

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Julija  
MOZŪRAITIENĖ

# Naujų molekulinių taikinių metastazavusiai melanomai gydyti paieška tarp E3 ubikvitino ligazių

**DAKTARO DISERTACIJA**

Medicinos ir sveikatos mokslai,  
Medicina (M 001)

---

Vilnius 2020

Disertacija rengta 2015–2020 metais Vilniaus universitete. Moksliniai tyrimai atlikti Nacionaliniame vėžio institute ir Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba. Doktorantūra buvo finansuojama ES struktūrinių fondų lėšomis.

**Mokslinė vadovė:**

**dr. Živilė Gudlevičienė** (Nacionalinis vėžio institutas; medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.96>  
<https://orcid.org/0000-0003-0736-2285>

VILNIUS UNIVERSITY

Julija  
MOZŪRAITIENĖ

# New molecular targets among E3 ubiquitin ligases for the treatment of metastatic melanoma

**DOCTORAL DISSERTATION**

Medical and Health Sciences,  
Medicine (M 001)

---

Vilnius 2020

The dissertation was prepared over the period from 2015 through 2020 at the Vilnius University. The research was conducted at the National Cancer Institute and the Life Sciences Center of Vilnius University.

The research was supported by the Research Council of Lithuania, and doctoral studies were funded by the EU Structural Funds.

**Scientific supervisor:**

**Dr. Živilė Gudlevičienė** (National Cancer Institute; Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	7
ĮVADAS .....	11
1. DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI.....	14
1.1. Darbo tikslas.....	14
1.2. Darbo uždaviniai .....	14
2. DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ .....	15
2.1. Autoriaus indėlis.....	16
3. LITERATŪROS APŽVALGA .....	17
3.1. Odos melanoma ir jos paplitimas .....	17
3.2. Rizikos veiksniai melanomai išsivystyti .....	18
3.3. Melnomos vystymosi stadijos ir klasifikacija.....	20
3.4. Melnomos gydymo metodai .....	25
3.5. Ubikvitino proteosomos sistema ir pagrindiniai signaliniai keliai ir genai, dalyvaujantys vystantis melanomai .....	28
3.5.1. Ubikvitilimo procesas ir ubikvitino ligazės.....	29
3.5.2. E3 ubikvitino ligazė FBXW7 .....	34
3.5.3. E3 ubikvitino ligazė MDM2.....	39
3.6. E3 ubikvitino ligazių reikšmė melanomos terapijoje.....	44
3.6.1. Naujos kartos MDM2–p53 sąveikos slopikliai nutlinas–3 ir RITA ...	45
3.6.2. E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas .....	47
4. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI.....	50
4.1. Tiriamosios grupės charakteristikos .....	50
4.2. Tyrimo metodai .....	53
4.2.1. Mėginių paruošimas .....	53
4.2.2. Ląstelių gyvybingumo nustatymas.....	55
4.2.3. Kiekybinė PGR.....	55
4.2.4. Audinių mikrogardelių imunohistocheminė (IHC) analizė .....	57

4.2.5. Statistinė duomenų analizė.....	58
5. REZULTATAI.....	60
5.1. E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos (MDM2–p53) slopiklių nutlino–3 ir RITA, E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir jų derinių poveikis žmogaus metastazavusios melanomos ląstelėms.....	60
5.1.1. MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA, E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino poveikio žmogaus metastazavusios melanomos SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumui įvertinimas.....	60
5.1.2. MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA, E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir jų derinių poveikio FM–3 ir FM–94 linijų ląstelių gyvybingumui įvertinimas.....	62
5.1.3. Genų raiškos pokyčių analizė.....	68
5.2. E3 ubikvitino ligazių FBXW7 ir MDM2 bei jų substratų p53 ir c–Myc baltymų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų pooperacinėje medžiagoje.....	72
5.2.1. FBXW7 baltymo raiškos tyrimo analizė.....	73
5.2.2. p53 baltymo raiškos tyrimo analizė.....	75
5.2.3. c–Myc baltymo raiškos tyrimo analizė.....	77
5.2.4. MDM2 baltymo raiškos tyrimo analizė.....	79
5.2.5. Sąsajų tarp FBXW7, c–Myc, MDM2 ir p53 baltymų raiškos pokyčių analizė.....	80
5.2.6. Vienaveiksmė ir daugiaveiksmė Cox regresijos analizė.....	81
6. REZULTATŲ APTARIMAS.....	84
IŠVADOS.....	95
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	96
PRIEDAI.....	114

## SANTRUMPOS

- AJCC – Amerikos jungtinis vėžio komitetas (angl. *American Joint Committee on Cancer*)
- AKT – serino / treonino kinazė (angl. *Serine / threonineprotein kinase*)
- APC / C – anafazę skatinantis kompleksas / ciklosoma (angl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*)
- BBC3 – genas koduojantis BCL2 šeimos baltymą, BCL2 jungiantis komponentas 3 (angl. *BCL2 binding component 3*)
- BRAF – protoonkogenas B-Raf, serino / treonino kinazė (angl. *Serine/threonine-protein kinase B-Raf*)
- C / EBP– δ-CCAAT – baltymo prisijungimo stipriklis (angl. *CCAAT / enhancer-bindingprotein-δ*)
- CDK4 – nuo ciklino priklausoma kinazė 4 (angl. *cyclin-dependent kinase 4*)
- CDKN2A – nuo ciklino priklausomas kinazės slopiklis 2A (angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)
- CKIT – receptorinė tirozino kinazė, protoonkogenas (angl. *tyrosine-protein kinase KIT*)
- c-Myc, c-Jun – ląstelės ciklą aktyvinantys transkripcijos veiksniai
- CCNE1 – ciklinas E1, genas, koduojantis ciklinų šeimos baltymą E1 (angl. *cyclin E1*)
- CI – pasikliautinis intervalas (angl. *Confidence Interval*)
- CTLA-4 – citotoksinių T-limfocitų reguliatorius (slopiklis) 4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyteassociated protein 4*)
- DNR – deoksiribonukleo rūgštis
- DMSO – dimetilsulfoksidą
- DNS – displastinių apgamų sindromas (angl. *dysplastic nevus syndrome*)
- DUB – deubikvitilimas
- EGF – epidermio augimo veiksnys (angl. *epidermal growth factor*)
- EMT – epitelio–mezenchimos virsmas
- ERK / MAPK – neląstelinio veiksnio (*signal*) reguliuojama kinazė, dalyvaujanti MAPK / ERK signaliniame kelyje (angl. *extracellular signal-regulated kinase*)
- FAMMM – šeiminių atipinių apgamų–melanomos sindromas
- FBW7 – konservatyvios F–sekos ir WD pakartotiną domeną turintis baltymas 7
- FDA – Maisto ir vaistų administracija, JAV (angl. *Food and drug administration*)

FGF – fibroblastų augimo veiksnys (angl. *fibroblast growth factors*)  
gp100 – glikoproteinas 100  
HECT – Konservatyvus ubikvitino ligazės domenas (angl. *homologous to the E6 AP carboxyl terminus*)  
HDM2 – baltymo ubikvitino ligazė (angl. *human double minute 2 homolog*)  
HGF – hepatocitų augimo veiksnys (angl. *hepatocyte growth factor*)  
HIF-1 $\alpha$  – hipoksijos indukuojamas veiksnys-1 $\alpha$   
HR – rizikos santykis (angl. *hazard ratio*)  
IARC – Tarptautinė vėžio tyrimų agentūra (angl. *International Agency for Research on Cancer*)  
*In vitro* – (lot.: stikle) tyrimai atlikti su negyvais organizmais  
*In vivo* – (lot.: gyvame) tyrimai atlikti su gyvais organizmais  
JAG1, JAG2 ir DLL1 – NOTCH receptoriaus ligandai (angl. *Jagged1, Jagged1* ir *delta-likeliland 1*)  
KIT – receptorinė tirozino kinazė KIT  
KLF5 – Į Kruppel panašių transkripcijos veiksnių 5-os šeimos baltymai, pasižymintys „cinko pirštų“ domenais  
MAPK – mitogenu aktyvinama proteinkinazė  
MAS – melanomos ir astrocitomos sindromas  
MC1R – melanokortino 1 receptorius  
Mcl-1 – mieloidinių ląstelių leukemijos baltymas Mcl1  
MDM2 – baltymo ubikvitino ligazė (angl. *mouse double minute 2 homolog*)  
MEK1 / MEK2 – dvigubo specifiškumo mitogenu aktyvinamos baltymų kinazės 1/2, dalyvaujančios MAPK / ERK signaliniame kelyje (angl. *MAP kinase / ERK kinase*)  
MSH – melanocitus stimuliuojantis hormonas  
mTOR – žinduolių *rapamicino* taikiny (angl. *mammalian target of rapamycin*)  
 $\mu$ M – mikromoliai  
n – atvejų skaičius  
NF1 – 1 tipo neurofibromatozė  
NICD – Notch viduląstelinis domenas (angl. *Notch intracellular domain*)  
NRAS – RAS genų šeimos protoonkogenas NRAS  
NRF1 – branduolio kvėpavimo veiksnys 1 (angl. *nuclear respiratory factor 1*)  
p – reikšmingumo lygmuo



p14ARF, p16INK4a – CDKN2A lokuso alternatyvaus skaitymo rėmelio baltymai, nuo ciklinų priklausomų kinazių slopikliai, naviką slopinančių genų produktai

p53 / *TP53* – baltymas p53, naviką slopinantis genas, koduojantis p53 baltymą

PD-1 – programuotos ląstelių mirties baltymas-1 (angl. *programmed cell death protein1*), reguliuojantis imuninį atsaką

PDGF – trombocitų augimo veiksnys (angl. *platelet-derived growth factor*)

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinazė (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PTEN – lipidų-baltymų fosfatazė, AKT slopiklis (angl. *phosphatase and tenesin homologue*)

PUVA – psoralenas kartu su ultravioletiniais A (UVA) spinduliais

PUMA – *p53* reguliuojamas apoptozės modulatorius (angl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*)

RAS / RAF / MEK / ERK – kinazės, dalyvaujančios MEK / ERK signaliniame procese

RBX1 / ROC1 ir RBX2 / ROC2 – RING tipo baltymai

RG7112 / RG7388 – farmakologiškai optimizuota nutlino-3 forma

RING – „cinko pirštų“ domenai, sudarantis ubikvitino ligazės (angl. *really interesting new gene*)

RITA – mažos molekulinės masės junginys, aktyvinantis apoptozę P53 funkcija pasižyminčiose ir nepasižyminčiose ląstelėse (angl. *reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*)

SAG – apoptozei jautrus genas (angl. *sensitive to apoptosis gene*)

SCF – S ląstelės dalijimosi fazę skatinantis veiksnys

SKP1 / Cullin-1 – konservatyvia F-seka pasižymintys baltymai

SREBP – sterolio reguliavimo elementą surišantys baltymai (angl. *sterol regulatory element binding proteins*)

TMA – audinių mikrogardelės

TNM – piktybinių navikų išplitimo vertinimo sistema ( angl. *tumor, nodes, metastasis*)

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. *vascular endothelial growth factor*)

vs – lyginant (lot. *versus*)

Wnt – onkogeninis signalinis procesas (pavadinimas kilęs iš genų *Wingless* ir *Int-1* pavadinimų)

$\chi^2$  – Pearsono chi-kvadrato testas

XIAP – su X susijęs apoptozės slopiklis (angl. *X-linked inhibitor of apoptosis*)

## ĮVADAS

Odos melanoma yra agresyviausias odos vėžys tarp visų odos vėžio formų. Sergamumas melanoma didėja kiekvienais metais. Per pastaruosius tris dešimtmečius melanomos paplitimas pasaulyje padidėjo daugiau nei dvigubai. Nors melanoma sudaro mažiau nei 5 proc. visų odos vėžio atvejų, mirtingumas nuo melanomos siekia daugiau kaip 70 proc. visų mirčių tarp odos navikų (1). Nacionalinio vėžio instituto Vėžio registro duomenimis, sergamumas melanoma Lietuvoje per pastarąjį dešimtmetį padvigubėjo ir sudaro apie 320 naujų atvejų per metus (2).

Pagrindinis melanomos gydymas yra operacinis naviko pašalinimas, tačiau, esant išplitusiai melanomai ir atsiradus tolimoms metastazėms, reikalingas papildomas taikinių arba imunoterapinis gydymas. Metastazės lemia daugumą su melanoma susijusių mirčių (3, 4). Dar prieš dešimtmetį vidutinis pacientų, sergančių metastazavusia melanoma, išgyvenamumas buvo 8–9 mėn., o trejų metų bendrasis išgyvenamumas siekė mažiau nei 15 proc. (5). Pastaraisiais metais pasiekta didelė pažanga siekiant suprasti šią ligą molekulinio lygiu, o pagilintos žinios apie melanomos molekulinę patogenezę paskatino naujų vaistų paieškas melanomai gydyti. Melanomos gydymas pasikeitė, klasikinę melanomos terapiją pakeitė nauji selektyvūs vaistiniai preparatai, atsirado naujas požiūris į individualizuotą melanomos gydymą.

Onkoimunologijos žinios ir tyrimai apie signalinius kelius ir jų sąveiką melanomos atveju įgalino nustatyti naujus taikinius (signalinių kelių slopiklius, imuninio atsako modulatorius) veiksmingam melanomos gydymui. Išsamus pacientų ištyrimas, specifinių biožymenų ir genų mutacijų nustatymas leidžia parinkti individualizuotą, specifinį melanomos gydymą tam tikram pacientui ir taip pasiekti geresnių gydymo rezultatų. Kelios pagrindinės vaistinių preparatų grupės, keičiančios klasikinę melanomos terapiją, yra taikinių terapija: selektyvūs *BRAF* (protoonkogenas B–Raf, serino / treonino kinazė) slopikliai (vemurafenibas, dabrafenibas, encorafenibas), specifinis MEK1 / MEK2 (dvigubo specifiskumo mitogenu aktyvintos baltymų kinazės) slopiklis (trametinibas) ir imunoterapija: citotoksinio T–limfocitų antigeno 4 (CTLA–4) monokloninis antikūnas (ipilimumabas), programuotas ląstelių mirties baltymo–1 (PD–1) slopiklio antikūnas (nivolumabas, pembrolizumabas).

Nuo 2011 metų, atsiradus naujiems vaistams, pacientų, sergančių neoperabilia arba metastazavusia melanoma, vidutinė bendrojo

išgyvenamumo trukmė padidėjo nuo 6–8 mėn. iki dvejų metų (6–8). Nors naujos gydymo strategijos daugeliu atvejų yra veiksmingos, problema, susijusi su išsivystančiu atsparumu gydymui, išlieka, ir tai lemia blogesnius gydymo rezultatus. Todėl būtini tyrimai, siekiant nustatyti naujus gydymo taikinius, atrasti tinkamus vaistus ir jų derinius su kitais medikamentais bei kitais gydymo metodais metastazavusiai melanomai gydyti. Kuriant naujas metastazavusios melanomos gydymo strategijas reikia atsižvelgti į tam tikro naviko individualų genetinį profilį ir specifinius biožymenis, dalyvaujančius kancerogenezeje, tokius kaip *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *PTEN*, *CDKN2A*, *MITF*, *p53* ir kt. genų mutacijas, Notch signalinio kelio raišką, ubikvitino proteosomos kelio dalyvių (c–Myc, FBXW7, MDM2 ir kitų ligazių) raiškos pokyčius, kraujagyslių augimo veiksnių (VEGF, VEGF–R1, VEGFR2 ir VEGF–R3) raišką, imuninio atsako komponentus (T ląstelių reguliatoriai (Treg), mieloidų sukliamas slopinančias ląstelės (MDSC) ir M2 makrofagai). Tyrėjų dėmesio centre yra įvairių lokalizacijų piktybiniai navikai, tačiau reikia atkreipti dėmesį, kad duomenys yra tik kaupiami, dar nėra susisteminti, ypač melanomos atžvilgiu. Žinant konkretaus paciento, sergančio melanoma, genų mutacijas, jų koduojamų baltymų raiškos pokyčius gali būti skiriama tikslinė (individualizuota) veiksminga taikinių terapija, kurios esmė yra naudojant mažas molekules, slopiklius ar aktyviklius arba antikūnus paveikti mutavusius baltymus, kurie lemia ligos progresavimą.

E3 ubikvitino ligazės, kurios yra specifiški ubikvitino–proteosomos sistemos fermentai, atkreipia tyrėjų dėmesį kaip vaistų taikynys dėl to, kad su jomis susijusios daugelio baltymų funkcijos ir jų tarpusavio sąveikos. Įvairūs E3 ligazių kompleksai (FBXW7, MDM2, RBX1 / ROC1, RBX2 / ROC2, kulinai ir kt.), vystantis melanomai, gali veikti kaip onkogenai arba navikų slopikliai. Šie baltymai reguliuoja įvairių signalinių kelių ir baltymų, tokių kaip p53 ir Notch funkcijas. Atskirų tyrimų duomenimis, E3 ubikvitino ligazės FBXW7 sumažėjusi raiška yra susijusi su blogesniu melanoma sergančių pacientų penkerių metų išgyvenamumu (9), padidėjusi c–Myc raiška siejama su melanomos tolimomis metastazėmis ir bloga prognoze (10), o sumažėjusi MDM2 raiška siejama su melanoma sergančių pacientų geresniu išgyvenamumu (11). Pavienių tyrimų metu stengiamasi identifikuoti genų produktus, kurių raiška kinta progresuojant ligai, kurie galėtų būti tiek nauji, potencialūs molekuliniai taikiniai gydant melanomą, tiek nauji prognoziniai žymenys ligos eigai numatyti (9, 12). Nustatyta, kad melanomos atveju yra padidėjusi Notch signalinio kelio raiška ir sumažėjusi p53 raiška (13, 14). Šių signalinių kelių išderinimą melanomos

atveju lemia E3 ubikvitino ligazių FBXW7 ir p53 regulatoriaus MDM2 raiškos ir aktyvumo pokyčiai. Identifikuoti naujos kartos E3 ubikvitino ligazių slopikliai nutlinas-3 ir RITA, kurie suardo MDM2-p53 sąveiką navikuose ir atstato p53 apoptotinę funkciją (15). Oridoninas aktyvina FBXW7 ir taip užtikrina ląstelės ciklo sustabdymą ir naviko ląstelių apoptozę (16). Tikėtasi, kad šio darbo metu minėtų E3 ubikvitino ligazių ir jų substratų p53 ir c-Myc baltymų raiškos priklausomybių nuo melanomos stadijų nustatymas padės įvertinti jų kaip potencialių taikinių reikšmę melanomai gydyti, o MDM2-p53 sąveikos slopikliai nutlinas-3 ir RITA bei E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas galės sukelti metastazavusios melanomos ląstelių apoptozę ir sustabdyti naviko augimą bei progresavimą – taip padėti modeliuoti personalizuotą melanomos gydymą. Todėl šis disertacinis darbas yra skirtas naujų molekulinų taikinių melanomai gydyti paieškai tarp E3 ubikvitino ligazių.

# 1. DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI

## 1.1. Darbo tikslas

Nustatyti E3 ubikvitino ligazių FBXW7 ir MDM2 bei jų substratų p53 ir c-Myc baltymų raiškos vaidmenį vystantis metastazavusiai melanomai ir įvertinti galimus naujus molekulinis taikinius šiai ligai gydyti.

## 1.2. Darbo uždaviniai

1. Nustatyti E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos (MDM2-p53) slopiklių nutlino-3 ir RITA bei jų derinių (nutlino-3 ir RITA; oridonino ir RITA; oridonino ir nutlino-3; oridonino, nutlino-3 ir RITA) poveikį žmogaus metastazavusios melanomos SK-MEL-26, FM-94 ir FM-3 ląstelių linijos gyvybingumui.
2. Nustatyti E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos (MDM2-p53) slopiklių nutlino-3 ir RITA poveikį *NUMB*, *FBW7*, *MDM2*, *MDM4*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *CDKN2A*, *CDKN1A*, *BBC3*, *p53*, *c-MYC*, *Jun*, *Parp*, *CCNE1*, *CCND1*, *JAG*, *LNX1* genų raiškai žmogaus metastazavusios melanomos SK-MEL-26 ir FM-94 linijų ląstelėse.
3. Nustatyti E3 ubikvitino ligazių FBXW7 ir MDM2 bei jų substratų p53 ir c-Myc baltymų raišką displastinių apgamų ir melanomos pacientų pooperacinėje medžiagoje ir palyginti su melanomos klinikinėmis ir patologinėmis charakteristikomis.
4. Įvertinti tirtųjų molekulinis biožymenų kaip potencialių taikinių reikšmę metastazavusiai melanomai gydyti.

## 2. DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

2012–2015 metais pasaulyje suintensyvėjo domėjimasis E3 ubikvitino ligazių ir potencialių šių fermentų slopiklių naudojimu vėžiui gydyti. Tyrimų metu stengtasi identifikuoti genų produktus, kurių raiška kinta progresuojant ligai. Žinoma, kad nutlinas–3 ir RITA stabdo melanomos ląstelių vystymąsi, tačiau apie oridonino poveikį metastazavusios melanomos ląstelėms iki 2015 metų buvo žinoma nedaug. Taip pat nebuvo duomenų apie nutlino–3 / RITA ir oridonino bei jų derinio poveikio melanomos ląstelėms. Atskirų autorių duomenimis, viena vertus, nustatyta padidėjusi *MDM2* geno raiška melanomos atveju, tai lemia sustiprėjusią p53 degradaciją, Notch signalinio kelio aktyvinimą ir naviko ląstelių proliferaciją (11), antra vertus, nutlinas–3 gali neigiamai paveikti *MDM2*–p53 sąveiką ir taip turėti slopinantį poveikį melanomai. Tačiau dar nėra tyrimų rezultatų, kaip keičiasi *MDM2* raiška ir funkcija po gydymo nutlinu–3 (17).

Rengiant šį darbą, atlikus *in vitro* eksperimentus, panaudojant žmonių metastazavusios melanomos ląstelių linijas, vadovaujantis mums prieinamos literatūros duomenimis, pirmą kartą kompleksiskai buvo įvertintas *MDM2*–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA, E3 ubikvitino ligazės *FBXW7* aktyviklio oridonino bei jų derinių (nutlino–3 ir RITA; oridonino ir RITA; oridonino ir nutlino–3; oridonino, nutlino–3 ir RITA) poveikis melanomos ląstelių gyvybingumui priklausomai nuo slopiklių ir aktyviklio, jų derinių koncentracijos ir ekspozicijos laiko. Atlikto darbo metu taip pat iširtas minėtų slopiklių (nutlino–3, RITA) ir aktyviklio (oridonino) poveikis genų (*NUMB*, *FBW7*, *MDM2*, *MDM4*, *NOTCH1*), dalyvaujančių p53 ir *MDM2* reguliacijoje, ir genų (*p53*, *c-MYC*, *CDKN2A*, *CDKN1A*, *BBC3*, *Jun*, *Parp*, *CCNE1*, *CCND1*), veikiančių ląstelės ciklą, proliferaciją ir žūties kelią, raiška žmogaus metastazavusios melanomos ląstelėse.

Tyrimo *in vivo* metu, panaudojus pooperacinę pacientų, kuriems buvo nustatyta melanoma arba displastinis apgamas, medžiagą, buvo nustatyta E3 ubikvitino ligazių *FBXW7* ir *MDM2* bei jų substratų p53 ir c–Myc raiška baltymų lygmeniu.

Buvo įvertinta sąsaja tarp visų tirtųjų baltymų E3 ubikvitino ligazių *FBXW7* ir *MDM2* bei jų substratų p53 ir c–Myc raiškos pokyčių ir pacientų klinikinių ir pataloginių charakteristikų. Atlikus vienaveiksmę ir daugiaveiksmę *Cox* regresinę analizę, įvertinta tirtųjų baltymų raiškos pokyčių, klinikinių–pataloginių charakteristikų ir jų sąveikos reikšmė pacientų mirtingumo rizikai.

Nustatyta, kad žema E3 ubikvitino ligazės FBXW7 raiška, susijusi su melanomos gyliu (pT3 ir pT4) ir morfologiniu melanomos tipu (mazginės melanomos tipas), todėl galėtų būti potencialus molekulinis taikinyš melanomai gydyti. Tyrimo su metastazavusios melanomos ląstelėmis metu nustatyta, kad oridoninas veiksmingiausiai slopino melanomos ląstelių gyvybingumą, todėl oridoninas būdamas FBXW7 aktyviklis, galėtų būti potencialus terapinis veiksnys gydant melanomą.

## 2.1. Autoriaus indėlis

Darbo autorė dalyvavo rengiant tyrimo protokolą, parengė dokumentus Biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimui gauti ir paruošė Informuoto asmens sutikimo formas. Atrinko pacientus, kuriems buvo diagnozuotas displastinis apgamas arba melanoma, rinko, sistemino, analizavo visus klinikinius ir patologinius duomenis. Autorė atrinko ląstelių linijas atliekant tyrimus *in vitro*, susipažino su metodais (audinių mikrogardelių imunohistochemine analize (TMA IHC), kiekybine polimerazės grandininine reakcija (PGR)), reikalingais tyrimui vykdyti. Ji dalyvavo atliekant duomenų statistinę analizę, interpretavo gautus rezultatus, pristatė darbo rezultatus tarptautinėse mokslinėse konferencijose, kartu su bendraautoriais rengė mokslines publikacijas.



### 3. LITERATŪROS APŽVALGA

#### 3.1. Odos melanoma ir jos paplitimas

Melanoma – tai piktybinis odos navikas, išsivystantis dėl pakitusių melanocitų proliferacijos (18). Nors odos melanoma sudaro mažiau nei 5 proc. visų odos piktybinių navikų, tai pats piktybiškiausias odos vėžys, pasižymintis agresyvia eiga ir dideliu mirtingumu (1). Per pastaruosius tris dešimtmečius melanomos paplitimas pasaulyje padidėjo daugiau nei dvigubai. Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros (angl. *International Agency of Research on Cancer, IARC*) duomenimis, 2018 metais pasaulyje užregistruota 287 723 naujų odos melanomos atvejų ir 60 712 mirčių nuo šios ligos. Daugiausiai naujų melanomos atvejų buvo nustatyta Europoje – 50,1 proc., antroje vietoje Šiaurės Amerikoje – 27,7 proc., trečioje vietoje Azijoje – 7,6 proc. Didžiausias sergamumo melanoma dažnis 100 000 gyventojui 2018 metais buvo Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje, o po jų minimos Skandinavijos šalys. Mažiausias susirgimų skaičius registruojamas Viduržemio jūros regione. Australijoje buvo nustatytas ir didžiausias melanomos procentas tarp vyrų, po jos minima Naujoji Zelandija. Didžiausias melanomos procentas tarp moterų registruotas Danijoje (19). Amerikos vėžio draugijos (angl. *American Cancer Society, ACS*) prognozės rodo, jog Jungtinėse Amerikos Valstijose (JAV) 2020 metais turėtų būti nustatyta 100 350 naujų melanomos atvejų, o mirtingumas turėtų siekti 6 850 atvejų. Apskritai melanoma dažniau serga vyrai, tačiau iki 50 metų amžiaus moterys serga dažniau nei vyrai. Baltaodžiai serga melanoma 20 kartų dažniau nei juodaodžiai. Baltaodžiai per visą gyvenimą turi 2,6 proc. (1 iš 38) riziką susirgti melanoma, juodaodžiai 0,1 proc. (1 iš 1000), o ispanai 0,6 proc. (1 iš 167). Melanomos rizika didėja su amžiumi. Vidutinis susirgusiųjų amžius melanomos diagnozės nustatymo metu yra 65 metai. Melanoma gali išsivystyti ir jaunesniems nei 30 metų asmenims (20).

