

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL SANNIO

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Corso di Laurea in Biotecnologie

Tesi di Laurea in
Bioinformatica

Glioblastoma: Metodi computazionali per la ricerca di una terapia differenziativa

Relatore:

Prof.
Francesco Napolitano

Candidato:

Francesco Saccomando Ciaramella
Matr. 171002821

Anno accademico:

2022/2023

Please: Do everything you possibly can in one lifetime.

- Kanye West

Alle mie ambizioni.

Indice

Introduzione	1
1 Contesto biologico	3
1.1 Encefalo	3
1.1.1 Barriera Ematoencefalica	4
1.1.2 Microanatomia	4
1.2 Glioblastoma Multiforme	5
1.2.1 Patogenesi	5
1.2.2 Sintomi	6
1.3 Cellule staminali neoplastiche del cervello (BTSC)	6
1.4 Terapie Standard	7
1.5 Terapie Sperimentali	8
2 Trascrittomica e cancro	9
2.1 Trascrittomica	10
2.1.1 Microarray	11
2.1.2 RNAseq	11
2.1.3 Bulk e Single Cell	12
2.2 Drug Discovery e trascrittoma	13
2.3 Trascrittomica per la Drug Discovery contro il cancro	14
2.4 Drug Discovery basato su trascrittomica in Glioblastoma	15
2.5 LINCS	16
2.5.1 L1000	17
3 revDECCODE	24
3.1 Dataset	25
3.1.1 MSigDB	25
3.1.2 Castellan et al.	26
3.1.3 LINCS	27
3.2 Gep2pep	28
3.3 revDECCODE	28
3.4 Risultati	29
3.5 Analisi dei Risultati	30
3.5.1 BMS-777607	32

3.5.2	UNC-669	33
3.5.3	dabrafenib	33
3.5.4	motesanib	34
3.5.5	Y-27632	34
3.5.6	decitabine	35
3.5.7	ibrutinib	35
3.5.8	NVP-AUY922	36
3.5.9	MC1568	36
Conclusioni		37
Bibliografia		39

Introduzione

La Bioinformatica ha recentemente guadagnato un ruolo di crescente importanza nello studio dei meccanismi molecolari alla base delle diverse forme di cancro grazie a test molecolari ad alto rendimento ed a strategie di data mining specifiche [1], e nella drug discovery di possibili terapie farmacologiche per gli stessi, grazie all'esplosione dei dati omici e della multi-omica [2]. A tal proposito sono state fondamentali le analisi genomiche e trascrittomiche che hanno caratterizzato molecularmente i singoli genomi tumorali ed hanno quindi rivelato i bersagli molecolari su cui poter agire per impedire differenziazione e proliferazione [3]. In tale contesto, parte della ricerca è stata focalizzata su tipologie di tumori di difficile trattamento, come ad esempio il Glioblastoma Multiforme (GBM), il tumore più comune e maligno tra quelli che colpiscono la glia. Tale neoplasia ha leggera predominanza nel sesso maschile rispetto a quello femminile [1.5:1], elevata eterogeneità (sottotipi) ed alta probabilità di recidiva, per tali motivi la prognosi è molto spesso infausta: i trattamenti standard quali chirurgia coadiuvata da radioterapia e temozolomide permettono una sopravvivenza media inferiore ai 2 anni [4]. Importante anche il contributo del Machine Learning (ML) per l'approccio multidimensionale che ha apportato nello studio della patogenesi del GBM: analizzando datasets di grandi dimensioni sono stati raggiunti risultati positivi nella classificazione e predizione del GBM [5]. La drug discovery ha quindi beneficiato di tali progressi nelle omiche ma anche dei progressi nel ML e nelle Intelligenze Artificiali (AI). Proprio grazie a ML e ad AI, si è arrivati alla Computer-aided drug discovery (CADD) che è divenuta in poco tempo metodica indispensabile per lo sviluppo di nuove terapie, basate sia sulla struttura (Structure-based) del bersaglio che sul ligando (Ligand-based) che vengono ottenute tramite cristallografia a raggi X o NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) [6]. La drug discovery applicata a patologie che colpiscono il sistema nervoso centrale (SNC) come il GBM, deve però tener conto di problematiche non presenti in altri tessuti: la Barriera Ematoencefalica (BEE) che protegge il SNC dalle sostanze nocive presenti nel sangue. Diviene quindi importante proporre molecole che non vengano bloccate dalla BEE stessa e al contempo svolgano l'azione desiderata sul bersaglio molecolare scelto [7]. La problematica riguardante la BEE può anche essere risolta incapsulando le molecole in carrier creati ad-hoc, e per questo non è stata direttamente considerata nella ricerca

dei profili di differenziamento. L'obiettivo di questa tesi è quello di ricercare piccole molecole in grado di promuovere il differenziamento delle Glioblastoma Stem Cells (GSC) sulla base dei profili di espressione genica da essi indotti. Si tratta quindi della ricerca di potenziali molecole candidate ad avere un ruolo nel supportare i trattamenti chemioterapici standard bersagliando la riserva staminale del tumore, spesso causa di recidiva. In tale contesto si parla di "terapia differenziativa". A tal fine si propone revDECCODE, un metodo che, prendendo in input le informazioni dell'espressione genica differenziale tra le GSC e le DGC, provenienti da un precedente studio, successivamente le confronta con i dati trascrittomici presenti in LINCS L1000 [8]. Fatte queste premesse, la tesi è quindi suddivisa in tre capitoli: nel primo viene analizzato il contesto biologico in cui insorge la patologia, vengono poi esplorate le strutture cerebrali e le cellule interessate ed infine viene presentata la patologia con sintomi e cause; Il secondo capitolo è invece incentrato sulle tecnologie che permettono la quantificazione dell'espressione genica, microarray ed RNAseq con relativi workflow. Infine, nel terzo ed ultimo capitolo vengono analizzati i datasets utilizzati, la pipeline per il processamento dei dati ed il metodo revDECCODE con i risultati da esso ottenuti, con particolare attenzione alle molecole più significative. Le analisi sono state eseguite con il software R, versione 4.3.1.

Capitolo 1

Contesto biologico

Per comprendere al meglio la sfida che rappresenta lo sviluppo di terapie sperimentali per il Glioblastoma Multiforme, occorre una breve panoramica sul contesto in cui esso esordisce, sulle cellule interessate, sulla progressione della malattia, sulle zone dell'encefalo interessate e sulla sintomatologia ad esso correlata.

1.1 Encefalo

L'encefalo è la parte di SNC contenuta completamente nella scatola cranica. Anatomicamente è costituito da: cervello (diviso in telencefalo e diencefalo), tronco encefalico (costituito da mesencefalo, ponte e bulbo) e dal cervelletto. Esternamente, la corteccia cerebrale, tessuto nervoso ad alto contenuto di neuroni (materia grigia), riveste gli emisferi cerebrali destro e sinistro (telencefalo). A loro volta i due emisferi cerebrali sono suddivisi in lobi, ovvero quattro grandi sezioni che sono: lobo frontale, lobo parietale, lobo temporale e lobo occipitale (Figura 1.1). Sotto la corteccia cerebrale è presente la materia bianca sottocorticale, costituita da assoni di neuroni e cellule della neuroglia.

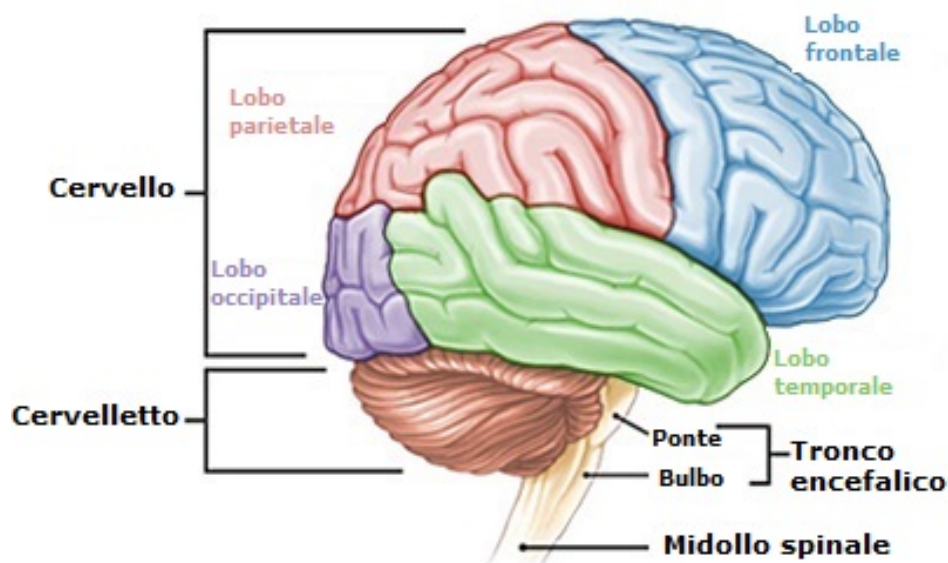


Figura 1.1: Divisione in lobi dell'encefalo. (medicinaonline.co)

1.1.1 Barriera Ematoencefalica

La Barriera Ematoencefalica (BEE) rappresenta un elemento cruciale nel proteggere il sistema nervoso centrale (SNC) dei vertebrati da sostanze dannose presenti nel sangue, sia di origine interna che esterna, garantendo così il corretto funzionamento neuronale. Questa barriera è il risultato di una complessa interazione tra le cellule endoteliali dei vasi sanguigni del SNC, i periciti, gli astrociti, i neuroni e le microglie, formando ciò che è noto con il nome di unità neurovascolare (NVU) Figura 1.2. È importante sottolineare che la funzione di barriera delle cellule endoteliali è strettamente regolata dalla via di segnalazione Wnt/beta-catenina e richiede un NVU intatto per garantire un funzionamento ottimale. La BBB e il NVU presentano una serie di specializzazioni molecolari che ne garantiscono la capacità di stretta, trasporto e risposta immunitaria [9]. La BEE rappresenta un ostacolo significativo per la somministrazione efficace di farmaci per il trattamento di malattie cerebrali, non solo per la capacità o meno delle molecola di penetrarla, ma anche per la velocità con cui essa è penetrabile dalla molecola, aspetto fondamentale per farmacodinamica e farmacocinetica [10]

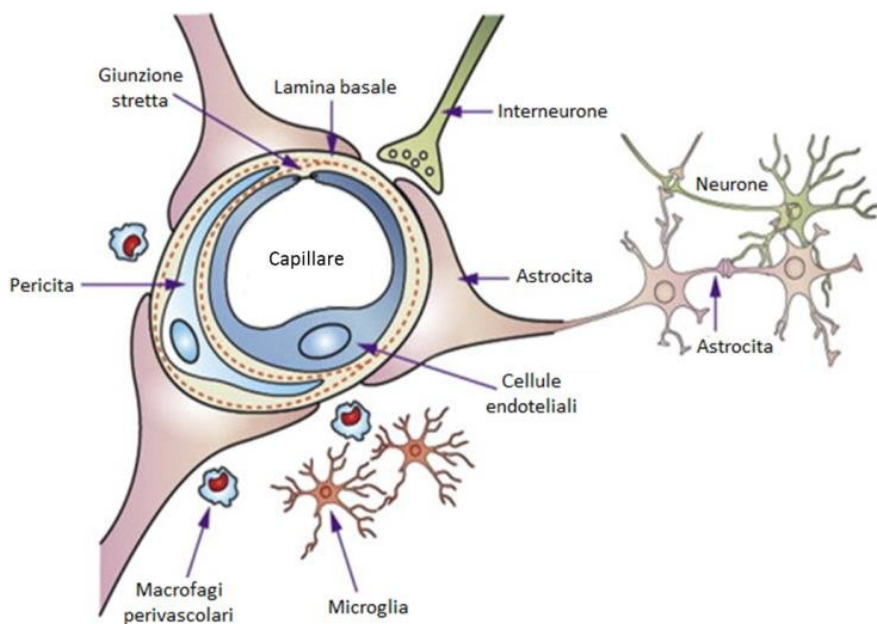


Figura 1.2: Struttura dell'unità neurovascolare (NVU). (researchgate.net)

1.1.2 Microanatomia

Le cellule che compongono il tessuto nervoso sono distinte in: neuroni, cellule gliali, cellule staminali neurali. I neuroni grazie alle loro peculiari proprietà fisiologiche e chimiche sono in grado di ricevere, elaborare, trasmettere impulsi

nervosi inibitori ed eccitatori, presentano un corpo cellulare costituito dal pirenoforo, dal corpo cellulare si dipanano prolungamenti citoplasmatici: dendriti e l'assone. Le cellule gliali sono invece costituite da astrociti, oligodendrociti, cellule endoteliali, cellule gliali radiali e microglia.

1.2 Glioblastoma Multiforme

Il Glioblastoma Multiforme (GBM) è il tumore più comune della glia (12-15% di tutte le neoplasie intracraniche), si manifesta a qualsiasi età ma più spesso negli adulti tra 45 e 70 anni e colpisce preferibilmente il sesso maschile [11], i casi pediatrici sono rari e rappresentano l'8.8% del totale. Tale tumore si presenta più spesso nella materia subcorticale degli emisferi del cervello, infatti i siti più colpiti sono: lobo temporale (31%), lobo parietale (24%), lobo frontale (23%) e lobo occipitale (16%). Viene distinto in "primario" se la neoplasia si presenta de novo e non deriva da precedenti tumori (95% dei casi), mentre è detto "secondario" se evolve da astrocitoma diffuso o astrocitoma anaplastico (5% dei casi).

1.2.1 Patogenesi

I tumori si formano per crescita anormale e sregolata di cellule, queste condizioni si verificano per via di alterazioni genetiche che a loro volta causano l'attivazione di fattori oncogeni e/o contemporaneamente disattivazione di oncosoppressori. Per il GBM la sequenza di alterazioni è la seguente:

Oncogeni attivati

1. EGF/R (Epidermal Growth Factor/Receptor, fattore di crescita dell'epidermide);
2. MDM2 (Oncoproteina Mouse Double Minute 2);
3. PDGF/R (Platelet-Derived Growth Factor/Receptor, fattore di crescita derivato dalle piastrine).

Oncosoppressori disattivati

1. 10p, 10q, 19q (cromosomi);
2. DCC (Deleted in Colorectal Cancer tumor suppressor gene, Gene con delezione nel cancro del colon-retto);
3. p16 (Tumor suppressor gene/protein, Antigene tumorale cellulare);
4. TP53 (Tumor suppressor gene/protein, Antigene tumorale cellulare);
5. PTEN (Phosphatase and TENsin homolog);

6. RB (RetinoBlastoma tumor suppressor gene).

1.2.2 Sintomi

I sintomi associati al GBM variano in base a seconda della sede e alle dimensioni del tumore e sono sintomi aspecifici di una massa in espansione all'interno del cranio, ovvero:

- Cefalea: Dolore persistente o mal di testa che può peggiorare al mattino o con l'attività;
- Nausea e Vomito: Questi sintomi possono essere causati dalla pressione del tumore sulle aree del cervello coinvolte nel controllo del vomito;
- Cambiamenti nella Visione: Compresi disturbi visivi, visione offuscata o doppia, perdita di visione periferica; Problemi Neurologici: Debolezza, difficoltà di coordinazione o cambiamenti nell'equilibrio, emiparesi, emianestesia;
- Convulsioni;
- Afasia: Può verificarsi la comparsa di problemi nel parlare, comprendere il linguaggio o trovare le parole giuste;
- Disturbi del Sonno o della Coscienza: Cambiamenti nei modelli di sonno, letargia o sonnolenza e difficoltà a rimanere svegli;
- Cambiamenti nella Personalità o Comportamento: Possono verificarsi alterazioni nell'umore, nella personalità o nei modelli comportamentali.

