεγχος των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού μέσου και αποκόλληση των κυττάρων.
- Μεταφορά του συνολικού όγκου σε 15ml falcon
- Φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 1500 στροφες.
- Απόρριψη υπερκείμενου.
- Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml θρεπτικό υλικό.
- Προσθήκη 10ml θρεπτικού μέσου σε μια φλάσκα καλλιέργειας T75
- Μεταφορά 1ml επαναιωρημένων κυττάρων (ή περισσότερος, ανάλογα με το πλήθος των κυττάρων στη φλάσκα καλλιέργειας T75).
- Μεταφορά της φλάσκας σε επωαστήρα ελεγχόμενης ατμόσφαιρας, σε θερμοκρασία 37°C και 5% περιεκτικότητα CO<sub>2</sub>, σε στείρες συνθήκες.

Τα κύτταρα παραμένουν στη συνέχεια στον επωαστήρα για τουλάχιστον 2-3 μέρες, κατά τις οποίες ελέγχονται καθημερινά σε μικροσκόπιο σχετικά με το στάδιο ανάπτυξης τους, ενώ γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε 2 μέρες. Όταν τα κύτταρα φτάσουν τουλάχιστον 80%

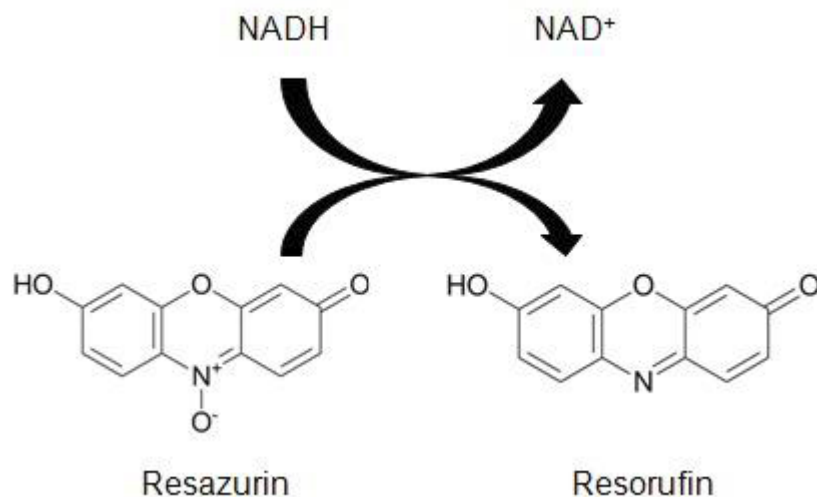
κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας είναι έτοιμα για ανακαλλιέργεια ή για χρήση σε άλλες πειραματικές διαδικασίες.

#### 3.4.2.3. Πάγωμα κυττάρων / Αποθήκευση

- Απόρριψη θρεπτικού μέσου μέσω αναρρόφησης.
- Πλύση κυττάρων με 5ml PBS pH 7.4 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biosera, PM-B2092).
- Προσθήκη 3ml θρυψίνης.
- Επώαση των κυττάρων στους 37 °C για 5 λεπτά.
- Έλεγχος των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού μέσου και αποκόλληση των κυττάρων.
- Μεταφορά του συνολικού όγκου σε 15ml falcon
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 1500 στροφες.
- Απόρριψη υπερκείμενου.
- Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 900μl θρεπτικό υλικό, σε ειδικό κρυο-φιαλίδιο.
- Προσθήκη 100μl DMSO (Dimethyl sulfoxide, Διμεθυλοσουλφοξείδιο, λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό και αποτρέπει τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου εντός των κυττάρων)
- Ανάδευση.
- Αποθήκευση του κρυο-φιαλιδίου σε ειδικό καταψύκτη φύλαξης κυττάρων στους -80°C και την επόμενη μέρα μεταφορά τους σε υγρό άζωτο.

#### 3.4.3. Μέθοδος Resazurin για τη μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας

Το resazurin είναι ένας κυτταρικά διαπερατός οξειδοαναγωγικός δείκτης των κυττάρων που χρησιμοποιείται για την μέτρηση του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Μπορεί να διαλυθεί σε φυσιολογικούς διαλύτες (π.χ. PBS) σχηματίζοντας ένα σκούρο μπλε διάλυμα, και να προστεθεί απευθείας σε κυτταροκαλλιέργειες με ομογενή τρόπο. Ζωντανά κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό μπορούν να ανάγουν το resazurin στο ροζ και φθορίζον resofurin.

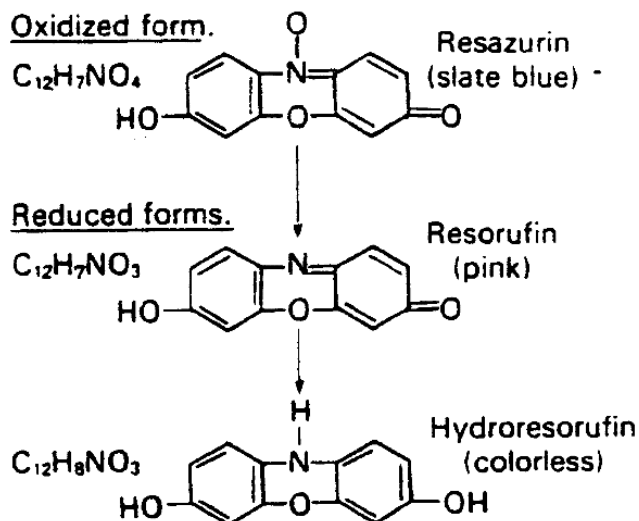


*Εικόνα 8: Αναγωγή του Resazurin σε Resorufin.*

Δεν απαιτείται προσθήκη ενός ενδιάμεσου φορέα ηλεκτρονίων για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, αλλά η προσθήκη θα μπορούσε να επιταχύνει την αντίδραση. Η ποσότητα resorufin που παράγεται είναι ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων και να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση φθορισμού σε μήκος κύματος διέγερσης 560nm και μήκος κύματος εκπομπής 590nm. Ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει και με μέτρηση οπτικής απορρόφησης, αλλά παρουσιάζει πολύ μικρότερη ευαισθησία.

Ο χρόνος επώασης που απαιτείται για την παραγωγή επαρκούς φθορίζον σήματος είναι συνήθως 1-4 ώρες και εξαρτάται από την μεταβολική ενεργότητα του κάθε κυτταρικού τύπου, της πυκνότητας των κυττάρων και των συνθηκών καλλιέργειας, όπως το θρεπτικό υλικό. Ο χρόνος επώασης πρέπει συνεπώς να προσδιορίζεται πειραματικά και να είναι αρκετά μικρός ώστε να αποφευχθεί η τοξικότητα του αντιδραστηρίου αλλά αρκετά μεγάλος ώστε να είναι αρκετή η ευαισθησία της μεθόδου. Περαιτέρω αναγωγή του resorufin οδηγεί σε σχηματισμό hydroresorufin, το οποίο είναι άχρωμο και μη-φθορίζον, και συνεπώς μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.





Εικόνα 9: Πλήρης αναγωγή του Resazurin.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε Resazurin sodium salt (SIGMA, R7017) διαλυμένο αρχικά σε Dulbecco's Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (Biosera, PM-B2092), και περαιτέρω αραιωμένο σε θρεπτικό υλικό πριν από κάθε πείραμα. Μετά από την 24ωρη έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες, αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε Resazurin 60μg/mL. Έγινε επώαση για 2 ώρες σε επωαστήρα 37°C, 5.0 CO<sub>2</sub>, 90% υγρασία και μετρήθηκε ο φθορισμός σε μήκη κύματος Ex560nm/Em590nm στο Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific™). Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό των εκτεθειμένων στις επαγωγικές ουσίες κυττάρων προς τα μη εκτεθειμένα.