Nacionalinio vėžio instituto (NVI) Vėžio registro duomenimis, kasmet Lietuvoje diagnozuojama apie 320 naujų melanomos atvejų. Mirtingumas Lietuvoje nuo šios ligos siekia 113 atvejų per metus. Nors mirštamumas Lietuvoje nuo melanomos, lyginant su kitomis Europos šalimis, yra žemas, tačiau kasmet susirgimų skaičius didėja (2).

### 3.2. Rizikos veiksniai melanomai išsivystyti

Melanomai išsivystyti reikšmės turi daugelio rizikos veiksnių poveikis – tiek genetiniai pokyčiai, tiek aplinkos įtaka. Pagrindiniai rizikos veiksniai melanomai išsivystyti yra šeiminė melanomos anamnezė, dauginiai apgamai odoje (dažniausiai esant daugiau nei 100 apgamų), pakitę odos apgamai, šviesi kūno oda, ilgalaikis ultravioletinės (UV) spinduliuotės poveikis, buvę stiprūs nudegimai saulėje (ypač vaikystėje), susilpnėjusi imuninė sistema.

**Ultravioletinė saulės spinduliuotė.** Ultravioletinės (UV) saulės spinduliuotės poveikis – vienas iš svarbiausių aplinkos rizikos veiksnių melanomai išsivystyti (21). Iki šiol UVB spinduliai buvo vertinami kaip vieninteliai kancerogeniniai saulės spinduliai, pasiekiantys Žemės paviršių. Tačiau 2009 metais Tarptautinė vėžio tyrimų agentūra (angl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) priskyre visą UV spindulių spektrą ir patalpų įdegio įtaisų skleidžiamus spindulius kaip kancerogeninius veiksnius žmonėms (22). Svarbu pažymėti, kad protarpinis arba atsitiktinis saulės poveikis odai turi ženkliai didesnę riziką melanomai išsivystyti, o lėtinis arba nuolatinis saulės spindulių poveikis turi arba apsauginį poveikį, arba neturi padidintos rizikos melanomai išsivystyti (23). Taip pat tyrimai parodė, kad buvę stiprūs nudegimai saulėje, ypač vaikystėje, padidina riziką susirgti odos melanoma (24). Sąsaja tarp UV spinduliuotės poveikio laipsnio ir rizikos susirgti melanoma yra kompleksiška. Paradoksalu, bet melanoma liemens ir viršutinių galūnių srityje, kur saulės poveikis nenuolatinis, išsivysto jaunesniame amžiuje, o nuolat saulės paveiktose kūno srityse, tokiose kaip veidas, ausys ir kaklas, melanoma išsivysto ženkliai vėlesniame gyvenimo tarpsnyje (25, 26). UV spinduliuotė tiesiogiai sukelia ląstelių deoksiribonukleorūgšties (DNR) pažeidimų, taip pat dėl jos poveikio susidaro toksinių medžiagų, netiesiogiai paveikiančių ląstelės DNR, skatinančių laisvųjų radikalų susidarymą, mažinančių ląstelių gebėjimą ištaisyti DNR pažeidimus, ir taip sukeliančių ląstelių piktybišką transformaciją ir kancerogenezės kaskadą (27).

Saulės šviesa nėra vienintelis UV spinduliuotės šaltinis. Soliariumų lempos taip pat didelis UV spinduliuotės šaltinis. Keli epidemiologiniai tyrimai parodė sąsają tarp dažno deginimosi soliariumuose ir rizikos susirgti melanoma (28, 29). Net psoriazei gydyti dažnai skiriama PUVA terapija (psoralenas kartu su UVA spinduliais) turi įtakos melanomai atsirasti (30).

**Odos fenotipas (pigmentacija).** Melanokortino 1 receptoriaus (*MC1R*) geno polimorfizmai yra atsakingi už skirtingus žmogaus odos spalvos fenotipus. Asmenys, turintys tokias savybes kaip raudoni plaukai, šviesi veido spalva ir šviesios akys, turi mažai pigmentacijos, todėl padidėja jų jautrumas UV spinduliuotei (31). Nustatyta, kad žmonės, turintys I odos tipą, šviesios odos, kuri sunkiai įdega, greitai ir lengvai nusvyta saulėje, turi didesnę riziką susirgti melanoma, lyginant su tamsesnio gymio žmonėmis (32).

**Apgamų skaičius.** Didelis gerybinių ir atipinių apgamų skaičius kūno odoje padidina riziką susirgti melanoma (33). Apgamų išsivystymas ir jų skaičius priklauso nuo aplinkos, genetinių bei imunologinių veiksnių. Dažniausiai įgyti apgamai atsiranda 6–12 gyvenimo mėnesiais, augant vaikui jie didėja ir paauglystėje jų kiekis daugėja. Vaikystėje apgamai dažniausiai išsidėsto saulės paveiktose ir labiausiai saulės nudegimo rizikingose vietose. Apgamų skaičius iki 30–40 metų vis didėja, o vėliau su amžiumi lėtai išnyksta. Buvo atlikta keletas atvejo–kontrolės tyrimų, siekiant nustatyti sąsają tarp pigmentinių apgamų skaičiaus ir melanomos rizikos. Nors atliktų tyrimų duomenys skiriasi, tačiau dauguma jų parodė sąsają tarp didelio apgamų skaičiaus ir padidėjusios rizikos susirgti melanoma (34). Taip pat buvo nustatyta, kad rizika išsivystyti melanomai padidėja esant dauginiams atipiniams apgamams, lyginant su dauginiais nepakitusiais pigmentiniais apgamais. Genetinis polinkis, lemiantis daugybinių įgimtų, taip pat ir atipinių apgamų atsiradimą, siejamas su pagrindiniu melanomos rizikos genu *CDKN2A* ir vadinamas displastinių apgamų sindromu (angl. *dysplastic nevus syndrome, DNS*) ir šeiminį atipinių apgamų melanomos sindromu (angl. *familial atypical multiple mole melanoma syndrome, FAMMM*) (35, 36).

**Genetiniai veiksniai.** Vienas iš svarbiausių genetinių melanomos rizikos veiksnių – tai melanomos diagnozė šeiminėje anamnezėje. Maždaug 7–15 proc. melanomos atvejų atsiranda asmenims, kurių šeimoje buvo susirgimų melanoma (37). Tačiau tikroji paveldima melanoma (t. y. kelių kartų, vienos linijos, dauginiai pirminiai navikai ir ankstyvoji ligos pradžia) yra nedažna. Manoma, kad už perduotos genetinės mutacijos buvimą atsakingi šeiminiai ligos klasteriai (37, 38). Pastaraisiais metais taip pat nustatyta, kad melanomos atsiranda šeimose, kuriose paprastai fiksuojamas polinkis į specifinius piktybinių navikų modelius, pavyzdžiui, anksčiau minėtą šeiminį dauginių atipinių apgamų – melanomos sindromą (FAMMM sindromą) ir jo variantą, melanomos ir astrocitomos sindromą (MAS) (38). Įgimtos nuo ciklino priklausomo kinazės slopiklio 2A (*CDKN2A* arba *p16*) mutacijos ir, rečiau, nuo ciklino priklausomos kinazės

4 (*CDK4*) mutacijos yra dažniausios genetinės anomalijos, nustatomos šiose šeimose (38, 39). Kitos paveldimos būklės, susijusios su padidėjusia melanomos išsivystymo rizika, yra pigmentinė kseroderma, šeimtinė retinoblastoma, II tipo *Lynch* sindromas ir *Li–Fraumen* vėžio sindromas (37).

**Asmeninė odos melanomos arba nemelanominio odos vėžio istorija.** Asmenys, kuriems praeityje buvo nustatyta odos melanoma, turi padidintą riziką išsivysti antrajai pirminei melanomai (40). Po pirmosios melanomos diagnozės antrosios pirminės melanomos rizika yra maždaug 5 proc. Ši rizika padidėja, jei pacientas vyriškos lyties, vyresnio amžiaus, o pirminė melanoma buvo nustatyta galvos arba kaklo srityje (41).

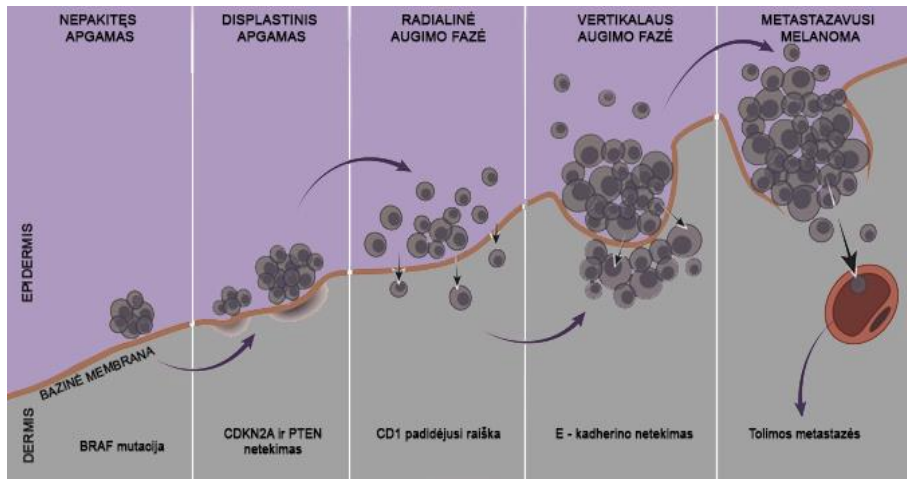
**Imunosupresija.** Pacientams po organų transplantacijų labai padidėja rizika susirgti visais odos vėžio tipais, įskaitant ir melanomą. Buvo nustatyta, kad šioje pacientų grupėje melanomos rizika buvo 1,6–2,5 karto didesnė nei bendroje populiacijoje (42). Tačiau pacientai, esant imunosupresijai, turi didesnę nemelanominio odos vėžio riziką (43). ŽIV/AIDS infekcija taip pat padidina riziką susirgti melanoma (44).

### 3.3. Melanomos vystymosi stadijos ir klasifikacija

Melanocitai – tai neuroektoderminės kilmės ląstelės, kurių daugiausia galima nustatyti baziniame epidermio sluoksnyje, plaukų folikuluose, gleivinių paviršiuose, smegenyse, akies ragenoje ir gyslainėje (45). Reaguodami į UV sukeltus DNR pažeidimus, odos keratinocitai gamina melanocitus stimuliuojantį hormoną (MSH), kuris jungiasi prie melanocitų paviršiuje esančio melanokortino 1 receptoriaus (MC1R), todėl melanocituose gaminamas ir atpalaiduojamas melaninas. Pigmentas melaninas galiausiai veikia kaip apsauginis skydas nuo UV spinduliuotės, ir taip apsaugo gilesnius odos sluoksnius nuo UV sukeliama pažeidimo ir „užkerta kelią“ tolesniems DNR pokyčiams (46). Melanoma vystosi dėl melanocitų piktybinės transformacijos (18). Piktybinė melanoma dažniausiai (apie 75 proc. atvejų) susiformuoja *de novo*, sveikoje odoje kaip pirminis navikas ir apie 25 proc. atvejų iš prieš tai buvusių apgamų (47).

Kaip teigia W. H. Klarkas (*W. H. Clark*), melanomos vystymuisi būdinga histologinių pokyčių kaskada nuo normalaus pigmentinio apgamo iki metastazavusios melanomos (48). Šie histologiniai pokyčiai siejami su įvairių genų mutacijomis, signaliniais keliais ir molekuliniais procesais,

kurie lemia progresavimą nuo nepakitusių melanocitų iki melanomos (1). Pradžioje įvyksta struktūriškai nepakitusių melanocitų proliferacija, tai lemia gerybinio apgamo susiformavimą. Histologiškai būdingas padidintas melanocitų lizdų skaičius bazinės membranos paviršiuje. Kitas etapas – tai atipinė melanocitų proliferacija, kuri gali būti buvusio apgamo vietoje arba naujoje odos srityje. Ir taip formuojasi displastinis apgamas, kuris pasižymi histologine ir architektūrine atipija. Iš displastinio apgamo ilgainiui gali išsivystyti piktybinė melanoma. Ankstyvajai melanomai būdinga „radialinė augimo fazė“, kurios metu melanomos ląstelės auga tarp epidermio sluoksnių ir gali iš dalies skverbtis į papilinę dermą. Progresuojant procesui melanoma tampa invazyvi, jai būdinga „vertikalaus augimo fazė“, kurios metu melanomos ląstelės perauga dermos sluoksnį ir gali siekti riebalinį sluoksnį. Galiausiai vystosi metastazavusi melanoma, kuri gali plisti į kitas odos ir poodžio vietas, sritinius limfinius mazgus ir kitus organus (1, 49) (1 paveikslas).



**1 paveikslas.** Melanomos vystymosi stadijos (adaptuota pagal (49))

Istoriškai W. H. Klarkas (*W. H. Clark*) su bendraautoriais suklasifikavo piktybinę melanomą į: a) paviršiumi plintančią melanomą, b) *lentigo maligna* tipo melanomą ir c) mazginę melanomą (50). Vėliau R. Ridas (*R. Reed*) pridėjo ketvirtą tipą – vadinamą akralinė lentiginė piktybinė melanoma (51). Nuo tada piktybinė melanoma klasifikuojama taip: a) paviršiumi plintanti melanoma (50–75 proc.), b) mazginė melanoma (15–35 proc.), c) *lentigo maligna* melanoma (5–15 proc.), d) akralinė lentiginė melanoma (5–10 proc.), e) desmoplastinė melanoma (reta forma) (52).

**Paviršiumi plintanti melanoma** – dažniausia melanomos forma, kuri diagnozuojama apie 70 proc. tarp visų melanomų atvejų. Šios rūšies melanoma ilgai auga viršutiniuose odos sluoksniuose, kol pradeda skverbtis į gilesnius odos sluoksnius. Dažnai paviršiumi plintanti melanoma vystosi iš pigmentinio apgamo. Dažniausiai lokalizuojasi vyrams liemens sityje, moterims – kojų srityje. Šios rūšies melanoma serga jauni asmenys.

**Lentigo maligna melanoma** – kaip ir paviršiumi plintanti melanoma vystosi viršutiniuose odos sluoksniuose. Šios rūšies melanoma dažniausiai atsiranda saulės paveiktoje ir pažeistoje veido, ausų, plaštakų ir liemens viršutinės dalies odoje.

**Akralinė melanoma** – taip pat pradžioje plinta viršutiniuose odos sluoksniuose, kol pradeda skverbtis gilyn. Dažniausiai atsiranda delnų arba padų odoje bei nago srityje. Dažniau būdinga afro–amerikiečiams ir Azijos gyventojams.

**Mazginė melanoma** – dažniausia būna invazyvi jau diagnozės nustatymo metu. Piktybiškumas paprastai nustatomas, kai melanoma tampa iškili. Dažniausiai lokalizuojasi liemens, kojų, rankų odoje, diagnozuojama vyresnio amžiaus asmenims. Tai pati piktybiškiausia melanomos forma ir sudaro apie 10–15 proc. atvejų (49, 53, 54).

Melanomos plitimo gylis odoje ir odos struktūrų pažeidimo gylis matuojamas milimetrais ir naudojamas kaip ligos prognozinis žymuo, kuris koreliuoja su pacientų bendroju išgyvenamumu. Ankstyvoji melanomos diagnostika yra svarbi klinikinėje praktikoje, laiku diagnozuota ir išoperuota melanoma padidina pacientų išgyvenamumą.

Klinikinėje praktikoje, siekiant histologiškai aprašyti melanomos stadiją ir išplitimą odoje, naudojamos dvi skalės: Klarko (*Clark*) ir Breslovo (*Breslow*). Melanomos stadija pagal Klarko (*Clark*) skalę parodo, kiek giliai navikas plinta odoje ir kuriuos odos sluoksnius pažeidė.

Pagal šį modelį skiriamos penkios melanomos stadijos (1 lentelė). Breslovo (*Breslow*) skalė parodo melanomos storį milimetrais, matuojamas atstumas tarp viršutinio odos sluoksnio – epidermio – ir giliausio naviko taško (55). Šios skalės gylio nustatymas laikoma vienu svarbiausiu prognozinio veiksnio (49).

**1 lentelė.** Koreliacija tarp melanomos stadijos ir pacientų penkerių metų išgyvenamumo (49).

<b>Klarko (Clark) stadija</b>	<b>Breslovo (Breslow) skalė</b>	<b>Naviko invazijos gylis</b>	<b>Penkerių metų išgyvenamumas (proc.)</b>
I stadija		Pakitusios ląstelės yra tik viršutiniame odos sluoksnyje (epidermyje).	99
II stadija	<1 mm	Melanomos ląstelės pasiekia dermos papilinį sluoksnį.	95
III stadija	1–2 mm	Melanomos ląstelių randama dermos papiliniame sluoksnyje ir jau siekia dermos tinklinį sluoksnį.	82
IV stadija	>2–4 mm	Melanomos ląstelės skverbiasi per visus dermos sluoksnius ir visą dermos tinklinį sluoksnį.	71
V stadija	>4 mm	Melanoma plinta į poodinį – riebalinį sluoksnį	49

Melanomos klasifikuojamos ir stadijos nustatomos vadovaujantis Amerikos jungtinio vėžio komiteto (angl. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*) TNM sistema. T (*tumor*) – pirminis navikas, N (*nodes*) – limfmazgis, M (*metastasis*) – tolimų metastazių buvimas. Pateikiama lentelė, kurioje parodytos TNM sistemos simbolių (T, N, M) reikšmių vertinimas (2 lentelė).

**2 lentelė.** Amerikos jungtinio vėžio komiteto (AJCC) melanomos stadijų sistemos pagal TNM simbolių reikšmes, 8-asis leidimas, 2017 m. (56)).

<b>Pirminis navikas (T)</b>	<b>Naviko gylis</b>	<b>Išopėjimas</b>
<b>T<sub>x</sub></b> : Negalima įvertinti pirminio naviko storio		
<b>T<sub>0</sub></b> : Nėra pirminio naviko požymių		
<b>T<sub>is</sub></b> : Melanoma <i>in situ</i>		
<b>T1</b>	≤1,0 mm	Nežinoma ar nepatikslinka
<b>a</b>	<0,8 mm	Be išopėjimo
<b>b</b>	<0,8 mm	Su išopėjimu
<b>T2</b>	>1,0–2,0 mm	Nežinoma ar nepatikslinka
<b>a</b>	>1,0–2,0 mm	Be išopėjimo
<b>b</b>	>1,0–2,0 mm	Su išopėjimu
<b>T3</b>	>2,0–4,0 mm	Nežinoma ar nepatikslinka
<b>a</b>	>2,0–4,0 mm	Be išopėjimo
<b>b</b>	>2,0–4,0 mm	Su išopėjimu
<b>T4</b>	>4,0 mm	Nežinoma ar nepatikslinka
<b>a</b>	>4,0 mm	Be išopėjimo
<b>b</b>	>4,0 mm	Su išopėjimu

#### **Sritinis limfinis mazgas (I/m) (N)**

**N<sub>x</sub>**: negalima įvertinti sritinių limfinių mazgų

**N<sub>0</sub>**: nenustatytos metastazės sritiniuose limfiniuose mazguose

**N<sub>1</sub>**: metastazė yra viename sritiniame limfmazgyje

    a – mikrometastazė

    b – makrometastazė

**N<sub>2</sub>**: metastazės yra 2–3 limfmazguose

    a – mikrometastazė

    b – makrometastazė

    c – metastazės yra pakeliui į artimuosius limfmazgius

**N<sub>3</sub>**: melanomos metastazė yra 4 ar didesniame skaičiuje sritinių limfmazgių arba metastaziniai limfmazgiai sudaro konglomeratą

#### **Tolimos metastazės (M)**

**M<sub>0</sub>**: tolimųjų metastazių nėra

**M<sub>x</sub>**: tolimųjų metastazių įvertinti neįmanoma.

**M<sub>1</sub>**: yra tolimųjų metastazių.

    a – yra melanomos metastazių toli nuo pirminio židinio

    b – yra melanomos metastazių plaučiuose

    c – yra melanomos metastazių bet kuriuose kituose vidaus organuose



Nustačius kategorijų T, N, M reikšmes, liga, vadovaujantis TNM sistema, priskiriama vienai ar kitai stadijai, atitinkančiai gautų reikšmių variantą (3 lentelė).

**3 lentelė.** Amerikos jungtinio vėžio komiteto (AJCC) melanomos stadijų sistema pagal TNM, 8-asis leidimas, 2017 m. (adaptuota pagal (56)).

<b>Stadija</b>	<b>T (tumor)</b>	<b>N (node)</b>	<b>M (metastasis)</b>
0 stadija	Tis	N0	M0
IA stadija	T1a	N0	M0
IB stadija	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IIA stadija	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB stadija	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC stadija	T4b	N0	M0
IIIA stadija	T(1–4)a	N1a	M0
	T(1–4)a	N2a	M0
IIIB stadija	T(1–4)b	N1a, N2a, N1b, N2b	M0
	T(1–4)a	N1b, N2b, N1c	M0
IIIC stadija	T(1–4)b	N1b, N2b, N2c	M0
	Bet kurios reikšmės T	N3	M0
IV stadija	Bet kurios reikšmės T	Bet kurios reikšmės N	M1

Melanomos išplitimo ir stadijos nustatymas labai svarbus klinikinėje praktikoje, nes padeda parinkti tinkamą gydymą pacientui ir numatyti ligos eigą ir prognozę.

### 3.4. Melanomos gydymo metodai

Pagrindinis melanomos gydymas yra chirurginis naviko pašalinimas sveikų audinių ribose. Operacinio pjūvio plotis (riba tarp naviko ir sveikų audinių operacinio pjūvio krašto) priklauso nuo melanomos gylio, kuris nustatomas pagal Breslovo (*Breslow*) skalę (55). Esant melanomai *in situ* rekomenduojamas pjūvio plotis 5 mm, jei melanomos gylis iki 1,0 mm,

atliekamas 10 mm pjūvis, esant 1,0–4,0 mm melanomos gyliui, operacinio pjūvio kraštai turi siekti nuo 1 iki 2 cm, o jei melanoma gilesnė nei 4,0 mm, operacinis kraštas turi siekti 2 cm (57). Tačiau, esant neoperabiliam arba progresuojančiam melanomai, atsiradus metastazėms limfiniuose mazguose arba kituose organuose, reikalingas papildomas medikamentinis gydymas. Nuo 1975 metų pagrindinis vaistas progresuojančiam melanomai gydyti buvo dakarbazinas (DTIC), kuris pasižymėjo dideliu toksiškumu ir pakankamai silpnu terapiniu atsaku, o pacientų penkerių metų išgyvenamumas siekė 2–6 proc. (58). Ilgą laiką progresuojančiam melanomai gydyti buvo taikytas sisteminis gydymas citotoksinais preparatais kaip monoterapija, taip pat derinant kelių vaistų kombinaciją, įskaitant DTIC, temozolomidą ir platinos preparatus (karboplatina), taip pat imunoterapija, įskaitant citokinus interferoną- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) ir interleukiną-2 (IL-2) (59). Daugiau nei 30 metų standartinis rekomenduojamas IV stadijos melanomos gydymas pagal Amerikos jungtinio vėžio komiteto (angl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) rekomendacijas buvo vien dakarbazinu (DTIC) (60). Tačiau gydymas DTIC vienu arba derinant su kitais vaistais parodė mažą atsako dažnį ir pasižymėjo žemais išgyvenamumo rodikliais. Gydymas vienu IL-2 taip pat parodė mažą atsako dažnį, tačiau tarp pacientų, vartojusių šį vaistą, kurie turėjo atsaką į gydymą, buvo stebimas ilgalaikis atsakas (61). Vėliau pavieniai III fazės klinikiniai tyrimai parodė padidėjusį atsako dažnį derinant chemoterapiją su imunoterapija (biochemoterapija). Tačiau išgyvenamumo rodikliai buvo nedideli, o vaistų toksinis poveikis ženkliai padidėjo (62, 63).

Atsiradus naujų tyrimų apie melanomos molekulinę patogenezę, suaktyvėjo naujų vaistų paieška melanomai gydyti, imta taikyti naujas individualizuoto melanomos gydymo strategijas. Klasikinę melanomos terapiją pakeitė nauji selektyvūs vaistiniai preparatai, tokie kaip BRAF slopikliai (vemurafenibas, dabrafenibas, encorafenibas), MEK1 / MEK2 specifinis slopiklis (trametinibas, kobimetinibas, binimetinibas), imunomodulatoriai – monokloninis antikūnas prieš citotoksinių T limfocitų antigeną 4, CTLA-4 (ipilimumabas), anti-PD-1 (programuotos ląstelių žūties receptorių 1) monokloniniai antikūnai (nivolumabas, pembrolizumabas) (4 lentelė).

**4 lentelė** Maisto ir vaistų administracijos (FDA, JAV) patvirtintas metastazavusios melanomos gydymas.

<b>Preparatas</b>	<b>Veikimo mechanizmas, vartojimo būdas</b>	<b>Indikacija</b>	<b>Patvirtinimo data</b>
<b>Alkilinamosios medžiagos</b>			
Dakarbazinas (DTIC)	Citotoksinė, alkilinamoji medžiaga, IV	Metastazavusi melanoma.	1975
<b>BRAF slopikliai</b>			
Vemurafenibas	BRAF slopiklis, PO		2011
Dabrafenibas	BRAF slopiklis, PO	BRAF V600E – teigiama metastazavusi melanoma.	2013
Encorafenibas	BRAF slopiklis, PO		2020
<b>MEK slopikliai</b>			
Trametinibas	MEK slopiklis, PO	BRAF V600E arba BRAF V600K – teigiama, metastazavusi melanoma, kai prieš tai nebuvo skirtas gydymas BRAF slopikliais.	2013
<b>Kombinuotas gydymas</b>			
Dabrafenibas + Trametinibas	BRAF slopiklis + MEK slopiklis, PO	BRAF V600E arba BRAF V600K – teigiama, metastazavusi melanoma, kai prieš tai nebuvo skirtas gydymas BRAF slopikliais.	2014
<b>Interleukinai</b>			
Aukštos dozės Interleukinas–2 (IL–2)	Imunoterapija, IV	Metastazavusi melanoma.	1998

IV– intraveninis, PO – peroralinis vaisto vartojimo būdas.

#### 4 lentelės tęsinys

Preparatas	Veikimo mechanizmas, vartojimo būdas	Indikacija	Patvirtinimo data
<b>Anti-CTLA-4 slopikliai</b>			
Ipilimumabas	Anti-CTLA-4 antikūnas, imunoterapija, IV	Metastazavusi melanoma.	2011
<b>PD-1 slopikliai</b>			
Pembrolizumabas	Anti PD-1 antikūnas, imunoterapija, IV	Metastazavusi melanoma, kai prieš tai buvo skirtas gydymas	2014
Nivolumabas	Anti PD-1 antikūnas, imunoterapija, IV	Ipilimumabu arba BRAF slopikliais, esant BRAF mutacijai.	2014

IV– intraveninis, PO – peroralinis vaisto vartojimo būdas.

### 3.5. Ubikvitino proteosomos sistema ir pagrindiniai signaliniai keliai ir genai, dalyvaujantys vystantis melanomai

Pabrėžtina, kad melanoma – heterogeniškas navikas ir jam išsivystyti bei progresuoti turi įtakos daugybės genų ir įvairių ląstelės signalinių kelių pokyčiai. Progresuojant melanomai nustatoma įvairių DNR mutacijų (genų delecijos, amplifikacijos, translokacijos), kurios gali aktyvinti onkogenus ir / arba inaktyvinti onkogenų slopiklius (64). Melanos progresavimas susijęs ir su epigenetiniais pokyčiais, kurie gali sukelti ląstelių signalinių kelių pokyčių. Signalo perdavimo keliai reguliuoja melanocitų proliferaciją, diferenciaciją, migraciją ir jų išgyvenamumą. Ląsteliniai signalizacijos mechanizmai yra pagrindiniai veiksniai, reguliuojantys gerybinių melanocitų transformaciją į nekontroliuojamą piktybinę proliferaciją, kancerogenezę ir invaziją. Melanocitų piktybinės transformacijos atveju šie signaliniai keliai dažniausiai išsiderina dėl somatinių genų mutacijų (65, 66). 5 lentelėje pateiktos somatinių genų mutacijos dažnai nustatomos vystantis melanomai.