1.3 Cellule staminali neoplastiche del cervello (BTSC)

Nel giro dentato dell'ippocampo e nella zona subventricolare dei ventricoli laterali, sono state individuate cellule staminali neuronali multipotenti, ovvero che possono produrre cellule indifferenziate ed anche cellule differenziate come neuroni e cellule gliali. È importante notare che le cellule staminali tumorali del GBM mostrano caratteristiche fenotipiche simili alle cellule staminali neurali normali e esprimono il gene CD133, insieme ad altri geni tipici delle cellule staminali neurali, manifestando anche la capacità di auto-rinnovamento in virtù di questo sono state chiamate Cellule Staminali Neoplastiche del Cervello (BTSC) (Figura 1.3). Tali cellule producono cellule tumorali ma anche cellule staminali tumorali. I meccanismi con cui le staminali neuronali si trasformino in BTSC non sono ancora chiari, ciò che è chiaro è il fatto che le BTSC siano resistenti

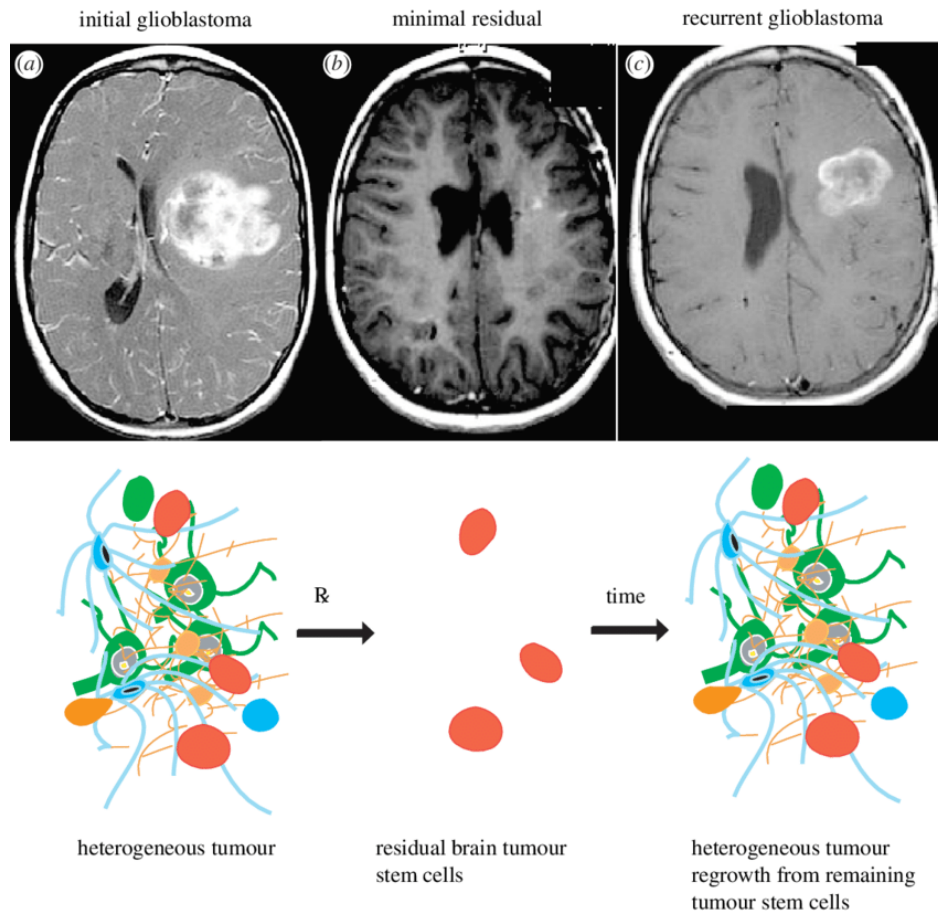


Figura 1.3: Le BTSC sono refrattarie alle terapie convenzionali e portano alla recidiva del GBM.
(www.researchgate.net)

alla radioterapia ed alla chemioterapia. La resistenza alle radiazioni e ai chemioterapici sembra essere mediata da un aumento della capacità di riparazione del DNA, con un'attivazione preferenziale dei checkpoint di risposta al danno del DNA. Queste BSTC presentano un elevato potenziale tumorigenico ma una bassa capacità di proliferazione. È importante notare che le cellule staminali tumorali del GBM mostrano caratteristiche fenotipiche simili alle cellule staminali neurali normali e esprimono il gene CD133, insieme ad altri geni tipici delle cellule staminali neurali, manifestando anche la capacità di auto-rinnovamento. Sperimentalmente, le BTSC del glioblastoma hanno dimostrato la capacità di riprodurre tumori policlonali originali quando inoculate in topi nude [12].

1.4 Terapie Standard

La terapia standard per il GBM prevede **chirurgia, radioterapia e chemioterapia**. Se la localizzazione della massa permette, l'approccio chirurgico è il cardine, non a caso se viene effettuata una resezione di più del 98% del volume totale della massa, aumenta la sopravvivenza rispetto ad una resezione parzia-

le. Negli ultimi anni l'intervento chirurgico si è evoluto andando a rimuovere il tumore del paziente *in awake*, ovvero "da sveglio". Grazie a tale metodica si può capire se una determinata parte del cervello è rimovibile senza causare danni al paziente. La radioterapia di norma viene effettuata post intervento chirurgico e mira a danneggiare le cellule tumorali (BTSC) sfuggite alla rimozione chirurgica. Anche la chemioterapia è mirata allo stesso scopo [13], nonostante i chemioterapici "standard" non abbiano apportato benefici significativi, l'unico chemioterapico che ha prodotto risultati in combinazione alla radioterapia è la Temozolomide (TMZ). Nonostante ciò alcune linee cellulari di GBM sviluppano resistenza alla TMZ, rendendo la terapia inefficace.

1.5 Terapie Sperimentali

Appare quindi chiaro, nel contesto del GBM, che le terapie standard risultino poco efficaci (la neoplasia recidiva nella totalità dei casi) e mirino a migliorare la qualità della vita del paziente. Gli sforzi sono stati quindi indirizzati verso la ricerca di nuove terapie, come ad esempio: *gene therapy* [14] ed *inibitori di pathway molecolari*. Purtroppo tali approcci, nonostante siano promettenti, sono ancora nella loro fase "embrionale" ed è quindi importante tentare tutti gli approcci possibili: La drug discovery computazionale è diventata quindi fondamentale, data la grande disponibilità di dati omici e sulle molecole farmacologiche e la sua velocità nell'analisi.

Capitolo 2

Trascrittomica e cancro

Il trascrittoma è l'insieme di tutti gli RNA (Acido Ribonucleico) trascritti a partire dal genoma di un individuo. A differenza del DNA gli RNA contengono Ossiribosio e non Deossiribosio ed i residui di Timina sono sostituiti dall'Uracile. Il processo che porta alla sintesi di RNA è chiamato trascrizione, sia il DNA codificante che quello non codificante vengono trascritti. Nelle cellule esistono diversi RNA, si tratta quindi di una molecola molto eterogenea:

- RNA Ribosomiale (*rRNA*) è l'RNA più abbondante nella cellula ed è componente essenziale dei ribosomi, complessi macromolecolari responsabili
- RNA Messaggero (*mRNA*) è il tipo di RNA che trasporta l'informazione e permette la codifica durante la trascrizione del DNA, sono distinguibili facilmente dagli altri RNA per la presenza della loro coda Poli-A; della sintesi delle proteine;
- Piccoli RNA Nucleari (*snRNA*) localizzati nel nucleo delle cellule eucariotiche, partecipano in concerto con proteine specifiche (formando gli *snRNP*), alla regolazione genica ed alla maturazione degli mRNA;
- RNA Transfer (*tRNA*) che trasporta in maniera specifica un amminoacido al sito dove avviene la sintesi proteica (nel ribosoma);
- MicroRNA (*miRNA*) e Piccoli RNA Interferenti (*siRNA*), molecole molto piccole di RNA, principalmente coinvolte nella regolazione dell'espressione genica post-traduzionale;
- Lunghi RNA Non Codificanti (*lnRNA*), hanno funzione regolatoria dell'espressione genica.

L'insieme di queste tipologie di RNA (Figura 2.1) viene definita trascrittoma, solo il 2-3% del DNA viene trascritto in mRNA maturo, che è l'RNA che sarà poi tradotto in proteine dai Ribosomi. Diversi regolatori determinano il destino e la natura del messaggio trasmesso per formare proteine attraverso vari meccanismi, tra cui lo splicing alternativo e la modifica dell'RNA [15]

Types of RNA Produced in Cells

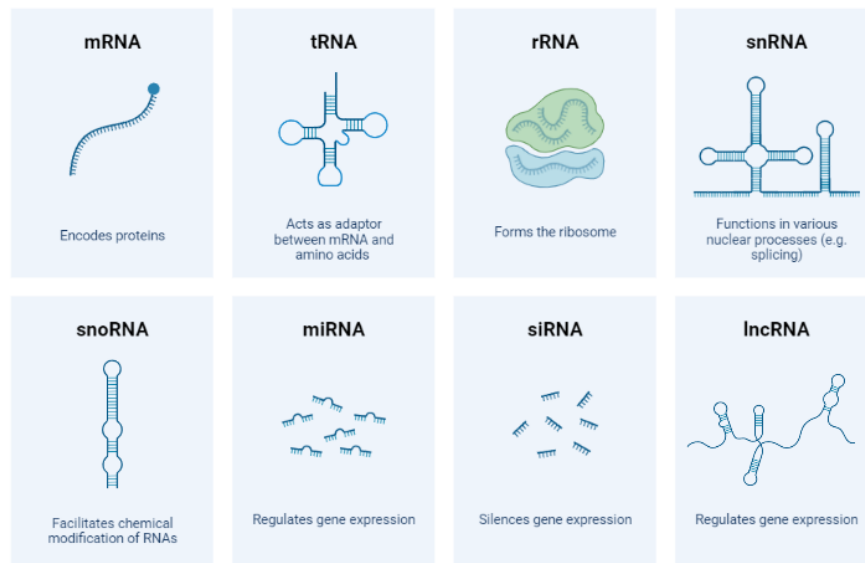


Figura 2.1: RNA presenti nelle cellule. (www.BioRender.com)

2.1 Trascrittomica

La trascrittomica è la branca delle "omiche" che analizza qualitativamente e quantitativamente l'espressione genica, essa è di vitale importanza non solo per la comprensione dell'espressione genica, ma anche per capire i meccanismi che portano alla patogenesi. Attualmente le tecnologie usate per l'analisi dell'espressione genica sono : *Microarray* e *RNAseq*. Negli ultimi anni, i rapidi progressi nella tecnologia di sequenziamento ad alto rendimento hanno rivoluzionato il campo della trascrittomica, consentendo l'analisi simultanea di migliaia di trascritti di RNA in un singolo esperimento. L' RNA-seq, offre una risoluzione senza precedenti nel profilo del trascrittoma, consentendo agli scienziati di identificare e caratterizzare i trascritti in modo accurato e efficiente. Inoltre, l'integrazione di approcci computazionali avanzati consente di elaborare e interpretare grandi quantità di dati trascrittomici, aprendo la strada a nuove scoperte e a una comprensione più approfondita dei meccanismi biologici sottostanti [16]. Attualmente le tecnologie usate per l'analisi dell'espressione genica sono : *Microarray* e *RNAseq*. I microarray sono stati usati per la prima volta nel 1995 e stanno venendo sostituiti velocemente dall'RNAseq per i motivi sopracitati.

2.1.1 Microarray

Esistono due tipi di microarray di DNA: i microarray di cDNA e gli array di oligonucleotidi (Figura 2.2). Gli array di cDNA vengono prodotti stampando un cDNA a doppio filamento su un supporto solido (vetro o nylon) utilizzando spilli robotici. Gli array di oligonucleotidi sono realizzati sintetizzando specifici oligonucleotidi in un allineamento specifico su una superficie solida utilizzando la fotolitografia [17]. Il segmento di DNA fissato al supporto solido è noto come probe, e in un array vengono utilizzate contemporaneamente migliaia di queste sonde. Gli array consentono di esaminare contemporaneamente la presenza di numerosi geni all'interno di un campione di DNA, che può rappresentare il genoma o il trascrittoma completo di un organismo. L'utilizzo dei microarray si basa sulla tecnica di ibridazione inversa, che implica il fissare tutti i segmenti di DNA (chiamati probe) su un supporto e marcare l'acido nucleico che si desidera identificare (detto target). Gli RNA, vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA utilizzando un enzima chiamato trascrittasi inversa e contemporaneamente marcati con una sonda fluorescente. Durante l'ibridazione tra la sonda sulla matrice e il cDNA target, quest'ultimo rimane legato alla sonda e può essere identificato rilevando la posizione del legame. I segnali di fluorescenza sono poi rilevati ed analizzati per quantificare l'espressione genica.