### 3.5. Πειραματικός σχεδιασμός

Επιλέχθηκαν 4 κυτταρικές σειρές-αντιπρόσωποι της κάθε ομάδας που δημιούργησε η υπολογιστική ανάλυση. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν αρχικά σε φλάσκες καλλιέργειας και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων με πλήρες θρεπτικό υλικό, 20.000 κύτταρα/πηγάδι, σε συνολικό όγκο 100μL/πηγάδι και αφέθηκαν να προσκολληθούν στην επιφάνεια του πηγαδιού για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε κάθε φορά τη δραστική ουσία/φάρμακο της οποίας θέλουμε να δούμε τις επιπτώσεις στη κυτταρική βιωσιμότητα, αφότου αραιώθηκαν έως συγκέντρωση 10μM. Έγινε επίσης και έλεγχος για συνεργιστική δράση μεταξύ των ουσιών με την προσθήκη τους ανά ζεύγη στο ίδιο πηγάδι. Μετά από 24 ώρες το θρεπτικό αφαιρέθηκε και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Resazurin για τη μέτρηση κυτταρικής

βιωσιμότητας. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism 6.0.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Επαναστόχευση φαρμάκων με cMap

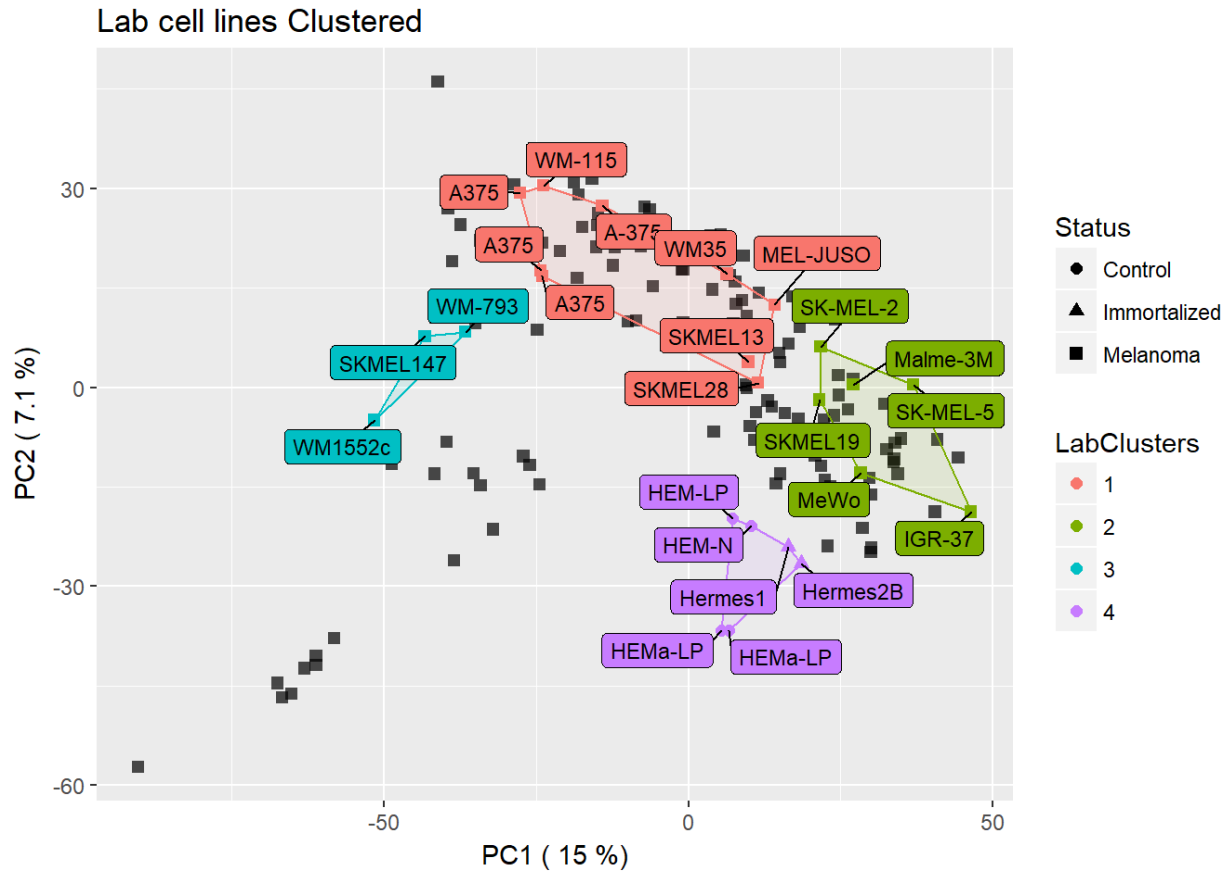
#### 4.1.1. Επαναστόχευση φαρμάκων

Η λίστα με τις κυτταροσειρές μελανώματος που υπάρχουν στο εργαστήριο είναι η παρακάτω:

A-375	SK-MEL-13	SK-MEL-5
IGR-37	SK-MEL-147	WM-115
Malme-M	SK-MEL-19	WM-35
MEL-JUSO	SK-MEL-2	WM-1552c
MEWO	SK-MEL-28	WM-793

*Πίνακας 2: Όλες οι κυτταροσειρές που είναι διαθέσιμες στο εργαστήριο Συστημικής Ενβιομηχανικής.*

Αυτές οι κυτταροσειρές στη συνέχεια ομαδοποιούνται με τη χρήση PCA (Principal Component Analysis), ανάλογα με το διαφορετικό προφίλ γονιδιακής έκφρασης που παρουσιάζουν σε σχέση με φυσιολογικές σειρές μελανοκυττάρων των οποίων το προφίλ έκφρασης επιλέχθηκε για να ορίσει το baseline της ανάλυσης. Το αποτέλεσμα της ομαδοποίησης παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 10: Απεικόνιση των ομάδων των μελανωματικών κυτταρικών σειρών του εργαστηρίου στον δυδιάστατο χώρο που δημιουργείται από την ανάλυση κυρίων στοιχείων (PCA).

Η μεγαλύτερη καρκινική ομάδα που δημιουργείται είναι η πρώτη (κόκκινο χρώμα) και περιέχει κυρίως δείγματα από την κυτταρική σειρά A-375. Τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια για τις κυτταροσειρές της κάθε μιας από τις 4 ομάδες που δημιουργήθηκαν βρέθηκαν με απλό γραμμικό μοντέλο. Τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια διαχωρίζονται σε υπέρ- και υπό-εκφρασμένα, με βάση το πρόσημο του  $\log_2(FC)$  τους. Το FC ή Fold Change αποτελεί τον λογάριθμο του λόγου των απόλυτων τιμών έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα (case) σε σχέση με ένα άλλο που ορίζουμε ως control:

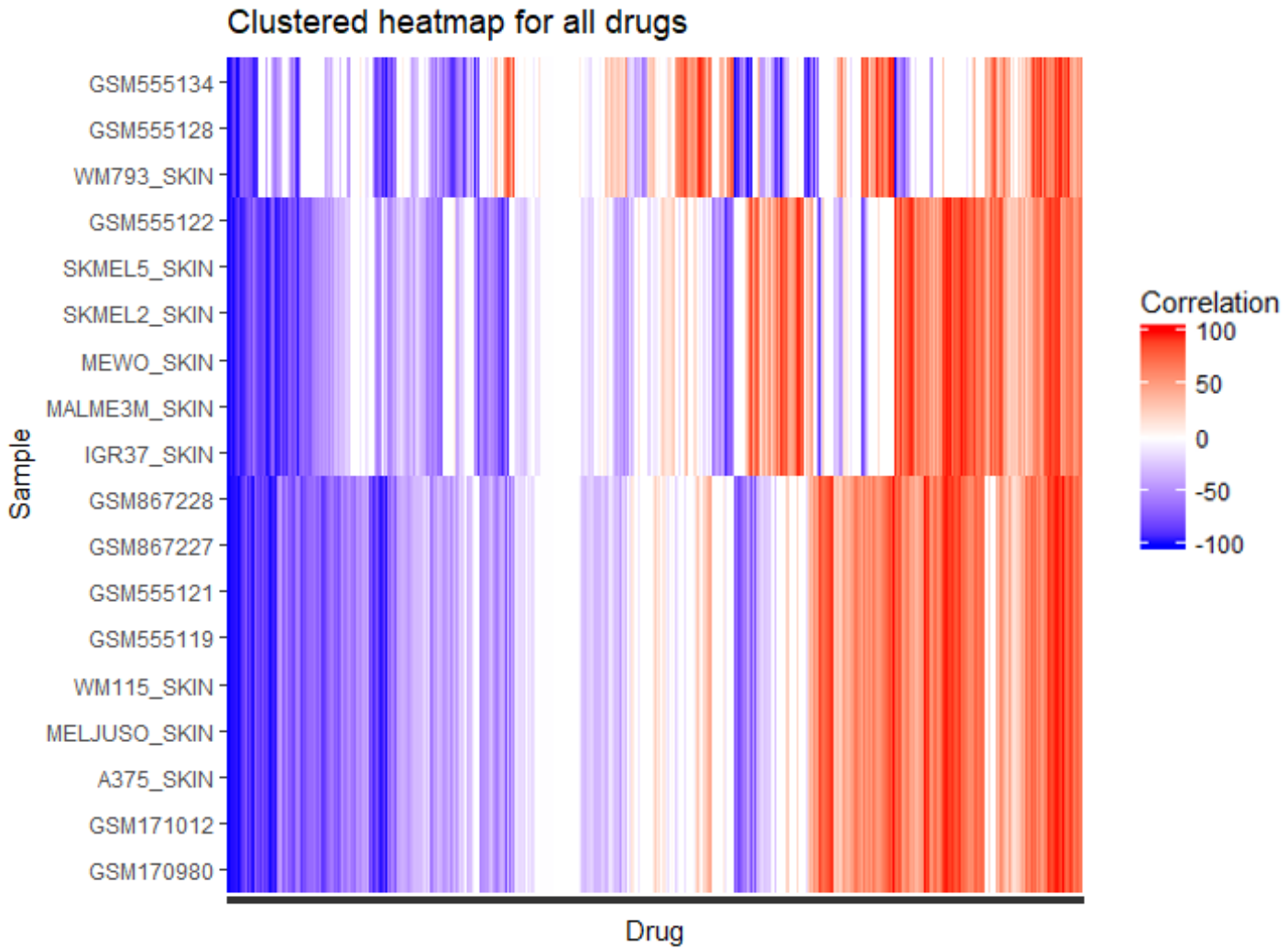
$$\log_2 FC_g = \log_2 \frac{E(g)_{case}}{E(g)_{control}}$$

Όπου  $E(g)_{case}$  η μέση έκφραση ενός γονιδίου στο προς μελέτη δείγμα και  $E(g)_{control}$  η μέση έκφραση ενός γονιδίου στο control δείγμα. Αν η τιμή που προκύπτει είναι αρνητική, το υπό μελέτη γονίδιο είναι υπό-εκφρασμένο, ενώ αν είναι θετική υπέρ-εκφρασμένο.

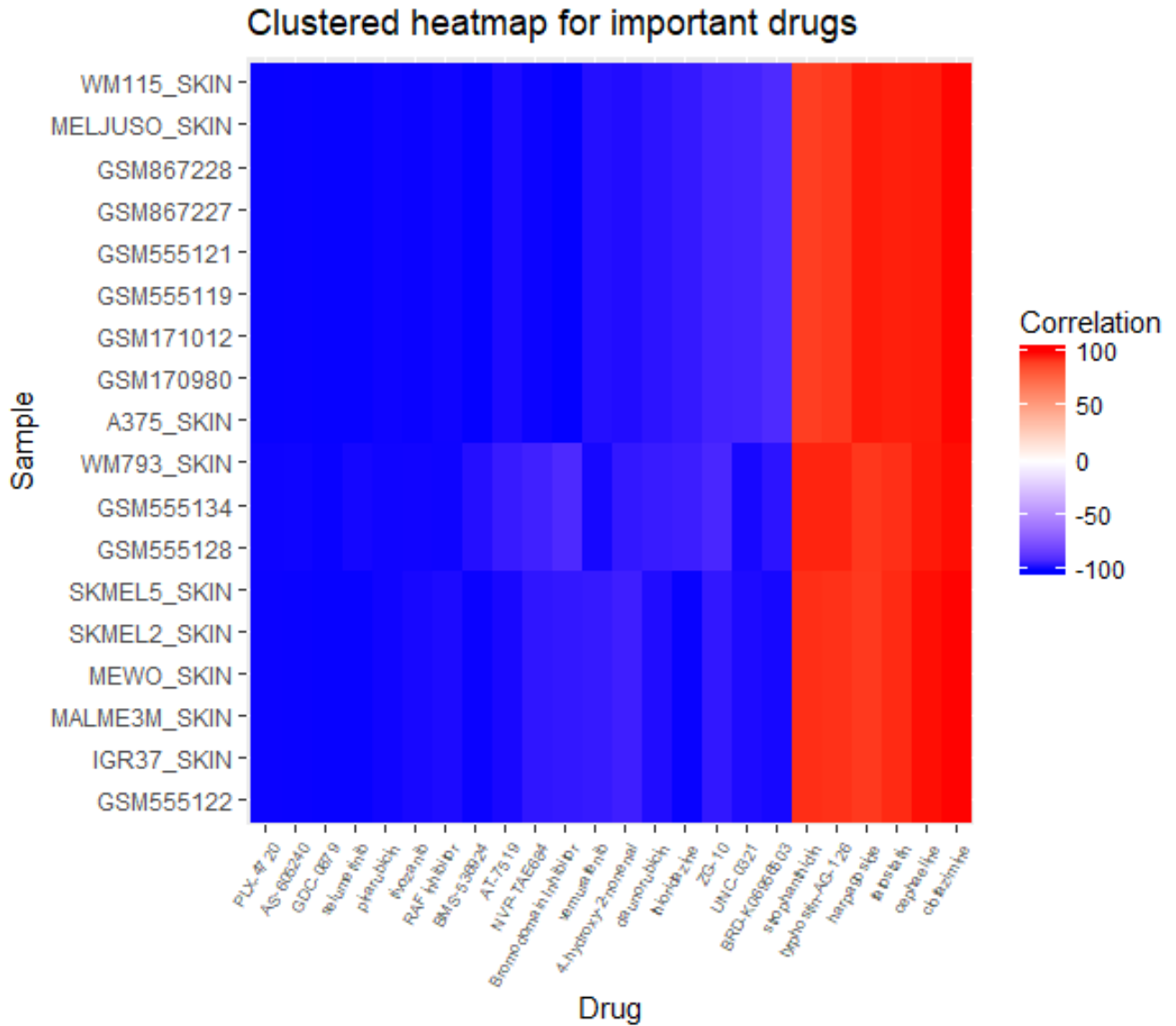
Οι δύο κατηγορίες έκφρασης (υπό- και υπέρ-) γονιδίων στοιχίζονται ανάλογα με το p-value τους και τα 150 πρώτα γονίδια αποθηκεύονται. Το Broad Institute προτείνει να εισάγονται στο cMap έως 150 διαφορεικές εκφράσεις γονιδίων ώστε να υπάρχει αξιοπιστία στα αποτελέσματα. Το cMap στηρίζει την ανάλυση του μόνο στην κυτταρική σειρά A-375 μιας και μόνο γι' αυτή υπάρχουν πειραματικά δεδομένα βάση δεδομένων του cMap. Από τα αποτελέσματα του cMap κρατούνται οι ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν συντελεστή συσχέτισης με τη γονιδιακή έκφραση των δειγμάτων τουλάχιστον -95%, ο λόγος για το οποίο εξηγήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Γίνονται επιπλέον αναζητήσεις στη βάση δεδομένων του cMap σύμφωνα με το γονιδιακό προφίλ της κάθε μιας από τις 3 ομάδες στις οποίες ομαδοποιήσαμε προηγουμένως τις κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου.