**5 lentelė.** Dažniausios somatinės mutacijos ir signaliniai keliai, dalyvaujantys melanomagenezėje (adaptuota pagal (66)).

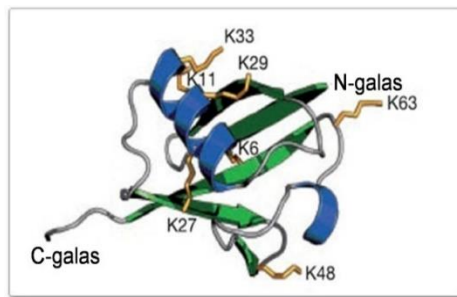
<b>Genas</b>	<b>Mutacijų dažnis</b>	<b>Signalinis kelias</b>	<b>Klinikinės sąsajos</b>	<b>Taikinių terapija</b>
<i>BRAF</i>	~50–75 proc.	Aktyvina mitogenu aktyvuotos proteino kinazės (MAPK) signalinį kelią.	Lėtinės saulės nepažeistoje odoje.	Vemurafenibas Dabrafenibas Encorafenibas
<i>NRAS</i>	~15–30 proc.	Aktyvina RAF kinazę ir PI3K (fosfoinositido 3 kinazės) signalinį kelią.	Lėtinės saulės nepažeistoje odoje.	Tipifarnibas (atliktas II fazės tyrimas)
<i>NFI</i>	~10–15 proc.	Slopina RAS/MAPK signalinį kelią. Turi įtakos atsirasti atsparumui RAF ir MEK slopikliams.	Lėtinės saulės paveiktoje odoje, vyresnio amžiaus pacientams, desmoplastinė melanoma.	-
<i>PTEN</i>	<5–20 proc.	PI3K signalinio kelio metu slopina AKT.	Vėlyvosios stadijos melanoma.	Perifosinas (atliktas II fazės tyrimas)
<i>c-KIT</i>	~3 proc.	Aktyvina KIT transmembraninio receptoriaus tirozino kinazę.	Lėtinės saulės pažeistoje odoje, gleivinių ir akralinė melanoma.	Imatinibas Nilotinibas Dasatinibas

### 3.5.1. Ubikvitilimo procesas ir ubikvitino ligazės

Visi viduląsteliniai ir daugybė ekstraląstelių baltymų nuolat skaidomi, tai yra jie hidrolizuojami iki jų sudedamųjų aminorūgščių ir pakeičiami naujais sintezės metu. Visuose audiniuose didžioji ląstelėse esančių baltymų dalis yra skaidoma ubikvitino proteosomos sistemoje degradacijos būdu. Ubikvitino proteosomos kelias (UPK) yra būtinas ląstelėms funkcionuoti ir yra atsakingas už ląstelių baltymų apykaitos reguliavimą. Ubikvitino proteosomos kelio atradėjai A. Ciechanoveris

(A. Ciechanover) ir A. Herškas (A. Hershko) 2004 metais buvo apdovanoti Nobelio premija (67, 68). Baltymai, kuriuos saardo ubikvitino proteosomos kelias, dalyvuoja daugelyje ląstelių biologinių procesų, tokių kaip vystymasis, diferenciacija, proliferacija, signalo perdavimas ir apoptozė (69). Be savo svarbaus vaidmens baltymų homeostazėje, proteosomos taip pat dalyvuoja ir ne proteolitiniuose procesuose, pvz., dalyvuoja reguliuojant genų raišką (70) ir transkripcijos iniciacijos ir elongacijos procesuose (71). Ubikvitino proteosomos sistema selektyviai pašalina pakitusius ar pažeistus baltymus, atsirandančius dėl įvairių mutacijų, biosintezės klaidų arba laisvųjų radikalų ar denatūracijos padarytos žalos (ypač esant aukštai temperatūrai).

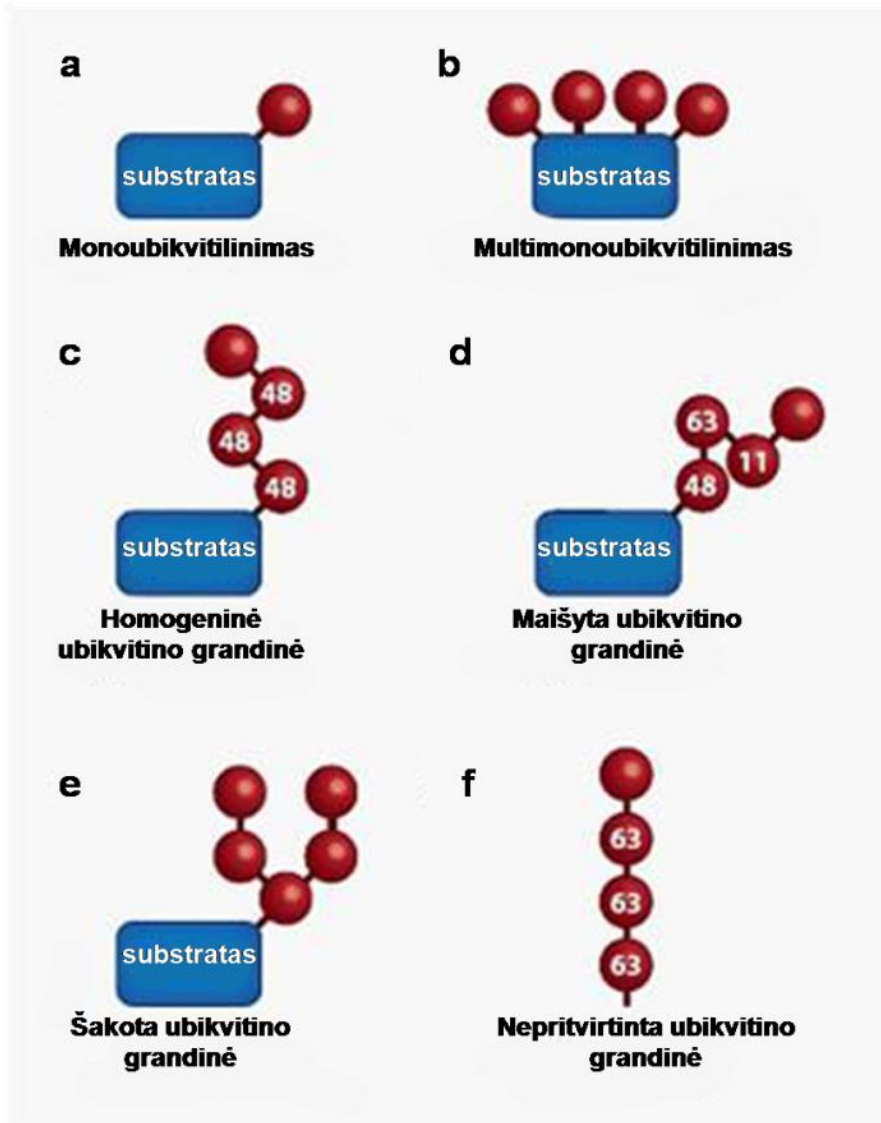
Ubikvitilinizacija – tai baltymų potransliacinis modifikavimas, kurį reguliuoja įvairūs su ubikvitilinizacija susiję fermentai (72–75). Priklausomai nuo modifikacijos tipo, ubikvitilinti substratai dalyvuoja įvairiuose procesuose – aktyvinant ar slopinant baltymų funkciją, proteosominėje arba lizosominėje degradacijoje. Ubikvitinas – baltymas, sudarytas iš 76 aminorūgščių, kurios susijungia į kompaktišką struktūrą, turinčią diglicino seką C–gale (76) (2 paveikslas). Per C–gale esančią glicino liekanos karboksigrupę ubikvitinas kovalentiškai jungiasi su baltymuose esančių lizino  $\epsilon$ –aminogrupe. Ši potransliacinė baltymų modifikacija svarbi reguliuojant baltymų funkcijas, lokalizaciją, rūšiavimą, tarpusavio sąveiką (77, 78).



**2 paveikslas.** Ubikvitino struktūra

Baltymai gali būti modifikuojami prisijungus vienai ubikvitino molekulei prie lizino (monoubikvitilinizacija), kelioms ubikvitino

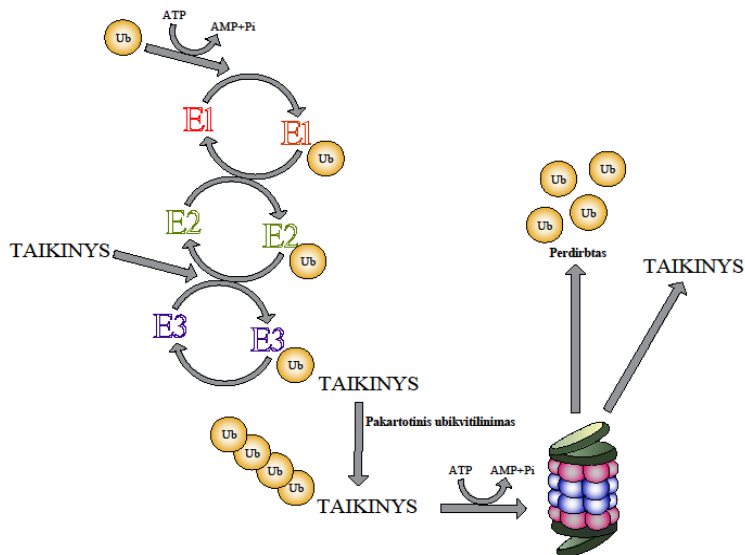
molekulėms prie daugelio (multiubikvitilinimas) ar kelioms ubikvitino molekulėms prie vieno (poliubikvitilinimas) lizino (79) (3 paveikslas).



**3 paveikslas.** Baltymų ubikvitilinimo tipai: monoubikvitilinimas (a), multimonoubikvitilinimas (b), homogeninė ubikvitino grandinė (c), mišri ubikvitino grandinė (d), šakota ubikvitino grandinė (e), nepritvirtinta ubikvitino grandinė (f) (adaptuota pagal (79)).

Ubikvitinui prisijungti prie baltymo–taikinio padeda fermentų kaskada: ubikvitiną aktyvuojantis fermentas (E1), ubikvitiną jungiantis fermentas

(E2) ir ubikvitino ligazė (E3). Iš pradžių ubikvitiną aktyvina E1 ligazė naudodama ATP, tuomet perkeliamas ant E2 – ubikvitiną jungiančio fermento – ir dalyvaujant E3 ligazei ubikvitinas jungiasi prie baltymo–taikinio. Susijungus pakankamo dydžio ubikvitino grandinei, baltymas–taikinyus atpažįstamas, deubikvitilinamas ir perkeliamas į 26S proteosomą. Galiausiai substratas skaidomas į mažus peptidų fragmentus ir ubikvitino molekulės perdirbamos (80) (4 paveikslas). Šis procesas yra griežtai kontroliuojamas ir labai svarbus reguliuojant daugelį ląstelių procesų, įskaitant tuos, kurie dalyvauja navikui vystantis (81), todėl UPK gali būti perspektyvus vėžio gydymo taikinyus.



#### 4 paveikslas. Ubikvitino proteosomos sistema

Ubikvitino prijungimas prie baltymo–taikinio vykdomas trimis etapais, dalyvaujant trimis fermentams – E1, E2 ir E2 ligazėms. 1) E1 ligazė, naudodama ATP, aktyvina ubikvitino molekulę; 2) ubikvitinas perkeliamas ant E2 ligazės – ubikvitiną jungiančio fermento; 3) ubikvitino molekulė jungiama prie baltyminio substrato veikiant E3 ligazei. Ubikvitilinti baltymai degraduojami 26S proteosomos iki trumpų peptidų (82, 83).

E3 ligazės labiausiai apibūdina ubikvitilino specifškumą, nes atpažįsta substratą ir skatina formotis jungčiai tarp ubikvitino C galo ir substrato lizino (69, 84). Ubikvitilino procesas yra grįžtamasis, dalyvaujant deubikvitilino fermentams (DUB) ubikvitinas gali būti



pašalintas nuo substrato (85). Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 600 E3 ubikvitino ligazių ir 100 deubikvitilimo fermentų, formuojančių molekulinę tinklą ir reguliuojančių viduląstelinio ubikvitilimo dinamiką (86). Ubikvitilimo procesas įtrauktas į įvairias fiziologines reakcijas: ląstelių augimą ir žūtį, DNR pažaidų atstatymą, taip pat įvairių rūšių piktybinių navikų, įskaitant odos vėžio formavimosi procesus (72, 87).

E3 ubikvitino ligazės atpažįsta substratą ubikvitilimui ir užtikrina ubikvitilimo proceso specifiškumą. Šios ligazės ženkliai specifiškesnės, lyginant su E2 ir E1 ligazėmis ir taip pat su DUB fermentais, todėl jos gali būti potencialūs gydymo taikiniai (88, 89).

E3 ubikvitino ligazės gali būti vienas peptidas, kaip MDM2 (angl. *mouse double minute 2 homolog*) arba XIAP (angl. *X-linked inhibitor of apoptosis*), arba gali būti sudarytos iš kelių komponentų APC / C (anafazę skatinantis kompleksas / ciklosoma) ar SCF (*SKP1-Cullin 1-F-dėžutės baltymai*). Dauguma E3 ligazių turi papildomų baltymų jungiklių ir gali būti suskirstamos į tris pagrindines grupes: a) RING (angl. *really interesting new gene*) klasės; b) HECT (angl. *homologous to the E6-AP carboxyl terminus*) klasės ir c) U-dėžutės. RING klasės E3 ligazės turi RING tipo domeną, kuris reguliuoja cinko jonų porą. RING E3 ligazės kaip ir U-dėžutės E3 ligazės (struktūriškai susijusi, bet cinko neturinti ligazė) atlieka tarpininko funkciją jungiantis E2 ligazei ir substratui. E3 ligazės RING domenai jungiasi su ubikvitiną jungiančia E2 ligaze ir ubikvitinas perkeliamas ant substrato lizino. Ubikvitino – substrato modifikavimo mechanizmas, dalyvaujant HECT klasės E3 ligazėms, skiriasi nuo RING E3 ligazių. E3 ligazės HECT domenai jungiasi su ubikvitiną jungiančia E2 ligaze ir ubikvitinas pradžioje perkeliamas ant E3 ligazės aktyviosios vietos cisteino, o vėliau perkeliamas ant substrato lizino (90, 91).

RING klasės SCF tipo E3 ligazės yra didžiausios E3 ligazių šeimos atstovės. SCF sudarytas iš keturių struktūrinių ir funkcinių komponentų: a) substrato, atpažįstančio F-dėžutės baltymą; b) SKP1 baltymo; c) CUL klasės baltymų (-1, -2, -3, -4A, -4B, -5 ir -7) ir d) dviejų RING baltymų – RBX1 / ROC1 ir RBX2 / ROC2. Visos SCF E3 ligazės turi panašią struktūrą, CUL jungiasi prie SKP1 ir F-dėžutės baltymų, esančių N-gale, o RING baltymai jungiasi prie RBX1 arba RBX2 prie C-galo (92). F-dėžutės baltymai dažniausiai atpažįsta fosforilintus baltymus-taikinius, o CUL-RBX1 arba CUL-RBX2 sudaro pagrindinį ligazės aktyvumą, katalizuoja ubikvitino perkėlimą iš E2 ant substrato (92, 93).

### 3.5.2. E3 ubikvitino ligazė FBXW7

Žmogaus genome identifikuota daugiau nei 70 galimų F–dėžutės baltymų, nors dauguma jų funkcijų ir substratų lieka neaiškūs (127, 128). Vienas iš gerai ištirtų F–dėžutę turinčių baltymų yra FBW7 (F–dėžutės ir WD pakartotinę domeną turintis 7 baltymas), taip pat žinomas kaip FBXW7. F–dėžutės baltymai – tai SCF tipo E3 ligazių subvienetai, kurie atpažįsta substratą, prisijungia prie jo ir nukreipia ubikvitiliniui ir skaidymui (93).

Žmogaus FBXW7 yra 4 chromosomoje ir koduoja tris transkriptus ( $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$  izoformos), gautus iš to paties geno lokuso. Visos trys izoformos skiriasi N–galiniu egzonu, kuris nulemia skirtingą izoformų lokalizaciją, bet turi konservatyvius domenus C gale (F–box ir WD40 kartojimai). C–galo regionas dalyvauja atpažįstant substratą ir jį ubikvitilinant. FBW7 $\alpha$  lokalizuojasi branduolyje, FBW7 $\beta$  – citoplazmoje, o FBW7 $\gamma$  – branduolėlyje. Manoma, kad FBW7 $\alpha$  atlieka pagrindines FBW7 funkcijas ir yra gausiausia izoforma proliferuojančiose ląstelėse (95). Nustatyta, kad FBXW7 veikia kaip naviko slopiklis, neigiamai reguliuodamas daugelį baltymų onkogenų (94). Taip pat buvo nustatyta daugybė su vėžiu susijusių FBXW7 ir jo substratų mutacijų ir identifikuotas FBXW7 funkcijos netekimas, kuris sukelia chromosomų nestabilumą ir naviko išsivystymą (94, 96, 97).

**FBXW7 reikšmė melanomos atveju.** Melanomos atveju FBXW7 veikia kaip naviko augimo slopiklis. Tyrimai parodė, kad FBXW7 raiška yra ženkliai sumažėjusi esant pirminei ir metastazinei melanomai, lyginant su displastiniais apgamais. Sumažėjęs FBXW7 lygis siejamas su melanomos progresavimu. FBXW7 reguliuoja keratinocitų proliferaciją ir diferenciaciją, sukeldamas c–Myc ir Notch baltymų degradaciją. Esant FBXW7 trūkumui keratinocituose stebima padidėjusi proliferacija, kuri priklauso nuo c–Myc kaupimosi, bet ne nuo Notch baltymų (94, 98). I. T. Aidinas (*I. T. Aycin*) ir bendraautorai įrodė, kad melanomos ląstelėse stebimas sumažėjęs FBXW7 aktyvumas, tai lemia NOTCH1 kaupimąsi ir skatina angiogenezę (9). Taip pat buvo teigiama, kad FBXW7 raiška yra ženkliai mažesnė pirminėje melanomoje nei displastiniuose apgamuose, o metastazinėje melanomoje FBXW7 lygis dar mažesnis lyginant su pirmine melanoma. Sumažėjusi jo raiška yra susijusi su blogesniu melanoma sergančių pacientų penkerių metų išgyvenamumu. Tolesnių *in vitro* tyrimų rezultatai parodė, kad FBXW7 slopina melanomos ląstelių migraciją per mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės / tarpląstelinio signalo

reguliuojamos kinazės (MAPK / ERK) signalinį kelią. Taigi FBXW7 nuslopinimas melanomos ląstelėse lemia padidėjusią ląstelių migraciją ir streso pluošto susidarymą (98). Sumažėjęs FBXW7 raiškos lygis siejamas su melanomos progresavimu ir c-Myc bei NOTCH1 baltymų kaupimusi (9).

Tyrimų metu buvo nustatyta keletas specifinių FBXW7 substratų, tokių kaip Cyclin E, c-Myc, c-Jun, Notch, Mcl-1 (mieloidinių ląstelių leukemija-1), SREBP, mTOR, KLF5 (*Kruppel* panašus veiksnys 5), Aurora A, NF1 (1 tipo neurofibromatozė), NRF1 (branduolio kvėpavimo veiksnys 1) ir HIF-1 $\alpha$  (hipoksiją indukuojantis veiksnys-1 $\alpha$ ) (95). L. Businas (*L. Busino*) su bendraautoriais nustatė, kad p100 yra naujas FBXW7 substratas. FBW7 $\alpha$  nukreipia branduolio p100 proteosominei degradacijai fosforilavimo būdu (99). Keturi FBXW7 substratai (c-Myc, Notch, Cyclin E ir c-JUN) išsiskiria dėl jų mutacijų dažnumo daugelio žmonių piktybinių navikų atvejais.

**E3 ubikvitino ligazės FBXW7 substratas c-Myc.** c-Myc yra onkobaltymas, kurio aktyvacija nustatoma apie 70 proc. visų žmogaus piktybinių navikų atveju, įskaitant leukozę, sarkomą ir karcinomą (100). Myc baltymas yra svarbus normaliam ląstelių augimui, o jo kiekis yra griežtai kontroliuojamas. Mažiausiai keturi skirtingi ubikvitino ligazės kompleksai gali nukreipti Myc proteosomos degradacijai, įskaitant FBXW7 (101). Myc transkriptiškai reguliuoja baltymų sintezę, ląstelių proliferaciją, apoptozę, metabolizmą ir diferenciaciją, o jo funkcijos sutrikimai skatina naviko formavimąsi. FBW7 $\alpha$  stimuliuoja Myc ubikvitilinimą proteosomose, o FBW7 $\gamma$  ubikvitilina Myc branduolyje taip slopindamas Myc gebėjimą stimuliuoti ląstelių augimą (102–106). Taigi FBXW7 raiškos sumažėjimas lemia c-Myc padidėjusią raišką (107). FBW7 atpažįsta ir sąveikauja su kinazės GSK-3 $\beta$  fosforilintu c-MYC ir lemia jo ubikvitilinimą (108). GSK-3 $\beta$  yra PI3K / AKT signalinio kelio taikynys. Fosforilintas GSK-3 $\beta$  nebegali fosforilinti c-MYC ir taip užtikrinama paties c-MYC stabilizacija. Taigi c-MYC reguliatorių PI3K ar FBW7 raiškos sumažėjimas lemia c-MYC padidėjusią raišką (109). Naujausi tyrimai parodė padidėjusią c-Myc raišką išplitusios ir metastazavusios melanomos atveju. X. Linas (*X. Lin*) ir bendraautorai nustatė, kad kliniškai padidėjusi c-Myc raiška siejama su melanomos tolimomis metastazėmis ir bloga prognoze, o biologiškai c-Myc padidinta raiška lemia reikšmingą ląstelių judrumą, invazyvumą ir metastazavimą (10).

**E3 ubikvitino ligazės FBXW7 substratas Notch.** Notch signalinis kelias – konservatyvusis tarpląstelinės sąveikos signalo perdavimo būdas,

aptinkamas evoliuciniu požiūriu skirtinguose organizmuose – nuo bestuburių iki žmogaus (110). Priklausomai nuo ląstelių ir audinių rūšies, Notch signalinis kelias reguliuoja ląstelių proliferaciją, migraciją, diferenciaciją ir apoptozę. Šie procesai labai svarbūs organams vystytis ir audinių homeostazei palaikyti, taip pat dalyvauja odos kancerogenezeje (111).

Nustatyta, kad vienas iš daugelio signalinių kelių, dalyvaujančių vystantis melanomai, yra Notch kelias. NOTCH1 ir NOTCH2 ir jų ligandų JAG1, JAG2 ir DLL1 raiška yra ženkliai didesnė displastiniuose apgamuose ir melanomos atveju nei melanocitiniuose apgamuose, o JAG2 mRNR raiška sumažėjusi invazyvios melanomos ląstelių linijose (112). Notch signalinis kelias turi įtakos naviko transformacijai ir rodo ankstyvuosius procesus vystantis melanomai iš pigmentinių apgamų (112).  $\gamma$ -sekretazės, vieno iš svarbių Notch signalinio kelio fermento, slopinimas sukelia melanomos ląstelių apoptozę, bet neveikia normalių melanocitų. Tai rodo, kad pakitęs Notch kelio aktyvumas melanomos atveju yra svarbus veiksnys melanomos ląstelėms išlikti (16).

*In vitro* ir *in vivo* tyrimų rezultatai parodė, kad NOTCH1 veikia kaip onkogenas ir gali transformuoti nepakitusius melanocitus ir ankstyvosios stadijos melanomos linijų ląsteles į agresyvesnę fenotipą reguliuojant MAPK / ERK ir PI3K / AKT kelius ir stabilizuojant  $\beta$ -kateniną (113).

NOTCH4 didesnis aktyvumas stebimas agresyvios, metastazavusios melanomos linijos ląstelėse nei silpnai agresyviose ląstelėse. Žmogaus audinių pavyzdžiuose šio geno raiška siejama su ligos progresavimu (114).

Daugybė įvairių tyrimų siūlė slopinti Notch signalinį kelią ir tai vertino kaip vėžio gydymo galimybę. Įvairūs Notch signalinio kelio komponentai – receptoriaus ir ligando jungimasis, NICD atlaisvinimas, NICD baltymo stabilumas, NICD sąveika su tam tikrais savitais slopikliais – gali būti potencialūs taikiniai kuriant vaistus. Monokloniniai antikūnai, RNR pažeidimas, receptorių blokavimas, RAS signalinio kelio slopinimas buvo naudojami slopinti Notch signalinį kelią (115).

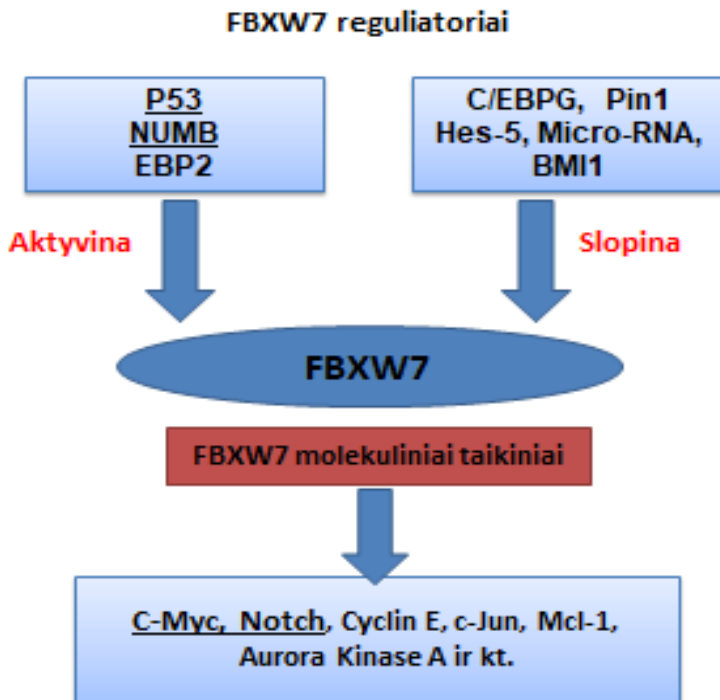
Notch baltymai yra FBXW7 substratas ir priklausomai nuo audinių tipo gali veikti kaip onkobaltymas arba kaip naviko slopiklis. Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, kad FBXW7 inaktyvuojančios mutacijos nustatomos 8,1 proc. melanomos atveju. Dauguma mutacijų aptinkamos WD40 domene, kurios sutrikdo substrato prisijungimą ir sukelia ilgalaikį FBXW7 substrato onkobaltymų aktyvinimą. Buvo nustatyta, kad dėl FBXW7 mutacijų leukemijos ląstelėse slopinama Notch baltymų degradacija – taip padidėja Notch signalinio kelio aktyvumas, ir kad

*FBXW7* mutacijos T ląstelių ūmios limfoblastinės leukemijos atveju gali sukelti atsparumą sekretazės slopikliams, kurie mažina Notch kelio aktyvumą (116). Mutuotas *FBXW7* nesugeba prisijungti prie NCID, nors mutuotos *FBXW7* formos vis dar gali prisijungti prie Myc ir nukreipia Myc degradacijai (94, 116). Buvo nustatyta, kad ūminės T ląstelių limfoblastinės leukemijos atveju NOTCH1 gali tiesiogiai reguliuoti c–Myc, todėl padidėjusi NOTCH1 raiška lemia padidėjusią c–Myc raišką, o c–Myc stimuliuoja piktybinio naviko ląstelių augimą. Daugiau nei 50 proc. ūminės T ląstelių limfoblastinės leukemijos atvejų yra padidėjusi c–Myc raiška, kuri siejama su NOTCH1 (117, 118).