2.1.2 RNAseq

RNAseq (RNA sequencing) è un metodo di sequenziamento di nuova generazione (NGS) che fornisce informazioni dettagliate sulla quantità relativa e sulla struttura degli RNA, inclusi i trascritti codificanti e non codificanti. In particolare, RNA-Seq facilita la capacità di esaminare trascritti alternativi di geni, modifiche post-trascrizionali, fusioni geniche, mutazioni e cambiamenti nell'espressione genica nel tempo, nonché differenze nell'espressione genica in gruppi o trattamenti diversi. Ciò ha portato ad una maggiore sensibilità e specificità dei dati generati con RNAseq rispetto a quelli provenienti dai Microarray. Il *workflow* Figura 2.3 ha inizio convertendo l'RNA estratto in cDNA tramite *trascrizione inversa*, Il cDNA viene quindi frammentato in piccoli pezzi di lunghezza stabilita, in base alla tecnologia di sequenziamento che verrà poi utilizzata, le più usate in short-read (50-300 bp) sono *illumina* e *Ion Torrent*, mentre le più usate in long-read (>10000 bp) sono *Pacific Biosciences* e *Oxford Nanopore* [18]. Successivamente le sequenze ottenute sono allineate con il genoma di riferimento o con trascritti noti per identificare la posizione di ciascun frammento

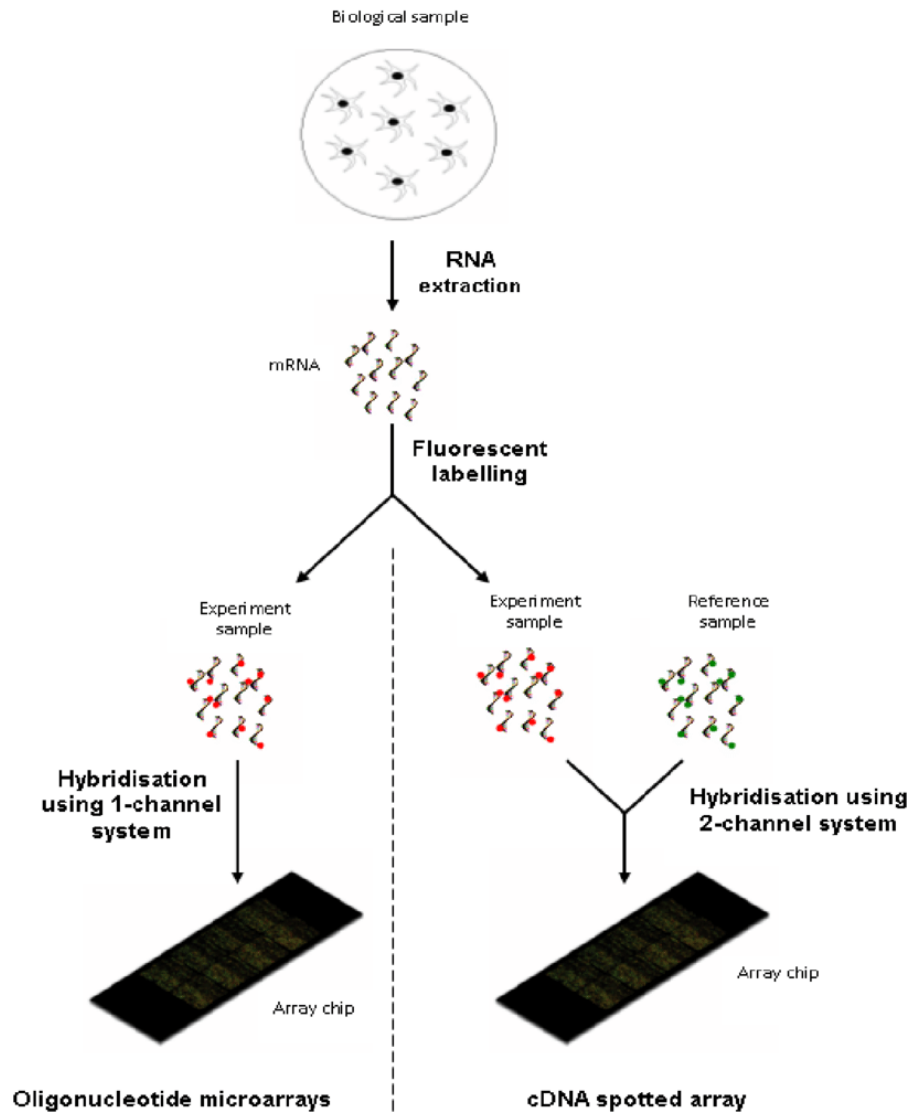


Figura 2.2: Differenze tra microarray ad oligonucleotidi e cDNA. (www.researchgate.net)

di cDNA nel contesto del genoma. Gli step finali prevedono la quantificazione dell'espressione genica e successiva analisi dei dati ed interpretazione dei risultati, il tutto con l'ausilio di *pipeline* bioinformatiche ideate appositamente per l'analisi da effettuare.

2.1.3 Bulk e Single Cell

L'RNAseq a sua volta, presenta due metodiche di analisi *bulk RNAseq* e *scRNAseq* (*single-cell*). Le metodiche *bulk RNAseq* sono state ampiamente utilizzate fin ora ma presentano la grande limitazione di perdere le differenze di trascritti tra le singole cellule, essendo l'analisi effettuata su una popolazione di cellule. Le analisi in *scRNAseq* invece permettono l'esplorazione dell'analisi di espressione per le singole cellule e sono quindi diventate in breve tempo fondamentali nello

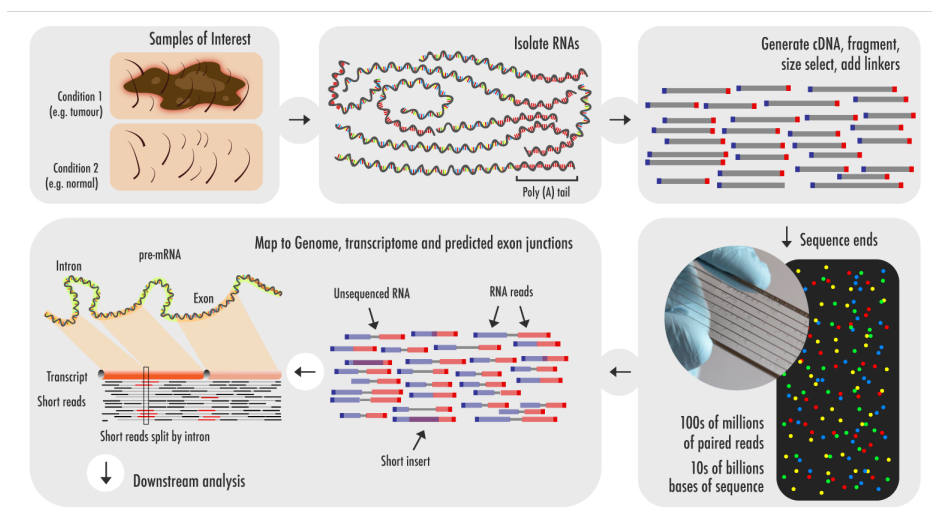


Figura 2.3: Workflow generale per l'RNAseq. (www.technologynetworks.com)

studio della maggior parte delle patologie umane, basti pensare alla possibilità di analizzare il trascrittoma di una cellula sana con quello di una cellula cancerosa. Nonostante la sua utilità, scRNAseq non è esente da svantaggi: a causa della bassa quantità di materiale di partenza, lo scRNAseq ha limitazioni di bassa efficienza di cattura e alti dropouts, rispetto al bulk RNAseq, lo scRNAseq produce dati più rumorosi e variabili (trascrizione stocastica) [19].

2.2 Drug Discovery e trascrittoma

I dati trascrittomici, permettono un'analisi più rapida ed economica, non necessitando dei dati strutturali del farmaco, ma solo del cambiamento nell'espressione genica, sono per questo diventati indispensabili nella moderna Drug Discovery. Accanto all'evoluzione delle tecnologie per l'analisi dell'espressione genica, le recenti migliorie nel campo delle Intelligenze Artificiali, hanno avuto un impatto significativo sulla qualità e velocità della Drug Discovery. Grazie a sistemi di ML (Machine Learning), è stato possibile predire l'efficacia di varie molecole contro determinate patologie, ciò dando in input il profilo d'espressione generato dalla malattia ed addestrando una rete neurale con i dati riguardanti le molecole farmacologiche contenute nella *Library of Integrated Network-based Cellular Signatures* (LINCS) [20]. I vantaggi della trascrittomica per la Drug Discovery non si limitano alla predizione dell'efficacia ma anche alla predizione di possibili effetti avversi, permettendo così una corretta gestione del budget per la ricerca ed evitando costosi trial clinici destinati al fallimento [21]. Oltre all'ampio utilizzo del trascrittoma, la Drug Discovery avviene per *Molecular Docking*, Il Molecular Docking rappresenta un processo cruciale nel design dei

farmaci, permettendo l'ancoraggio delle molecole piccole alle strutture proteiche per valutare la loro capacità di legarsi al sito attivo. È una metodologia dinamica che trova applicazioni in diversi ambiti, quali il design dei farmaci basato sulla struttura, l'ottimizzazione dei lead e la comprensione dei meccanismi molecolari dei processi biologici. Tuttavia, le sfide nel docking molecolare, come la corretta posizione delle molecole e la previsione dell'affinità di legame, richiedono un'attenta considerazione al fine di ottenere risultati affidabili e significativi [22].

2.3 Trascrittomica per la Drug Discovery contro il cancro

Nella "Post-sequencing era", i primi approcci di drug discovery contro il cancro erano basati sull'analisi del genoma [23], non a caso, iniziative come l'International Cancer Genome Consortium (ICGC) e il Cancer Genome Atlas (TCGA) sono riuscite negli scorsi anni a catalogare i genomi di numerosi tipi di cancro, permettendo lo sviluppo di terapie sperimentali. Nonostante ciò, nella maggioranza dei casi, tali terapie non eradicano completamente la malattia, che purtroppo si ripresenta con prognosi infausta [24]. Si verifica spesso che tumori generati da stesso sottotipo di mutazioni genetiche siano eterogenei tra loro, ciò ha portato alla conclusione che molteplici combinazioni di mutazioni portino allo stesso tumore e sia quindi possibile bloccare la trasformazione della cellula cancerosa agendo su un limitato numero di regolatori proteici. In virtù di questo il profilo del trascrittoma è emerso come uno degli approcci più potenti nell'ambito della drug discovery oncologica, fornendo importanti informazioni prognostiche e predictive per la gestione del cancro. Grazie allo sviluppo di nuove tecnologie, come il sequenziamento di nuova generazione, siamo in grado di identificare biomarcatori del cancro, firme genetiche e valutare l'espressione aberrante di geni che influenzano l'oncogenesi. La trascrittomica sta portando a un cambio di paradigma nella comprensione del cancro, spostandosi da classificazioni basate sull'aspetto istopatologico o organico a una più precisa e molecolare. Questo approccio apre la strada a una diagnosi e a una terapia dei tumori più personalizzate. Ulteriori progressi nel profilo del trascrittoma potrebbero portare alla standardizzazione e alla riduzione dei costi delle analisi, rappresentando così un passo significativo verso l'integrazione della trascrittomica come elemento fondamentale nella medicina oncologica contemporanea [25]. Validato alleato della

trascrittomica la bioinformatica, sarà sempre più importante per risalire alla "firma" che le neoplasie imprimono al trascrittoma (confrontando i trascrittomi di cellule sane con la controparte malata), tale analisi di espressione, seguita poi dall'identificazione di farmaci che hanno una relazione di inversione con la firma della malattia, permetterà di risalire a nuovi possibili bersagli molecolari e quindi a potenziali molecole efficaci [26].

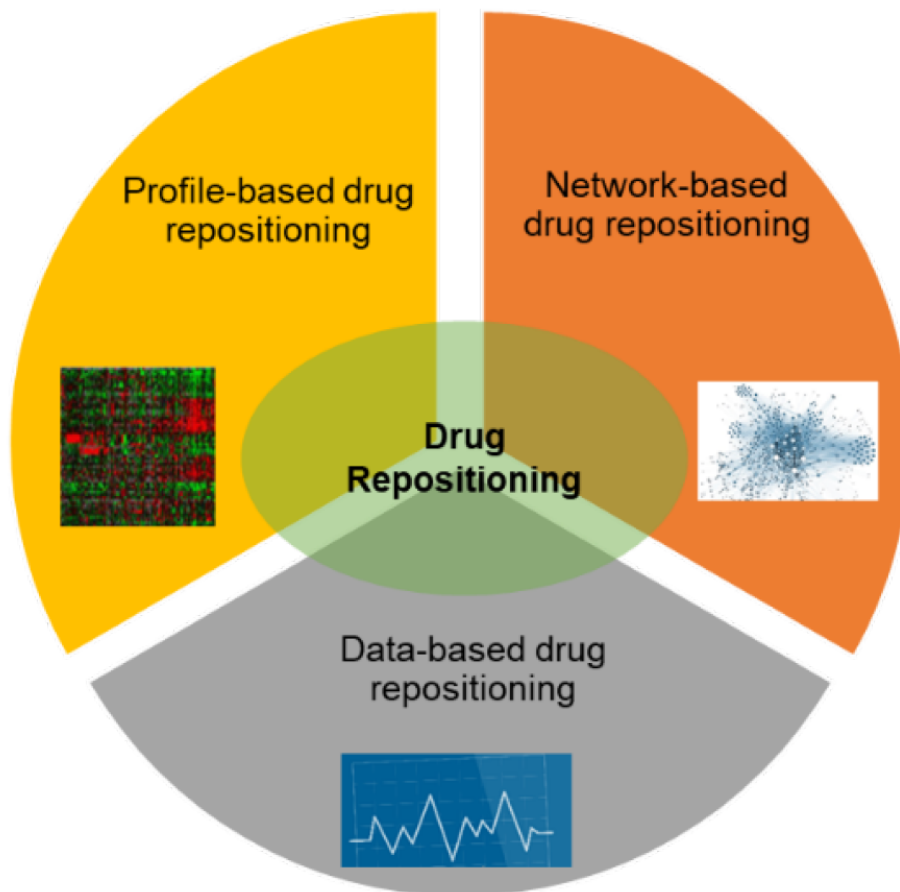


Figura 2.4: Schema generale per gli approcci di drug repurposing. (mdpi.com)

2.4 Drug Discovery basato su trascrittomica in Glioblastoma

Il GBM è una delle peggiori neoplasie esistenti per prognosi: le cure standard sono poco efficaci e non portano alla completa remissione, nella totalità dei casi la neoplasia si ripresenta con maggiore malignità e prognosi infausta. Vi è quindi una certa urgenza nel proporre nuovi approcci per il trattamento, un valido aiuto è quindi giunto dai progressi nella trascrittomica. Un esempio dell'aiuto che la trascrittomica sta dando alla drug discovery per il Glioblastoma è la possibilità di effettuare medicina di precisione: ottenuti i trascritti delle cellule di

GBM di un paziente ed identificate le proteine interessate da mutazione (BRAF e PIK3R1), si può procedere con un approccio di *Drug Repurposing* (Figura 2.4) computazionale attingendo a vari databases (ZINC) di farmaci [27]. Oltre agli approcci di drug repurposing, che analizzano i trascritti di mRNA, sono stati sfruttati i lncRNA analizzati in single cell, data l'elevata eterogeneità [28] esistente tra le cellule dello stesso GBM, ciò ha permesso una nuova tipizzazione del GBM oltre a rivelare nuovi possibili bersagli farmacologici [29].

2.5 LINCS

Parlando del ruolo della trascrittomica nella Drug Discovery, non si può non far riferimento al **LINCS** (Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures). LINCS è un programma a fondo comune del NIH (National Institutes of Health) che mira a creare una comprensione della biologia umana, catalogando le variazioni nell'espressione genica e proteica, nei processi di segnalazione, nella morfologia cellulare e negli stati epigenetici che si verificano quando le cellule sono esposte a vari agenti perturbanti. Osservare come e quando il fenotipo di una cellula viene alterato da specifici fattori di stress può fornire indizi sui meccanismi sottostanti coinvolti nella perturbazione e, quindi nei processi patogenetici: ciò aiuterà quindi gli sforzi per la ricerca di nuove terapie. I dati provenienti dal programma LINCS sono liberamente accessibili come risorsa comunitaria attraverso una serie di rilasci di dati, la prima fase (Phase 1) è stata rilasciata nel 2013 mentre la Phase 2 è stata rilasciata tra il 2015 e il 2017. I dati sono ottenute da colture cellulari e da cellule primarie che sono state sperimentalmente perturbate. Qualsiasi condizione capace di alterare lo stato cellulare viene indicata con il termine "perturbagen" [30]. I datasets LINCS comprendono i risultati di esperimenti su cellule trattate con piccole molecole bioattive, anticorpi e ligandi. Per quanto riguarda la misurazione della risposta cellulare, vengono utilizzati diverse tipologie di saggi tra i quali: misurazioni dell'espressione di mRNA e proteine; stato epigenomico; e fenotipi cellulari, molecolari e morfologici catturati da letture biochimiche e di imaging. I saggi vengono tipicamente eseguiti su tipi cellulari multipli ed in diversi intervalli, i "perturbagen" applicati a dosi crescenti.