Οι ουσίες που προκύπτουν από την ανάλυση παρουσιάζονται στους πίνακες του παραρτήματος, οι οποίες είναι παρούσες στις αναλύσεις και των τριών ομάδων που δημιουργήθηκαν από την ανάλυση. Τα αποτελέσματα φαίνονται αρκετά έμπιστα, αφού πρώτη σε κάθε ανάλυση εμφανίζεται με σκορ σχεδόν -100 η κατηγορία των αναστολέων RAF. Όπως αναλύσαμε στο κεφάλαιο 1.6.4.1 οι περισσότερες περιπτώσεις κακοήθους μελανώματος υποθάλπτουν μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο, υπερεκφράζοντας το και οδηγώντας σε υπερέκφραση του μονοπατιού MAPK, επάγοντας την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης βλέπουμε και την παρουσία αναστολέων των MAP κινασών, όπως το Selumetinib, το οποίο αναστέλλει τη δράση των MAPK1/2. Τέλος παρατηρούνται και αναστολείς του PI3K όπως το AS605240. Οι λειτουργίες των παραπάνω μορίων-στόχων και των επιπτώσεων που έχουν στα διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 1.4.

Παρακάτω ακολουθούν οι απεικονίσεις των αποτελεσμάτων του cMap μετά από ιεραρχική ομαδοποίηση των κυτταροσειρών του εργαστηρίου και των ουσιών που πρότεινε το πρόγραμμα, με βάση τον πίνακα που περιέχει τους συντελεστές συσχέτισης μεταξύ του δείγματος (γραμμές) και της ουσίας (στήλες).



Εικόνα 11: Τα αποτελέσματα του cMap για όλες τις ουσίες που περιλαμβάνει, απεικονισμένα σε θερμικό χάρτη.



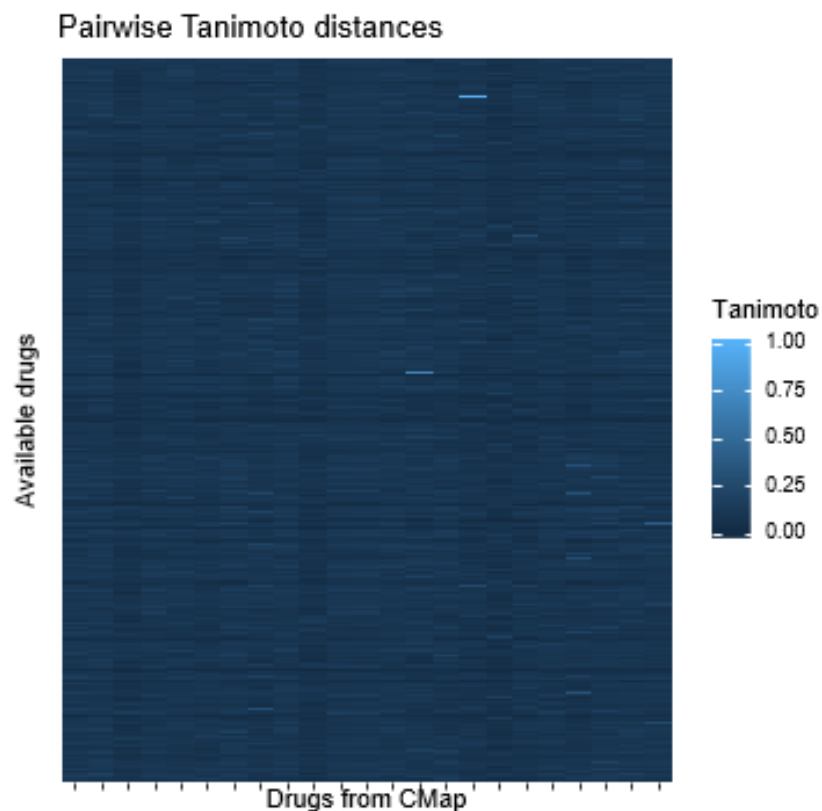
Εικόνα 12: Τα αποτελέσματα του cMap τα οποία περιλαμβάνουν ουσίες με απόλυτο συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο του 90.

Ακολουθεί η λίστα με τις ουσίες που αντιστρέφουν τη γονιδιακή έκφραση των κυτταρικών σειρών μελανώματος και στις 3 ομάδες που προέκυψαν από την ομαδοποίηση:

Name	Description	Target	Mean Score
GDC-0879	RAF inhibitor	BRAF	-99.70666667
PLX-4720	RAF inhibitor	BRAF, KDR, PIK3CA	-99.58
AS-605240	Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor	PI3K inhibitor, MAOB, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG	-99.56
selumetinib	MEK inhibitor	MAP kinase inhibitor, MAP2K1, MAP2K2	-99.51
pirarubicin	topoisomerase inhibitor	TOP2A	-99.40333333
tivozanib	VEGFR inhibitor	KIT inhibitor, tyrosine kinase inhibitor, FTL1, FTL4, KDR, KIT, PDGFRA, PDGFRB	-99.28
BMS-536924	insulin growth factor receptor inhibitor	insulin receptor ligand, IGF1R, AKT1, CCNE1, CDK2, CYP3A4, ERBB2, INSR, KDR, LCK, MAPK1, MET, PDGFRA, PDGFRB	-99.05
tozasertib	Aurora kinase inhibitor	Bcr-Abl kinase inhibitor, FLT3 inhibitor, JAK inhibitor, Abl kinase inhibitor, mitotic inhibitor, AURKA, AURKB, ABL1, AURKC, BCR, FLT3, JAK2, DDR2, LCK	-98.97
GW-5074	RAF inhibitor	leucine rich repeat kinase inhibitor, LRRK1, LRRK2, NTRK1, RAF1	-98.01333333
daunorubicin	RNA synthesis inhibitor	topoisomerase inhibitor, DNA synthesis inhibitor, radical formation stimulant, TOP2A, TOP2B	-97.75666667
AT-7519	CDK inhibitor	cell cycle inhibitor, CDK2, CDK5, CDK1, CDK4, CDK6, CDK9	-97.46666667
vemurafenib	RAF inhibitor	protein kinase inhibitor, BRAF, CYP2C19, CYP3A4, RAF1	-97.35333333
simvastatin	HMGCR inhibitor	HMGCR, CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, ITGB2	-97.29

Πίνακας 3: Ουσίες που αντιστρέφουν την γονιδιακή έκφραση και των τριών ομάδων κυτταρικών σειρών μελανώματος.