Melanomos atveju padidėjusi Notch kelio raiška gali būti siejama su *FBXW7* mutacija arba inaktyvacija (9, 119, 120). C. Oberg (*C. Oberg*) ir bendraautorai nustatė, kad *FBXW7* ubikvitilina ir neigiamai reguliuoja Notch signalinį kelią (119). Notch viduląstelinio domeno (NICD) reguliavimas vyksta ubikvitilinimo ir proteosominės degradacijos būdu. Taip pat nustatyta, kad Jagged–1 viduląstelinis domenas sąveikauja su NOTCH1 ląstelinio domenu ir stimuliuoja jo skaidymą per *FBXW7* priklausomą proteosominį kelią (121). NOTCH1 slopinimas galėtų „užkirsti kelią“ inaktyvuotos *FBXW7* sukeltos melanomos vystymuisi, todėl Notch signalinis kelias yra perspektyvus melanomos gydymo taikynys pacientams, turintiems *FBXW7* mutacijų. Be to, branduolinės *FBXW7* dažymas parodė glaudžią neigiamą koreliaciją tarp *FBXW7* raiškos pokyčių ir pacientų ligos eigos, o tolesnė *Cox* regresijos analizė atskleidė, kad branduolinės *FBXW7* raiška – nepriklausomas melanomos prognozinis veiksnys. Reikia pažymėti, kad *FBXW7* nutildymas, viena vertus, turėjo minimalų poveikį melanomos ląstelių proliferacijai, antra vertus, ženkliai sustiprino migracijos pajėgumus, ir tai rodo, kad *FBXW7* inaktyvacija turi įtakos melanomai vystytis ir progresuoti (98).

**FBXW7 funkcijos reguliatoriai.** *FBXW7* sumažėjimo mechanizmas navikų atveju vis dar nėra visiškai aiškus. Naujausi tyrimai parodė, kad keletas reguliatorių, tokių kaip p53 ir C / EBP–d (CCAAT / baltymo prisijungimo stipriklis), NUMB, taip pat miRNA (mikroRNR), įskaitant miR–27a ir miR–223, gali tiesiogiai keisti *FBXW7* raišką, ir tai lemia *FBXW7* inaktyvinimą žmogaus piktybinių navikų atvejais (94, 122) (5 paveikslas). Vienas svarbiausių *FBXW7* reguliatorių yra p53. p53 yra pagrindinis baltymas – navikų slopiklis, kurio mutacijų nustatoma daugelio žmonių piktybinių navikų atvejų (74, 123–125). Naviko slopiklis p53 yra transkripcijos veiksnys, kurio veikla suaktyvinama reaguojant į įvairius ląstelių stresus, lemiančius ląstelių ciklo sutrikdymą ar apoptozę,

ir taip apsaugo nuo ląstelės piktybinės transformacijos. Inaktyvuojančios mutacijos, susijusios su *p53* koduojančiu genu, įvyksta maždaug 50 proc. žmogaus navikų atvejų, kurios vaidina svarbų vaidmenį vystantis ir progresuojant vėžiui, taip pat vystantis gydymo atsparumui (126, 127). J. H. Mao (*J. H. Mao*) ir bendraautoriai nustatė, kad *FBXW7* tarpininkauja kritiniam *p53* vaidmeniui reaguojant į DNR pažeidimą, ir tai rodo, kad *FBXW7* yra priklausomas nuo *p53* naviką slopinančio geno, dalyvaujančio navikui vystantis. Daugelio autorių rezultatai parodė, kad, veikiant *p53* signalinį kelią, galėtų būti atstatyta *FBXW7* raiška (107, 128). Žinoma, kad melanomos dažniausiai turi laukinio tipo *p53* (129). Tačiau, atsižvelgiant į melanomos piktybinį pobūdį ir atsparumą gydymui, atrodo, kad melanomos atveju *p53* neveiksmingas kaip naviko slopiklis. Nors šie mechanizmai dar nėra visiškai aiškūs, tačiau yra duomenų, kad kai kurie *p53* taikiniai gali būti išderinti melanomos atveju (130, 131).



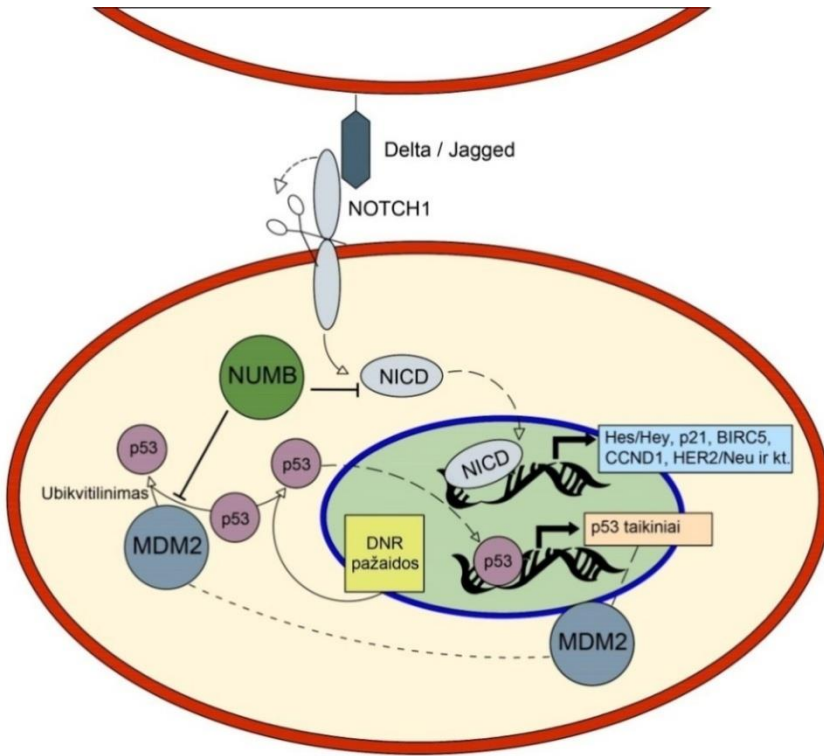
**5 paveikslas.** E3 ligazės *FBXW7* reguliatoriai ir taikiniai piktybinių navikų atvejais

### 3.5.3. E3 ubikvitino ligazė MDM2

E3 ubikvitino ligazė – MDM2, kaip ir anksčiau aptarta FBXW7, priklauso RING E3 ligazių šeimai. E3 ubikvitino ligazė MDM2 yra baltymo p53 naviko slopiklio pagrindinis neigiamas reguliatorius, todėl ši ligazė, slopindama p53, skatina naviko vystymąsi. Nepakitusiose ląstelėse MDM2 buvimas yra būtinas norint išlaikyti p53 baltymą baziniame lygyje, reguliuojant jo ubikvitilinimą ir degradaciją 26S proteosomoje (132, 133). Dalyvaujant E2 ubikvitino jungiančiam fermentui MDM2 veikia kaip E3 ubikvitino ligazė, kuri palengvina p53 perkėlimą iš branduolio į citoplazmą ir nukreipia p53 nuo ubikvitino priklausomam skaidymui proteosomose. Be to, MDM2 slopina p53 funkciją tiesiogiai prisijungusi prie p53 transkripcinės sąveikos vietos – taip užkertamas kelias jo sąveikai su transkripcijos veiksniais. p53 ir MDM2 sąveikauja suformuodami neigiamą autoreguliacinę kilpą, kurioje padidėjęs p53 transkripcijos lygis suaktyvina MDM2, dėl ko savo ruožtu sumažėja p53 lygis (74, 134, 135).

MDM2 taip pat reguliuoja Notch signalinį kelią – pirma, reguliuodama NUMB ubikvitilinimą ir sukeldama jo degradaciją, netiesiogiai suaktyvina Notch signalinį kelią; antra, tiesiogiai veikdama NOTCH1 lemia NICD stabilumą ir aktyvumą (83). Taip pat esama duomenų, kad NOTCH4 ubikvitilinimas ir degradacija, dalyvaujant MDM2, yra atvirkščiai proporcinga p53 baltymo kiekiui ląstelėje (136). Todėl manoma, kad p53–MDM2–NUMB kompleksai gali reguliuoti tiek p53, tiek Notch signalinius kelius (14).

Esant onkogeninei stimuliacijai padidėja p53 baltymo kiekis. p53 jungiasi prie *MDM2* geno p53 prisijungimo vietos ir taip aktyvina MDM2, kuris vėliau, grįžtamojo ryšio metu, slopina p53 veikimą. NUMB baltymas taip pat jungiasi prie E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir slopina ją, tai lemia p53 aktyvinimą. Notch signalinio kelio metu į citoplazmą patekęs atskeltas viduląstelinis Notch domenas NICD gali būti neigiamai reguliuojamas NUMB baltymo, dėl ko NICD negali jungtis prie transkripcijos veiksnių CSL ir aktyvinti Notch signalinio kelio kaskados. Taigi MDM2, skaidydamas NUMB, apsaugo nuo NOTCH1 funkcijos sumažėjimo. Taip pat MDM2 gali tiesiogiai jungtis prie Notch viduląstelinio domeno NICD, lemti jo ubikvitilinimą ir Notch signalinio kelio aktyvinimą (83, 135) (6 paveikslas).



**6 paveikslas.** E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviko slopiklio p53 sąveika (adaptuota pagal (137)). Ligandai (Delta arba Jagged) (viršutinė ląstelė) sąveikauja su gretimos ląstelės (apatinė ląstelė) Notch receptoriais (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4). Receptoriaus ir ligando sąveika sukelia du proteolitinius kirpimus, kurie atlaisvina Notch viduląstelinį domeną (NICD) nuo ląstelės membranos. NICD keliauja į branduolį ir sukelia Notch genų taikinių transkripcijos aktyvinimą.

Nustatyta MDM2 onkobaltymo padidinta raiška daugelyje žmogaus navikų, turinčių laukinio tipo p53 alelį (138). Didelis MDM2 kiekis siejamas su blogesne ligos prognoze atskirų navikų atvejais (89). Piktybinėms melanomoms būdinga padidinta MDM2 raiška. P. Rajabi (*P. Rajabi*) ir bendraautoriai įrodė, kad esama sąsajos tarp MDM2 raiškos lygio, naviko gylio ir invazijos pirminės odos piktybinės melanomos atveju (139). 50 proc. melanomos atvejų nustatoma padidėjusi MDM2 geno raiška, ir tai lemia sustiprėjusią p53 degradaciją, Notch signalinio kelio aktyvaciją ir naviko ląstelių proliferaciją. Priešingai, sumažėjusi MDM2 raiška siejama su melanoma sergančių pacientų geresniu išgyvenamumu (11).



Būtina pažymėti, kad MDM2 yra pagrindinis RAS / RAF / MEK / ERK ir PI3K / AKT signalinių kelių taikynys. Daugelio tyrimų duomenimis, RAS / RAF / MEK / ERK signalinis kelias yra aktyvuotas daugiau kaip 80 proc. visų odos melanomų atvejų. Mitogenu aktyvuotos baltymo kinazės (**MAPK) signalinis kelias** yra vienas iš svarbiausių skirtingų ląstelių tipų signalinių kelių ir fiziologiškai yra susijęs su ekstraląsteliniais signalais, tokių kaip augimo veiksnių ir hormonų perdavimu į branduolį, ir tai sukelia genų, atsakingų už ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir išgyvenamumą, raišką (140,141). Be to, buvo įrodyta, kad MAPK aktyvinimas yra lemiamas veiksnys įvairių tipų navikų biologijoje ir yra dažniausiai pasitaikantis netipiškai aktyvuotas kelias melanomos atveju (142). Iki 90 proc. melanomos atvejų nustatomas netipiškas (klaidingas) MAPK aktyvavimas, ir tai yra pagrindinis veiksnys vystantis melanomai, atsakingas už ląstelių ciklo išderinimą ir apoptozės slopinimą (140, 143, 144). Tarp skirtingų mechanizmų, atsakingų už netipišką MAPK kelio aktyvinimą melanomos atveju, dažniausiai nustatomų genetinių sutrikimų yra *BRAF* mutacijos (145, 146).

***BRAF* geno mutacija** nustatoma apie 50–60 proc. odos melanomų atvejų. Tarp *BRAF* geno mutacijų daugiau nei 90 proc. jų nustatoma 600 kodone, ir kurių 70–80 proc. sudaro vieno nukleotido mutacija, pasireiškianti valino pakaita į glutamatą (*BRAF* V600E), rečiau (10–20 proc.) toje pačioje pozicijoje įvyksta *BRAF* V600K pakaita (valino į liziną), o rečiausiai (<5 proc.) arginino pakaita valinu – *BRAF* V600R (147). *BRAF* geno mutacija dažniausiai nustatoma melanomos, atsiradusios saulės nepažeistoje odoje, atvejais. Atkreiptinas dėmesys, kad gleivinių ir akralinės melanomos atveju šios mutacijos retos (148).

*BRAF* geno mutacijų dažnai (> 80 proc.) nustatoma ir pigmentiniuose apgamuose, ir tai liudija, kad šie somatiniai pokyčiai įvyksta ankstyvoje melanomagenezėje (47). Visgi dauguma apgamų neišsivysto į piktybinę melanomą. Tai rodo, kad *BRAF* mutacija gali būti svarbi, bet nepakankama, kad paskatintų piktybinę transformaciją. Manoma, kad reikalingos ir kitos mutacijos naviko piktybinei transformacijai ir progresijai sukelti, ypač melanomoms, kurios atsirado iš anksčiau buvusio apgamo (47).

Antra dažna priežastis pakitusio MAPK signalinio kelio aktyvumo odos melanomos atveju yra ***NRAS* geno mutacijos**. Žmogaus melanomos atveju *NRAS* mutacijų aptinkama maždaug 15–30 proc. atvejų. Tarp visų *NRAS* mutacijų dažniausiai yra RASQ61K / R– glutamino pakaita 61 pozicijoje lizinu ar argininu (149). Onkogeninė *NRAS* ir *BRAF* raiška skatina

melanomos ląstelių proliferaciją, jų išgyvenimą, invaziją ir angiogenezę aktyvuojant MAPK kelią (150). Be to, NRAS / BRAF aktyvacija tarpininkauja epitelio – mezenchiminio perėjimo (EMT) jungčiai vėlyvosios melanomos stadijoje. EMT yra nepriklausomas melanomos prognoziniis veiksnys. NRAS / BRAF signalinis kelias, atsižvelgiant į aukštą mutacijų dažnumą ir jo svarbų vaidmenį vystantis melanomai, yra potencialus taikinyis vaistams nuo vėžio (47).

Trečia pakitusio MAPK signalinio kelio priežastis yra **NF1 geno mutacijos**. *NF1* yra genas navikų slopiklis ir taip pat trečiasis dažniausiai mutuojantis genas melanomos atveju (10–15 proc. atvejų) (151). NF1 baltymas reguliuoja RAS paverčiant aktyvų RAS–guanozino trifosfatą (RAS–GTP) neaktyviu RAS–guanozino difosfatu (RAS–GDP) ir taip slopina RAS signalinį kelią (152). Todėl NF1 funkcijos praradimas sukelia NRAS baltymo padidintą aktyvinimą ir taip padidėja MAPK ir PI3K signalinio kelio aktyvumas (151–153). NF1 genetiniai pokyčiai dažniau pasireiškia melanomos atvejais, atsiradusiose chroniškai saulės paveiktoje odoje ir yra susiję su daugybe įvairių genetinių mutacijų, tarp jų ir su *BRAF* arba *NRAS* mutacijomis (153).

NF1 mutacijos gydant vaistais gali turėti įtakos atsparumui atsirasti dėl pakitusios sąveikos su BRAF / MEK taikiniiais. Manoma, kad NF1 praradimas turi įtakos atsparumui RAF ir MEK slopikliams, nes nuolat suaktyvinamas MAPK kelias. Naudojant pelių modelius nustatyta, kad *NF1* mutacija slopina *BRAF* sukeltą melanocitų senėjimą, skatina melanocitų proliferaciją ir sustiprina melanomos vystymąsi. Žmogaus melanomos ląstelių linijose NF1 abliacija sumažina melanomos jautrumą BRAF slopikliams. Klinikinių tyrimų duomenys patvirtina eksperimentinius duomenis, nes *NF1* mutacijų randama navikuose kartu su *BRAF* mutacija pacientų, kuriems nustatytas atsparumas BRAF slopikliams (154).

**KIT** (receptorius tirozino kinazė) yra fiziologiškai susijusi su melanomos proliferacija ir išlikimu per PI3K / AKT ir RAS / RAF / MEK / ERK kelius. Šio geno aktyvių somatinių mutacijų buvo nustatyta 2–8 proc. visų piktybinių melanomų atvejų ir dažniau pasireiškia akralinės melanomos, gleivinių melanomos atvejais ir tais melanomos atvejais, kai oda periodiškai buvo veikiama saulės (63, 64).

*BRAF*, *NRAS*, *NF1* ir *KIT* genetiniai pokyčiai yra vertinami kaip pagrindiniai veiksniai vystantis melanomai, tačiau būtina pabrėžti, kad yra daugybė kitų genų, susijusių su melanomos invazyvumu ir metastazavimu (6 lentelė).

**6 lentelė.** Genetiniai pokyčiai odos melanomos atveju (adaptuota pagal (157)).

<b>Genas</b>	<b>Pakitimų dažnis/tipas</b>
<i>BRAF</i>	50–70 proc. mutuoatas
<i>NRAS</i>	15–30 proc. mutuoatas
<i>AKT3</i>	Padidinta raiška, 43–50 proc. selektyvus aktyvumas
<i>Ciklinas D</i>	6–44 proc. sustiprintas (priklausomai nuo potipio: lėtinis saulės poveikis / veido, akralinė ir gleivinių melanoma)
<i>CDK4</i>	Dažniausiai nustatomas akralinės ir gleivinių melanomos atveju
<i>MITF</i>	10–16 proc. sustiprintas
<i>Notch</i>	Padidinta raiška
<i>c-met</i>	Padidinta raiška
<i>c-kit</i>	Sustiprintas ir / arba mutuoatas: 22–39 proc. (gleivinių), 36 proc. (akralinė), 28 proc. (saulės paveiktoje odoje), 15 proc. (analinė)
<i>c-Myc</i>	padidinta raiška
<i>CDKN2A</i>	30–70 proc. ištrintas, mutuoatas arba nutildytas
<i>PTEN</i>	5–20 proc. ištrintas arba mutuoatas
<i>APAF-1</i>	40 proc. nutildytas
<i>p53</i>	10 proc. prarastas arba mutuoatas

Augimo veiksmų signalai, sklindantys per RAS, aktyvina PI3K / AKT signalinį kelią ir MER–ERK, ir tai aktyvina MDM2. AKT fosforilina MDM2, taip lemia jo patekimą į branduolį ir sustiprina jo gebėjimą slopinti p53 (11).

PI3K / AKT signalinis kelias – vienas iš svarbiausių signalinių kelių vėžio atveju, susijęs su melanomos iniciacija ir metastazavimu. Daugybė tyrimų parodė, kad šio kelio aktyvinimas vaidina svarbų vaidmenį melanomos atveju, dažnai nustatant vienu metu RAS / RAF / MEK / ERK signalinių kelių aktyvinimą (158). Dažnas pokytis, sukeltantis PI3K signalinio kelio aktyvavimą sergant melanoma, yra PTEN praradimas. PTEN praradimas siejamas su melanomos progresavimu, dažnai vykstančiu kartu su *BRAF* mutacijomis ir navikuose esant laukiniam tipui *BRAF* / *NRAS*. PTEN netekimas retai pasitaiko melanomos atveju esant

*NRAS* mutacijoms (159). *PTEN* – naviką slopinantis genas, kuris kontroliuoja ląstelių ciklo progresiją ir dažnai yra inaktyvuotas vėžio atveju. Inaktyvintas *PTEN* negali slopinti PI3K, dėl to mitogeniniai baltymai aktyvuojami aukštesniu reguliatoriumi AKT3 (47, 150). AKT3 yra serino / treonino kinazės forma, dažniausiai ekspresuojama žmogaus melanomos atveju, ir jo aktyvinimas genų amplifikacijos būdu nustatomas 60 proc. sporadinių melanomų (150, 160). *PTEN* funkcijos pokyčiai identifikuojami 10–30 proc. odos melanomos atvejų ir dažniausiai aptinkami melanomos vertikalaus augimo fazėje ir metastazėse (146, 161). Genetiniai *PTEN* pokyčiai paprastai nesusiję su *NRAS* mutacijomis, bet dažnai pakinta kartu su *BRAF* funkcijos sutrikimais. *BRAF* mutacijos ir *PTEN* funkcijos sutrikimas kartu aktyvina MAPK ir PI3K kelius – tai prilygsta vien *NRAS* aktyvinimui (162, 163). Klinikinėje praktikoje *PTEN* funkcijos praradimas siejamas su vienu iš svarbiausių mechanizmų vystantis atsparumui *BRAF* slopikliams gydant *BRAF* mutaciją turinčią melanomą (164).

### 3.6. E3 ubikvitino ligazių reikšmė melanomos terapijoje

Molekulinė onkologija atskleidė naujų krypčių gydant piktybinius navikus ir suteikė galimybių skirti gydymą atsižvelgiant į konkretų piktybiniui navikui būdingą taikinį. Tai patvirtina sėkmingas pavyzdys taikant gydymą kinazių slopikliais ir imunomodulatoriais. Tačiau dėl piktybinių navikų heterogeniškumo ne kiekvienam naviko tipui gali būti skiriama tinkama selektyvi terapija, juolab kad kai kurie iš jų geriausiai reaguoja į vaistų derinius (165). Proteosomos slopinimas tam tikra prasme yra molekulinė terapija, nes proteosomų slopikliais veikiama ne daugiau kaip tris proteolitinius fermentus (ir, matyt, keletą papildomų pagalbinių fermentų) proteosomos katalizinėje šerdyje. Antra vertus, beveik 90 proc. ląstelėje tirpių baltymų skaidomi proteosomoje, ir tai rodo, kad proteosomų aktyvumo slopinimas turėtų sukelti visuotinį ir galbūt naikinantį poveikį ląstelėms. Alternatyvus ubikvitino–proteosomos kelio taikinytis – E3 ubikvitino ligazės, iš kurių kiekviena pažymi ribotą skaičių baltymų–taikinių proteosominiam skaidymui, konjuguojant juos į (poli)ubikvitino grandines, galėtų būti perspektyvesnės už proteosomas, nes jos paveiktų nedidelį baltymų pogrupį, o ne, bent jau teoriškai, daugumą ar visus baltymus (165).

Tam tikra pažanga padaryta ieškant E3 ligazių slopiklių, turinčių priešnavikinį potencialą, tačiau tradiciniai metodai, skirti nustatyti E3

slopiklius veikiančius naviką, dar nebuvo sėkmingi. Kadangi kiekviena iš kelių šimtų E3 ligazių lemia tam tikrų baltymų degradaciją kartu su E1 ir E2, selektyvus tam tikros E3 ligazės slopinimas turėtų sukelti selektyvų farmakologinį poveikį esant santykinai nedideliam nepageidaujama poveikiui organizmui (165). Pastangos identifikuoti baltymų ir baltymų sąveikos slopiklius buvo palyginti nesėkmingos, kol nebuvo naudojami struktūrinės biologijos metodai kuriant E3 ligazę veikiančius eksperimentinius priešnavikinius vaistus, tokius kaip nutlinai ir kitos mažos molekulės, kurios sutrikdo p53 naviko slopiklio jungimąsi su atitinkama E3 ligaze HDM2 / MDM2 (166, 167).

### 3.6.1. Naujos kartos MDM2–p53 sąveikos slopikliai nutlinas–3 ir RITA

Kaip jau buvo minėta, apie 95 proc. melanomos atveju *p53* yra laukinio tipo. Kadangi melanomos atveju *p53* dažnai yra struktūriškai nepakitęs, bet praradęs savo funkciją dėl *CDKN2A / ARF* praradimo, todėl *p53* funkcijos atstatymas yra perspektyvus melanomos gydymo taikynys. MDM2 atlieka svarbų vaidmenį ne tik neigiamai reguliuodamas *p53* naviką slopinančio baltymo funkciją, bet ir reguliuodamas Notch signalinį kelią – taip sukeliama NICD slopiklio NUMB degradacija ir aktyvinamas Notch signalinis kelias. Taigi E3 ubikvitino ligazė MDM2 gali būti perspektyvus taikynys veikiant *p53* ir Notch signalinį kelią piktybinės melanomos atveju. Dėl specifinių E3 ligazės MDM2 slopiklių trukūmo, siekiant paveikti taikinį, dėmesys gali būti nukreiptas į MDM2–*p53* sąveikos suardymą arba MDM2 raiškos blokavimą, o ne į tiesioginį poveikį E3 ubikvitino ligazės aktyvumui. Nustatyta daugybė mažų molekulių, galinčių atkurti laukinio tipo *p53* funkciją navikinėse ląstelėse. Vienos iš tokių molekulių, kurios blokuoja *p53* ir MDM2 sąveiką, yra nutlinai. Nutlinai priklauso cis–imidazolinų šeimos junginiams, klinikoje vartojami nutlin–1, nutlin–2, nutlin–3 analogai.

Nutlinai geba sutrikdyti įvairias baltymo–baltymo sąveikas (tarp jų ir *p53*–MDM2) (168). *In vitro* tyrimų metu įvairių navikinių ląstelių linijų atvejais (tarp jų kiaušidžių vėžio, sarkomos ir glioblastomos) nustatyta, kad nutlinai sukelia ląstelių apoptozę (169–171). Kita vertus, H. Tseng (H. Tseng) ir bendraautorai, atlikę tyrimus su melanomos ląstelių linijomis (turinčiomis laukinio tipo *p53*), nustatė, kad nutlinas–3 sukelia greitą ir ilgalaikį *p53* aktyvinimą ir slopina ląstelių augimą, tačiau nesukelia reikšmingos apoptozės (net esant 20  $\mu\text{mol/L}$  koncentracijai ir inkubuojant 48 valandas). Faktas, kad nutlinas–3 nesugeba sukelti apoptozės

melanomos ląstelių linijose, turinčiose tiek laukinio tipo, tiek mutantinį *p53* (net jei *p53* funkcija buvo atstatyta), buvo pastebėtas ir kitų *in vitro* tyrimų metu (172). Atlikta nemažai ikiklinikinių tyrimų, naudojant nutliną kaip terapinį vaistą (daugiausia nutliną–3).