2.5.1 L1000

L1000 è un saggio sviluppato dal progetto LINCS, esso misura l'espressione di 978 geni "landmark" da lisati cellulari grezzi con un metodo di amplificazione mediata da ligazione accoppiato con una rilevazione basata su Luminex su piastre da 384 pozzetti [8]. Data la struttura altamente correlata dell'espressione genica, il trascrittoma non misurato può essere inferito computazionalmente da questi geni landmark, selezionati per consentire una fedele ricostruzione utilizzando un algoritmo addestrato su un ampio insieme di trascrittomi completi. Per consentire la scalatura e la normalizzazione, vengono misurati 80 geni in-varianti. Il metodo è stato dimostrato essere comparabile con l'RNAseq, ha un costo molto inferiore rispetto allo stesso, e ha prodotto un compendio di oltre un milione di profili di perturbazioni cellulari resi pubblicamente disponibili. L1000 misura i profili di espressione di diverse linee cellulari umane (Tabella 2.1) in risposta a 1768 diverse molecole farmacologiche, somministrate in 83 diverse concentrazioni ed in 4 diverse durate di trattamento. I Dati dell'L1000 sono separati in 5 livelli (L1-L5), corrispondenti ai 5 step della pipeline utilizzata per il processamento dei dati. Tutti i livelli sono disponibili online sul sito web *Gene Expression Omnibus* (GEO).

Linea Cellulare	Informazioni
A375	Linea cellulare isolata dalla pelle di una paziente di 54 anni affetta da melanoma maligno.
A375.311	A375 geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.
A549	Linea isolata dal tessuto polmonare di un maschio bianco di 58 anni affetto da cancro ai polmoni.
A549.311	A549 geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.
A763	E'una linea cellulare che presenta una morfologia poligonale isolata dal muscolo di una paziente di 15 anni affetta da sarcoma di Ewing.

Linea Cellulare	Informazioni
AGS	Linea cellulare isolata nel 1979 dallo stomaco di una paziente bianca di 54 anni con adenocarcinoma gastrico
BT20	Isolata nel 1958 da un tumore al seno di una donna bianca di 74 anni.
CL34	Linea isolata da una donna con un adenocarcinoma primario del colon moderatamente differenziato.
CORL23	Linea originata nel 1985 da un versamento pleurico di un maschio di 62 anni affetto da un carcinoma anaplastico del polmone a cellule giganti.
COV644	Linea cellulare di carcinoma epiteliale-mucinoso ovarico umano stabilita da un tumore primario solido.
DV90	Linea stabilita dal versamento pleurico di un uomo di 50 anni con adenocarcinoma polmonare (IV stadio) nel 1990.
EFO27	Linea proveniente dalla metastasi solida omentale di un adenocarcinoma papillare mucinoso dell'ovaio di una donna di 36 anni, nel 1979.
H1299	Linea cellulare epiteliale isolata dal polmone di un paziente maschio bianco di 43 anni affetto da carcinoma.
HA1E	Linea cellulare epiteliale renale umana normale.
HA1E.101	HA1E geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.
HA1E.311	HA1E geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.

Linea Cellulare	Informazioni
HCC15	Proveniente dal tumore di un uomo di 47 anni con carcinoma polmonare non a piccole cellule (sottotipo carcinoma squamoso).
HCC515	Linea cellulare di adenocarcinoma proveniente da una paziente di 39 anni caucasica.
HCT116	Isolata dal colon di un maschio adulto affetto da cancro al colon
HEC108	Linea cellulare proveniente da un adenocarcinoma endometriale di una donna giapponese.
HEK293T	Linea embrionale epiteliale normale isolata dal rene di un paziente.
HEKTE	Linea cellulare di rene normale.
HELA	Linea isolata nel 1951 da un carcinoma cervicale di una paziente di 31 anni afroamericana.
HELA.311	HELA geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.
HEPG2	Linea cellulare isolata da un carcinoma epatocellulare di un giovane maschio bianco di 15 anni con cancro al fegato.
HL60	Promieloblasti isolati dal sangue periferico, mediante leucoaferesi, di una donna bianca di 36 anni affetta da leucemia promielocitica acuta.
HME1	Cellule normali isolate dal seno di una paziente di 53 anni sottoposta a intervento di mastoplastica riduttiva.
HS27A	Linea cellulare di fibroblasti isolata dallo stroma di un donatore maschio bianco di 30 anni.
HS578T	Cellule epiteliali isolate dal tessuto mammario derivato da una paziente caucasica, affetta da cancro al seno, di 74 anni.

Linea Cellulare	Informazioni
HT115	Cellule isolate da un paziente affetto da carcinoma del colon.
HT29	Linea cellulare isolata nel 1964 da un tumore primario, proveniente da una paziente bianca di 44 anni affetta da adenocarcinoma del colon-retto.
HT29.311	HT29 geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.
HUH7	Linea cellulare di carcinoma ben differenziata, originariamente prelevata da un tumore al fegato in un maschio giapponese di 57 anni nel 1982
HUVEC	Linea cellulare endoteliale isolata dalla vena del cordone ombelicale.
JHUEM2	Linea cellulare derivata da adenocarcinoma endometrioidale uterino di una paziente giapponese di 62 anni.
JURKAT	Linea stabilita dal sangue periferico di un paziente di 14 anni, maschio, con leucemia acuta delle cellule T.
LNCAP	Linea cellulare isolata nel 1977 da un linfonodo sopraclavicolare di un uomo di 50 anni, bianco, affetto da carcinoma metastatico della prostata.
LOVO	Cellule isolate nel 1971 dall'intestino crasso di un maschio bianco, di 56 anni, affetto da cancro del colon-retto di grado IV.
MCF10A	Linea isolata nel 1984 dalla ghiandola mammaria di una donna bianca di 36 anni con seno fibrocistico.
MCF7	Cellule derivate da un adenocarcinoma della ghiandola mammaria.
MCF7.101	MCF7 geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.
MCF7.311	MCF7 geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.

Linea Cellulare	Informazioni
MCH58	Linea cellulare di fibroblasti normali.
MDAMB231	Linea cellulare di adenocarcinoma mammario metastatico.
MDST8	Linea cellulare estratta da espianiti di tumore del colon-retto.
NCIH1694	Linea cellulare isolata dai polmoni di un uomo bianco di 61 anni con carcinoma polmonare a piccole cellule in stadio E.
NCIH1836	Cellule isolate dai polmoni di un paziente maschio bianco di 52 anni affetto da carcinoma polmonare a piccole cellule.
NCIH2073	Cellule isolate dai polmoni di una paziente bianca di 47 anni con adenocarcinoma polmonare non a piccole cellule allo stadio 3A.
NCIH508	Linea proveniente dal cieco di un paziente maschio bianco, di 55 anni, affetto da adenocarcinoma del colon-retto.
NCIH596	Linea cellulare isolata dal polmone di un maschio bianco di 73 anni affetto da carcinoma adenosquamoso polmonare
NCIH716	Cellule isolate nel 1984 dal cieco di un paziente maschio bianco di 33 anni affetto da adenocarcinoma del colon-retto.
NKDBA	Cellule renali normali immunoselezionate per la positività al DBA.
NOMO1	Linea dal midollo osseo di una donna di 31 anni affetta da leucemia mieloide acuta alla 2a recidiva.
OV7	Cellule da tessuto tumorale ovarico solido al 3 stadio, prelevato da una paziente di 78 anni.
PC3	Linea cellulare iniziata da una metastasi ossea di un adenocarcinoma prostatico di grado IV da un maschio bianco di 62 anni.
PC3.101	PC3 geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.

Linea Cellulare	Informazioni
PC3.311	PC3 geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.
PL21	Cellule dal sangue periferico di un uomo di 24 anni con leucemia promielocitica acuta refrattaria dopo sarcoma granulocitico mediastinico.
RKO	Linea cellulare di carcinoma del colon scarsamente differenziata.
RMGI	Linea cellulare di un tumore ovarico metastatico.
RMUGS	Linea cellulare di Cancro ovarico mucinoso.
SHSY5Y	Linea stabilita nel 1970 da un tumore osseo metastatico di un malato di cancro di 4 anni.
SKBR3	Linea isolata nel 1970 da cellule di versamento pleurico di una paziente bianca di 43 anni con adenocarcinoma mammario.
SKLU1	Cellule isolate dai polmoni di una paziente bianca di 60 anni affetta da adenocarcinoma.
SKM1	Isolata dal sangue periferico di un uomo di 76 anni affetto da leucemia monoblastica acuta nel 1989 a seguito di sindrome mielodisplastica.
SKMEL1	Melanociti isolati dalla pelle di un paziente maschio bianco di 29 anni affetto da melanoma.
SKMEL28	Melanociti isolati dal tessuto cutaneo di un paziente maschio di 51 anni affetto da melanoma maligno.
SNGM	Linea cellulare di carcinoma endometriale dall'utero di una paziente giapponese di 52 anni.
SNU 1040	Linea proveniente da un Carcinoma coloretale.
SNUC5	Linea cellulare di carcinoma allo stomaco.
SW480	Cellule isolate dall'intestino crasso di un cancro del colon-retto III stadio.
SW620	Cellule isolate dall'intestino crasso di un uomo di 51 anni, da un cancro del colon-retto III stadio.
SW948	Cellule dal colon di una paziente bianca di 81 anni con adenocarcinoma del colon-retto.

Linea Cellulare	Informazioni
T3M10	Linea cellulare di carcinoma a cellule grandi, proveniente da un paziente giapponese di 40 anni.
THP1	Monocito isolato dal sangue periferico di un paziente con leucemia monocitica acuta.
TYKNU	Linea cellulare da cancro ovarico umano.
U266	Linfocita B isolato dal sangue periferico di un paziente maschio di 53 anni affetto da mieloma.
U2OS	Linea derivante (1964) da un sarcoma moderatamente differenziato della tibia di una paziente, con osteosarcoma, bianca di 15 anni.
U937	Linea da cellule ottenute dal versamento pleurico di un paziente maschio bianco di 37 anni affetto da linfoma istiocitico.
VCAP	Cellule da un paziente maschio bianco, di 59 anni, affetto da cancro alla prostata.
WSUDLCL2	Cellule dal versamento pleurico di un uomo di 41 anni affetto da linfoma non Hodgkin a cellule B
YAPC	Cellule ottenute laparatomia esplorativa di un uomo di 43 anni con carcinoma del pancreas.
YAPC.311	YAPC geneticamente modificata per esprimere stabilmente la proteina Cas9.

Tabella 2.1: Linee cellulari contenute in L1000.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE92742>)

Capitolo 3

revDECCODE

L'obiettivo inizialmente posto era: partendo da un profile PEP (Pathway-based Expression Profiles), ricercare profili di espressione genica differenziali indotti da molecole farmacologiche simili ad esso. Per ottenerlo, ci si è avvalsi di un metodo al quale ci riferiamo con il nome **revDECCODE** (Figura 3.1). L'analisi dell'mRNA presenta sfide significative, spesso influenzate dalle tecnologie impiegate. Attualmente, le due principali piattaforme utilizzate per quantificare l'mRNA sono i microarray e l'RNA-Seq. Tuttavia, la comparabilità dei risultati ottenuti da queste piattaforme rimane una questione critica, poiché numerosi studi hanno evidenziato discrepanze nei risultati. Questa disparità può ostacolare l'integrazione e l'interpretazione dei dati, limitando la comprensione dei meccanismi biologici sottostanti. I risultati degli studi precedentemente effettuati, indicano che la trasformazione dei dati trascrittomici in punteggi di arricchimento biologicamente rilevanti porta a una maggiore coerenza tra le piattaforme. Questa trasformazione non solo filtra il rumore presente nei dati grezzi, ma enfatizza anche le caratteristiche biologiche significative, consentendo una migliore integrazione dei dati provenienti da piattaforme diverse [31]. In virtù di ciò i dati "grezzi" di partenza sono stati processati con l'ausilio di una apposita *pipeline*, per convertirli in PEP, molto più confrontabili e comparabili. Le DGC sono le cellule responsabili della progressione del GBM, in quanto favoriscono la migrazione dei macrofagi nel tessuto canceroso e modellano il microambiente cellulare favorendo l'estensione del tumore [32]. In questo capitolo viene presentato revDECCODE, metodo *non-rational* di drug discovery per la ricerca di una terapia farmacologica che permetta il differenziamento delle GSC stem-like (*Cancer Stem Cells*) a cellule differenziate di Glioblastoma (DGC). Il motivo di questo specifico obiettivo è da ricercare nel fatto che, le CSC emergono essere le dirette responsabili della recrudescenza del GBM, poiché dotate di capacità di resistenza intrinseche e plasticità fenotipica che consentono loro di sfuggire alle terapie convenzionali [33]. Tale metodo è stato sviluppato partendo dal **DECCODE** (Drug Enhanced Cell Conversion using Differential Expression) un innovativo metodo computazionale mirato all'identificazione di molecole in grado di influenzare la riprogrammazione cellulare e la conversione cellulare.

Basandosi su dati trascrizionali, DECCODE analizza una vasta collezione di profili indotti da farmaci in confronto con un ampio dataset di profili trascrizionali cellulari primari. Il suo obiettivo è individuare composti farmacologici, sia singolarmente che in combinazione, che possano migliorare efficacemente i processi di riprogrammazione e conversione cellulare. Un'ampia fase di validazione, condotta su cellule staminali pluripotenti umane indotte, attesta la capacità di DECCODE di selezionare e prioritizzare farmaci e combinazioni di farmaci in grado di ottimizzare tali processi [34].

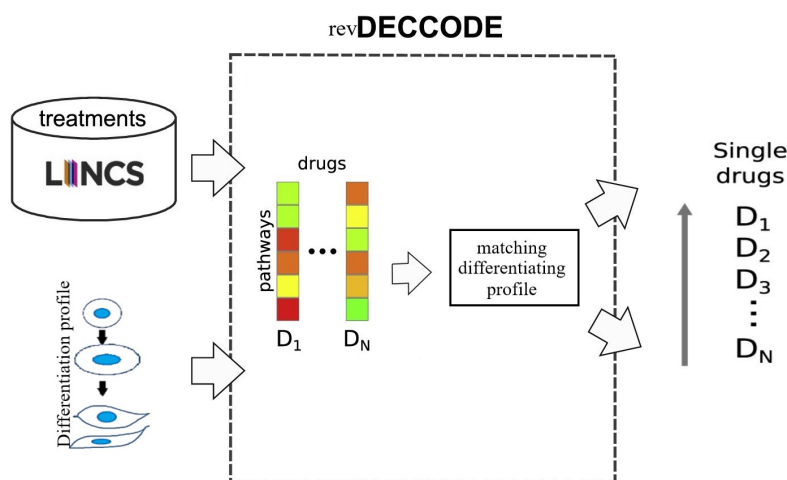


Figura 3.1: Workflow di revDECCODE.

3.1 Dataset

I dataset utilizzati nell'analisi sono liberamente consultabili sul web, in particolare sono stati utilizzati:

- MSigDB v6.1;
- Castellan et al;
- LINCS.