Ακολούθησε η ανάλυση Tanimoto για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων του cMap με τις ουσίες που περιέχονται στη LOPAC. Ο χάρτης θερμότητας (heatmap) αντιπροσωπεύει όλα τα  $c_{Tanimoto}$  μεταξύ των πιθανών ζευγών ουσιών καταλήγοντας τελικά στη λίστα με τα 5 φάρμακα που ταυτοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες:



Εικόνα 13: Θερμικός χάρτης της απόστασης Tanimoto μεταξύ των προτεινόμενων ουσιών του CMap και των διαθέσιμων ουσιών στη LOPAC.

Compound Name	Target
AS605240	PI 3-kinase $\gamma$ (PI 3-K $\gamma$ ) inhibitor
GW5074	c-Raf1 kinase inhibitor
U0126	Inhibitor of both MEK1 and MEK2
Thioridazine hydrochloride	Dopamine antagonist (antipsychotic)
Tamoxifen	Estrogen receptor antagonist

Πίνακας 4: Τελικός πίνακας με τις φαρμακολογικά ενεργές ουσίες της LOPAC που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας.

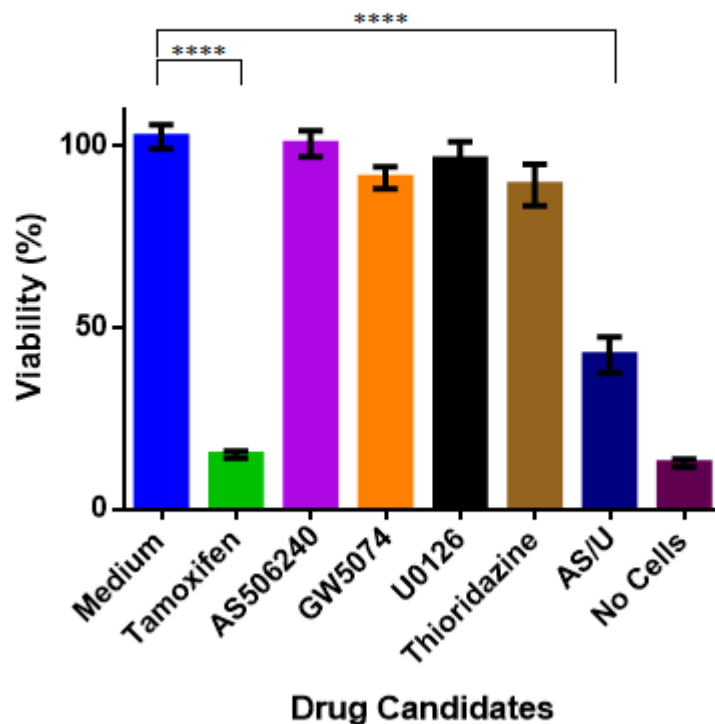


## 4.2.Κυτταρική Βιωσιμότητα

Για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα της υπολογιστικής ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις κυτταρικής βιωσιμότητας κατά την έκθεση αντιπροσώπων της καθεμίας από τις 3 ομάδες μελανωματικών καρκινικών σειρών που δημιούργησε η υπολογιστική ανάλυση, στις ουσίες που προέκυψαν από τα αποτελέσματα του cMap.

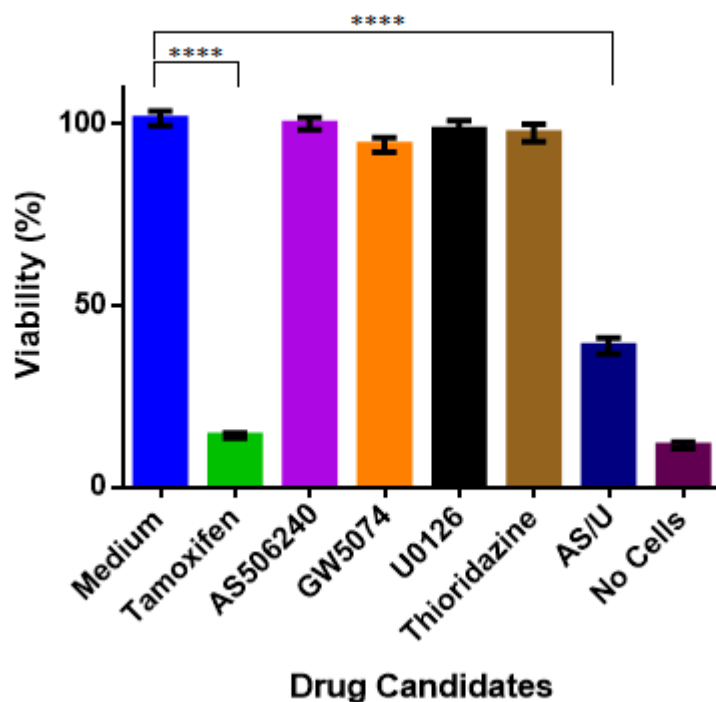
Η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων της μεθόδου Resazurin για τη μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας (cell viability) έγιναν με τη χρήση της μεθόδου two-way ANOVA, ανάλυση διακύμανσης κατά 2 παράγοντες. Μετά από κανονικοποίηση, τα τελικά αποτελέσματα για κάθε κυτταρική σειρά φαίνονται παρακάτω. Ως βάση αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 0.1% DMSO, αφού αυτός ήταν και ο διαλύτης των φαρμάκων υπό εξέταση:

### MEWO Viability Scores compared to DMSO (<50% works)



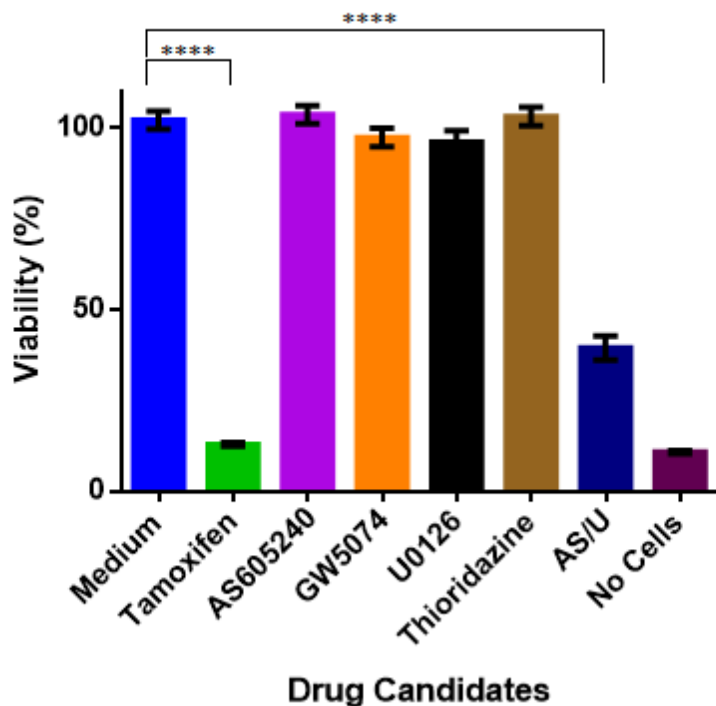
Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά MEWO μετά από έκθεση στα επαναστοχευμένα φάρμακα.