Nustatyta, kad nutlinas jungiasi prie MDM2 N galo ir taip trukdo MDM2–*p53* sąveikai, t. y. slopinama MDM2 funkcija, atkuriamą *p53* funkcija ir toku būdu slopinamas naviko augimas (75, 170). Ypač daug dėmesio skirta įvertinti nutlino potencialą gydyti piktybiniais navikams, tokiems kaip ūmiai mieloleukemijai, ūmiai limfoblastinei leukemijai ir B ląstelių lėtinei limfocitinei leukemijai. Nustatyta, kad gydymas nutlinu veiksmingas esant laukinio tipo *p53*. Naujausi duomenys rodo, kad nutlino veiksmingumas priklauso ir nuo *p53* geno taikinių epigenetinio profilio (17, 173). Navikų, kuriuose *p53* yra funkciškai neaktyvus, tyrimai parodė, kad nutlinas–3 didina *p53* baltymo raišką ir jo aktyvumo lygį. Atkreiptinas dėmesys, kad dar nėra tyrimų rezultatų, kaip keičiasi MDM2 raiška ir funkcija po gydymo nutlinu–3 (174). Neseniai buvo baigtas I fazės klinikinis tyrimas, kurio metu buvo gydyti solidiniai navikai ir hematologinės būklės taikant farmakologiškai optimizuotą nutlino–3 formą – vaistinį preparatą RG7112. Pavyzdžiui, gydant sergančiuosius liposarkoma, rezultatai parodė silpną poveikį, esant daliniam atsakui ir stabiliai ligos eigai 70 proc. visos kohortos. Sunkių nepageidaujamų reakcijų pasireiškė 40 proc. pacientų (175). RG7388 (idasanutlinas), antrosios kartos nutlinas, buvo sukurtas siekiant sustiprinti nutlino poveikį ir sumažinti toksiškumą. Preliminarūs I fazės ir tęstinių tyrimų duomenys rodo teigiamą klinikinį atsaką į gydymą RG7388 (idasanutlinu) tiek monoterapijos, tiek derinant su kitais vaistiniais preparatais ūmios mieloleukemijos atvejais (176).

Kita maža molekulė, slopinanti *p53*–MDM2 sąveiką, yra RITA (angl. *Reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*). RITA jungiasi prie *p53* ir taip sukelia konformacinių pokyčių molekulėje, „užkertančių kelią“ jungtis su MDM2 (177, 178). Panaudojus žmogaus galvos ir kaklo navikų ląstelių liniją (HNC), RITA atkūrė *p53* funkciją ir sukėlė apoptozę *in vitro* tyrimuose (179). Priešnavikinis RITA poveikis taip pat konstatuotas veikiant neuroblastomos linijos ląsteles (180). Priešingai nei nutlinas–3, kuris jungiasi prie MDM2 ir neleidžia jungtis prie *p53*, RITA jungiasi prie *p53* ir neleidžia prisijungti prie MDM2. Tai skatina *p53* kaupimąsi ir sukelia nuo *p53* priklausomą įvairių linijų navikinių ląstelių apoptozę, įskaitant plaučių, storosios žarnos, krūties, odos karcinomos, melanomos ir limfomos atvejus (181). Mažos RITA koncentracijos slopino

navikinių ląstelių, turinčių laukinio tipo p53, augimą, parodė minimalų poveikį ląstelėms, neturinčiom jo. Priešingai nei kiti MDM2 slopikliai, RITA aktyvina p53 jungdamasi prie jo, o ne jungdamasis prie MDM2 (182). Be to, RITA slopino žmogaus ksenografinių navikų augimą pelėse, nesukeldama toksinio poveikio sveikų pelių audiniams (183). Tai leido manyti, kad RITA gali selektyviai aktyvinti p53 naviko ląstelėse.

Nutlinas-3 ir RITA savitai veikia tą patį baltymų kompleksą (MDM2-p53) (129). Tačiau šie mažamolekuliniai junginiai turi ir kitų biologinių taikinių. Nutlinas-3 keičia su MDM2 prisijungiančius partnerius, o RITA daro įtaką p53 sąveikai. M. Burmakinas (*M. Burmakin*) ir bendraautorai nustatė, kad be MDM2-p53 sąveikos RITA suardo ir kitas p53 prisijungimo sąveikas, pavyzdžiui su iASPP (p53 apoptozę stimuliuojančio baltymo slopiklius), Parc (su p53 susijusiu *Parkin* citoplazmos baltymas) arba E6-AP (su E6 susijęs baltymas) (180).

### 3.6.2. E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas

Žinant, kad daug FBXW7 substratų yra onkobaltymai, FBXW7 aktyvinimas (FBXW7 raiška yra sumažėjusi esant pirminei ir metastazavusiai melanomai) gali būti naujos chemoterapijos iššūkis. Aišku, reikia nustatyti tikslų tokio poveikio mechanizmą. Būtina identifikuoti junginius, kurie farmakologiniais ir genetiniais metodais tikslingai veiktų tik FBXW7 ir nesukeltų nepageidaujamo poveikio organizmui. Buvo nustatyta, kad natūralus junginys oridoninas aktyvuoja FBXW7 E3 ubikvitino ligazę, ir tai lemia c-Myc kelio slopinimą (16, 93). Oridoninas yra natūralus diterpenoidinis junginys, išgautas iš kinų tradicinės medicininės žolelės *Isodon rubescens*, ir pasižymi daug žadančiu priešnavikiniu poveikiu, ypač leukemijos atveju (184–186). Oridoninas pasižymi proapoptotiniu aktyvumu įvairiose navikinėse ląstelėse, o eksperimentinio tyrimo su pelėmis metu nesukėlė akivaizdaus šalutinio poveikio (187). Nustatyta, kad oridoninas nukreipia c-Myc onkobaltymą nuo FBXW7 priklausomai degradacijai ir taip sumažina jo transkripcinį aktyvumą (16). Be to, slopindamas c-Myc reguliuojamas mikroRNR, oridoninas mažina atsparumą vaistams tyrimuose naudojant leukemijos ląsteles (188). Veikiant oridoninu leukemijos ir limfomos ląsteles ženkliai padidėjo FBW7 $\alpha$  ir FBW7 $\gamma$  raiška ir sumažėjo c-Myc funkciją (16). Naujaisių tyrimų rezultatai rodo, kad oridoninas slopina melanomos ląstelių migraciją, invaziją ir adheziją, taip pat slopina TGF- $\beta$ 1 sukeltą epitelinę-mezenchiminę tranziciją veikdamas PI3K / Akt / GSK-3 $\beta$

signalinį kelią. Šio tyrimo rezultatai leidžia manyti, kad oridoninas yra perspektyvus terapinis veiksnys gydant melanomos metastazes (189). Žemiau lentelėje pateiktas trumpas slopiklių (nutlino-3 / RITA) ir aktyviklio (oridonino) aprašymas (7 lentelė).

**7 lentelė.** Nutlino-3 / RITA ir oridonino veikimo mechanizmas.

<b>Slopikliai/ aktyvikliai</b>	<b>Trumpas aprašymas</b>	<b>Veikimo mechanizmas</b>
Nutlinas-3	MDM2 slopiklis	Nutlinas-3 yra MDM2 slopiklis, p53 aktyviklis ir apoptozės induktorius. MDM2 jungiasi prie p53 baltymo – naviko slopiklio ir neigiamai reguliuoja jo transkripcinį aktyvumą ir stabilumą. MDM2-p53 sąveikos slopinimas lemia p53 funkcijos atstatymą, ląstelių ciklo sustabdymą ir apoptozę (75, 170).
RITA	p53 aktyviklis	Triliciklinis tiofeno darinys jungiasi prie p53 ir suardo MDM2-p53 kompleksą, tai lemia p53 aktyvumą ir ląstelių apoptozę. Mažos RITA koncentracijos slopina navikinių ląstelių, turinčių laukinio tipo p53, augimą, tačiau turi minimalų poveikį ląstelėms, neturinčioms jo. Priešingai nei kiti MDM2 slopikliai, RITA aktyvina p53, jungdamasis prie jo, o ne jungdamasis prie MDM2 (182).
Oridoninas	E3 ubikvitino ligazės FBXW7 (naviko slopiklio) aktyviklis	Oridoninas pasižymi priešnavikiniu poveikiu. Oridoninas yra efektyvus FBXW7 aktyviklis, c-Myc slopiklis. Oridoninas aktyvina E3 ubikvitino ligazę FBXW7 ir GSK-3 kinazę, kurios sukelia nuo ubikvitino – proteosomos priklausomą c-Myc skaidymą, kuris lemia ląstelių apoptozę ir navikų augimo slopinimą (16).

Apibendrinant literatūros apžvalgą, atkreiptinas dėmesys, kad melanoma – heterogeniškas navikas, kuriam vystantis dalyvauja daug tarpusavyje sąveikaujančių baltymų ir genų. Melanomos ląstelėse vykstančius procesus kontroliuoja įvairūs signaliniai keliai, o eliminavus arba paveikus tam tikrus



genus ir baltymus, įsijungia mechanizmai, kurie gali lemti tolesnę melanomos progresavimą. Ir nors naujas individualizuotas, taikinių terapija pagrįstas gydymas ženkliai pailgino pacientų, sergančių melanoma, bendrąjį išgyvenamumą, melanomos gydymo problema ir toliau išlieka tyrėjų dėmesio centre, ypač dėl išsivystančio atsparumo gydymui, kurio mechanizmai nėra visiškai aiškūs. Todėl būtini tolesni melanomos patogenezės tyrimai molekulinio lygiu siekiant įvertinti atskirų signalinių kelių ir genų tarpusavio sąveikos ypatumus, nustatyti jų reikšmę melanomai progresuojant – taip išsiaiškinti naujus galimus taikinius metastazavusiai melanomai gydyti. Pastarųjų metų mokslinių tyrimų duomenys rodo, kad ubikvitino proteosomos sistemos komponentai gali būti potencialūs prognoziniai biožymenys ir molekuliniai terapiniai taikiniai melanomai gydyti. Siekiant patikslinti E3 ubikvitino ligazių reikšmę ir jų sąveiką su tam tikrų signalinių kelių dalyviais, kurie taip pat gali būti svarbūs formuojantis ir progresuojant melanomai, reikalingi tolesni šios srities moksliniai tyrimai. Šio tyrimo metu siekta įvertinti E3 ubikvitino ligazes kaip galimus naujus molekulinis taikinius melanomai gydyti.

## 4. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

Tyrimas sudarytas iš dviejų dalių – naudotos žmogaus melanomos ląstelių linijos ir pacientų mėginiai (pooperacinė medžiaga).

Tyrimuose *in vitro*, siekiant nustatyti E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos (MDM2–p53) slopiklių nutlino–3 ir RITA ir jų derinių poveikį melanomos ląstelių gyvybingumui, buvo pasirinktos žmogaus metastazavusios melanomos ląstelių linijos. Ląstelių gyvybingumui įvertinti naudotas MTT metodas. Kadangi tyrimo metu siekta nustatyti, kaip keičiasi pasirinktų genų raiška ląstelėse po poveikio minėtais slopikliais ir aktyvikliu, buvo naudojamas kiekybinis polimerazės grandininės reakcijos tyrimas.

*In vivo* tyrimuose, siekiant įvertinti E3 ubikvitino ligazių FBXW7 ir MDM2 ir jų substratų p53 ir c–Myc baltymų raiškos sąsają su melanomos klinikinėmis ir patologinėmis charakteristikomis, buvo naudojami pacientų pooperacinės medžiagos parafino blokai konstruojant audinių mikrogardeles. Tirtųjų ligazių raiška buvo nustatoma baltymų lygmeniu, todėl buvo naudotas imunohistocheminis tyrimas.

### 4.1. Tiriamosios grupės charakteristikos

**Melanomos ląstelių linijos.** Tyrimo metu naudotos žmogaus metastazavusios melanomos ląstelių linijos SK–MEL–26, FM–94 ir FM–3 buvo gautos iš Latvijos biomedicinos tyrimų ir studijų centro. SK–MEL–26 ląstelių linija turėjo patvirtinta *BRAF* geno mutaciją ir laukinio tipo *NRAS* ir *TP53*. FM–94 ir FM–3 ląstelių linijos turėjo patvirtintas *BRAF*, *NRAS* genų mutacijas ir laukinio tipo *TP53*. FM–94 linijos ląstelės gautos iš metastazavusios piktybinės odos melanomos, vyriškosios lyties paciento, o FM–3 ir SK–MEL–26 – moteriškosios lyties paciento.

**Pacientų mėginiai.** Prieš atliekant tyrimą klinikoje buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas vykdyti biomedicininį tyrimą (Nr. 158200–16–878–387, 2016–12–13). Tyrime dalyvavo pacientai, pasirašę Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formas (1–5 priedai).

### ***Įtraukimo į tyrimą kriterijai:***

- visų amžiaus grupių (vyresni nei 18 metų) vyrai ir moterys, kuriems diagnozuotas ir chirurginiu būdu pašalintas displastinis apgamas ar melanoma (pirminiai pacientai);
- pasirašytos Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formos.

### ***Neįtraukimo kriterijai:***

- asmenys iki 18 metų;
- nepakitęs apgamas, kito tipo odos vėžys;
- histologiškai nepatvirtinta diagnozė;
- psichinės, genetinės, nervų – raumenų ligos;
- nėštumas, laktacija;
- paciento atsisakymas dalyvauti tyrime.

Tyrimo rezultatai gauti analizuojant 100 pacientų operacinę biologinę medžiagą atliekant tyrimus audinių mikrogardelėse (angl. *tissue microarrays*, TMA). Į analizę buvo įtraukti asmenų patologiniai mėginiai, iš kurių 16 buvo displastiniai apgamai, 16 melanoma *in situ* ir po 17 – I, II, III ir IV stadijų melanomos mėginių. Išanalizavus klinikinius įrašus nustatyta, kad iš 100 analizuotų atvejų ištirta 39 vyrų ir 61 moters mėginiai. Tiriamųjų amžiaus vidurkis siekė 54,1 metus – iki 50 metų amžiaus fiksuoti 28 atvejai, nuo 50 iki 59 metų – 17 atvejų, vyresnių nei 60 metų – 55 atvejai. Pagal morfologinį melanomos tipą 48 atvejais buvo nustatyta paviršiumi plintanti melanoma, 27 – mazginė melanoma, 9 – *lentigo maligna*. Iš analizuotų melanomos atvejų 26 atvejais melanomos gylis buvo mažesnis nei 1,0 mm, o 42 atvejais didesnis nei 1,1 mm. Iš 68 melanomų nuo pT1 iki pT4 stadijos (pagal naviko gylį – T) 22 atvejais buvo išopėjusios. 77 proc. visų atvejų navikas buvo nustatytas saulės paveiktoje vietoje. Pacientų klinikinės ir pataloginės charakteristikos pateiktos 8 lentelėje.

**8 lentelė.** Tiriamosios grupės klinikinės ir pataloginės charakteristikos.

<b>Charakteristika</b>	<b>n</b>	
<b>Iš viso atvejų</b>	<b>100</b>	
<b>Lytis</b>	Vyrai	39
	Moterys	61
<b>Amžius</b>	≤58	44
	>58	56
<b>Naviko stadijos pagal gylį (pT)</b>	Displastinis apgamas	16
	Melanoma <i>in situ</i>	16
	pT1	17
	pT2	17
	pT3	17
<b>Naviko morfologinis tipas</b>	pT4	17
	Displastinis apgamas	16
	Paviršiumi plintanti melanoma	48
	<i>Lentigo maligna</i> melanoma	9
<b>Naviko invazijos gylis</b>	Mazginė melanoma	27
	Be invazijos	32
	0,1–1,0 mm	26
<b>Naviko lokalizacija</b>	1,1 mm +	42
	Saulės nepaveiktoje odoje	13
	Saulės paveiktoje odoje	77
<b>Melanomos išopėjimas (pT1–pT4)</b>	Nežinoma	10
	<b>Iš viso:</b>	<b>68</b>
	Be išopėjimo	46
	Su išopėjimu	22

Iš ligos istorijų buvo surinktos ir vertinamos šios klinikinės pacientų ir pataloginės odos darinių charakteristikos: pacientų lytis, amžius, naviko pataloginė stadija pagal gylį (pT), morfologinis naviko tipas, išopėjimas bei lokalizacija.

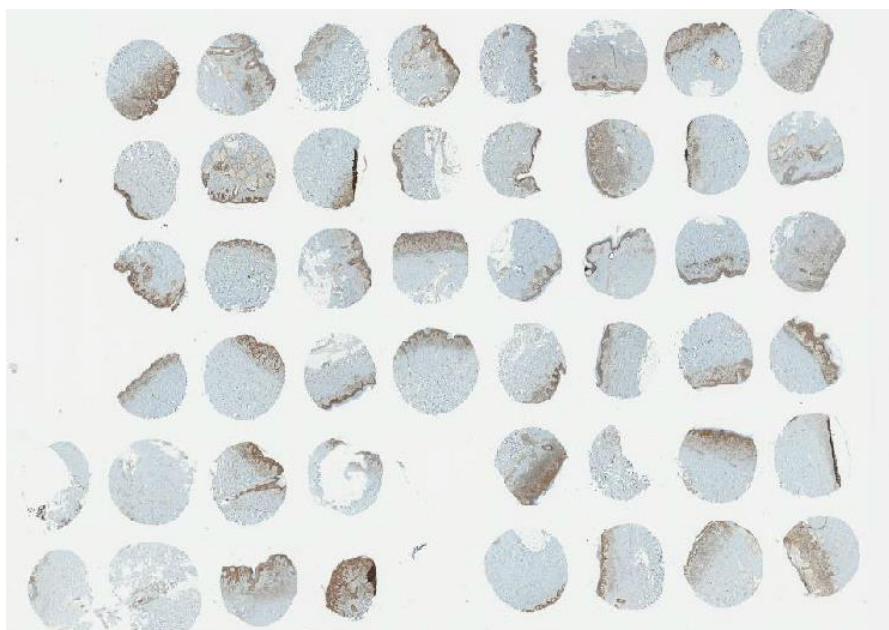
## 4.2. Tyrimo metodai

### 4.2.1. Mėginių paruošimas

- SK–MEL–26, FM–94 ir FM–3 žmogaus metastazavusios melanomos ląstelių linijos buvo kultivuojamos DMEM (angl. *Dulbecco's modified eagle medium*) terpėje su 10 proc. FBS (angl. *fetal bovine serum*), 2 mM L – glutamino, 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino, 37°C temperatūros, 5 proc. CO<sub>2</sub> ir 95 proc. drėgmės sąlygomis CO<sub>2</sub> inkubatoriuje. Ląstelės buvo persėjamos kas 2–3 dienas. Išsėjamų ląstelių skaičius buvo nustatomas naudojant Neubauerio hemacitometro kamerą (*HEINZ HERENZ Medizinalbedarf GmbH*, Vokietija).
- Prieš nustatant MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3, RITA ir FBXW7 aktyviklio oridonino poveikį melanomos ląstelių linijoms, 4000 ( $4 \cdot 10^4$ ) ląstelių / ml buvo išpilstytos į 96 šulinėlių plokštes. Po 24 val. inkubacijos ląstelės buvo ištrauktos iš CO<sub>2</sub> inkubatoriaus ir SK–MEL–26 linijos ląstelės paveiktos skirtingų koncentracijų slopikliais RITA (1 µM ir 0,5 µM) ir nutlinu–3 (12 µM ir 6 µM), jų deriniu RITA (0,5 µM) ir nutlinu–3 (6 µM) bei skirtingų koncentracijų aktyvikliu oridoninu (2,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM ir 120 µM). Paveikus SK–MEL–26 ląsteles slopikliais (nutlino–3, RITA), jų gyvybingumas buvo vertinamas po 48 ir 72 valandų inkubacijos, paveikus aktyvikliu oridoninu – po 24, 48 ir 72 valandų. FM–94 ir FM–3 linijų ląstelės buvo paveiktos skirtingos koncentracijos slopikliais: nutlinu–3 (30 µM, 20 µM, 16 µM), RITA (1,6 µM, 1 µM, 0,5 µM), aktyvikliu oridoninu (120 µM, 60 µM, 30 µM, 15 µM, 2,5 µM) ir jų deriniais (20 µM nutlinas–3 + 0,5 µM RITA, 30 µM oridoninas + 0,5 µM RITA, 30 µM oridoninas + 20 µM nutlinas–3, 30 µM oridoninas + 20 µM nutlinas–3 + 0,5 µM RITA). Paveikus FM–94 ir FM–3 ląsteles slopikliais (nutlinu–3, RITA), aktyvikliu oridoninu bei jų deriniais gyvybingumas buvo vertinamas po 24, 48 ir 72 valandų. Kadangi slopikliai ir aktyviklis buvo ištirpinti DMSO (angl. *dimethyl sulfoxide*), kontroliniam poveikiui pasirinkta 0,1 proc. DMSO.
- Pacientų pooperacinė medžiaga atrinkta iš 100 pacientų, kuriems 2013–2018 metais Nacionaliniame vėžio institute (NVI) buvo diagnozuotas, chirurginiu būdu pašalintas ir Vilniaus universiteto

ligoninės Santaros klinikų filiale Valstybiniame patologijos centre (VPC) morfologiškai patvirtintas displastinis apgamas arba melanoma. Audinių mikrogardelių (TMA) ruošimas, histologinė ir imunohistocheminė (IHC) analizė bei skenuotų vaizdų vizualus patologo vertinimas buvo atliktas VPC. Visuose mėginiuose buvo vertinama FBXW7, c-Myc, MDM2 ir p53 baltymų raiška balais nuo 0 iki 3 ir procentais pagal branduolių nusidažymo intensyvumą.

- Audinių mikrogardelės buvo sukonstruotos iš 10 proc. buferinio formalino tirpale fiksuotų, parafinu impregnuotų audinių blokų. Audinių parafino blokus peržiūrėjo ir mikrogardelėms atrinko gydytojas patologas. Iš gydytojo patologo žymėtų naviko zonų buvo paimti 2 mm diametro mėginiai (po 1 kiekvienam pacientui). Tokiu būdu naudojant audinių mikrogardelių ruošimo aparatą (*3DHISTECH, TMA Master*, Budapeštas, Vengrija) buvo sukonstruotos 2 TMA (7 paveikslas).



**7. paveikslas.** Audinių mikrogardelės pjūvis

#### 4.2.2. Ląstelių gyvybingumo nustatymas

Ląstelių gyvybingumas buvo vertinamas po poveikio slopikliais (nutlinu-3 / RITA) ir aktyvikliu (oridoninu) naudojant MTT dažą (3-[4,5-di-metiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolas) ir Vybrant® MTT ląstelių proliferacijos analizės įrankį (*Molecular Probes*, JAV). Priklausomai nuo NAD(P)H kiekio ląstelėje, spalvinis indikatorius – tetrazolio druska MTT daugelio dehidrogenazių yra redukuojama iki stipraus chromoforo – netirpus junginio formazano. Formazano kiekis proporcingas gyvybingoms ląstelėms. Jo koncentracija nustatoma spektrofotometru, išmatuojant visų pavyzdžių optinį tankį. Spektrofotometru (*Mindray MR-96A*, Kinija) išmatuojamas optinis tankis, esant 540 nm bangos ilgiui. Gauti mėginių optiniai tankiai buvo apdoroti naudojantis *Microsoft Office* paketo *Excel 2016* programa.

#### 4.2.3. Kiekybinė PGR

RNR buvo išskirta iš ląstelių naudojant rinkinį *GeneJET RNA Purification Kit* (*Thermo Scientific*, Lietuva). Bendras RNR kiekis buvo nustatytas spektrofotometru (*Thermo Scientific Nanodrop 200c*, Lietuva), o vientisumas – 2 proc. agarozės gelio elektroforeze. kDNR sintezė buvo atlikta naudojant rinkinį *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Scientific*, Lietuva) ir sintezės rinkinį.

kDNR sintezė atlikta automatinio termocikleriu (*Eppendorf Thermomixer*, Vokietija) laikantis gamintojo rekomendacijų. kDNR sintezei buvo naudojama RNR, gauta SK-MEL-26, FM-94 ląsteles paveikus kontroliniu tirpalu, slopikliais nutlinu-3 / RITA ir aktyvikliu oridoninu. Susintetinta kDNR buvo naudojama kaip kiekybinės PGR reakcijos šablonas (9 lentelė).

**9 lentelė.** Pasirinktų genų tiesioginiai ir atvirkštiniai pradmenys, naudoti kiekybinei PGR reakcijai.

Genas	Pradmuo	Nukleotidų seka
<i>HPRT1</i>	tiesioginis	5'-CTGAAGAGCTATTGTAATGACCAG-3'
	atvirkštinis	5'-CCTGACCAAGGAAAGCAAAG-3'
<i>TBP</i>	tiesioginis	5'-GTACCGCAGCTGCAAAT-3'
	atvirkštinis	5'-CTCATGATTACCGCAGCAA-3'
<i>p53</i>	tiesioginis	5'-CTCACTCCAGCCACCTGAA-3'
	atvirkštinis	5'-AAGTGGAGAATGTCAGTCTGAGTC-3'

## 9 lentelės tęsinys

Genas	Pradmuo	Nukleotidų seka
<i>NUMB</i>	tiesioginis	5'-TGCAGTGCCAGAAGTAGAAGG-3'
	atvirkštinis	5'-AGCAGATGAGAAGGGGTCCT-3'
<i>MDM4</i>	tiesioginis	5'-TGCATTCTTGCCTAGTTTTCC-3'
	atvirkštinis	5'-AGCACAATTA AAAAGTATTA AAAAGCA-3'
<i>MDM2</i>	tiesioginis	5'-GACCCTGGTTAGACCAAAGC-3'
	atvirkštinis	5'-TGTTGCTTCTCATCATATAATCGTT -3'
<i>NOTCH1</i>	tiesioginis	5'-GCAGAACAACAGGGAGGAGA-3'
	atvirkštinis	5'-CAGCAGCCTCACGATGTC -3'
<i>NOTCH2</i>	tiesioginis	5'-GGAGGAGGCGACCGAGAA-3'
	atvirkštinis	5'-GCCTTCTGGACATTTGCAGTATC
<i>NOTCH3</i>	tiesioginis	5'-CCTGTGGCCCTCATGGTATC-3'
	atvirkštinis	5'-CATGGGTTGGGGTCACAGTC -3'
<i>FBXW7</i>	tiesioginis	5'-ATGTTTCAGAGCTGGAGTGGA-3'
	atvirkštinis	5'-TGCCA ACTCTTTAGGGAGCA-3'
<i>LNX1</i>	tiesioginis	5'GGAATTACCACGGTGCTTGTAT-3'
	atvirkštinis	5'-TGTATGCTGGTGTTCCTTCAAC-3'
<i>BBC3</i>	tiesioginis	5'-GGAGACAAGAGGAGCAGCAG-3'
	atvirkštinis	5'-GCACCTAATTGGGCTCCATC-3'
<i>c-Myc</i>	tiesioginis	5'-CAGCGACTCTGAGGAGGAAC-3'
	atvirkštinis	5'-GCTGTGAGGAGGTTTGCTGT-3'
<i>JUN</i>	tiesioginis	5'-CCAATTTGGAATCTTCTTTGA-3'
	atvirkštinis	5'-TTTTGGTATTTGAATACATTTATTGTG-3'
<i>CCNE1</i>	tiesioginis	5'-CTTGGATTTGCTGGACAAAG-3'
	atvirkštinis	5'-GCTCTGCTTCTTACCGCTCT-3'
<i>CDKN1A</i>	tiesioginis	5'-GCATGACAGATTTCTACCACTCC-3'
	atvirkštinis	5'-AAGATGTAGAGCGGGCCTTT-3'
<i>CCND1</i>	tiesioginis	5'-TGTGCCACAGATGTGAAGTT-3'
	atvirkštinis	5'-CGGGTCACACTTGATCACTC-3'
<i>CDKN2A</i>	tiesioginis	5'-CAGACATCCCCGATTGAAAG-3'
	atvirkštinis	5'-TTTTCTAAATGAAA ACTACGAAAGC-3'
<i>PARP9</i>	tiesioginis	5'-GGATGGACTTTTCCATGGTG-3'
	atvirkštinis	5'-TCCCCTTTCTCCACTGAGG-3'
<i>JAG2</i>	tiesioginis	5'-CAGCTGGACGCCAATGAGT-3'
	atvirkštinis	5'-CCCGGGATGCAATCACAGTA-3'

Amplifikavimo produktas buvo aptiktas naudojant *Sybr Green PCR Mix* (2x) (*Thermo Scientific*, Lietuva) reagentus. Santykinis genų raiškos pokytis buvo apskaičiuotas lyginamosios kritinės ribinės vertės metodu naudojant tikro laiko PGR sistemą (*Eppendorf Mastercycler egradient S*,



JAV). Siekiant normalizuoti tiriamų genų raišką buvo amplifikuojami *HPRT1* ir *TBP* „namų apyvokos“ genai.