Segue una sottosezione in cui verranno illustrate le caratteristiche principali di ogni dataset, ciò data la complessità degli stessi e per una migliore comprensione dell'intero workflow utilizzato durante l'analisi.

3.1.1 MSigDB

MSigDB (Molecular Signatures Database), è un database di set di geni utilizzato principalmente per l'analisi di arricchimento di geni (GSEA). Questo data-

base contiene collezioni di geni raggruppati in categorie o set, che possono essere utilizzati per interpretare dati ad alto rendimento o throughput, come quelli derivati da microarray o NGS. La versione più recente di MSigDB (MSigDB v2023.2) è composta da otto collezioni, *Human Collections*, denominate C1-C8, ciascuna delle quali incorpora specifiche categorie di geni [35, 36]. Queste categorie includono: geni raggruppati in base alla loro posizione nel genoma umano (C1), percorsi canonici e firme sperimentali curate da pubblicazioni (C2), geni che condividono motivi cis-regolatori su o giù delle loro sequenze codificanti (C3), cluster di geni co-espressi in compendi di microarray (C4), geni raggruppati secondo le categorie di gene ontology (GO) (C5), firme di attivazione di percorsi oncogeni (C6), una vasta collezione di condizioni immunologiche (C7), e set di geni derivanti da cluster identificati in studi di sequenziamento di singole cellule di tessuto umano (C8). Tutti i set di geni presenti in MSigDB sono soggetti a un processo di revisione, cura e annotazione manuale da parte del curatore di MSigDB. Essi sono rappresentati come elenchi di simboli genici umani assegnati dal Comitato di Nomenclatura Genica (HUGO) presso l'Istituto Europeo di Bioinformatica. Questa pratica assicura un'accurata e aggiornata rappresentazione dei geni all'interno delle diverse categorie, consentendo agli utenti di MSigDB di accedere a informazioni di alta qualità per l'analisi e l'interpretazione dei dati genetici. Le analisi mostrate in seguito nel capitolo sono state effettuate con la versione 6.1 del MSigDB, reperibile sul sito **GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)** [37].

3.1.2 Castellan et al.

I dati utilizzati provengono dal paper *Single-cell analyses reveal YAP/TAZ as regulators of stemness and cell plasticity in glioblastoma*. Utilizzando dataset a singola cellula, gli autori hanno identificato le GSC come elemento primario dell'eterarchia di differenziazione all'interno del GBM. Attraverso la ricostruzione della rete regolatoria delle GSC, è emerso che i coattivatori YAP/TAZ sono i principali regolatori di questo stato cellulare, indipendentemente dai diversi sottotipi di GBM. Inoltre, è stato dimostrato che YAP/TAZ sono essenziali per conferire alle cellule primarie le proprietà delle GSC, nonché per l'inizio e il mantenimento del tumore sia nei modelli murini che umani di GBM. La loro inibizione è stata rivelata come un'efficace strategia per bloccare la differenziazione delle GSC, impedendo così la rigenerazione delle cellule simili alle GSC e la progressione tumorale [38]. In particolare, dai dati supplementari del paper

è stata adoperata la tabella *GSC-DGC* in cui sono annotati *gene symbol* con i valori di fold change tra le GSC (Glioblastoma Stem Cells) e le DGC (Differentiated Glioblastoma Cells), tali dati sono stati trattati con il pacchetto *gep2pep* per R ed inseriti nella pipeline.

3.1.3 LINCS

Nello specifico sono stati utilizzati i dati dell'espressione genica contenuti in *LINCS L1000* (Figura 3.2). L1000 contiene i profili di espressione di cellule umane in risposta a 1768 diverse molecole farmacologiche in 41 linee cellulari, 83 diverse concentrazioni e 4 diverse durate di trattamento. Sono stati utilizzati i dati di Livello 5, scaricati dal sito web GEO (Gene Expression Omnibus) repository pubblico internazionale che archivia e distribuisce gratuitamente set di dati di espressione genica ad alto rendimento e altri dati di genomica funzionale [39].

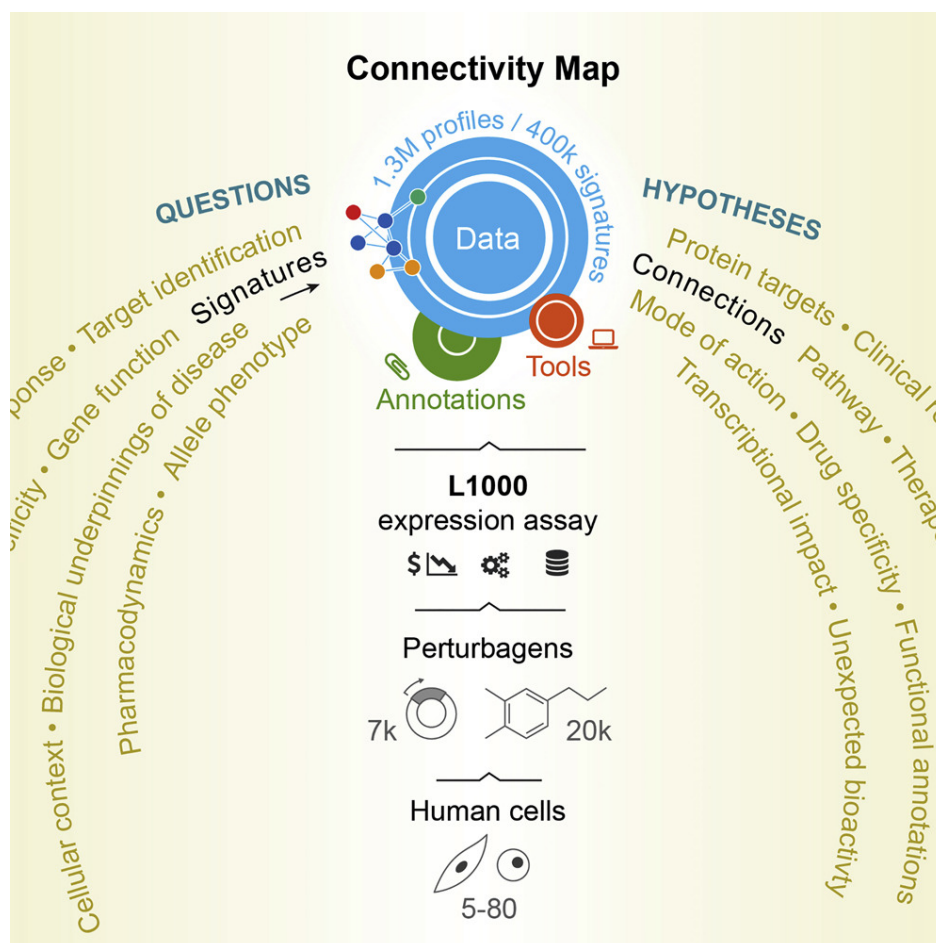


Figura 3.2: Connectivity Map del progetto LINCS (Subramanian et. al, 2017).

3.2 Gep2pep

Il pacchetto R/Bioconductor **gep2pep** è stato impiegato come strumento fondamentale nell'ambito dell'analisi. Gep2pep ha consentito la gestione efficiente di ampie collezioni di profili genetici eterogenei. L'uso di gep2pep ha reso possibile l'analisi dei dati attraverso la creazione di *GEPs* (Gene Expression Profile), e poi la generazione di *PEPs* (Profile Expression Pathway) utilizzando il Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). I PEPs vengono generati con il seguente procedimento: dati N GEP correlati a un insieme di condizioni sperimentali e un database di M pathways, viene eseguito un GSEA per ogni coppia (c, p) , dove c è una condizione e p è un pathway; pertanto, ad ogni coppia (c, p) viene assegnato un punteggio di arricchimento (Enrichment Score, ES) e il relativo valore P secondo il test di Kolmogorov–Smirnov (KST) [40], dando luogo a una matrice $M \times N$ E di ES e una matrice $M \times N$ P di valori P [41]. Inoltre, gep2pep permette l'esecuzione di analisi avanzate e l'analisi di arricchimento dell'insieme di pathway (PathSEA), basate sui profili di espressione genica dei pathway anziché sui tradizionali profili di espressione genica. Entrambe si basano su una procedura simile a GSEA eseguita sui PEP anziché sui GEP. CondSEA prima ordina i PEP per riga, successivamente, dato un insieme di condizioni in input, calcola il loro KST all'interno di ciascuna riga. La versione utilizzata per l'analisi dei dati è la 1.22.0.

3.3 revDECCODE

Per effettuare tutte le analisi è stato impiegato il software RStudio 4.3.1. Il primo step è stato, utilizzando il pacchetto **gep2pep**, l'importazione del Molecular Signature Database (msigdb v6.1) in una *Gene Set Collection*, dopo tale operazione è stata creata una Repository con la funzione **createRepository**, per rendere le collections contenute nel MSigDB, utilizzabili dal pacchetto gep2pep. Successivamente, dai dati aggiuntivi del paper *Single-cell analyses reveal YAP/TAZ as regulators of stemness and cell plasticity in glioblastoma GSC-DGC.xls*, sono stati estratti i gene symbols e valori di fold-change (FC) associati ai geni nelle due linee cellulari, usando il pacchetto **readxl**. Il FC misura quanto un parametro differisca da una misurazione originaria ad una successiva [42], ed è grazie ad esso che il profilo differenziativo tra le due linee cellulari viene "costruito". I valori di fold-change sono poi stati ordinati, tramite la funzione **rank** del pacchetto base di R, con i seguenti argomenti: (**fold-change**, **na.last** = "keep",

`ties.method = "random")`. Questi valori di FC sono stati poi trasferiti in una matrice, in cui le intestazioni di riga sono state riempite con i nomi dei geni precedentemente estratti, usando il comando `rownames`, mentre nell'intestazione di colonna è stato inserito "FC" (Fold-change), tramite il comando `colnames`. La matrice ottenuta è una GEP (Gene Expression Pathway). La GEP è stata quindi convertita in una PEP (Profile Expression Pathway) con la funzione `buildPEPs` dando come argomenti la GEP stessa e la repository precedentemente creata. A questo punto è stata importata la PEP di LINCS, per poi procedere all'estrazione delle *matrici di enrichment score (ES)*: la funzione usata `loadESmatrix`, prende in input una Repository ed una Gene Collection (le gene collection nella Repository sono consultabili col comando `getCollections`). Dalla Repository è stata estratta la matrice di enrichment score delle pathways d'interesse, mentre da LINCS la matrice di enrichment score dei farmaci, entrambe le matrici sono state ordinate, sempre con l'ausilio della funzione `rank`. Infine generata la matrice combinata degli enrichment score e dei farmaci, con un ciclo *for*, sono state calcolate le distanze di Manhattan (Figura 3.3) [43] associate ad ogni molecola farmacologica ed infine i dati esportati in un file excel.

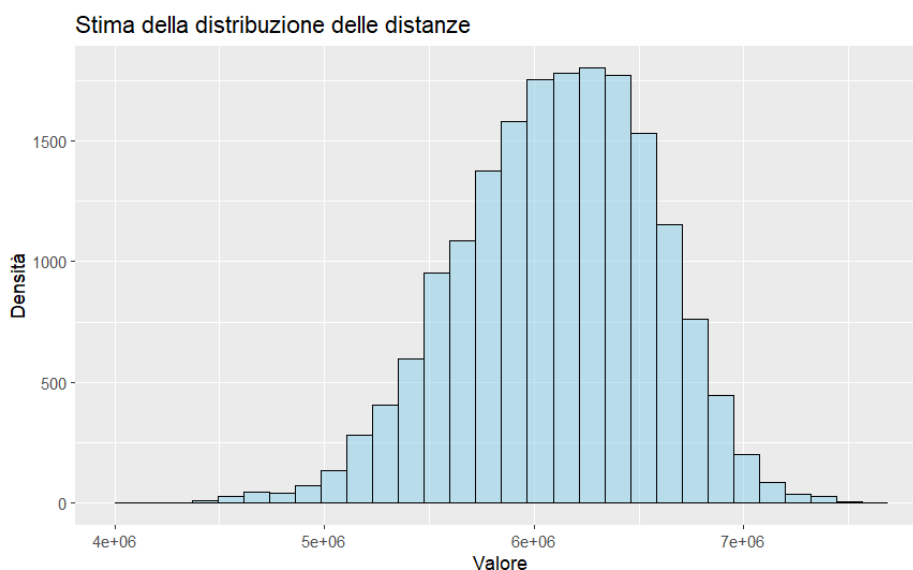


Figura 3.3: Grafico che illustra la distribuzione delle distanze di Manhattan calcolate.

3.4 Risultati

Le distanze associate ad ogni molecola contenuta in L1000, sono state poi validate valutandone la correlazione lineare di Pearson rispetto ad uno score che indica il livello di staminalità di un profilo di espressione. In particolare, dai dati supplementari dello studio relativo al metodo DECCODE [34] sono stati

estratti i valori di *Pluripotency Score* e sono stati allineati ai rispettivi valori delle distanze di Manhattan qui calcolate. Le colonne contenenti i valori di pluripotency score e le distanze di manhattan sono poi state correlate con la funzione `cor` ottenendo così una stima della loro concordanza. È atteso, infatti, che a distanze di Manhattan maggiori, che valutano la dissimilarità rispetto al profilo di differenziamento precedentemente definito, debbano corrispondere score di pluripotenza maggiori. Sulla base degli studi precedenti è altrettanto prevedibile, come di fatto accade, che il valore di tale correlazione risulti non significativo. Questo è dovuto alla larga maggioranza di molecole il cui effetto rispetto al differenziamento è poco significativo. Per questo motivo, si procede ad una analisi dei soli valori estremi. In particolare, i valori di distanza di Manhattan sono stati divisi in 3 gruppi *Primi 30*, *Dati Centrali* ed *Ultimi 30*, per generare un boxplot *Gruppo vs Score Pluripotenza* (Figura 3.4). Il boxplot aiuta a visualizzare la distribuzione delle molecole inducenti la differenziazione ricercata: il valore di pluripotenza cresce cresce lungo l'ordinata, pertanto le molecole che si avvicinano maggiormente al profilo trascrittomico desiderato (induzione di differenziamento) sono quelle appartenenti al gruppo *Primi 30*. Ciò dimostra che il metodo ha efficacemente ordinato i farmaci rispetto all'effetto cercato.

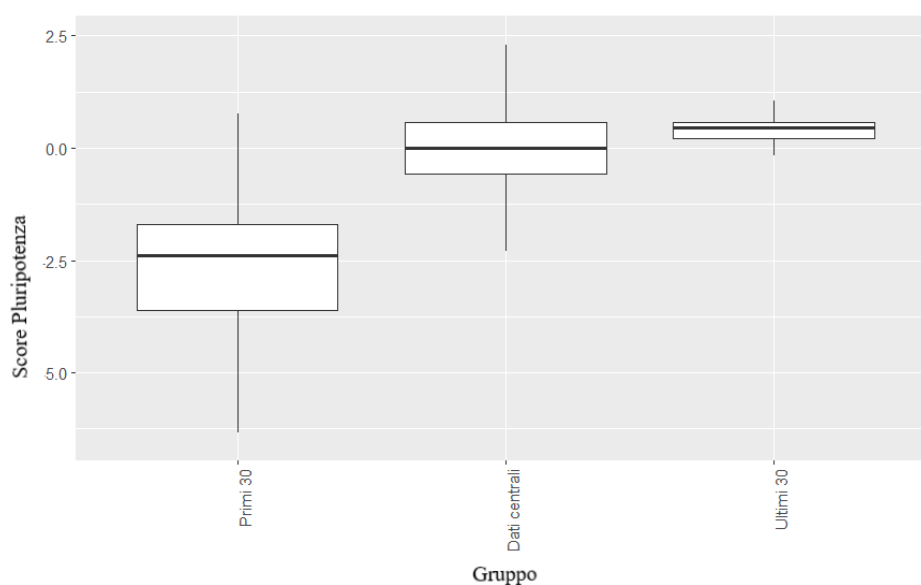


Figura 3.4: Istogramma in cui le molecole sono correlate allo score di pluripotenza.