## MEL-JUSO Viability Scores compared to DMSO (<50% works)



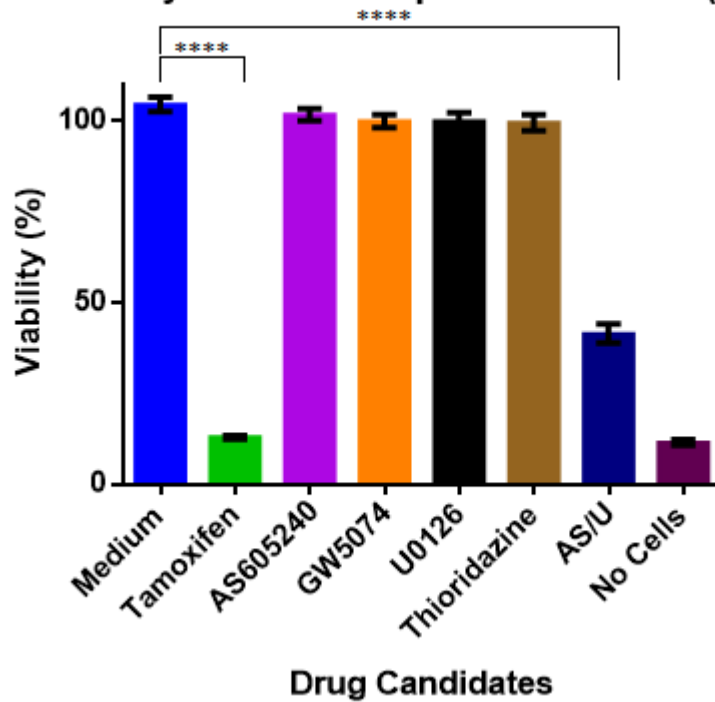
Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά MEL-JUSO μετά από έκθεση στα επαναστοχευμένα φάρμακα.

## A375 Viability Scores compared to DMSO (<50% works)



Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά A375 μετά από έκθεση στα επαναστοχευμένα φάρμακα.

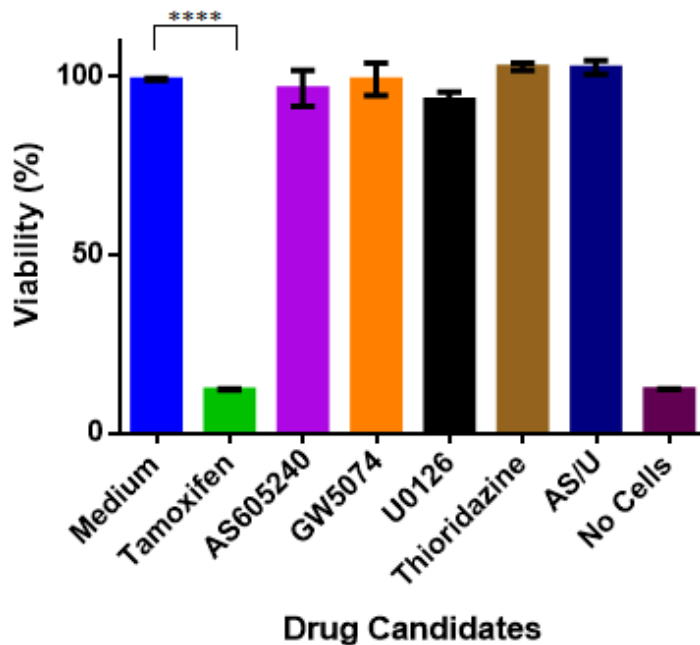
### WM115 Viability Scores compared to DMSO (<50% works)



Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά WM115 μετά από έκθεση στα επαναστοχευμένα φάρμακα.

Για περαιτέρω επιβεβαίωση της ειδικότητας των παραπάνω αποτελεσμάτων, τα φάρμακα δοκιμάστηκαν και στην μη μελανωματική κυτταρική σειρά HELA, η οποία είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά ανθρωπίνων αθανατοποιημένων κυττάρων.

### HELA Viability Scores compared to DMSO (<50% works)



Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά HELA μετά από έκθεση στα επαναστοχευμένα φάρμακα.

## 5. Συμπεράσματα

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς στο πρώτο κεφάλαιο, το κακοήθες μελάνωμα είναι ένας από τους πιο πολυπαραγοντικούς τύπους καρκίνου, του οποίου τα ποσοστά εμφάνισης στον πληθυσμό ολοένα και αυξάνονται. Οι υπάρχουσες θεραπείες αδυνατούν να καλύψουν όλους τους νέους μοριακούς στόχους που συνεχώς ταυτοποιούνται, ενώ το κόστος *de novo* ανακάλυψης νέων φαρμάκων ολοένα και αυξάνεται.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκε ένας τρόπος χρήσης του τεράστιου όγκου δεδομένων τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα στο διαδίκτυο σχετικά με το γονιδιακό προφίλ του κακοήθους μελανώματος. Δεδομένα διαφορικής έκφρασης γονιδίων στο μελάνωμα χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση πιθανών ουσιών που να την αντιστρέφουν με τη χρήση του cMap.

Παράλληλα, κυτταρικές σειρές μελανώματος κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με το γονιδιακό τους προφίλ έκφρασης και σε αντιπρόσωπους από τις κατηγορίες που δημιουργήθηκαν έγινε δοκιμή των ουσιών που ταυτοποιήθηκαν και μέτρηση της επιρροής τους στην κυτταρική βιωσιμότητα.

Από τα αποτελέσματα είναι προφανές ότι ενώ το cMap θεωρητικά έχει κάνει σωστές προβλέψεις, τα εργαστηριακά αποτελέσματα δεν συμφωνούν. Ουσίες όπως το AS605240 το οποίο είναι αναστολέας της PI3-Κινάσης γ ή το U0126 το οποίο αναστέλλει το MEK1/2 θεωρητικά θα έπρεπε να λειτουργήσουν ατομικά. Η μόνη ουσία που παρατηρούμε να παρουσιάζει σημαντική μεταβολή της βιωσιμότητας είναι το Tamoxifen, το οποίο είναι μια από τις ισχυρότερες θεραπείες που χορηγείται στον καρκίνο του στήθους, παρόλα αυτά δε φαίνεται να παρουσιάζει ειδικότητα ως προς τον τύπο του καρκίνου.

Ελπιδοφόρος όμως φαίνεται να είναι ο συνδυασμός των AS605240 και U0126. Η ταυτόχρονη αναστολή κρίσιμων μορίων που συμμετέχουν σε δυο από τα βασικότερα μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης του κακοήθους μελανώματος φαίνεται να επηρεάζει την βιωσιμότητα των κυττάρων του σε σημαντικό ποσοστό, χωρίς να επηρεάζει μη μελανωματικά κύτταρα.