Tiriamų genų transkriptų kiekiai – genų raiškos pokyčiai (kartais), kurie palyginami su ląstelių, kurios nepaveiktos slopikliais ir aktyvikliu (kontrolė), transkriptų kiekiu, buvo apskaičiuojami pagal formulę (1):

$$k = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Formulėje laipsninis rodiklis išreiškiamas lygybe (2):

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{genas} - Ct_{HPRT1 \text{ arba } TBP})_{po \text{ poveikio reagentais}} - (Ct_{genas} - Ct_{HPRT1 \text{ arba } TBP})_{kontrolė}.$$

Ct (angl. *threshold cycle*) – reikšmė, nurodanti, kiek amplifikacijos ciklų prireikė tam, kad būtų užfiksuotas tiriamo pavyzdžio signalas.

Slenkstinė riba, nuo kurios stebima, ar geno raiška reikšmingai padidėjo / sumažėjo, laikoma, kai genų raiškos pokyčio (kartais) reikšmė siekia  $\geq 2$  arba  $\leq 2$ .

#### 4.2.4. Audinių mikrogardelių imunohistocheminė (IHC) analizė

TMA blokai, skirti imunohistochemijai, buvo supjaustyti į 2  $\mu\text{m}$  storio mėginius ir sumontuoti ant TOMO adhezinio stiklo plokštelių (*Matsunami Glass*, Oska, Japonija). Mėginiai buvo deparafinuoti, dehidratuoti. p53 ir c-Myc antigenams aptikti buvo naudojama *DAKO PTLINK* sistema su *EnVision FLEX Target* buferiu (pH 8,0) 95°C temperatūroje 20 minučių (*Dako; Agilent Technologies, Inc.*), o FBXW7 ir MDM2 antigenams aptikti buvo naudojama *Ventana Benchmark Ultra* sistema su ląstelių kondicionavimo tirpalu (pH 8,5) 100°C temperatūroje 36 minutes. (*Ventana* medicinos sistemos). Vėliau mėginiai buvo inkubuoti: p53 (kat. Nr. DO-7; *Dako; Agilent Technologies, Inc.*; 1:200) ir c-Myc (kat. Nr. Y69; *Abcam*; 1:40) kambario temperatūroje 30 minučių, naudojant *DAKO EnVision FLEX* sistemą. Inkubacija su FBXW7 (kat. Nr. OT16F5; *Invitrogen*; 1:50) ir MDM2 (IF2; *Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.*; 1:250) buvo atlikta naudojant *Ventana Ultraview DAB* aptikimo rinkinį 37°C temperatūroje 32 minutes. Galiausiai sekcijos buvo padengtos Majerio (*Mayer*) hematoksilinu kambario temperatūroje 10 minutes. Neigiamą kontrolę buvo atlikta netaikant pirminio antikūno.

Skaitmeniniai vaizdai buvo užfiksuoti naudojant *Aperio ScanScope XT* skaidrių skaitytuvą (*Leica Aperio Technologies, Vista, CA, JAV*), padidinant objektyvo dydį 20 kartų (skiriamoji geba 0,5  $\mu\text{m}$ ).

Baltymų imuninio dažymo intensyvumas buvo įvertintas balais nuo 0 iki 3 (0 – neigiamas, 1 – silpnas, 2 – vidutinis, 3 – stiprus), branduolinio nusidažymo intensyvumas išreikštas procentais.

#### 4.2.5. Statistinė duomenų analizė

Melanomos FM–94 ir FM–3 linijų ląstelių gyvybingumui įvertinti taikytas Stjudento testas, siekiant įvertinti, kiek reikšmingai gauti rezultatai (ląstelių gyvybingumo rodikliai procentais) skiriasi nuo kontrolės (DMSO). Veikiant ląsteles atitinkamos koncentracijos slopikliais (nutlinu–3 / RITA) arba aktyvikliu oridoninu bei jų deriniais buvo atlikta po tris bandymus ir išmatuotos mėginių optinio tankio reikšmės. Iš visų trijų bandymų reikšmių buvo išvestas aritmetinis vidurkis. Vidurkio reikšmė buvo palyginta su kontrolės vidurkio reikšme ir skirtumas išreikštas procentais. Taip pat buvo įvertintas standartinis nuokrypis, siekiant įvertinti, kiek daug gautos reikšmės skiriasi nuo vidutinės reikšmės. Duomenų paskirstymas pagal normalųjų dėsnį vertintas naudojant Kolmogorovo–Smirnovą testą.

SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumo reikšmių po poveikio oridoninu vidurkių palyginimui buvo atlikta vienpusė dispersijos analizė (ANOVA). Suporuotų reikšmių palyginimui buvo naudotas Holmo–Sidako (*Holm-Sidak*) testas.

Tiriamų genų raiškos pokyčiai (kartais) buvo apskaičiuojami naudojant *Ct* formulę (aprašyta skyriuje 2.2.3. Kiekybinė PGR).

Slenkstinė riba, nuo kurios stebima, ar geno raiška reikšmingai padidėjo / sumažėjo, laikoma, kai genų raiškos pokyčio (kartais) reikšmė siekė  $\geq 2$  arba  $\leq 2$ .

Baltymų raiškos tyrimų pacientų pooperacinėje medžiagoje statistinė analizė buvo atlikta naudojant STATA 11.2 (*StataCorp LP, TX, JAV*) programą. Visų tirtųjų baltymų nusidažymo balai buvo gauti derinant imuninio dažymo intensyvumą ir branduolinio nusidažymo intensyvumą procentais. Baltymų imuninio dažymo intensyvumas buvo suskirstytas balais nuo 0 iki 3 (0 – neigiamas, 1 – silpnas, 2 – vidutinis, 3 – stiprus); branduolinio nusidažymo intensyvumo procentas buvo suskirstytas į 4 kategorijas: 0–25 proc. – 1, 26–50 proc. – 2, 51–75 proc. – 3 ir 76–100 proc. – 4. Remiantis dažymo balais, baltymų raiška buvo klasifikuojama kaip žema (dažymo balai nuo 0 iki 6) ir aukšta (dažymo balai nuo 7 iki 12).

Sąsajoms tarp lyginamųjų grupių kokybinių rodiklių įvertinti naudotas Chi kvadrato ( $\chi^2$ , angl. *Chi-square*) testas.

Imties dydis buvo apskaičiuotas naudojant Diuseldorfo universiteto sukurta programą <http://www.gpower.hhu.de/>. Imties dydis buvo skaičiuotas taip, kad esant reikšmingumo lygmeniui 0,05, kriterijaus galia būtų pakankama statistiškai reikšmingiems pokyčiams nustatyti. Apskaičiuota, kad esant reikšmingumo lygmeniui  $\alpha=0,05$  ( $\beta=0,20$ ), vienos grupės analitiniam tyrimui imties dydį turi sudaryti 85 mėginiai. Šiame tyrime naudota 100 mėginių. Lyginant dvi grupes (32 neinvazyvūs navikai ir 68 melanomos), esant  $\alpha=0,05$  ( $\beta=0,20$ , standartiniam nuokrypiui SN=1), apskaičiuota tyrimo galia 80 proc. ir efekto dydis 0.593. Kad būtų patikrinti atskirų subgrupių skirtumai (pagal pT stadijas), esant reikšmingumo lygmeniui 0,05 ( $\beta=0,20$ , SN=0,5), pakanka po 17 mėginių kiekvienoje grupėje.

Vienaveiksmė ir daugiaveiksmė Cox regresinė analizė atlikta siekiant įvertinti, kurie iš tirtųjų baltymų raiškos pokyčių, klinikinių – patologinių charakteristikų ir jų sąveikos turi reikšmę pacientų mirtingumo rizikai. Buvo vertinamas rizikos santykis (HR – angl. *Hazard ratio*), koreguotas HR ir 95 proc. pasikliautiniai intervalai. p reikšmė  $< 0,05$  buvo vertinama kaip statistiškai reikšminga. Kai p reikšmė buvo nuo 0,05 iki 0,1 – skirtumai laikyti tendencingais.

Ekspperimentai su ląstelių linijomis buvo atlikti Gyvybės mokslų centre<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Darbo autorė dėkoja dr. Violetai Jonušienei, dr. Danutei Labeikytei, Viliui Vilčinskiui ir Aistei Petrovaitei. Atliekant statistinius skaičiavimus, konsultavo Ieva Vincerževskienė (NVI).

## 5. REZULTATAI

5.1. E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos (MDM2–p53) slopiklių nutlino–3 ir RITA, E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir jų derinių poveikis žmogaus metastazavusios melanomos ląstelėms

Vienas iš šio disertacinio darbo uždavinių buvo nustatyti E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos (MDM2–p53) slopiklių nutlino–3 ir RITA ir jų derinių (nutlino–3 ir RITA; oridonino ir RITA; oridonino ir nutlino–3; oridonino, nutlino–3 ir RITA) poveikį žmogaus metastazavusios melanomos SK–MEL–26, FM–3 ir FM–94 linijų ląstelių gyvybingumui.

5.1.1. MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA, E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino poveikio žmogaus metastazavusios melanomos SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumui įvertinimas

Pirminių tyrimų metu siekta nustatyti įvairių koncentracijų ir skirtingos inkubacijos E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos (MDM2–p53) slopiklių RITA ir nutlino–3 bei E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino poveikį žmogaus metastazavusios melanomos SK–MEL–26 linijos ląstelėms.

**MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA poveikis SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumui.**

*Rezultatai po 48 val. inkubacijos:*

- Mažesnės MDM2–p53 sąveikos slopiklio koncentracijos (6  $\mu\text{M}$ ) nutlinas–3 reikšmingos įtakos SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumui neturėjo. Šios linijos ląstelių gyvybingumą neženkliai slopino 12  $\mu\text{M}$  koncentracijos nutlinas–3 – ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki 85,51 proc.
- Abiejų MDM2–p53 sąveikos slopiklio RITA (1 $\mu\text{M}$  ir 0,5  $\mu\text{M}$ ) koncentracijų preparatai neturėjo poveikio SK–MEL–26 ląstelėms, jų gyvybingumas išliko didelis – apie 90 proc.
- Po MDM2–p53 sąveikos slopiklių RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (6  $\mu\text{M}$ ) derinio poveikio SK–MEL–26 ląstelių gyvybingumas sumažėjo neženkliai – iki 84,75 proc.

Kadangi po 48 val. inkubacijos tiriami MDM2–p53 sąveikos slopikliai neturėjo reikšmingo poveikio SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumui, vėliau buvo vertinamas didesnės ekspozicijos (po 72 val. inkubacijos) poveikis ląstelėms.

*Rezultatai po 72 val. inkubacijos:*

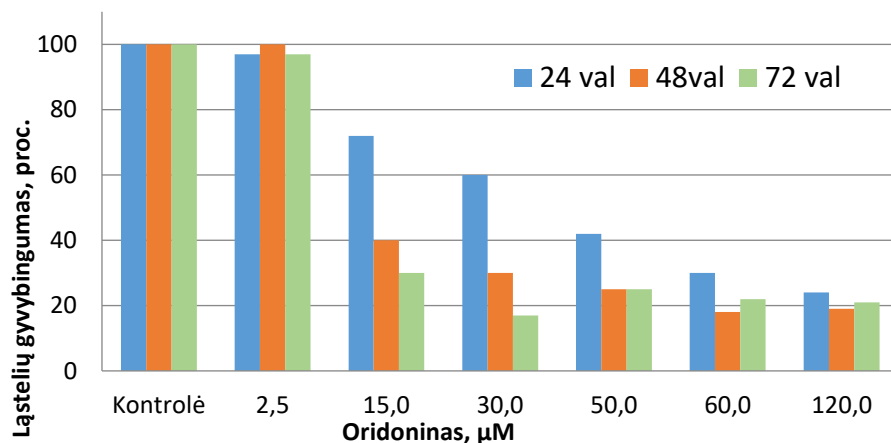
Po 72 val., kaip ir po 48 val., ląstelių gyvybingumas nepasikeitė, po poveikio MDM2–p53 sąveikos slopikliu nutlinu–3 esant jo koncentracijai 12  $\mu\text{M}$  SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumas išliko didelis (98,73 proc.), o po MDM2–p53 sąveikos slopiklių RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (6  $\mu\text{M}$ ) derinio poveikio SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumas neženkliai sumažėjo (iki 81,15 proc.).

Iš gautų duomenų matyti, kad MDM2–p53 sąveikos slopikliai nutlinas–3 ir RITA neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumui po 48 ir 72 val. inkubacijos.

### **E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino poveikis SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumui.**

Po 24 val. inkubacijos veiksmingiausiai SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumą veikė 60  $\mu\text{M}$  ir 120  $\mu\text{M}$  koncentracijos oridoninas – ląstelių gyvybingumas sumažėjo atitinkamai iki 30 proc. ir 24 proc.

Po 48 val. ir 72 val. inkubacijos stebėta ta pati tirtų SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumo pokyčių tendencija, t. y. veiksmingiausiai ląstelių gyvybingumą veikė didesnės (60  $\mu\text{M}$  ir 120  $\mu\text{M}$ ) koncentracijos oridoninas – ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki 18 proc. ( $p < 0,001$ ) (8 paveikslas).

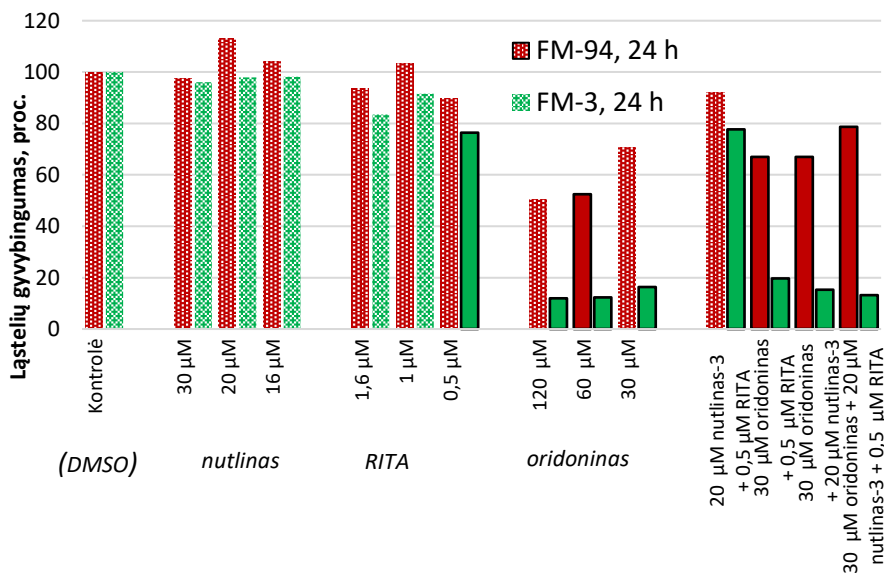


**8 paveikslas.** SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumas paveikus jas oridoninu (2,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  ir 120  $\mu\text{M}$ ) po 24, 48 ir 72 val. inkubacijos.

Gauti duomenys rodo, kad FBXW7 aktyviklis oridoninas veiksmingai slopino SK–MEL–26 ląstelių gyvybingumą priklausomai nuo poveikio laiko ir dozės: efektyviausiai veikė 60  $\mu\text{M}$  koncentracijos oridoninas po 48 val. inkubacijos.

Siekiant tiksliau įvertinti MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA bei E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino poveikį melanomos ląstelių gyvybingumui, buvo tęsiami tyrimai su skirtingomis ląstelių linijomis veikiant ląsteles didesnėmis MDM2–p53 sąveikos slopiklių ir FBXW7 aktyviklio bei jų derinių koncentracijomis.

### 5.1.2. MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA, E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino ir jų derinių poveikio FM–3 ir FM–94 linijų ląstelių gyvybingumui įvertinimas



**9 paveikslas.** FM–94 ir FM–3 ląstelių gyvybingumas paveikus jas nutlino–3 (30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ ), RITA (1,6  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ ), oridoninu (120  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ ), slopiklių ir aktyviklio deriniais: nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) (po 24 val. inkubacijos). Paryškinti stulpeliai rodo statistiškai reikšmingą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą.

Po 24 val. inkubacijos (9 paveikslas):

- Paveikus FM–94 ir FM–3 linijų ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliu nutlino–3 (30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ ) abiejų linijų ląstelės

jam buvo atsparios. FM–94 ląstelių gyvybingumas (pagal nurodytą koncentracijų tvarką) buvo atitinkamai 97,65 proc., 112,99 proc., 104,11 proc., o FM–3 – 96,10 proc., 97,97 proc., 98,21 proc.

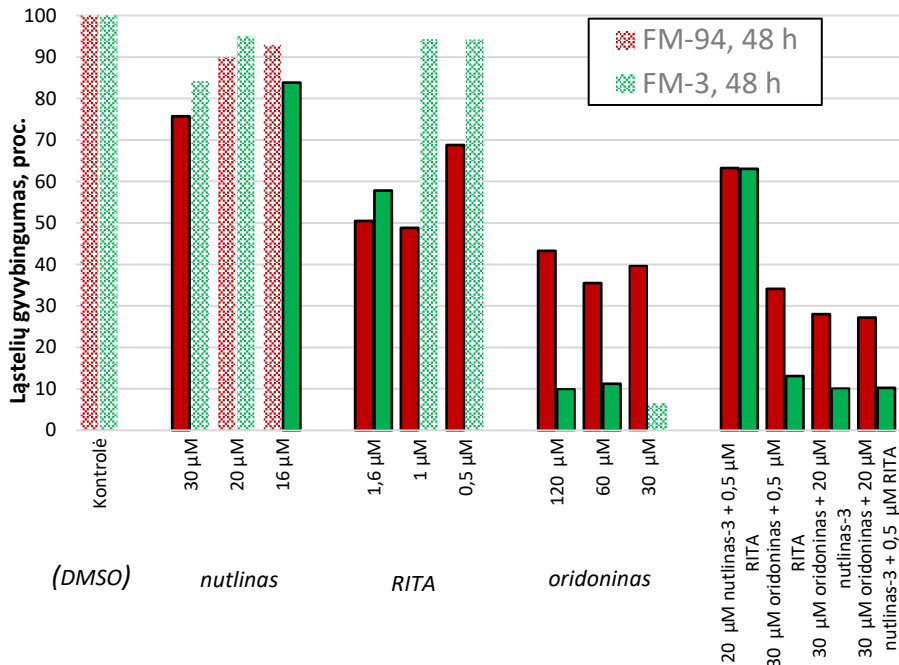
- Paveikus minėtų linijų ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliu RITA (1,6  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ ) abiejų linijų ląstelių gyvybingumas išliko didelis. FM–94 gyvybingumas (pagal nurodytą koncentracijų tvarką) buvo 93,62 proc., 103,30 proc., 89,58 proc., o FM–3 – 83,44 proc., 91,53 proc., 76,41 proc.
- Po poveikio E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikiu oridoninu (120  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ ) abiejų linijų ląstelių gyvybingumas ženkliai sumažėjo. Pabrėžtina, kad FM–3 linijos ląstelės pasižymėjo didesniu jautrumu oridonino poveikiui. FM–94 gyvybingumas (pagal nurodytą koncentracijų tvarką) buvo 50,24 proc., 52,46 proc. ir 70,82 proc., o FM–3 ląstelių – 11,95 proc., 12,30 proc. ir 16,34 proc.
- MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) derinys reikšmingo poveikio abiejų linijų ląstelėms neturėjo. FM–94 linijos ląstelių gyvybingumas buvo 92 proc., o FM–3 – 77,7 proc.
- Paveikus FM–94 ir FM–3 linijų ląsteles oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) deriniais, FM–94 linijos ląstelių gyvybingumas buvo atitinkamai 66,98 proc., 66,98 proc., 78,69 proc. FM–3 linijos ląstelių gyvybingumas buvo ženkliai mažesnis – 19,68 proc., 15,29 proc., 13,18 proc.

Gauti duomenys leidžia teigti:

- 1) Visų tirtų MDM2–p53 sąveikos slopiklio koncentracijų nutlino–3 neturėjo reikšmingos įtakos FM–94 ir FM–3 linijų ląstelių gyvybingumui.
- 2) FM–94 ir FM–3 linijų ląstelės buvo atsparios MDM2–p53 sąveikos slopiklio RITA poveikiui.
- 3) FM–3 linijos ląstelės yra jautresnės MDM2–p53 sąveikos slopikliams nutlino–3 ir RITA bei FBXW7 aktyvikiu oridonino poveikiui.
- 4) Po 24 valandų inkubacijos FM–3 linijos ląstelių gyvybingumą labiausiai sumažino visų koncentracijų (120  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  ir 30  $\mu\text{M}$ ) oridoninas
- 5) Oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ )

deriniai ženkliai sumažino FM–3 linijos ląstelių gyvybingumą, tačiau nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) derinys reikšmingo poveikio FM–3 linijos ląstelių gyvybingumui neturėjo.

- 6) FM–94 linijos ląstelių gyvybingumą labiausiai (iki 50 proc.) sumažino 120  $\mu\text{M}$  ir 60  $\mu\text{M}$  koncentracijų oridoninas. Oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) deriniai veiksmingiau slopino FM–94 ląstelių gyvybingumą lyginant su pavieniu slopiklių nutlino–3 ir RITA poveikiu.



**10 paveikslas.** FM–94 ir FM–3 ląstelių gyvybingumas paveikus jas nutlino–3 (30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ ), RITA (1,6  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ ), oridoninu (120  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ ), slopiklių ir aktyviklio deriniais: nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) (po 48 val. inkubacijos). Paryškinti stulpeliai rodo statistiškai reikšmingą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą.

Po 48 val. inkubacijos (10 paveikslas):

- Paveikus FM–94 ir FM–3 linijų ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliu nutlino–3 (30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ ) po 48 val., kaip ir po 24 val. inkubacijos, abiejų linijų ląstelės buvo pakankamai atsparios ir ląstelių gyvybingumas išliko didelis. FM–94 linijos ląstelių



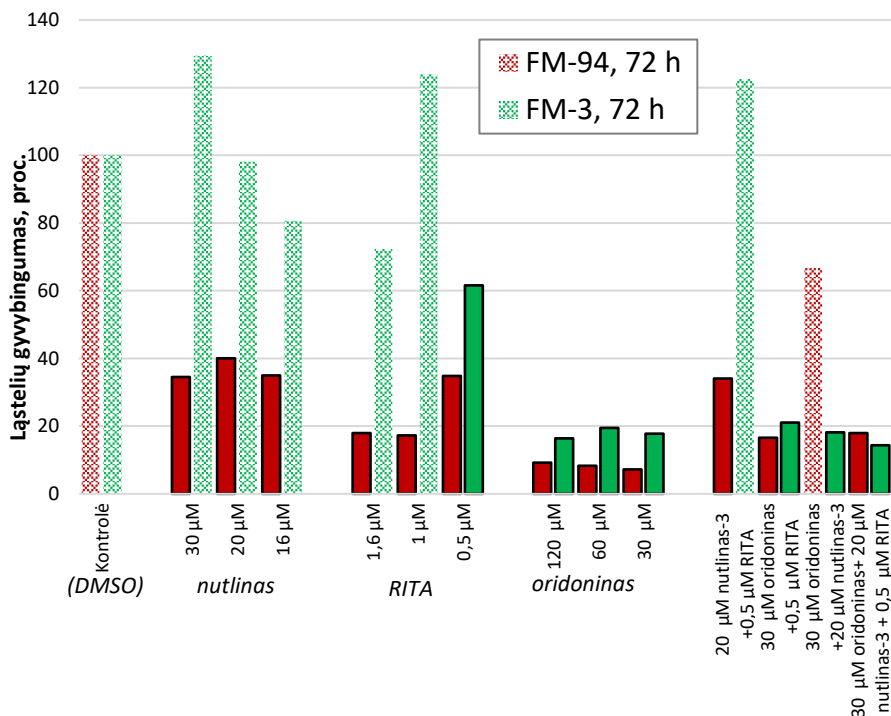
gyvybingumas (pagal nurodytą koncentracijų tvarką) atitinkamai buvo 75,71 proc., 89,86 proc., 92,91 proc., o FM-3 – 84,21 proc., 95,06 proc., 83,83 proc.

- Dėl MDM2-p53 sąveikos slopiklio RITA (1,6  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M) poveikio po 48 val., kaip ir po 24 val., abiejų linijų ląstelių gyvybingumas neženkiai sumažėjo: pagal nurodytą koncentracijų eiliškumą buvo atitinkamai 50,47 proc., 48,81 proc. ir 68,78 proc., FM-3 – 57,81 proc., 94,30 proc. ir 94,22 proc. Atkreiptinas dėmesys, kad FM-94 linijos ląstelių gyvybingumas sumažėjo labiau.
- FBXW7 aktyviklio oridonino (120  $\mu$ M, 60  $\mu$ M ir 30  $\mu$ M) visų koncentracijų poveikis abiejų linijų ląstelių gyvybingumui buvo efektyvesnis nei po 24 val. FM-3 linijos ląstelės pasižymėjo didesniu jautrumu oridonino poveikiui lyginant su FM-94 linijos ląstelėmis. FM-3 linijos ląstelių gyvybingumas (atitinkamai pagal nurodytas koncentracijas) buvo 9,93 proc., 11,22 proc., 6,37 proc., o FM-94 linijos ląstelių gyvybingumas – 50,24 proc., 52,46 proc. ir 70,82 proc.
- MDM2-p53 sąveikos slopiklių nutlino-3 (20  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M) derinys abiejų linijų ląstelių gyvybingumą paveikė neženkiai, tačiau ląstelių gyvybingumas sumažėjo labiau nei po 24 val. inkubacijos. FM-94 linijos ląstelių gyvybingumas buvo 63,23 proc., o FM-3 – 63,04 proc.
- Paveikus minėtas ląsteles oridonino (30  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M), oridonino (30  $\mu$ M) ir nutlino-3 (20  $\mu$ M) bei oridonino (30  $\mu$ M), nutlino-3 (20  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M) deriniais, ląstelių gyvybingumas sumažėjo labiau lyginant su rezultatais po 24 val. inkubacijos. FM-3 linijos ląstelių gyvybingumas atitinkamai buvo 13,08 proc., 10,12 proc. ir 10,24 proc., o FM-94 – 34,11 proc., 28,01 proc. ir 27,18 proc.

Gauti duomenys leidžia teigti:

- 1) Po 48 valandų inkubacijos abiejų linijų ląstelių gyvybingumas sumažėjo labiau nei po 24 val. inkubacijos.
- 2) FM-3 linijos ląstelių gyvybingumas buvo labiau slopinamas lyginant su 24 val. inkubacija.
- 3) Veiksmingiausiai FM-3 linijos ląstelių gyvybingumą sumažino 60  $\mu$ M ir 120  $\mu$ M koncentracijų FBXW7 aktyviklis oridoninas.
- 4) Veiksmingiau FM-3 ir FM-94 linijų ląstelių gyvybingumą veikė oridonino (30  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M), oridonino (30  $\mu$ M) ir nutlino-3 (20  $\mu$ M), oridonino (30  $\mu$ M), nutlino-3 (20  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M)

deriniai lyginant su nutlino-3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) derinio poveikiu.



**11 paveikslas.** FM-94 ir FM-3 linijų ląstelių gyvybingumas paveikus jas nutlino-3 (30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ ), RITA (1,6  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ ), oridoninu (120  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ ), slopiklių ir aktyviklio deriniais: nutlino-3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino-3 (20  $\mu\text{M}$ ); oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino-3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) (po 72 val. inkubacijos). Paryškinti stulpeliai rodo statistiškai reikšmingą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą.