3.5 Analisi dei Risultati

La (Tabella 3.1) riassume i risultati dell'analisi, sono annotate le molecole del gruppo **Primi 30**. Ricercando in letteratura, è facilmente riscontrabile che

alcune delle molecole identificate sono già state attenzionate nella ricerca, sia in vivo che in vitro, contro il GBM. In particolare le molecole che sono risultate avere una comprovata efficacia terapeutica sono **BMS-777607**, **UNC-669**, **dabrafenib**, **motesanib**, **Y-27632**, **decitabine**, **ibrutinib**, **NVP-AUY922** e **MC1568**. Un'ulteriore fetta delle molecole estratte, come ad esempio *pazopanib* o *QL-XII-47*, risulta avere efficacia contro altre tipologie di cancro, sarebbe quindi interessante studiare in vitro e poi in vivo una possibile applicazione contro il GBM. Tra le molecole estratte tramite il metodo revDECCODE vi è anche il *tirasemtiv*, molecola in passato ritenuta promettente per il trattamento della SLA, ma che non ha poi superato i trials di fase 3. Ci sono infine due farmaci estratti dall'analisi, *tranylcypromine* e *saxagliptin*, che sono risultati essere già approvati e commercializzati per il trattamento di patologie non neoplastiche, il primo per il trattamento della depressione e dell'ansia, il secondo per il trattamento del diabete di tipo 2. Anche queste molecole sono da attenzionare e testare in modelli in vitro e murini, in quanto è sempre possibile un drug repurposing o repositioning.

Molecola	Informazioni	Commento
QL-X-138	Agisce sulle chinasi BTK/MNK inibendole.	Efficacia testata in vitro su Linfociti B cancerosi (Leucemia e Linfomi) [44].
WZ-7043	Agisce sui recettori CSF1R e DDR1 implicati nella migrazione, adesione ed invasione cellulare.	Mutazioni di entrambe i recettori sono associate a diverse neoplasie tra cui il GBM [45, 46].
BMS-777607	Agisce sul recettore RTK-AXL.	Il recettore RTK-AXL è ritenuto un bersaglio farmacologico promettente nel GBM [47].
semagacestat	Agisce inibendo la proteina transmembrana gamma-secretasi.	Non ha superato i trials di fase 3 (trattamento dell'Alzheimer) [48].
pazopanib	Agisce sui recettori VEGFR-1 -2 -3, PDGFR, ITK, LCK, FGFR-1 -3.	E' attualmente usato per il trattamento del carcinoma a cellule renali e del sarcoma dei tessuti molli [49].
LACZ	Nessuna informazione disponibile.	Gene di E.Coli codificante per la beta-galattosidasi [50].
UNC-669	Agisce velocizzando la degradazione del fattore di trascrizione SOX2.	SOX2 regola la pluripotenza delle cellule staminali legandosi al motivo MBT (Malignant Brain Tumor) [51].
JW 55	Agisce inibendo il dominio PARP dei recettori TNKS1/2	Il suo uso nel trattamento del cordoma è supportato da esperimenti in vivo [52].
KIN001-270	Agisce sulla CDK9.	Da studi computazionali risulterebbe essere efficace contro un sottotipo di colangiocarcinoma intraepatico derivante dalle mutazioni di TP53 o KRAS [53].
KIN001-260	Inibitore della proteina IKK-beta.	IKK-beta sembra avere importante ruolo nella riparazione del danno al DNA in differenti neoplasie [54].
PF-04217903	Inibitore competitivo del recettore c-MET.	c-MET è responsabile della crescita, invasione e metastasi in molti tumori [55].

Molecola	Informazioni	Commento
dabrafenib	Inibitore di BRAF (ERK-MERK pathway).	E' attualmente utilizzato nel trattamento del melanoma derivato dalla mutazione BRAFV600. Sono riportati in letteratura casi di GBM responsivi alla molecola [56].
compound e	Inibitore selettivo delle gamma-secretasi e di NOTCH.	Studi in vitro suggeriscono un suo uso nel trattamento del neuroblastoma, la sua azione inibisce crescita e differenziazione del tumore [57].
QL-XII-47	Inibitore del recettore BTK.	E' stata dimostrata la sua efficacia contro la leucemia mieloide acuta FLT3-ITD-positiva [58].
motesanib	Antagonista dei recettori VEGF, PDGF-R e SCFR.	Il suo uso nell'impedimento della transattivazione di MET, in combinazione con altri farmaci, lo rende utile per il trattamento dei gliomi [59].
rebamipide	Farmaco attualmente utilizzato nel trattamento di gastriti ed ulcere duodenali.	E' in discussione una sua potenziale efficacia contro il cancro allo stomaco [60].
Y-27632	Inibitore della Rho-chinasi (ROCK).	ROCK è coinvolta nella migrazione e proliferazione delle cellule di GBM [61].
anacardic-acid	Agisce da inibitore dell' EMT (Epithelial-Mesenchymal transition).	Ha azione antimetastatica su cellule di glioma U-87[62].
tranylcypromine	Farmaco in uso dagli anni 60 utilizzato come antidepressivo ed ansiolitico.	Ricerche in corso per il suo possibile utilizzo come inibitore di LSD1 (Istone Demetilasi A1) nella terapia contro i tumori [63].
decitabine	Agente Ipometilante utilizzato nel trattamento della leucemia mieloide acuta e sindrome mielodisplastica.	E' un possibile agente sensibilizzante per immunoterapia contro il GBM: le cellule trattate in vitro sono più suscettibili ai linfociti T [64].
ibrutinib	Inibitore covalente della BTK, è approvato per il trattamento di neoplasie ematologiche.	Comprovata la sua utilità contro il GBM sono allo studio vettori per avviare all'effetto di primo passaggio epatico [65].
NVP-AUY922	Inibitore di HSP90	Le evidenze attuali la fanno ritenere una molecola promettente per il trattamento del GBM [66].
saxagliptin	Ipoglicemizzante orale utilizzato nel trattamento del diabete di tipo 2.	E' stato osservato un effetto antimetastatico in pazienti operati per cancro del colon-retto e polmone, ma i meccanismi non sono chiari [67].
AST-1306	Inibitore irreversibile di EGFR e ErbB2.	Nel tumore allo stomaco inibisce la transizione EMT e le metastasi [68].
TP53	Nessun dato disponibile.	Gene codificante il fattore di trascrizione P53.
piketopufen	Antinfiammatorio non steroideo (FANS).	
MC1568	Inibitore selettivo della HDAC II (Istone deacetilasi II).	L'uso di tali inibitori per il trattamento del GBM è ben attenzionato nonostante l'azione terapeutica non sia ben caratterizzata [69].
tirasemtiv	Attivatore della troponina dei muscoli scheletrici	La molecola non ha superato i trials di fase 3 (trattamento della SLA) [70].
daminozide	Impiegato come fitoregolatore.	Esperimenti in vitro hanno dimostrato la sua azione di inibizione selettiva sulla KDM2A (Lisina demetilasi) iperespressa nel tumore al seno [71].

Tabella 3.1: Top 30 molecole farmacologiche che inducono il profilo differenziativo ricercato.

3.5.1 BMS-777607

La molecola inibisce le chinasi BTK/MNK (Bruton Tirosine Kinase/ Mitogen Activated Protein Kinase Interacting Kinases. Lo studio [46] ha esaminato

gli effetti di **BMS-777607**, su cellule di GBM in vitro ed ex vivo. Si è osservato che BMS-777607 induceva un aumento dell'apoptosi, una diminuzione della proliferazione e della migrazione nelle cellule GBM SF126 e U118. Inoltre, in vivo è stata osservata una significativa riduzione del volume tumorale nel 56 % dei xenotrapianti SF126 e una remissione superiore al 91 % nei xenotrapianti U118MG. L'effetto anti-angiogenico di BMS-777607 è stato confermato attraverso il test di formazione dei tubi, il quale ha mostrato una soppressione della formazione dei vasi sanguigni, fenomeno che è stato riscontrato anche nei xenotrapianti tumorali. Analisi immunochimiche condotte su tessuto di GBM umano hanno evidenziato la presenza di RTK-AXL fosforilato nelle regioni tumorali ipercellulari, nel fronte migratorio delle cellule tumorali e nei proliferati vascolari interni al tumore. Inoltre, è stata confermata la fosforilazione di RTK-AXL sia nello stato di malattia primario che ricorrente. Questi risultati suggeriscono un potenziale ruolo di BMS-777607 nel trattamento del GBM attraverso la sua capacità di influenzare l'apoptosi, la proliferazione cellulare, la migrazione e l'angiogenesi nel contesto tumorale.

3.5.2 UNC-669

Il target di UNC-669 è il fattore di trascrizione SOX2. Tale fattore trascrizionale gioca un ruolo cruciale nella regolazione della pluripotenza delle cellule staminali, della differenziazione cellulare e della tumorigenesi. Tuttavia, la sua stabilità proteica è soggetta a una regolazione complessa e multilivello che richiede un'approfondita comprensione. La proteina PHF20L1 interagisce con SOX2, opponendosi alla sua ubiquitinazione e degradazione. È stato osservato che **UNC-669**, legandosi al dominio MBT (malignant brain tumor) di PHF20L1 [51] ed inibendolo, accelera la degradazione di SOX2. Queste scoperte forniscono importanti prospettive per lo sviluppo di terapie mirate contro tumori positivi per SOX2, tra cui il GBM.

3.5.3 dabrafenib

Il gene BRAF è il target molecolare del dabrafenib: tipicamente regolato da fattori extracellulari, BRAF mutante porta a una crescita cellulare incontrollata attraverso la via di segnalazione MEK-ERK (proteina chinasi regolata da segnali extracellulari). Sebbene gli inibitori orali del BRAF oncogenico BRAFv600 abbiano dimostrato una certa efficacia nei gliomi, sono descritti diversi meccanismi che mediano la resistenza agli inibitori del BRAF (BRAFi). Tuttavia, è stato

osservato che l'associazione di BRAF con inibitori di MEK attenua questi effetti e migliora la sopravvivenza globale rispetto alla monoterapia con BRAFi nel melanoma metastatico. In particolare, il dabrafenib, un inibitore del BRAF, ha dimostrato di essere efficace nel trattamento dei tumori con mutazioni di BRAF, inclusi i gliomi. Nel paper [56] viene presentato il caso di un paziente con un GBM con BRAFv600 mutato, che ha avuto una risposta clinica e radiografica quando è stato trattato con il **dabrafenib** in combinazione con trametinib. Tale caso sottolinea l'importanza del dabrafenib come agente terapeutico efficace nei tumori con mutazioni di BRAF, aprendo nuove prospettive per il trattamento dei tumori cerebrali primari.

3.5.4 motesanib

La molecola agisce su più recettori: VEGF/EGFR, PDGF-R e SCFR. Il mutante di troncamento del recettore EGFRvIII, è una variante comunemente espressa nel GBM. La presenza di EGFRvIII contribuisce alla tumorigenesi, in parte attraverso la sua capacità di attivare altri recettori tirosina chinasi (RTK). Sebbene il blocco di questa trasattivazione possa costituire una strategia promettente per il trattamento del GBM, il meccanismo sottostante tale fenomeno rimane ancora poco chiaro. Concentrando l'attenzione sul recettore tirosina chinasi MET, la ricerca ha evidenziato che la sua trasattivazione nelle cellule di glioma umano U87MG in vitro è direttamente proporzionale all'attività di EGFRvIII e coinvolge l'eterodimerizzazione di MET associata a una piattaforma di chinasi adesione focale (FAK). Utilizzando un modello murino di GBM intracranico, è stato dimostrato che il targeting simultaneo di EGFRvIII con panitumumab e degli RTK trasattivati con **motesanib** ha portato a una significativa estensione della sopravvivenza rispetto all'uso singolo di ciascuna molecola. Questi risultati sottolineano l'importanza di una terapia multipla mirata per i pazienti affetti da GBM che esprimono EGFRvIII, mutazione che tradizionalmente risponde poco ai trattamenti convenzionali [59].

3.5.5 Y-27632

In studi in vitro, è stata impiegata la linea cellulare umana di GBM LN-18 per investigare l'effetto di **27632**, un inibitore di ROCK, e U0126, un inibitore di MEK, singolarmente o in combinazione [61]. I risultati hanno dimostrato che Y-27632 riduceva la fosforilazione di ERK1/2, inoltre il trattamento con Y-27632 per 24 ore ha inibito la migrazione delle cellule GBM e ha ridotto la

proliferazione delle stesse. I risultati suggeriscono quindi un coinvolgimento della pathway *Rho/ROCK* nella migrazione e nella proliferazione delle cellule di GBM. L'inibizione di ROCK su cellule hiF (human inducible fibroblasts-like), effettuata con Y-27632 ha inoltre dimostrato che ROCK, con la sua azione, impedisce il *Reprogramming* verso la pluripotenenza [72]. In virtù di tali evidenze, Y-27632 risulta essere la molecola più interessante tra quelle estratte, visto l'obiettivo posto con lo sviluppo di revDECCODE.

3.5.6 decitabine

Agente metilante già utilizzato nel trattamento della leucemia mieloide acuta e della sindrome mielodisplastica. Linee cellulari derivate da pazienti con GBM, sono state trattate con **decitabina** (DAC) e sottoposte a una dettagliata analisi molecolare tramite sequenziamento completo del trascrittoma, successivamente, le linee cellulari sono state utilizzate in diversi saggi cellulari per valutare la risposta dei linfociti T specifici per neoantigeni e antigeni tumorali del testicolo (CTA). I risultati hanno chiaramente dimostrato che il trattamento con DAC ha comportato un aumento dell'espressione dell'mRNA dei neoantigeni e dei CTA nelle cellule tumorali. I risultati hanno chiaramente dimostrato che il trattamento con DAC hanno comportato un aumento dell'espressione dell'mRNA dei neoantigeni e dei CTA nelle cellule tumorali [64].