Ολοκληρώνοντας, μπορούμε να πούμε με ασφάλεια πως η συγκεκριμένη προσέγγιση στην επαναστόχευση φαρμάκων που εφαρμόστηκε εδώ δείχνει αρκετά ελπιδοφόρα. Γενικότερα, η επαναστόχευση φαρμάκων με χρήση γονιδιακών υπογραφών μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο στο συνεχόμενο αγώνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων σε σοβαρές ασθένειες, όπως το κακοήθες μελάνωμα.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Slominski, A., et al., *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1155-228.
2. Ali, Z., N. Yousaf, and J. Larkin, *Melanoma epidemiology, biology and prognosis*. *EJC Suppl*, 2013. **11**(2): p. 81-91.
3. Chang, A.E., L.H. Karnell, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade*. *The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society*. *Cancer*, 1998. **83**(8): p. 1664-78.
4. Jiang, A.J., P.V. Rambhatla, and M.J. Eide, *Socioeconomic and lifestyle factors and melanoma: a systematic review*. *Br J Dermatol*, 2015. **172**(4): p. 885-915.
5. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
6. Forsea, A.M., et al., *Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities*. *Br J Dermatol*, 2012. **167**(5): p. 1124-30.
7. Rastrelli, M., et al., *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. *In Vivo*, 2014. **28**(6): p. 1005-11.
8. Elwood, J.M. and J. Jopson, *Melanoma and sun exposure: an overview of published studies*. *Int J Cancer*, 1997. **73**(2): p. 198-203.
9. Tripp, M.K., et al., *Correlates of Sun Protection and Sunburn in Children of Melanoma Survivors*. *Am J Prev Med*, 2016. **51**(3): p. e77-85.
10. Lin, J.Y. and D.E. Fisher, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. *Nature*, 2007. **445**(7130): p. 843-50.
11. Hussussian, C.J., et al., *Germline p16 mutations in familial melanoma*. *Nat Genet*, 1994. **8**(1): p. 15-21.
12. de Snoo, F.A. and N.K. Hayward, *Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes*. *Cancer Lett*, 2005. **230**(2): p. 153-86.
13. Nikolaou, V., et al., *Comprehensive mutational analysis of CDKN2A and CDK4 in Greek patients with cutaneous melanoma*. *Br J Dermatol*, 2011. **165**(6): p. 1219-22.
14. Puntervoll, H.E., et al., *Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants*. *J Med Genet*, 2013. **50**(4): p. 264-70.
15. Carbone, M., et al., *BAP1 and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(3): p. 153-9.
16. Yokoyama, S., et al., *A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma*. *Nature*, 2011. **480**(7375): p. 99-103.
17. Cronin, J.C., et al., *Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009. **22**(4): p. 435-44.
18. Horn, S., et al., *TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma*. *Science*, 2013. **339**(6122): p. 959-61.
19. Aoude, L.G., et al., *Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015. **28**(2): p. 148-60.

20. Munoz-Couselo, E., et al., *NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect*. *Onco Targets Ther*, 2017. **10**: p. 3941-3947.
21. Sears, R., et al., *Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability*. *Genes Dev*, 2000. **14**(19): p. 2501-14.
22. Duronio, R.J. and Y. Xiong, *Signaling pathways that control cell proliferation*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(3): p. a008904.
23. Murphy, L.O., et al., *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(8): p. 556-64.
24. Fingar, D.C., et al., *mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(1): p. 200-16.
25. Cagnol, S. and J.C. Chambard, *ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence*. *FEBS J*, 2010. **277**(1): p. 2-21.
26. Ward, P.S. and C.B. Thompson, *Signaling in control of cell growth and metabolism*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(7): p. a006783.
27. Plas, D.R. and C.B. Thompson, *Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7435-42.
28. Ying, H., et al., *Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism*. *Cell*, 2012. **149**(3): p. 656-70.
29. Sumimoto, H., et al., *The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1651-6.
30. Sebolt-Leopold, J.S. and R. Herrera, *Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(12): p. 937-47.
31. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 142-9.
32. Nebreda, A.R. and A. Porras, *p38 MAP kinases: beyond the stress response*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(6): p. 257-60.
33. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(8): p. 537-49.
34. Karin, M. and E. Gallagher, *From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(4-5): p. 283-95.
35. Cuenda, A. and S. Rousseau, *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(8): p. 1358-75.
36. Sabapathy, K., et al., *Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation*. *Mol Cell*, 2004. **15**(5): p. 713-25.
37. Ventura, J.J., et al., *Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK*. *Mol Cell*, 2006. **21**(5): p. 701-10.
38. Ambrosino, C. and A.R. Nebreda, *Cell cycle regulation by p38 MAP kinases*. *Biol Cell*, 2001. **93**(1-2): p. 47-51.
39. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(11): p. 834-46.
40. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation*. *Science*, 2008. **320**(5876): p. 667-70.
41. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-44.

42. Del Prete, A., et al., *Molecular pathways in cancer-related inflammation*. Biochem Med (Zagreb), 2011. **21**(3): p. 264-75.
43. Kumar, S., J. Boehm, and J.C. Lee, *p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(9): p. 717-26.
44. Del Barco Barrantes, I., et al., *Regulation of Mammary Luminal Cell Fate and Tumorigenesis by p38alpha*. Stem Cell Reports, 2018. **10**(1): p. 257-271.
45. Psaty, E.L. and A.C. Halpern, *Current and emerging technologies in melanoma diagnosis: the state of the art*. Clin Dermatol, 2009. **27**(1): p. 35-45.
46. Slue, W., A.W. Kopf, and J.K. Rivers, *Total-body photographs of dysplastic nevi*. Arch Dermatol, 1988. **124**(8): p. 1239-43.
47. Rayner, J.E., et al., *Clinical Perspective of 3D Total Body Photography for Early Detection and Screening of Melanoma*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 152.
48. Gerger, A., et al., *Diagnostic applicability of in vivo confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(3): p. 493-8.
49. Wilson, M.A. and K.L. Nathanson, *Molecular testing in melanoma*. Cancer J, 2012. **18**(2): p. 117-23.
50. Marsh, S., *Pyrosequencing applications*. Methods Mol Biol, 2007. **373**: p. 15-24.
51. Senetta, R., M. Paglierani, and D. Massi, *Fluorescence in-situ hybridization analysis for melanoma diagnosis*. Histopathology, 2012. **60**(5): p. 706-14.
52. Hossain, D., et al., *Differentiation of melanoma and benign nevi by fluorescence in-situ hybridization*. Melanoma Res, 2011. **21**(5): p. 426-30.
53. Wei, X., et al., *Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma*. Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 442-6.
54. Batus, M., et al., *Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions*. Am J Clin Dermatol, 2013. **14**(3): p. 179-94.
55. Wilson, M.A. and L.M. Schuchter, *Chemotherapy for Melanoma*. Cancer Treat Res, 2016. **167**: p. 209-29.
56. Kim, C., et al., *Long-term survival in patients with metastatic melanoma treated with DTIC or temozolomide*. Oncologist, 2010. **15**(7): p. 765-71.
57. Middleton, M.R., et al., *Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 158-66.
58. Hahn, A.W., et al., *The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4*. Immunotherapy, 2017. **9**(8): p. 681-692.
59. Sanlorenzo, M., et al., *Role of interferon in melanoma: old hopes and new perspectives*. Expert Opin Biol Ther, 2017. **17**(4): p. 475-483.
60. Rafique, I., J.M. Kirkwood, and A.A. Tarhini, *Immune checkpoint blockade and interferon-alpha in melanoma*. Semin Oncol, 2015. **42**(3): p. 436-47.
61. Bright, R., et al., *Clinical Response Rates From Interleukin-2 Therapy for Metastatic Melanoma Over 30 Years' Experience: A Meta-Analysis of 3312 Patients*. J Immunother, 2017. **40**(1): p. 21-30.