Po 72 val. inkubacijos (11 paveikslas):

- Po 72 val. inkubacijos MDM2-p53 sąveikos slopiklis nutlinas-3 (30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ir 16  $\mu\text{M}$ ) labiau sumažino FM-94 linijos ląstelių gyvybingumą nei po 24 ir 48 val. inkubacijos. FM-3 linijos ląstelių gyvybingumui slopiklis nutlinas-3 po 72 val. inkubacijos didelio poveikio neturėjo, kaip ir po 24 ir 48 val. inkubacijos, tačiau esant 30  $\mu\text{M}$  nutlino-3 koncentracijai, pasireiškė priešingas efektas – FM-3 linijos ląstelių gyvybingumas padidėjo ir siekė 129,47 proc.

- Dėl MDM2–p53 sąveikos slopiklio RITA (1,6  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ ) poveikio FM–94 linijos ląstelių gyvybingumas (atitinkamai pagal RITA koncentracijas) sumažėjo – 17,94 proc., 17,25 proc. ir 34,82 proc. Lyginant su 48 val. inkubacijos rezultatais FM–94 linijos ląstelių gyvybingumas sumažėjo daugiau nei per pusę. FM–3 linijos ląstelių gyvybingumui, kaip ir paveikus slopikliu nutlino–3 (30  $\mu\text{M}$ ), pasireiškė priešingas poveikis – paveikus 1  $\mu\text{M}$  koncentracijos RITA slopikliu ląstelių gyvybingumas padidėjo ir buvo 123,94 proc. Labiausiai FM–3 linijos ląstelių gyvybingumą slopino 0,5  $\mu\text{M}$  koncentracijos RITA – ląstelių gyvybingumas siekė iki 61,57 proc.
- Visų koncentracijų (120  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  ir 30  $\mu\text{M}$ ) FBXW7 aktyviklio oridonino poveikis abiejų linijų ląstelių gyvybingumui buvo didžiausias ir efektyvesnis nei po 24 val. ir 48 val. inkubacijos. Tyrimo metu pastebėta, kad aktyviklio oridonino (120  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  ir 30  $\mu\text{M}$ ) poveikiui buvo jautresnės FM–94 linijos ląstelės, o 30  $\mu\text{M}$  koncentracijos oridoninas veiksmingiausiai sumažino FM–94 linijos ląstelių gyvybingumą (iki 7,21 proc.). FM–3 linijos ląstelių gyvybingumas buvo didesnis lyginant su 24 val. ir 48 val. inkubacija ir siekė (atitinkamai pagal oridonino koncentracijas) 16,38 proc., 19,47 proc. ir 17,76 proc.
- Paveikus FM–94 linijos ląsteles nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) bei oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) deriniais, ląstelių gyvybingumas sumažėjo labiau negu po 24 val. ir 48 val. inkubacijos. Ląstelių gyvybingumas (atitinkamai pagal minėtų derinių koncentracijas) buvo 34,05 proc., 16,56 proc., 17,94 proc. Oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) derinys FM–94 linijos ląstelių gyvybingumo nesumažino, jis išliko toks pat kaip ir po 24 val. inkubacijos – 66,72 proc. Dėl oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) bei oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) derinių poveikio FM–3 ląstelių gyvybingumas padidėjo lyginant su 48 val. inkubacija ir siekė (atitinkamai pagal minėtų derinių koncentracijas) 21,05 proc., 18,11 proc. ir 14,34 proc. Pažymėtina, kad paveikus FM–3 linijos ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliu nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) deriniu, ląstelių gyvybingumas padidėjo (122,56 proc.), kaip ir paveikus minėtas ląsteles atskirai 30  $\mu\text{M}$  nutlino–3 ir 1  $\mu\text{M}$  RITA koncentracijomis.

Gauti duomenys leidžia teigti:

- 1) Po 72 val. inkubacijos FM–94 linijos ląstelių gyvybingumas sumažėjo, o FM–3 linijos, skirtingai nei po 24 val. ir 48 val. inkubacijos, padidėjo.
- 2) FM–94 linijos ląstelių gyvybingumą labiausiai sumažino 30  $\mu\text{M}$  ir 60  $\mu\text{M}$  koncentracijų aktyviklis oridoninas.
- 3) Nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) bei oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) derinių poveikis FM–94 ląstelėms buvo didesnis lyginant su jų poveikiu po 24 val. ir 48 val. inkubacijos.
- 4) MDM2–p53 sąveikos slopiklio RITA 1,6  $\mu\text{M}$  ir 1  $\mu\text{M}$  koncentracijos veiksmingai slopino tik FM–94 linijos ląstelių gyvybingumą.

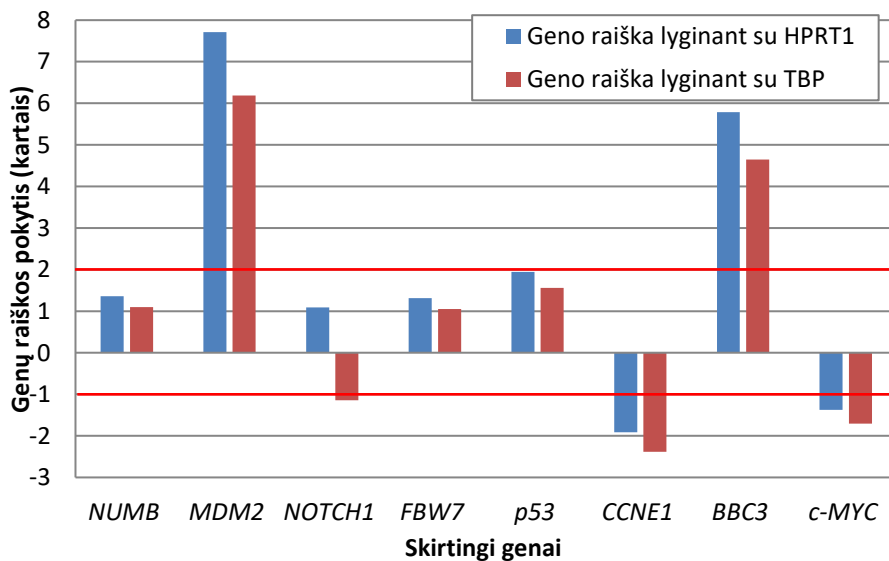
Taigi apibendrinant gautus FM–94 ir FM–3 linijų ląstelių gyvybingumo duomenis po 24, 48 ir 72 val. inkubacijos, nustatyta, kad efektyviausiai abiejų linijų (FM–94 ir FM–3) ląstelių gyvybingumą veikė E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas; FM–3 linijos ląstelių gyvybingumą veiksmingiausiai slopino 120  $\mu\text{M}$  (po 24, 48 ir 72 val.) oridonino koncentracijos, o FM–94 linijos ląsteles veiksmingiausiai veikė 30  $\mu\text{M}$  oridonino koncentracija po 72 val. inkubacijos. FM–94 linijos ląstelių gyvybingumą po 72 val. inkubacijos taip pat gerai slopino MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ), oridonino (30  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) bei oridonino (30  $\mu\text{M}$ ), nutlino–3 (20  $\mu\text{M}$ ) ir RITA (0,5  $\mu\text{M}$ ) derinių poveikis.

### 5.1.3. Genų raiškos pokyčių analizė

Dar vienas uždavinys, atliekant tyrimus su žmogaus metastazavusios melanomos FM–94 ir SK–MEL–26 linijų ląstelėmis, buvo nustatyti MDM2–p53 sąveikos slopiklių nutlino–3 ir RITA bei E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklio oridonino poveikį genų raiškai žmogaus metastazavusios melanomos ląstelėse. Siekiant išsiaiškinti, kokie genai yra aktyvūs arba išaktyvinti, paveikus FM–94 ir SK–MEL–26 linijų ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliais nutlino–3 (30  $\mu\text{M}$ ), RITA (1,6  $\mu\text{M}$ ) arba E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikliu oridoninu (7,5  $\mu\text{M}$ ), buvo atlikta pasirinktų genų raiškos pokyčių analizė. Buvo tiriama SK–MEL–26 linijos ląstelių *NUMB*, *FBW7*, *MDM2*, *MDM4*, *NOTCH*, *CDKN2A*, *CDKN1A* (*p21*), *BBC3* (*Puma*), *p53*, *c-MYC*, *Jun*, *Parp*, *CCNE1*, *CCND1* genų raiška, paveikus juos slopikliais (nutlino–3 ir RITA), *p53*, *BBC3*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*,

*JAG*, *MDM4*, *LNX1*, *JUN*, *FBXW7*, *NEDD4* genų raiška, paveikus juos aktyvikiu (oridoninu), ir FM–94 linijos ląstelių *NUMB*, *MDM2*, *NOTCH1*, *FBW7*, *p53*, *CCNE1*, *BBC3* ir *c-MYC* genų raiška, paveikus juos slopikliais (nutlino–3 ir RITA) ir aktyvikiu (oridoninu). Pasirinktų tiriamųjų genų raiška buvo lyginama su *HPRT1* ir *TBP* „namų apyvokos“ (angl. *house keeping genes*) genų raiška. Tiriamieji genai (*NUMB*, *FBW7*, *MDM2*, *MDM4*, *NOTCH1*) vienokiu ar kitokiu būdu dalyvauja naviką slopinančio baltymo p53 ir E3 ubikvitino ligazės baltymo MDM2 reguliacijoje ar yra šių baltymų veikiami. Likę tiriamieji genai veikia ląstelės ciklą, proliferaciją ir žūties kelią (*p53*, *c-MYC*, *CDKN2A*, *CDKN1A*, (*p21*), *BBC3* (*Puma*), *Jun*, *Parp*, *CCNE1*, *CCND1*). Slenkstinė riba, nuo kurios buvo stebima, ar geno raiška statistiškai reikšmingai padidėjo arba sumažėjo, buvo, kai genų raiškos pokyčio (kartais) reikšmė siekė  $\geq 2$  arba  $\leq -2$ .

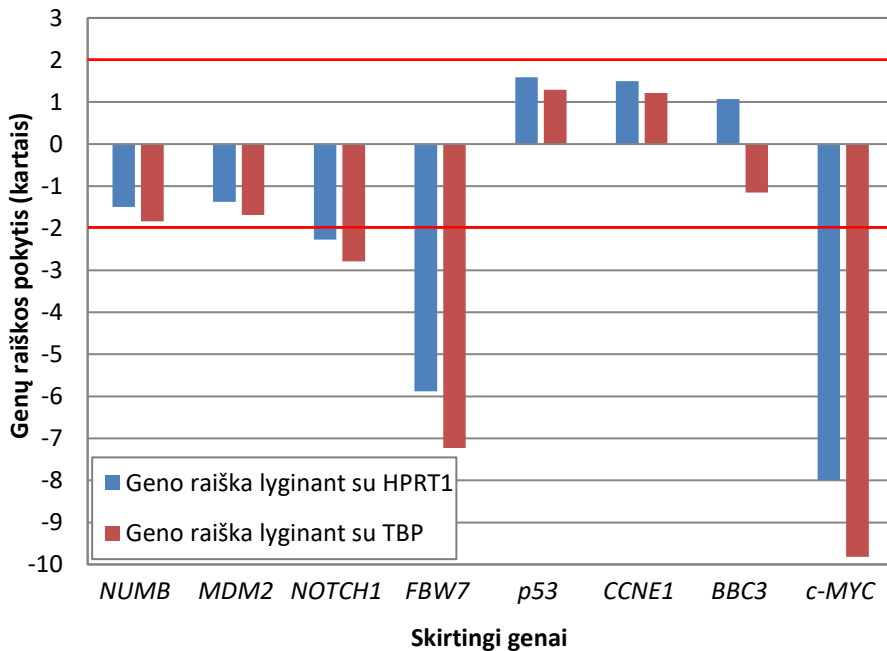
**FM–94 linijos ląstelių genų raiškos analizė po poveikio MDM2–p53 sąveikos slopikliais nutlino–3 (30  $\mu$ M) ir RITA (1,6  $\mu$ M) bei E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikiu oridoninu (7,5  $\mu$ M).** Paveikus FM–94 linijos ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliu nutlino–3 (30  $\mu$ M), labiausiai padidėjo *MDM2* geno raiška – beveik 8 kartus lyginant su *HPRT1*, 6 kartus lyginant su *TBP* (12 paveikslas). Pakankamai didelė buvo



**12 paveikslas.** FM–94 linijos ląstelių genų raiškos pokyčiai, lyginant su „namų apyvokos“ genais *HPRT1* ir *TBP*, paveikus MDM2–p53 sąveikos slopikliu nutlino–3. Raudonos linijos žymi slenkstinę ribą, nuo kurios stebimi statistiškai reikšmingi geno raiškos pokyčiai.

ir *BBC3* geno raiška, kuri padidėjo beveik 6 kartus, lyginant su *HPRT1* geno raiška, ir beveik 5 kartus lyginant su *TBP* geno raiška. *p53* raiška, lyginant su abiejų „namų apyvokos“ genų raiška, padidėjo beveik 2 kartus. *CCNE1* ir *c-MYC* genų raiška sumažėjo beveik 2 kartus.

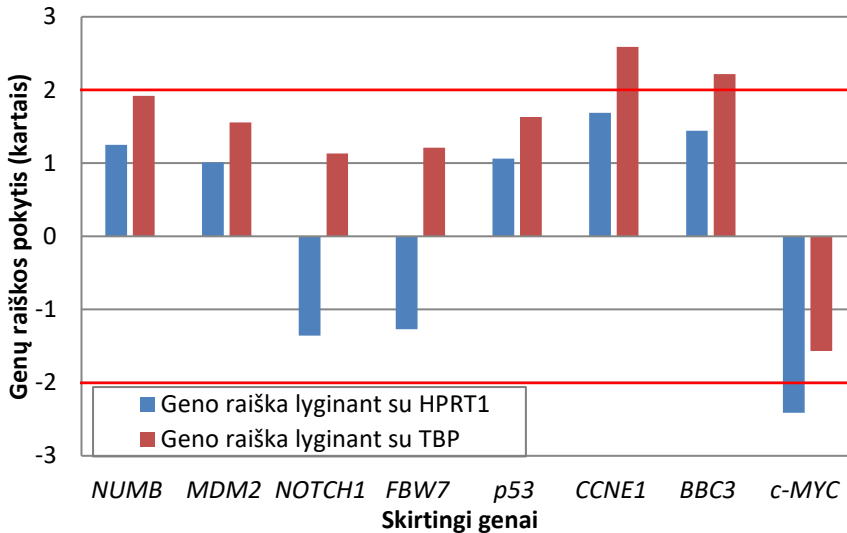
Analizuojant FM–94 linijos ląstelių genų raiškos pokyčius, paveikus MDM2–p53 sąveikos slopikliu RITA (1,6  $\mu\text{M}$ ), nustatyta, kad reikšmingai sumažėjo *c-MYC* geno raiška – 7 kartus lyginant su *HPRT1* geno raiška ir beveik 10 kartų lyginant su *TBP* geno raiška. Taip pat statistiškai reikšmingai sumažėjo *FBW7* geno raiška – beveik 6 ir 7 kartus lyginant atitinkamai su „namų apyvokos“ genais. Statistiškai nereikšmingai sumažėjo *MDM2*, *NUMB* ir *NOTCH1* genų raiška, o padidėjo *p53* raiška (13 paveikslas).



**13 paveikslas.** FM–94 linijos ląstelių genų raiškos pokyčiai lyginant su „namų apyvokos“ genais *HPRT1* ir *TBP*, paveikus MDM2–p53 sąveikos slopikliu RITA. Raudonos linijos žymi slenkstinę ribą, nuo kurios stebimi statistiškai reikšmingi geno raiškos pokyčiai.

Paveikus FM–94 linijos ląsteles E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikiu oridoninu (7,5  $\mu\text{M}$ ), lyginant su *TBP* geno raiška, statistiškai reikšmingai padidėjo *CCNE1* geno raiška – 2,5 karto; *BBC3* – 2 kartus, o *c-MYC* geno raiška lyginant su *HPRT1* geno raiška sumažėjo 2,5 karto.

*NOTCH1* ir *FBW7* geno raiška lyginant su *HPRT1* geno raiška neženkiai sumažėjo (14 paveikslas).



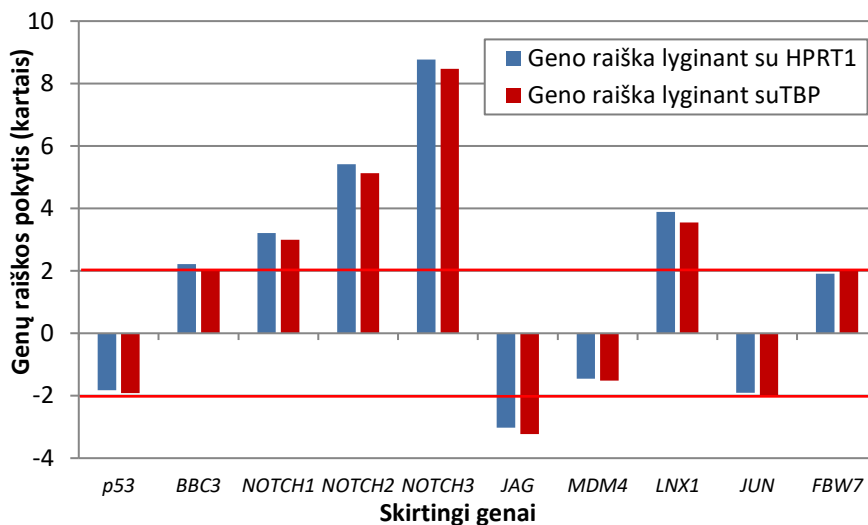
**14 paveikslas.** FM–94 linijos ląstelių genų raiškos pokyčiai lyginant su „namų apyvokos“ genais *HPRT1* ir *TBP*, paveikus E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikiu oridoninu. Raudonos linijos žymi slenkstinę ribą, nuo kurios stebimi statistiškai reikšmingi geno raiškos pokyčiai.

Taigi E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas veiksmingai slopina FM–94 linijos ląstelių gyvybingumą aktyvindamas proapoptotinį *BBC3* geną ir slopindamas ląstelės ciklo aktyviklį *c-MYC*.

**SK–MEL–26 linijos ląstelių genų raiškos analizė po poveikio MDM2–p53 sąveikos slopikliais RITA ir nutlinu–3.** Paveikus SK–MEL–26 linijos ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliu RITA, daugumos tirtų genų raiškos pokyčių nenustatyta. Konstatuoti tik nedideli *NUMB*, *FBW7*, *CDKN1A*, *p53*, *c-MYC*, *CCND1* ir *Parp* genų raiškos pokyčių svyravimai, kurie gali būti siejami su silpnu slopiklio RITA poveikiu ląstelių gyvybingumui. Statistiškai reikšmingai sumažėjo tik *Jun* geno raiška – beveik 9 kartus lyginant su *TBP* geno raiška ir beveik 8 kartus lyginant su *HPRT1* geno raiška. Panašūs rezultatai gauti veikiant SK–MEL–26 linijos ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliu nutlinu–3.

Taigi SK–MEL–26 linijos ląstelių genų raiškos pokyčiai parodė, kad pavienis MDM2–p53 sąveikos slopiklių RITA ir nutlino–3 poveikis silpnai veikia tiriamų genų raišką, išskyrus *Jun* geno raišką.

**SK–MEL–26**linijos ląstelių genų raiškos analizė po poveikio **E3** ubikvitino ligazės **FBXW7** aktyvicklio oridonino. Paveikus SK–MEL–26 linijos ląsteles E3 ubikvitino ligazės **FBXW7** aktyvickliu oridoninu statistiškai reikšmingai padidėjo *NOTCH1* geno raiška – 3 kartus, *NOTCH2* – 5 kartus, *NOTCH3* – 8,5 karto ir *LNX1* – beveik 4 kartus, **FBXW7** – 2 kartus, o *JAG* geno raiška 3 kartus sumažėjo lyginant su „namų apyvokos“ genų raiška (15 paveikslas).



**15 paveikslas** SK–MEL–26 linijos ląstelių genų raiškos pokytis, lyginant su „namų apyvokos“ genais *TBP* ir *HPRT1*, paveikus **FBXW7** aktyvickliu oridoninu. Raudonos linijos žymi slenkstinę ribą, nuo kurios stebimi statistiškai reikšmingi geno raiškos pokyčiai.

Taigi E3 ubikvitino ligazės **FBXW7** aktyvicklis oridoninas veiksmingai slopino SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumą, aktyvindamas E3 ubikvitino ligazes ir Notch signalinį kelią.

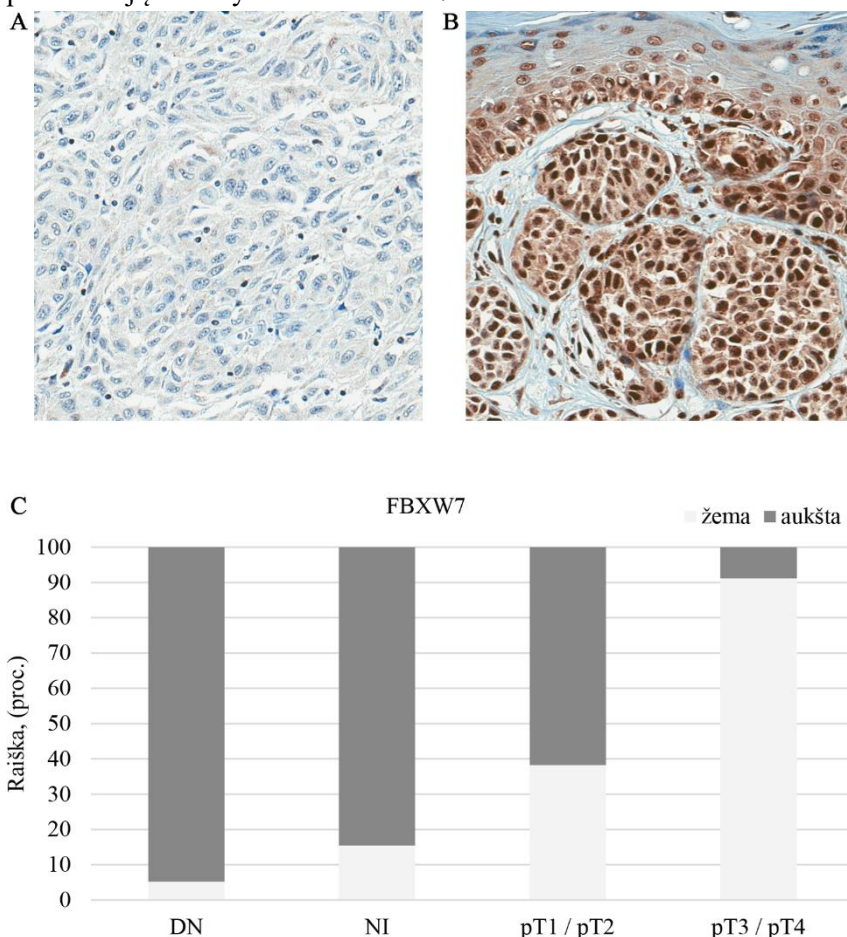
## 5.2. E3 ubikvitino ligazių **FBXW7** ir **MDM2** bei jų substratų **p53** ir **c–Myc** baltymų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų pooperacinėje medžiagoje

Tiriamieji pacientų mėginius vienas iš šio darbo uždavinių buvo nustatyti E3 ubikvitino ligazių **FBXW7** ir **MDM2** bei jų substratų **p53** ir **c–Myc** baltymų raišką displastinių apgamų ir melanomos pacientų mėginiuose ir palyginti su melanomos klinikinėmis ir pataloginėmis charakteristikomis.



### 5.2.1. FBXW7 baltymo raiškos tyrimo analizė

FBXW7 baltymo aukšta raiška buvo nustatyta 53 proc. mėginių, o žema – 47 proc. atvejų. Statistiškai reikšmingai žemesnė FBXW7 raiška buvo nustatyta esant pT3 ir pT4 stadijos melanomai lyginant su displastiniais apgamais, melanoma *in situ* ir pT1 stadijos melanomos atvejais ( $p < 0,001$ ). Displastinių apgamų atveju FBXW7 aukšta raiška nustatyta 15 iš 16 mėginių, melanomos *in situ* – 73,3 proc. atvejų, pT1 – 88,2 proc. (16 paveikslas). Esant pT2 melanomos stadijai FBXW7 aukšta raiška nustatyta 35,3 proc. atvejų, o III ir IV stadijos melanomos atvejais 91 proc. atvejų nustatyta žema FBXW7 raiška.



**16 pav.** FBXW7 baltymo raiška odos melanomos atveju. Neigiama FBXW7 raiška dažant imunohistocheminiu būdu pT4 melanomos atveju (A) ir aukšta FBXW7 raiška esant pT1 melanomai (B). C – žema FBXW7 raiška sietina su melanomos progresavimu. DN – displastinis apgamas (*dysplastic nevus*), NI – neinvazyvi melanoma (melanoma *in situ*).

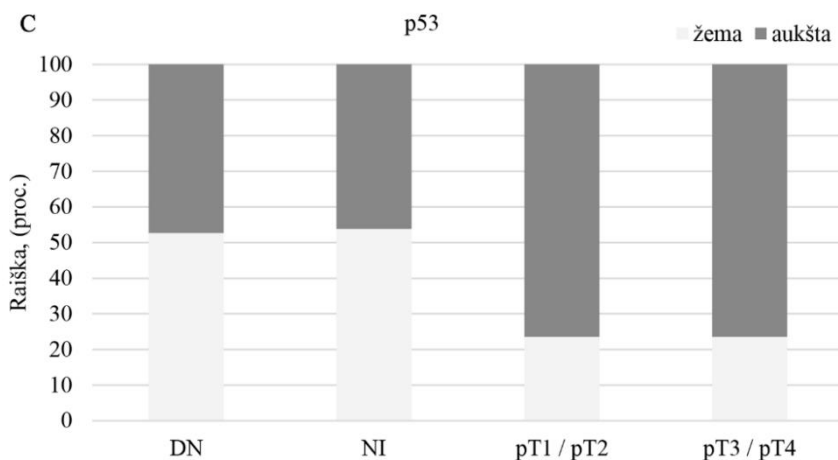
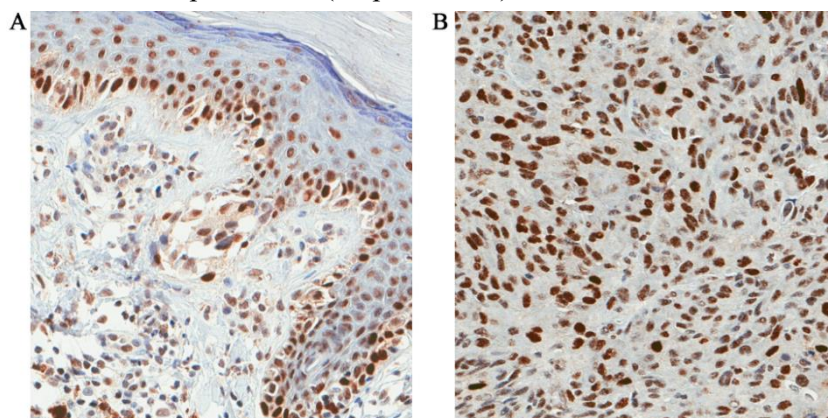
Nustatyta statistiškai reikšminga sąsaja tarp baltymo FBXW7 raiškos ir morfologinio naviko tipo ( $p < 0,001$ ); displastinių apgamų atvejais aukšta FBXW7 raiška nustatyta 93,7 proc. atvejų, *lentigo maligna* – 77,8 proc., esant paviršiumi plintančiai melanomai – 54,2 proc. atvejų, o esant mazginės melanomos tipui – 81,5 proc. atvejų buvo nustatyta žema FBXW7 raiška. Taip pat nustatyta statistiškai reikšminga sąsaja tarp FBXW7 raiškos lygio ir naviko gylio ( $p < 0,001$ ) – melanomos gyliui neviršijus 1 mm 76,9 proc. atvejų buvo nustatyta aukšta FBXW7 baltymo raiška, o esant melanomos invazijai daugiau nei 1 mm, 90,5 proc. atvejų nustatyta žema FBXW7 raiška. Gautieji rezultatai parodė, kad nėra statistiškai reikšmingos sąsajos tarp FBXW7 raiškos ir pacientų lyties, amžiaus ir naviko lokalizacijos (10 lentelė).