3.5.7 ibrutinib

L'elevata espressione di BTK, è stata associata a una maggiore capacità staminale, potenziale metastatico e resistenza alla terapia antitumorale in GBM. **Ibrutinib** (IBR), un inibitore irreversibile di BTK risulta essere quindi una valida alternativa terapeutica. La ricerca si è concentrata sull'impiego di IBR e idrossiclorochina (HCQ) nel trattamento del GBM, sfruttando nanoparticelle a base di siero albumina umana (HSA) come veicolo di consegna. Attraverso studi in vitro e analisi molecolari, è stato dimostrato che le nanoparticelle HSA, somministrate per via endovenosa, mostrano una capacità di accumulo nei siti tumorali, ritenzione aumentata e la possibile superazione della barriera emato-encefalica. E' stato anche dimostrato che il trattamento con IBR aumenta l'espressione di mRNA dei neoantigeni e degli antigeni tumorali del testicolo (CTA) attraverso l'ipometilazione del DNA, portando a un aumento della pre-

sentazione di neoantigeni da parte del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e all'attivazione dei linfociti T specifici per gli stessi [65].

3.5.8 NVP-AUY922

Inibitore di HSP90 (Heat Shock Protein 90 kDa) E' stato osservato che **NVP-AUY922** mostra una notevole attività anti GBM sia in sistemi di coltura cellulare in vitro che in modelli in vivo di glioblastoma umano, caratterizzati da diverse anomalie genetiche, sia di origine adulta che pediatrica. I modelli sperimentali hanno dimostrato che NVP-AUY922 è in grado di esercitare effetti citostatici, proapoptotici e antiangiogenici, con particolare evidenza di apoptosi estesa nelle linee cellulari di GBM pediatrico. VP-AUY922 induce l'apoptosi, inibendo la fosforilazione sia di ERK che di AKT[66].

3.5.9 MC1568

Studi in vitro e vivo hanno osservato che **MC1568** ha effetti inibitori sulle HDAC II: riduzione dell'invasività e migrazione delle cellule di GBM sono stati osservati chiaramente utilizzando [18F]TFAHA un radiotracciante ad alta affinità per HDAC II. L'assorbimento tumorale del radiotracciante, è significativamente diminuita dopo somministrazione di MC1568 a dimostrazione dell'inibizione, tuttavia i meccanismi con cui ciò avviene non sono ancora chiari [69].

Conclusioni

La drug discovery è un campo in continuo aggiornamento. Al fianco delle metodiche classiche basate sull'informazione strutturale, la trascrittomica ha in breve tempo occupato uno spazio sempre più importante. I risultati raggiunti con il metodo revDECCODE, nonostante la sua relativa semplicità, rappresentano un ulteriore punto a supporto della drug discovery basata sulla trascrittomica. Il metodo ha certamente dei limiti, il principale dei quali probabilmente risiede nel fatto che le risposte trascrittomiche contenute in LINCS L1000 provengono da 41 linee cellulari differenti, che non necessariamente comprendono i tipi cellulari di interesse per l'analisi. Un'altra importante limitazione, che riguarda specificamente questo studio, è la mancanza di validazione sperimentale per le molecole che non sono risultate già essere funzionanti contro il GBM. Accanto ad essa, meno importante ma non trascurabile, anche il fatto che il progetto LINCS, in particolare per quanto riguarda lo sfruttamento della piattaforma L1000, non risulta aggiornato ed ampliato rispetto ai due principali rilasci. Dati di espressione genica indotti da nuovi perturbagen potrebbero portare ad un'identificazione più accurata di nuove ulteriori molecole. Anche il problema della permeabilità della BEE non è stato tenuto in conto nell'analisi. Si potrebbe pensare di tenere in considerazione tale problematica, e in particolare il relativo compromesso derivante dal restringimento del pool di molecole. Ciononostante il problema della BEE potrebbe essere superato adoperando particolari tecniche [73]. Nonostante gli sforzi comuni, patologie come il GBM risultano ancora poco comprese a livello di pathways patogenetiche e di conseguenza lo sviluppo di terapie è deficitario. Saranno quindi cruciali gli ulteriori sforzi nella trascrittomica, grazie a dati sempre più completi ed affinati. Anche il ruolo patogenetico di RNA presenti in quantità minime sarà sperabilmente chiarito attraverso questo tipo di analisi. Il ruolo dei lncRNA e dell'epigenetica nel cancro potrà essere ulteriormente investigato [57], rivelando ulteriori possibili bersagli farmacologici. La *trascrittomica spaziale* è un campo emergente che integra l'analisi dei trascritti con l'informazione spaziale all'interno di tessuti biologici. Questa tecnologia consente di mappare la distribuzione spaziale delle molecole di mRNA all'interno di campioni tissutali, consentendo agli scienziati di comprendere meglio la complessità delle interazioni cellulari e del microambiente tissutali. La trascrittomica spaziale potrebbe introdurre una ulteriore rivoluzione all'interno

della drug discovery in ambito oncologico e non solo: permetterà anche la comprensione di come la posizione fisica di una qualsiasi cellula, rispetto ai suoi vicini e alle strutture non cellulari, influisca nella definizione del fenotipo cellulare, dello stato della cellula e della funzione cellulare e tissutale [74]. Tale evoluzione della trascrittomica, rappresenta quindi un'opportunità senza precedenti per caratterizzare l'eterogeneità tra le cellule che compongono il GMB: sarà possibile analizzare l'interfaccia tumorale [75], le strutture linfoidi terziarie che mostrano microambienti tumorali unici, rendendo possibile una comprensione a 360° del comportamento del GBM nei confronti del tessuto sano. Con questa tesi, abbiamo dunque proposto un passo ulteriore in questa ottica, mostrando la potenzialità dell'approccio omico nell'ulteriore ambito della drug discovery in glioblastoma.

Bibliografia

- [1] A. G. Rivenbark and W. B. Coleman, “Dissecting the molecular mechanisms of cancer through bioinformatics-based experimental approaches,” *Journal of cellular biochemistry*, vol. 101, no. 5, pp. 1074–1086, 2007.
- [2] K. Li, Y. Du, L. Li, and D.-Q. Wei, “Bioinformatics approaches for anti-cancer drug discovery,” *Current drug targets*, vol. 21, no. 1, pp. 3–17, 2020.
- [3] K. Kasaian, Y. Y. Li, and S. J. Jones, “Bioinformatics for cancer genomics,” in *Cancer genomics*. Elsevier, 2014, pp. 133–152.
- [4] A. C. Tan, D. M. Ashley, G. Y. López, M. Malinzak, H. S. Friedman, and M. Khasraw, “Management of glioblastoma: State of the art and future directions,” *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 70, no. 4, pp. 299–312, 2020.
- [5] J. Valdebenito and F. Medina, “Machine learning approaches to study glioblastoma: A review of the last decade of applications,” *Cancer Reports*, vol. 2, no. 6, p. e1226, 2019.
- [6] S. P. Leelananda and S. Lindert, “Computational methods in drug discovery,” *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, vol. 12, pp. 2694–2718, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267>
- [7] S. Vatansever, A. Schlessinger, D. Wacker, H. Ü. Kaniskan, J. Jin, M.-M. Zhou, and B. Zhang, “Artificial intelligence and machine learning-aided drug discovery in central nervous system diseases: State-of-the-arts and future directions,” *Medicinal research reviews*, vol. 41, no. 3, pp. 1427–1473, 2021.
- [8] A. Subramanian, R. Narayan, S. M. Corsello, D. D. Peck, T. E. Natoli, X. Lu, J. Gould, J. F. Davis, A. A. Tubelli, J. K. Asiedu *et al.*, “A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles,” *Cell*, vol. 171, no. 6, pp. 1437–1452, 2017.
- [9] F. Benz and S. Liebner, “Structure and function of the blood–brain barrier (bbb),” in *Physiology, Pharmacology and Pathology of the Blood-Brain Barrier*. Springer, 2020, pp. 3–31.
- [10] X. Liu, C. Chen, and B. J. Smith, “Progress in brain penetration evaluation in drug discovery and development,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 325, no. 2, pp. 349–356, 2008.
- [11] S. Grochans, A. M. Cybulska, D. Simińska, J. Korbecki, K. Kojder, D. Chlubek, and I. Baranowska-Bosiacka, “Epidemiology of glioblastoma multiforme—literature review,” *Cancers*, vol. 14, no. 10, p. 2412, 2022.
- [12] C. Altaner, “Glioblastoma and stem cells-minireview,” *Neoplasma*, vol. 55, no. 5, p. 369, 2008.
- [13] K. P. Becker and J. Yu, “Status quo—standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma,” *The Cancer Journal*, vol. 18, no. 1, pp. 12–19, 2012.
- [14] X. Tang, S. Zhang, R. Fu, L. Zhang, K. Huang, H. Peng, L. Dai, and Q. Chen, “Therapeutic prospects of mrna-based gene therapy for glioblastoma,” *Frontiers in oncology*, vol. 9, p. 1208, 2019.
- [15] M. Tsakiroglou, A. Evans, and M. Pirmohamed, “Leveraging transcriptomics for precision diagnosis: Lessons learned from cancer and sepsis,” *Frontiers in Genetics*, vol. 14, p. 1100352, 2023.

- [16] Z. Dong and Y. Chen, "Transcriptomics: advances and approaches," *Science China Life Sciences*, vol. 56, pp. 960–967, 2013.
- [17] A. Singh and N. Kumar, "A review on dna microarray technology," *International Journal of Current Research and Review*, vol. 5, no. 22, p. 1, 2013.
- [18] T. Hu, N. Chitnis, D. Monos, and A. Dinh, "Next-generation sequencing technologies: An overview," *Human Immunology*, vol. 82, no. 11, pp. 801–811, 2021.
- [19] G. Chen, B. Ning, and T. Shi, "Single-cell rna-seq technologies and related computational data analysis," *Frontiers in genetics*, vol. 10, p. 317, 2019.
- [20] J. Zhu, J. Wang, X. Wang, M. Gao, B. Guo, M. Gao, J. Liu, Y. Yu, L. Wang, W. Kong *et al.*, "Prediction of drug efficacy from transcriptional profiles with deep learning," *Nature biotechnology*, vol. 39, no. 11, pp. 1444–1452, 2021.
- [21] B. Verbist, G. Klambauer, L. Vervoort, W. Talloen, Z. Shkedy, O. Thas, A. Bender, H. W. Göhlmann, S. Hochreiter, Q. Consortium *et al.*, "Using transcriptomics to guide lead optimization in drug discovery projects: Lessons learned from the qstar project," *Drug discovery today*, vol. 20, no. 5, pp. 505–513, 2015.
- [22] S. Saikia and M. Bordoloi, "Molecular docking: challenges, advances and its use in drug discovery perspective," *Current drug targets*, vol. 20, no. 5, pp. 501–521, 2019.
- [23] S. Makin, "The rna and protein landscape that could bring precision medicine to more people." *Nature*, vol. 585, no. 7826, pp. S7–S7, 2020.
- [24] P. Brennan and C. P. Wild, "Genomics of cancer and a new era for cancer prevention," *PLoS genetics*, vol. 11, no. 11, p. e1005522, 2015.
- [25] S. Supplitt, P. Karpinski, M. Sasiadek, and I. Laczmanska, "Current achievements and applications of transcriptomics in personalized cancer medicine," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 3, 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1422>
- [26] B. Chen, L. Ma, H. Paik, M. Sirota, W. Wei, M.-S. Chua, S. So, and A. J. Butte, "Reversal of cancer gene expression correlates with drug efficacy and reveals therapeutic targets," *Nature communications*, vol. 8, no. 1, p. 16022, 2017.
- [27] M. E. Saeed, O. Kadioglu, H. J. Greten, A. Yildirim, K. Mayr, F. Wenz, F. A. Giordano, and T. Efferth, "Drug repurposing using transcriptome sequencing and virtual drug screening in a patient with glioblastoma," *Investigational new drugs*, vol. 39, pp. 670–685, 2021.
- [28] D. Eisenbarth and Y. A. Wang, "Glioblastoma heterogeneity at single cell resolution," *Oncogene*, pp. 1–11, 2023.
- [29] Q. Meng, Y. Zhang, G. Li, Y. Li, H. Xie, and X. Chen, "New insights for precision treatment of glioblastoma from analysis of single-cell lncrna expression," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 147, pp. 1881–1895, 2021.
- [30] A. B. Keenan, S. L. Jenkins, K. M. Jagodnik, S. Koplev, E. He, D. Torre, Z. Wang, A. B. Dohlman, M. C. Silverstein, A. Lachmann *et al.*, "The library of integrated network-based cellular signatures nih program: system-level cataloging of human cells response to perturbations," *Cell systems*, vol. 6, no. 1, pp. 13–24, 2018.
- [31] F. M. van der Kloet, J. Buurmans, M. J. Jonker, A. K. Smilde, and J. A. Westerhuis, "Increased comparability between rna-seq and microarray data by utilization of gene sets," *PLoS computational biology*, vol. 16, no. 9, p. e1008295, 2020.

- [32] A. Uneda, K. Kurozumi, A. Fujimura, K. Fujii, J. Ishida, Y. Shimazu, Y. Otani, Y. Tomita, Y. Hattori, Y. Matsumoto *et al.*, “Differentiated glioblastoma cells accelerate tumor progression by shaping the tumor microenvironment via ccn1-mediated macrophage infiltration,” *Acta Neuropathologica Communications*, vol. 9, pp. 1–23, 2021.
- [33] M. Marzagalli, F. Fontana, M. Raimondi, and P. Limonta, “Cancer stem cells—key players in tumor relapse,” *Cancers*, vol. 13, no. 3, p. 376, 2021.
- [34] F. Napolitano, T. Rapakoulia, P. Annunziata, A. Hasegawa, M. Cardon, S. Napolitano, L. Vaccaro, A. Iuliano, L. G. Wanderlingh, T. Kasukawa *et al.*, “Automatic identification of small molecules that promote cell conversion and reprogramming,” *Stem cell reports*, vol. 16, no. 5, pp. 1381–1390, 2021.
- [35] A. Liberzon, A. Subramanian, R. Pinchback, H. Thorvaldsdóttir, P. Tamayo, and J. P. Mesirov, “Molecular signatures database (MSigDB) 3.0,” *Bioinformatics*, vol. 27, no. 12, pp. 1739–1740, 05 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260>
- [36] A. Liberzon, C. Birger, H. Thorvaldsdóttir, M. Ghandi, J. P. Mesirov, and P. Tamayo, “The molecular signatures database hallmark gene set collection,” *Cell systems*, vol. 1, no. 6, pp. 417–425, 2015.
- [37] A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander *et al.*, “Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 43, pp. 15 545–15 550, 2005.
- [38] M. Castellan, A. Guarnieri, A. Fujimura, F. Zanconato, G. Battilana, T. Panciera, H. L. Sladitschek, P. Contessotto, A. Citron, A. Grilli *et al.*, “Single-cell analyses reveal yap/taz as regulators of stemness and cell plasticity in glioblastoma,” *Nature cancer*, vol. 2, no. 2, pp. 174–188, 2021.
- [39] E. Clough and T. Barrett, “The gene expression omnibus database,” *Statistical Genomics: Methods and Protocols*, pp. 93–110, 2016.
- [40] V. W. Berger and Y. Zhou, “Kolmogorov–smirnov test: Overview,” *Wiley statsref: Statistics reference online*, 2014.
- [41] F. Napolitano, D. Carrella, X. Gao, and D. Di Bernardo, “gep2pep: a bioconductor package for the creation and analysis of pathway-based expression profiles,” 2020.
- [42] J. Feng, C. A. Meyer, Q. Wang, J. S. Liu, X. Shirley Liu, and Y. Zhang, “Gfold: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from rna-seq data,” *Bioinformatics*, vol. 28, no. 21, pp. 2782–2788, 2012.
- [43] E. Kobayashi, T. Fushimi, K. Saito, and T. Ikeda, “Similarity search by generating pivots based on manhattan distance,” in *PRICAI 2014: Trends in Artificial Intelligence: 13th Pacific Rim International Conference on Artificial Intelligence, Gold Coast, QLD, Australia, December 1-5, 2014. Proceedings 13*. Springer, 2014, pp. 435–446.
- [44] H. Wu, C. Hu, A. Wang, E. L. Weisberg, Y. Chen, C.-H. Yun, W. Wang, Y. Liu, X. Liu, B. Tian *et al.*, “Discovery of a btk/mnk dual inhibitor for lymphoma and leukemia,” *Leukemia*, vol. 30, no. 1, pp. 173–181, 2016.
- [45] J. Wen, S. Wang, R. Guo, and D. Liu, “Csf1r inhibitors are emerging immunotherapeutic drugs for cancer treatment,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 245, p. 114884, 2023.
- [46] A. Elkamhawy, Q. Lu, H. Nada, J. Woo, G. Quan, and K. Lee, “The journey of ddr1 and ddr2 kinase inhibitors as rising stars in the fight against cancer,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 12, p. 6535, 2021.