62. Ribas, A., et al., *Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(1): p. 390-9.
63. Flaherty, K.T., *Targeting metastatic melanoma*. Annu Rev Med, 2012. **63**: p. 171-83.
64. Brose, M.S., et al., *BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6997-7000.
65. Livingstone, E., et al., *BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: adverse events and their management*. Chin Clin Oncol, 2014. **3**(3): p. 29.
66. Flaherty, K.T., et al., *Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 107-14.
67. Niezgoda, A., P. Niezgoda, and R. Czajkowski, *Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 851387.
68. Mullard, A., *2018 FDA drug approvals*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(2): p. 85-89.
69. Ashburn, T.T. and K.B. Thor, *Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(8): p. 673-83.
70. Wang, Y., X.S. Zhang, and L. Chen, *Modelling biological systems from molecules to dynamical networks*. BMC Syst Biol, 2012. **6 Suppl 1**: p. S1.
71. Zhang, T.T., et al., *Network-based drug repositioning: A novel strategy for discovering potential antidepressants and their mode of action*. Eur Neuropsychopharmacol, 2018. **28**(10): p. 1137-1150.
72. Lamb, J., et al., *The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1929-35.
73. Rogers, D. and M. Hahn, *Extended-connectivity fingerprints*. J Chem Inf Model, 2010. **50**(5): p. 742-54.



## 7. Παράρτημα

### Πιθανές ουσίες προς επαναστόχευση για την ομάδα κυτταρικών σειρών 1

name	description	target	belongs to	median score	Score	Case studied	cell line
tivozanib	VEGFR inhibitor, KIT inhibitor, tyrosine kinase inhibitor	FLT1, FLT4, KDR, KIT, PDGFRA, PDGFRB	PDGFR/KIT inhibitor, VEGFR inhibitor	-93.77	-99.6	Cluster 1	A375
tozasertib	Aurora kinase inhibitor, Bcr-Abl kinase inhibitor, FLT3 inhibitor, JAK inhibitor, Abl kinase inhibitor, mitotic inhibitor	AURKA, AURKB, ABL1, AURKC, BCR, FLT3, JAK2, DDR2, LCK		-96.63	-99.58	Cluster 1	A375
aminopurvalanol-a	CDK inhibitor, tyrosine kinase inhibitor	CDK1, CDK2, CDK5, CDK6	CDK inhibitor	-87.58	-99.49	Cluster 1	A375
lobelanidine	acetylcholine receptor antagonist, dopamine receptor modulator, opioid receptor antagonist, vesicular monoamine transporter ligand	SLC18A2, CHRNA10, CHRNA4, CHRNA9, CHRNB2, OPRM1		0	-98.27	Cluster 1	A375
pidorubicine	topoisomerase inhibitor, DNA intercalating drug	TOP2A	Topoisomerase inhibitor	-92.33	-98.02	Cluster 1	A375
latrunculin-b	actin destabilizer, unidentified pharmacological activity	ACTA1, MKL1, SPIRE2		-82.9	-97.68	Cluster 1	A375
benzatropine	anticholinergic	CHRM1, HRH1, SLC6A3		-45.41	-96.53	Cluster 1	A375
wiskostatin	neural Wiskott-Aldrich syndrome protein inhibitor	WAS, WASL		-89.88	-96.04	Cluster 1	A375

### Πιθανές ουσίες προς επαναστόχευση για την ομάδα κυτταρικών σειρών 2

name	description	target	belongs to	median score	Score	Case studied	cell line
sirolimus	mTOR inhibitor, CCR expression inhibitor, cell cycle inhibitor, proteasome inhibitor, protein kinase inhibitor, T cell inhibitor	MTOR, FKBP1A, CCR5, FGF2		-79	-99.04	Cluster 2	A375
tivozanib	VEGFR inhibitor, KIT inhibitor, tyrosine kinase inhibitor	FLT1, FLT4, KDR, KIT, PDGFRA, PDGFRB	PDGFR/KIT inhibitor, VEGFR inhibitor	-93.77	-98.9	Cluster 2	A375
andarine	androgen receptor modulator	AR	Androgen receptor modulator	0	-98.75	Cluster 2	A375
niguldipine	adrenergic receptor antagonist, calcium channel blocker, calcium channel antagonist, calcium channel inhibitor	ADRA1A, CACNA1C, ADRA1B, ADRA1D		-78.2	-98.17	Cluster 2	A375
alimemazine	histamine receptor ligand	HRH1		-72.76	-98.01	Cluster 2	A375
pseudopelletierine	stimulant reflex trigger used as an anthelmintic and anti-amoeboid			12.29	-97.56	Cluster 2	A375
fluocinolone	corticosteroid agonist, glucocorticoid receptor agonist	NR3C1, SERPINA6		-49.43	-97.52	Cluster 2	A375

name	description	target	belongs to	median score	Score	Case studied	cell line
sirolimus	mTOR inhibitor, CCR expression inhibitor, cell cycle inhibitor, proteasome inhibitor, protein kinase inhibitor, T cell inhibitor	MTOR, FKBP1A, CCR5, FGF2		-79	-99.04	Cluster 2	A375
tivozanib	VEGFR inhibitor, KIT inhibitor, tyrosine kinase inhibitor	FLT1, FLT4, KDR, KIT, PDGFRA, PDGFRB	PDGFR/KIT inhibitor, VEGFR inhibitor	-93.77	-98.9	Cluster 2	A375
andarine	androgen receptor modulator	AR	Androgen receptor modulator	0	-98.75	Cluster 2	A375
niguldipine	adrenergic receptor antagonist, calcium channel blocker, calcium channel antagonist, calcium channel inhibitor	ADRA1A, CACNA1C, ADRA1B, ADRA1D		-78.2	-98.17	Cluster 2	A375
alimemazine	histamine receptor ligand	HRH1		-72.76	-98.01	Cluster 2	A375
pseudopelletierine	stimulant reflex trigger used as an anthelmintic and anti-amoeboid			12.29	-97.56	Cluster 2	A375
fluocinolone	corticosteroid agonist, glucocorticoid receptor agonist	NR3C1, SERPINA6		-49.43	-97.52	Cluster 2	A375

### Πιθανές ουσίες για την ομάδα κυτταρικών σειρών 3

name	description	target	belongs to	median score	Score	Case studied	cell line
cimaterol	adrenergic receptor agonist		Beta-adrenergic receptor agonist	23.05	-99.62	Cluster 3	A375
benzatropine	anticholinergic	CHRM1, HRH1, SLC6A3		-45.41	-99.39	Cluster 3	A375
tivozanib	VEGFR inhibitor, KIT inhibitor, tyrosine kinase inhibitor	FLT1, FLT4, KDR, KIT, PDGFRA, PDGFRB	PDGFR/KIT inhibitor, VEGFR inhibitor	-93.77	-99.34	Cluster 3	A375
niguldipine	adrenergic receptor antagonist, calcium channel blocker, calcium channel antagonist, calcium channel inhibitor	ADRA1A, CACNA1C, ADRA1B, ADRA1D		-78.2	-98.82	Cluster 3	A375
etazolate	phosphodiesterase inhibitor, alpha secretase activator, GABA receptor modulator	GABRB3, PDE4A		0	-97.65	Cluster 3	A375
levocabastine	histamine receptor antagonist	HRH1, NTSR2		1.09	-97.61	Cluster 3	A375
nitrocaramiphen	acetylcholine receptor antagonist			23	-97.35	Cluster 3	A375
sinensetin	cyclooxygenase inhibitor			-8.91	-96.66	Cluster 3	A375
salbutamol	adrenergic receptor agonist	ADRB2, ADRB1		-26.77	-96.65	Cluster 3	A375
econazole	cell wall synthesis inhibitor, lanosterol demethylase inhibitor, sterol demethylase inhibitor	CYP51A1, NPY1R, NPY2R, TRPM2, TRPV5	Sterol demethylase inhibitor	-24.29	-93.73	Cluster 3	A375
fluorometholone	corticosteroid agonist, glucocorticoid receptor agonist	NR3C1	Glucocorticoid receptor agonist	-51.16	-92.97	Cluster 3	A375