- [47] J. Onken, R. Torka, S. Korsing, J. Radke, I. Krenteskaia, M. Nieminen, X. Bai, A. Ullrich, F. Heppner, and P. Vajkoczy, “Inhibiting receptor tyrosine kinase axl with small molecule inhibitor bms-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 9, p. 9876, 2016.
- [48] S. Tagami, K. Yanagida, T. S. Kodama, M. Takami, N. Mizuta, H. Oyama, K. Nishitomi, Y.-w. Chiu, T. Okamoto, T. Ikeuchi *et al.*, “Semagacestat is a pseudo-inhibitor of γ -secretase,” *Cell reports*, vol. 21, no. 1, pp. 259–273, 2017.
- [49] S. Miyamoto, S. Kakutani, Y. Sato, A. Hanashi, Y. Kinoshita, and A. Ishikawa, “Drug review: pazopanib,” *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 48, no. 6, pp. 503–513, 2018.
- [50] D. H. Juers, B. W. Matthews, and R. E. Huber, “LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance,” *Protein Science*, vol. 21, no. 12, pp. 1792–1807, 2012.
- [51] Q. Wang, M. Yu, Y. Ma, X. Zhang, H. Zhang, S. Li, R. Lan, and F. Lu, “Phf201l antagonizes sox2 proteolysis triggered by the mll1/wdr5 complexes,” *Laboratory Investigation*, vol. 98, no. 12, pp. 1627–1641, 2018.
- [52] X. Cao, Y. Lu, Y. Liu, Y. Zhou, H. Song, W. Zhang, D. Davis, J. Cui, S. Hao, J. Jung *et al.*, “Combination of parp inhibitor and temozolomide to suppress chordoma progression,” *Journal of Molecular Medicine*, vol. 97, pp. 1183–1193, 2019.
- [53] C. Guo, Z. Liu, Y. Yu, Y. Chen, H. Liu, Y. Guo, Z. Peng, G. Cai, Z. Hua, X. Han *et al.*, “Tp53/kras co-mutations create divergent prognosis signatures in intrahepatic cholangiocarcinoma,” *Frontiers in Genetics*, vol. 13, p. 844800, 2022.
- [54] J. A. Prescott and S. J. Cook, “Targeting ikk β in cancer: challenges and opportunities for the therapeutic utilisation of ikk β inhibitors,” *Cells*, vol. 7, no. 9, p. 115, 2018.
- [55] H. Y. Zou, Q. Li, J. H. Lee, M. E. Arango, K. Burgess, M. Qiu, L. D. Engstrom, S. Yamazaki, M. Parker, S. Timofeevski *et al.*, “Sensitivity of selected human tumor models to pf-04217903, a novel selective c-met kinase inhibitor,” *Molecular cancer therapeutics*, vol. 11, no. 4, pp. 1036–1047, 2012.
- [56] M. Kushnirsky, L. G. Feun, S. H. Gultekin, and M. I. de la Fuente, “Prolonged complete response with combined dabrafenib and trametinib after braf inhibitor failure in braf-mutant glioblastoma,” *JCO precision oncology*, vol. 4, 2020.
- [57] G. Ferrari-Toninelli, S. A. Bonini, D. Uberti, L. Buizza, P. Bettinsoli, P. L. Poliani, F. Facchetti, and M. Memo, “Targeting notch pathway induces growth inhibition and differentiation of neuroblastoma cells,” *Neuro-oncology*, vol. 12, no. 12, pp. 1231–1243, 2010.
- [58] C. Hu, F. Zou, A. Wang, W. Miao, Q. Liang, E. L. Weisberg, Y. Wang, J. Liu, W. Wang, and Q. Liu, “Targeting chaperon protein hsp70 as a novel therapeutic strategy for flt3-itd-positive acute myeloid leukemia,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 1, p. 334, 2021.
- [59] S. A. Greenall, J. F. Donoghue, M. Van Sinderen, V. Dubljevic, S. Budiman, M. Devlin, I. Street, T. E. Adams, and T. G. Johns, “Egfrviii-mediated transactivation of receptor tyrosine kinases in glioma: mechanism and therapeutic implications,” *Oncogene*, vol. 34, no. 41, pp. 5277–5287, 2015.
- [60] D. S. Min, “A potential efficacy of rebamipide as anti-gastric cancer drug,” *Journal of Life Science*, vol. 26, no. 10, pp. 1214–1217, 2016.
- [61] V. M. Zohrabian, B. Forzani, Z. Chau, R. Murali, and M. Jhanwar-Uniyal, “Rho/rock and mapk signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation,” *Anticancer research*, vol. 29, no. 1, pp. 119–123, 2009.

- [62] P. Shilpa, K. Kaveri, and B. P. Salimath, "Anti-metastatic action of anacardic acid targets vegf-induced signalling pathways in epithelial to mesenchymal transition," *Drug Discoveries & Therapeutics*, vol. 9, no. 1, pp. 53–65, 2015.
- [63] Y. C Zheng, B. Yu, G. Z Jiang, X. J Feng, P. X He, X. Y Chu, W. Zhao, and H. M Liu, "Irreversible lsd1 inhibitors: application of tranylcypromine and its derivatives in cancer treatment," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 16, no. 19, pp. 2179–2188, 2016.
- [64] R. Ma, M. Rei, I. Woodhouse, K. Ferris, S. Kirschner, A. Chandran, U. Gileadi, J.-L. Chen, M. Pereira Pinho, Y. Ariosa-Morejon *et al.*, "Decitabine increases neoantigen and cancer testis antigen expression to enhance t-cell-mediated toxicity against glioblastoma," *Neuro-oncology*, vol. 24, no. 12, pp. 2093–2106, 2022.
- [65] Z. Yang, Y. Du, L. Lei, X. Xia, X. Wang, F. Tong, Y. Li, and H. Gao, "Co-delivery of ibrutinib and hydroxychloroquine by albumin nanoparticles for enhanced chemotherapy of glioma," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 630, p. 122436, 2023.
- [66] N. Gaspar, S. Y. Sharp, S. A. Eccles, S. Gowan, S. Popov, C. Jones, A. Pearson, G. Vassal, and P. Workman, "Mechanistic evaluation of the novel hsp90 inhibitor nvp-auy922 in adult and pediatric glioblastoma," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 9, no. 5, pp. 1219–1233, 2010.
- [67] R. Varela-Calviño, M. Rodríguez-Quiroga, P. Dias Carvalho, F. Martins, A. Serra-Roma, L. Vázquez-Iglesias, M. Paez de la Cadena, S. Velho, and O. J. Cordero, "The mechanism of sitagliptin inhibition of colorectal cancer cell lines' metastatic functionalities," *IUBMB life*, vol. 73, no. 5, pp. 761–773, 2021.
- [68] G. Song, H. Zhang, C. Chen, L. Gong, B. Chen, S. Zhao, J. Shi, J. Xu, and Z. Ye, "mir-551b regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer by inhibiting erbb4 expression," *Oncotarget*, vol. 8, no. 28, p. 45725, 2017.
- [69] L. Everix, E. N. Seane, T. Ebenhan, I. Goethals, and J. Bolcaen, "Introducing hdac-targeting radiopharmaceuticals for glioblastoma imaging and therapy," *Pharmaceutics*, vol. 16, no. 2, p. 227, 2023.
- [70] A. Philippidis, "Unlucky 13: Top clinical trial failures of 2017: In missing their primary endpoints, these drugs sparked layoffs, losses, and a ceo resignation," *Genetic Engineering & Biotechnology News*, vol. 38, no. 3, pp. 6–6, 2018.
- [71] J.-Y. Chen, C.-F. Li, P.-Y. Chu, Y.-S. Lai, C.-H. Chen, S. S. Jiang, M.-F. Hou, and W.-C. Hung, "Lysine demethylase 2a promotes stemness and angiogenesis of breast cancer by upregulating jagged1," *Oncotarget*, vol. 7, no. 19, p. 27689, 2016.
- [72] D. Cacchiarelli, C. Trapnell, M. J. Ziller, M. Soumillon, M. Cesana, R. Karnik, J. Donaghey, Z. D. Smith, S. Ratanasirintrao, X. Zhang *et al.*, "Integrative analyses of human reprogramming reveal dynamic nature of induced pluripotency," *Cell*, vol. 162, no. 2, pp. 412–424, 2015.
- [73] R. Gabathuler, "Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases," *Neurobiology of disease*, vol. 37, no. 1, pp. 48–57, 2010.
- [74] C. G. Williams, H. J. Lee, T. Asatsuma, R. Vento-Tormo, and A. Haque, "An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research," *Genome Medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 1–18, 2022.
- [75] N. Yoosuf, J. F. Navarro, F. Salmén, P. L. Ståhl, and C. O. Daub, "Identification and transfer of spatial transcriptomics signatures for cancer diagnosis," *Breast Cancer Research*, vol. 22, pp. 1–10, 2020.

Ringraziamenti

Voglio ringraziare il mio relatore, il Professor Napolitano per il percorso svolto, per la pazienza e per tutto ciò che mi ha insegnato (non solo nel campo della bioinformatica, ma soprattutto come persona) nel corso di questi mesi. Se diventerò un professionista nel campo della bioinformatica sarà anche grazie a Lei.

Ringrazio i miei genitori, con cui sono spesso in disaccordo sulle questioni giornaliere di vita, non mi avete mai posto freni di nessun tipo e di questo ve ne sono grato. Vi ringrazio anche per la comprensione che avete nei miei riguardi, spesso non capite il perché io mi comporti in un certo modo e mi rendo conto di essere scostante, ma voi mi amate incondizionatamente, non è una cosa banale.

A Peppone, ormai come un fratello per me, ci siamo incontrati per caso facendo i deficienti, mi sei poi stato vicino nel periodo più difficile della mia vita, supportandomi e non lasciandomi solo, non dimenticherò mai quel che hai fatto per me. Ah poi mi hai anche introdotto al mondo di Berserk, quindi hai anche fatto qualche guaio.

A Ludo, la mia fotografia personale, tu e Peppone mi avete fatto sentire ogni giorno che ho passato Benevento come fossi a casa mia. Grazie per tutto il supporto che mi hai dato, costante ed incondizionato. Anche tu mi sei stata vicina quando ho toccato il fondo, non ti ringrazierò mai abbastanza per tutto ciò.

A Felicita, compagna di "sventure" bioinformatiche. Le giornate intere passate nel laboratorio di informatica, i pezzi di pizza alla tavola calda, le nevrosi che ci ha dato R ed i suoi crash. Ma che ne fanno gli altri "biocosi". Grazie per aver reso le ore di tirocinio divertenti e spensierate.

A Chiara, amica fedele e provider di fiducia di appunti e dispense. Le nostre chat riguardo gli allenamenti in palestra sono la storia! Grazie per esser sempre stata disponibile con me, ti voglio bene!

A Luca, il mio gymbro di fiducia, che sia pioggia o che sia sole, si va in palestra a martellare. Grazie per il continuo spronarmi a fare meglio in allena-

mento, mi ha indurito e reso più tosto caratterialmente. Grazie anche per tutti gli smems che mi hai mandato.

Grazie a Simone, mio fratello calabrese. Hai ascoltato la mia storia e mi hai aiutato a crescere come persona, in barba a chi dice che non si possano creare belle amicizie grazie ai social. I nostri inside jokes mi hanno sempre strappato un sorriso, anche nei giorni più bui e duri, grazie di cuore.

Un ringraziamento speciale anche ai ragazzi del gruppo "Bro support": Nunzio, Davide ed Ylenia. Persone speciali, con cui si può discutere apertamente di tutto e soprattutto, sempre pronte ad aiutarmi, in qualunque situazione, nonostante le centinaia di km che ci dividono.

Ad Alex, sei la persona più fuori di testa che io conosca. Mi hai sempre rallegrato le giornate con le tue uscite improvvise ed i tuoi video assurdi. King dello shitpost.

A Narsete, il pro nucleare di fiducia (HAIL AVVOCATO DELL'ATOMO), per tutte le discussioni su temi di cui non sembra fregare a nessuno, mi hai fatto sentire meno solo

Ad Alessandro, uno dei pochi che riesce a capire quanto si deve esser "autistici" per essere appassionati di allenamento contro resistenze. Grazie per tutte le chiacchierate e le risate a tema.

Un ringraziamento al compianto Kentaro Miura per Berserk. La filosofia dietro Berserk mi aiutato ad affrontare le sfide più dure che la vita mi ha riservato (inclusa questa Laurea) e riserverà, RIP.

Grazie Gatsu, non hai mai smesso di combattere, nemmeno quando tutto sembrava perduto. La tua lotta è la lotta di ogni essere umano che non ha mai smesso di crederci. Ed io non ho mai smesso di credere in me stesso, anzi, ho appena iniziato.

Grazie Travis Scott, Kanye West, Sampha, Pino Daniele e tutti gli altri artisti, la musica che ho ascoltato è stata la colonna sonora perfetta per questo incredibile viaggio.

Un grazie anche a chi non c'è più. Sareste stati contenti di vedermi realizzato, ma il destino non ha voluto. Non credo ci sia nulla dopo la morte, ed è per questo che dopo il DNA, la cosa più importante è il ricordo. Io non vi dimentico.

Un ringraziamento anche a tutte le persone che ho incontrato durante questa esperienza e non cito direttamente, ho sempre pensato che ogni persona quando interagisce con le altre dia qualcosa di se agli altri, vi ringrazio.

Infine un ringraziamento a Martina. Ci siamo voluti bene, poi odiati, poi ignorati. Anche se non sei più nella mia vita, la catena di eventi che mi ha portato alla fine di questo percorso, l'hai innescata tu. Grazie, dovunque tu sia, ti auguro il meglio.

Ah, poi grazie a me stesso. Solo tu sai cosa hai passato, l'hai vissuto in prima persona. E nonostante tutto, sei ancora qui, a plasmare il tuo futuro e te stesso, giorno dopo giorno, KEEP GRINDING.



Figura 3.5: Can we get much higher?