**10 lentelė.** Sąsajos tarp FBXW7 baltymo raiškos ir klinikinių–patologinių charakteristikų.

Klinikinės–patologinės charakteristikos	n	FBXW7 raiška		p reikšmė
		aukšta n (proc.)	žema n (proc.)	
<b>Visi atvejai</b>	100	53 (53,0)	47 (47,0)	–
<b>Lytis</b>	Vyrai 39	23 (54,8)	16 (45,2)	0,34
	Moterys 61	30 (49,2)	31 (50,8)	
<b>Amžius</b>	≤58 44	25 (56,8)	19 (43,2)	0,50
	>58 56	28 (50,0)	28 (50,0)	
<b>Stadija pagal naviko gylį (T)</b>	Displastinis apgamas 16	15 (93,7)	1 (6,25)	<b>0,001</b>
	Tis 16	14 (73,7)	2 (12,5)	
	T1 17	15 (88,2)	2 (11,8)	
	T2 17	6 (35,3)	11 (64,7)	
	T3 17	1 (5,9)	16 (94,1)	
	T4 17	2 (11,8)	15 (88,2)	
<b>Invazijos gylis</b>	0,1–1,0 mm 26	20 (76,9)	6 (23,1)	<b>0,001</b>
	1,1 mm + 42	4 (9,5)	38 (90,5)	
	Neinvazyvi 32	29 (90,6)	3 (9,4)	
<b>Morfologinis tipas</b>	Paviršiumi plintanti 48	26 (54,2)	22 (45,8)	<b>0,001</b>
	<i>Lentigo maligna</i> 9	7 (77,8)	2 (22,2)	
	Mazginė 27	5 (18,5)	22 (81,5)	
	Displastinis apgamas 16	15 (93,7)	1 (6,5)	
<b>Lokalizacija</b>	Saulės nepaveiktoje 13	5 (38,5)	8 (61,5)	0,50
	Saulės paveiktoje 77	42 (54,5)	35 (45,5)	
	Nežinoma 10	6 (60,0)	4 (4,0)	

### 5.2.2. p53 baltymo raiškos tyrimo analizė

Vertinant p53 baltymo raiškos reikšmę melanomos progresavimui pagal stadijas statistiškai reikšmingų rezultatų negauta. Displastinių apgamų ir melanomos *in situ* atvejais beveik vienodai buvo nustatyta tiek aukšta, tiek žema p53 raiška. Lyginant p53 baltymo raišką displastinių apgamų ir melanomos *in situ* atvejais, pT1 / pT2 ir pT3 / pT4 melanomos atvejais stebima aukštesnė p53 raiška (17 paveikslas).



**17 paveikslas.** p53 baltymo raiška odos melanomos atveju. Žema p53 raiška dažant imunohistocheminiu būdu melanomos *in situ* atveju (A) ir aukšta p53 raiška pT4 melanomos atveju (B). C – p53 raiškos pokyčiai displastinių apgamų (DN), neinvazyvios (NI), pT1 / pT2 ir pT3 / pT4 melanomos atvejais.

Nepaisant to, kad melanomos atvejais (nuo pT1 iki pT4) buvo nustatyta aukšta p53 raiška (70–80 proc.), gauti duomenys nėra statistiškai

reikšmingi ( $p=0,08$ ). Nenustatyta sąsajos tarp p53 raiškos ir pacientų lyties, amžiaus ir naviko lokalizacijos.

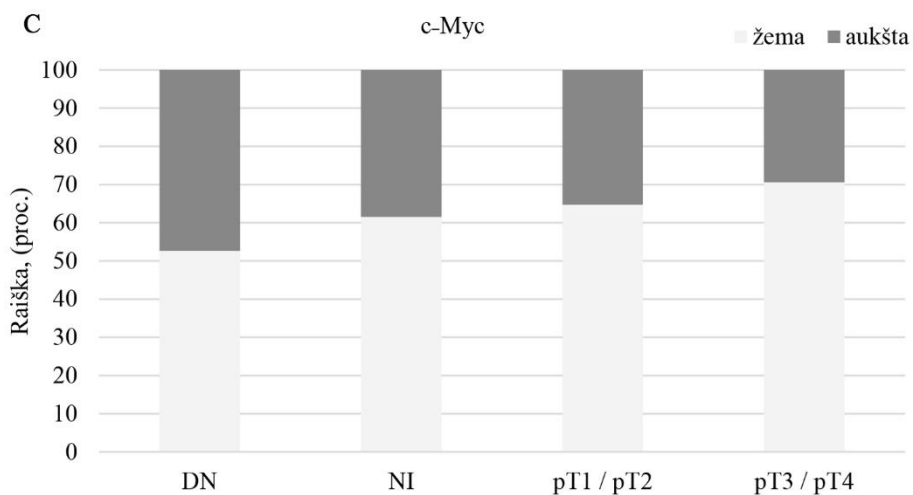
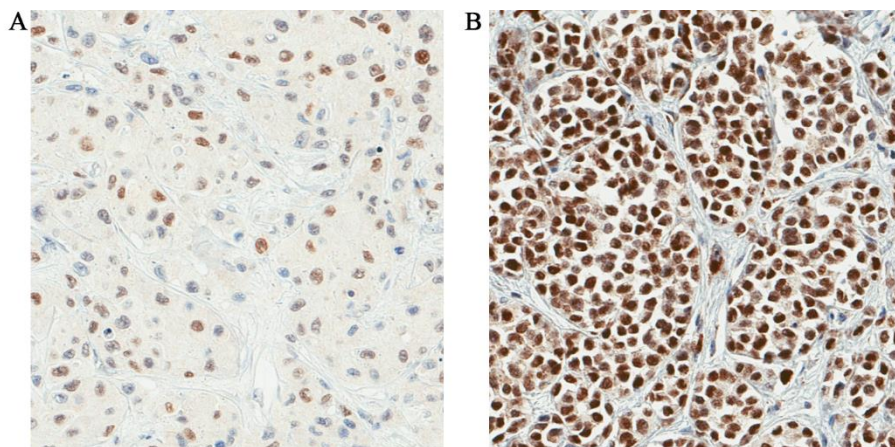
Tyrimo metu nustatyta, kad p53 baltymo raiška turi sąsają su melanomos invazijos gyliu – melanomos gyliui neviršijus 1,0 mm ir esant gilesnei nei 1,1 mm p53 baltymo raiška buvo atitinkamai aukšta – 76,9 proc. ir 76,2 proc. atvejų, lyginant su neinvazyvių navikų atvejais (displastiniai apgamai ir melanoma *in situ*) – 46,9 proc. ( $p=0,01$ ). Konstatuota statistiškai reikšminga sąsaja tarp p53 raiškos lygio ir morfologinio naviko tipo – 85,2 proc. mazginės melanomos atvejų nustatyta aukšta p53 raiška, diagnozavus paviršiumi plintančią melanomą p53 aukšta raiška nustatyta 68,8 proc. atvejų, o *lentigo maligna* atveju aukšta p53 raiška buvo 33,3 proc. atvejų ( $p=0,01$ ) (11 lentelė).

**11 lentelė.** Sąsajos tarp p53 baltymo raiškos ir klinikinių–patologinių charakteristikų.

Klinikinės –patologinės charakteristikos		n	p53 raiška		p reikšmė
			aukšta n (proc.)	žema n (proc.)	
<b>Visi atvejai</b>		100	67 (67,0)	33 (33,0)	–
<b>Lytis</b>	Vyrai	39	23 (59,0)	16 (41,0)	0,17
	Moterys	61	44 (72,1)	17 (27,9)	
<b>Amžius</b>	≤58	44	31 (70,5)	13 (29,5)	0,51
	>58	56	36 (64,3)	20 (35,7)	
<b>Stadija pagal naviko gylį (T)</b>	Displastinis apgamas	16	8 (50,0)	8 (50,0)	0,08
	Tis	16	7 (43,7)	9 (56,3)	
	T1	17	14 (82,3)	3 (17,7)	
	T2	17	12 (70,6)	5 (29,4)	
	T3	17	12 (70,6)	5 (29,4)	
	T4	17	14 (82,3)	3 (17,7)	
<b>Morfologinis invazijos gylis</b>	0,1–1,0 mm	26	20 (76,9)	6 (23,1)	<b>0,01</b>
	1,1 mm +	42	32 (76,2)	10 (23,8)	
	Neinvazyvi	32	15 (46,9)	17 (53,1)	
<b>Morfologinis tipas</b>	Paviršiumi plintanti	48	33 (68,8)	15 (31,2)	<b>0,01</b>
	Lentigo maligna Mazginė	9	3 (33,3)	6 (66,7)	
	Displastinis apgamas	27	23 (85,2)	4 (14,8)	
		16	8 (50,0)	8 (50,0)	
<b>Lokalizacija</b>	Saulės nepaveiktoje	13	11 (84,6)	2 (15,4)	0,33
	Saulės paveiktoje	77	49 (63,6)	28 (36,4)	
	Nežinoma	10	7 (70,0)	3 (30,0)	

### 5.2.3. c-Myc baltymo raiškos tyrimo analizė

Baltymų raiškos tyrimų rezultatai parodė, kad c-Myc aukšta raiška buvo nustatyta 36 proc., o žema – 64 proc. atvejų. Analizuojant c-Myc baltymo raiškos reikšmę melanomos progresavimui statistiškai reikšmingų rezultatų nebuvo gauta (18 paveikslas).



**18 paveikslas.** c-Myc baltymo raiška odos melanomos atveju. Žema c-Myc raiška imunohistocheminio dažymo metastazavusios melanomos atveju (A), aukšta c-Myc raiška imunohistocheminio dažymo atveju esant pT1 stadijos melanomai (B). C – c-Myc raiškos lygis displastinių apgamų (DN), neinvazyvios (NI), pT1 / pT2 ir pT3 / pT4 melanomos atvejais.

Nenustatyta sąsajos tarp c-Myc baltymo raiškos ir klinikinių–patologinių charakteristikų (lyties, amžiaus, naviko morfologinio tipo, invazijos gylio ir lokalizacijos) (12 lentelė).

**12 lentelė.** Sąsajos tarp c-Myc baltymo raiškos ir klinikinių–patologinių charakteristikų.

Klinikinės–patologinės charakteristikos		n	c-Myc raiška		p reikšmė
			aukšta n (proc.)	žema n (proc.)	
<b>Visi atvejai</b>		100	36 (36,0)	64 (64,0)	–
<b>Lytis</b>	Vyrai	39	17 (43,6)	22 (56,4)	0,21
	Moterys	61	19 (31,1)	42 (68,9)	
<b>Amžius</b>	≤58	44	14 (31,8)	30 (68,2)	0,44
	>58	56	22 (39,3)	34 (60,7)	
<b>Stadija pagal naviko gylį (T)</b>	Displastinis apgamas	16	8 (50,0)	8 (50,0)	0,77
	Tis	16	6 (37,5)	10 (62,5)	
	T1	17	7 (41,2)	10 (58,8)	
	T2	17	5 (29,4)	12 (70,6)	
	T3	17	5 (29,4)	12 (70,6)	
	T4	17	5 (29,4)	12 (70,6)	
<b>Invazijos gylis</b>	0,1–1,0 mm	26	10 (38,5)	16 (61,5)	0,39
	1,1 mm +	42	12 (28,6)	30 (71,4)	
	Neinvazyvi	32	14 (43,7)	18 (56,3)	
<b>Morfologinis tipas</b>	Paviršiumi plintanti	48	17 (35,4)	31 (64,6)	0,60
	Lentigo maligna	9	3 (33,3)	6 (66,7)	
	Mazginė	27	8 (29,6)	19 (70,4)	
	Displastinis apgamas	16	8 (50,0)	8 (50,0)	
<b>Lokalizacija</b>	Saulės nepaveiktoje	13	5 (38,5)	8 (61,5)	0,54
	Saulės paveiktoje	77	29 (37,7)	48 (62,3)	
	Nežinoma	10	2 (20,0)	8 (80,0)	

Melanomos atveju žema c-Myc baltymo raiška nustatyta 56 proc. atvejų. 71,4 proc. melanomos atvejų žema raiška nustatyta, kai melanomos gylis viršija 1,0 mm. Displastinių apgamų atveju c-Myc baltymo raiškos pokyčių neužfiksuota – tiek aukšta, tiek žema raiška pasiskirsto tolygiai (po 50 proc.), melanomos *in situ* ir I stadijos melanomos atvejais žema c-Myc raiška nustatyta atitinkamai 62,5 proc. ir 58,8 proc., pT2, pT3 ir pT4 melanomos stadijų atvejais žema c-Myc baltymo raiška jau siekė 70,6

proc. Pabrėžtina, kad statistiškai reikšmingos sąsajos tarp c-Myc raiškos lygio ir melanomos stadijos nebuvo nustatyta ( $p=0,77$ ).

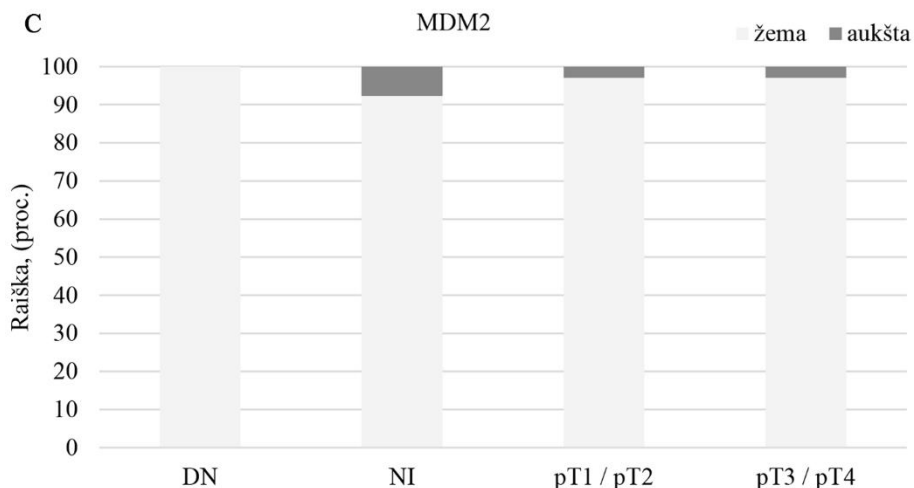
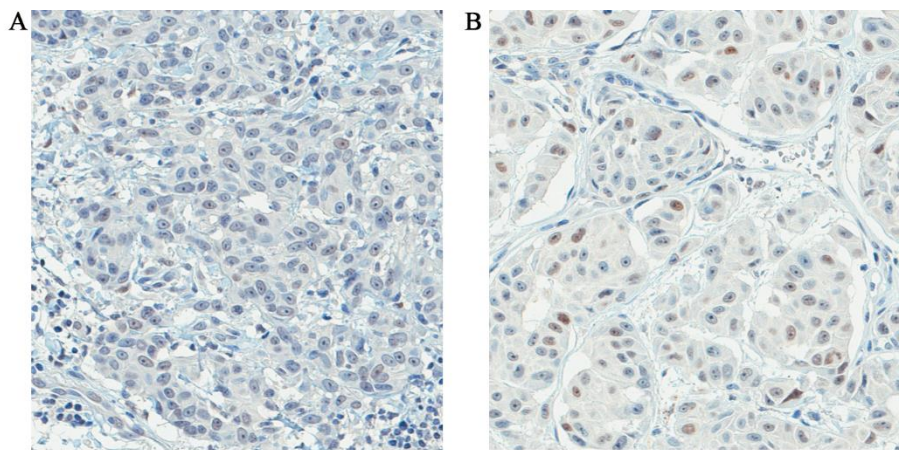
#### 5.2.4. MDM2 baltymo raiškos tyrimo analizė

Atlikto tyrimo metu 97 proc. visų tiriamų navikų atvejų buvo nustatyta žema MDM2 baltymo raiška. Gauti rezultatai neparodė statistiškai reikšmingos sąsajos tarp MDM2 raiškos ir melanomos progresavimo bei kitų klinikinių ir pataloginių charakteristikų (13 lentelė, 19 paveikslas).

**13 lentelė.** Sąsajos tarp MDM2 baltymo raiškos ir klinikinių–pataloginių charakteristikų.

Klinikinės–pataloginės charakteristikos	n	MDM2 raiška		p reikšmė
		aukšta n (proc.)	žema n (proc.)	
<b>Visi atvejai</b>	100	3 (3,0)	97 (97,0)	–
<b>Lytis</b>	Vyrai	39	2 (5,1)	0,32
	Moterys	61	1 (1,1)	
<b>Amžius</b>	≤58	44	2 (4,5)	0,42
	>58	56	1 (1,8)	
<b>Stadija pagal naviko gylį (T)</b>	Displastinis apgamas	16	0 (0,00)	0,69
	Tis	16	1 (6,3)	
	T1	17	1 (5,9)	
	T2	17	0 (0,0)	
	T3	17	1 (5,9)	
	T4	17	0 (0,0)	
<b>Invazijos gylis</b>	0,1–1,0 mm	26	1 (3,8)	0,94
	1,1 mm +	42	1 (2,4)	
	Neinvazyvi	32	1 (3,1)	
<b>Morfologinis tipas</b>	Paviršiumi plintanti	48	1 (2,1)	0,44
	Lentigo maligna	9	1 (11,1)	
	Mazginė	27	1 (3,7)	
	Displastinis apgamas	16	0 (0,0)	
<b>Lokalizacija</b>	Saulės nepaveiktoje	13	0 (0,0)	0,63
	Saulės paveiktoje	77	3 (3,9)	
	Nežinoma	10	0 (0,0)	





**19 paveikslas.** MDM2 baltymo raiška odos melanomos atveju. Žema MDM2 raiška atlikus imunohistocheminį dažymą pirminės (A) ir metastazavusios melanomos atvejais (B). C – žemas MDM2 raiškos lygis displastinių apgamų (DN), neinvazyvios (NI), pT1 / pT2 ir pT3 / pT4 melanomos atvejais.

#### 5.2.5. Sąsajų tarp FBXW7, c-Myc, MDM2 ir p53 baltymų raiškos pokyčių analizė

Siekiant įvertinti tarpusavio tiriamų FBXW7, c-Myc, MDM2 ir p53 baltymų raiškos pokyčių sąsajas, buvo atliktas  $\chi^2$  testas. Tyrimo metu buvo nustatyta statistškai reikšminga sąsaja tarp FBXW7 ir c-Myc raiškos pokyčių – esant žemai FBXW7 baltymo raiškai 76,6 proc. atvejų



statistiškai reikšmingai buvo žema ir c-Myc raiška (p=0,01) (14 lentelė). Kitų tirtųjų baltymų raiškos pokyčių tarpusavio sąsajų nenustatyta.

**14 lentelė.** Sąsajos tarp FBXW7, c-Myc, MDM2 ir p53 baltymų raiškos pokyčių.

Baltymas	Baltymo raiška	p53		p	c-Myc		p	MDM2		p
		aukšta n (proc.)	žema n (proc.)		aukšta n (proc.)	žema n (proc.)		aukšta n (proc.)	žema n (proc.)	
c-Myc	aukšta	27 (75,0)	9 (25,0)	0,20						
	žema	40 (62,5)	24 (37,5)							
MDM2	aukšta	2 (66,7)	1 (33,3)	0,99	2 (66,7)	1 (33,3)	0,26			
	žema	34 (35,0)	36 (65,0)		34 (35,0)	36 (65,0)				
FBXW7	aukšta	33 (62,3)	20 (37,7)	0,28	25 (47,2)	28 (52,8)	0,01	2 (3,8)	51 (96,2)	0,63
	žema	34 (72,3)	13 (27,7)		11 (23,4)	36 (76,6)		1 (2,1)	46 (97,9)	

#### 5.2.6. Vienaveiksmė ir daugiaveiksmė Cox regresijos analizė

Siekiant nustatyti, kurie veiksniai iš tiriamų FBXW7, c-Myc, MDM2 ir p53 baltymų raiškos pokyčių ir tiriamųjų klinikinių ir pataloginių charakteristikų galėjo padidinti pacientų mirtingumo riziką, buvo atlikta vienaveiksmė Cox regresinė analizė. Gautų duomenų analizė parodė, kad, viena vertus, pacientų lytis ir amžius neturėjo rizikos mirštamumui. Tokios įtakos neturėjo ir navikų morfologinis tipas, ir naviko lokalizacija. Antra vertus, nustatyti tendencingi duomenys tarp naviko išopėjimo ir didesnės mirtingumo rizikos (p=0,06). Neabejotinai pacientų išgyvenamumui didžiausią įtaką turėjo naviko gylys ir progresuojant melanomai mirtingumo rizika padidėjo net 5,6 karto (p=0,03). Mūsų tyrimo metu vertinant, kokią įtaką turėjo FBXW7, c-Myc, MDM2 ir p53 baltymų

raiškos pokyčiai mirtingumo rizikai, statistiškai reikšmingų rezultatų negauta (15 lentelė).

**15 lentelė.** Skirtingų baltymų raiškos ir kitų melanoma sergančių pacientų klinikinių–patologinių veiksnių rizikos įvertinimas (vienaveiksmė *Cox* regresijos analizė).

Charakteristikos	(n=68)	p
	HR (95 % CI)	
Lytis (vyrai vs moterys)	2,01 (0,56–7,22)	0,29
Amžius ( $\leq 58$ vs $> 58$ )	1,16 (0,39–3,49)	0,79
Naviko gylis (T1 / T2 vs T3 / T4)	<b>5,60 (1,24–25,2)</b>	<b>0,03</b>
Morfologija (paviršiumi plintanti vs kitos)	2,48 (0,83–7,43)	0,10
Išopėjimas (nėra vs yra)	2,79 (0,95–8,08)	0,06
Lokalizacija (saulės nepaveikta vs saulės paveikta)	0,57 (0,16–2,11)	0,40
p53 raiška (žema vs aukšta)	2,48 (0,83–7,43)	0,10
c-Myc raiška (žema vs aukšta)	0,36 (0,08–1,63)	0,19
FBXW7 raiška (žema vs aukšta)	0,16 (0,02–1,23)	0,08

Siekiant įvertinti, kiek visi veiksniai kartu turi įtakos pacientų mirtingumo rizikai, buvo atlikta daugiafaktorinė analizė, tačiau statistiškai reikšmingų rezultatų nebuvo nustatyta (16 lentelė).

**16 lentelė.** Skirtingų baltymų raiškos ir kitų odos melanoma sergančių pacientų klinikinių–patologinių veiksnių rizikos įvertinimas (daugia-veiksmė *Cox* regresijos analizė).

Charakteristikos	(n=68)	p
	HR (95 % CI)	
Lytis (vyrai vs moterys)	1,47 (0,31–7,07)	0,48
Amžius ( $\leq 58$ vs $> 58$ )	0,69 (0,13–3,55)	0,66
Naviko gylis (T1 / T2 vs T3 / T4)	3,13 (0,38–25,7)	0,29
Morfologija (paviršiumi plintanti vs kitos)	1,37 (0,28–6,60)	0,69
Išopėjimas (nėra vs yra)	2,33 (0,60–9,09)	0,23
Lokalizacija (saulės nepaveikta vs saulės paveikta)	0,42 (0,09–1,98)	0,27
p53 raiška (žema vs aukšta)	0,65 (0,16–2,70)	0,55
c-MYC raiška (žema vs aukšta)	0,35 (0,07–1,72)	0,19
FBXW7 raiška (žema vs aukšta)	0,65 (0,05–9,12)	0,75

Apibendrinant visų pateiktų tyrimų rezultatus galima teigti:

- 1) FBXW7 baltymo raiška yra susijusi su melanomos progresavimu, melanomos invazijos gyliu ir naviko morfologiniu tipu.
- 2) p53 baltymo raiška yra susijusi su melanomos invazijos gyliu ir naviko morfologiniu tipu.
- 3) Nenustatyta sąsaja tarp c-Myc baltymo raiškos lygio ir melanomos progresavimo.
- 4) Nenustatyta MDM2 raiškos lygio įtaka melanomos progresavimui.
- 5) Nustatyta tiesioginė sąsaja tarp sumažėjusio žemos FBXW7 baltymo raiškos ir žemos c-Myc baltymo raiškos.
- 6) Didžiausią reikšmę pacientų mirtingumui turėjo melanomos gylis (pT3 / pT4).

## 6. REZULTATŲ APTARIMAS

Ubikvitino – proteosomos kelias jau yra pritaikytas vėžiui gydyti skiriant proteosomų slopiklius bortezomibą ir carfilzomibą, atskleidė taikinius, tarp kurių yra selektyvių taikinių, pavyzdžiui, E3 ligazių slopikliai, ubikvitiną konjuguojantys fermentai, taip pat ir neselektyvių taikinių, kaip proteosomų proteazės (81). Per pastaruosius du dešimtmečius vaistų, skirtų piktybiniam navikams gydyti, kūrimas, pagrįstas šiomis dviem taikinių grupėmis, vyko lygiagrečiai, nors ankstyvieji rezultatai parodė, kad neselektyvios proteosomos yra geresni taikiniai. Visgi vėliau paaiškėjo, kad „neselektyvus“ proteosomų taikinyje gali būti veikiamas selektyviai ir detalesnis E3 ligazės reakcijos supratimas gali paskatinti sukurti efektyvių slopiklių (165, 190). Tarp sėkmingesnių ligazė pagrįstų vaistų atradimo strategijų buvo E3 ligazių jungimosi prie substratų antagonistų kūrimas (baltymo–baltymo sąveikos). E3 ligazės MDM2 / HDM2 (angl. *human double minute 2 homolog*, HDM2) yra vienos iš priešnavikinių taikinių tarp neproteosominių ubikvitino kelio baltymų, jos yra atsakingos už baltymo p53 naviko slopiklio ubikvitilinimą. Tyrimų metu buvo nustatyti naujos kartos E3 ubikvitino ligazių slopikliai: nutlinas–3 ir RITA, kurie gali suardyti MDM2–p53 sąveiką navikuose ir taip atstatyti p53 apoptotinę funkciją (15), o E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas gali aktyvinti FBXW7 ir taip užtikrinti ląstelės ciklo sustabdymą ir naviko ląstelių apoptozę (16).

Buvo nustatyta, kad natūralus junginys oridoninas yra efektyvus FBXW7 aktyviklis ir c–Myc slopiklis (16). Naujausių tyrimų rezultatai parodė, kad oridoninas slopina melanomos ląstelių migraciją, invaziją ir adheziją. Tai leidžia manyti, kad oridoninas galėtų būti perspektyvus terapinis veiksnys gydant metastazavusią melanomą (189). Be to, žinoma, kad melanomos atveju yra padidėjusi Notch signalinio kelio raiška, o E3 ubikvitino ligazė FBXW7 ubikvitilina ir neigiamai reguliuoja NOTCH, jo raiškos padidėjimas gali būti siejamas su FBXW7 mutacija ar funkcijos praradimu dėl kitų priežasčių arba inaktyvacija (9, 119, 120). Vadinasi, Notch signalinio kelio slopinimas galėtų sustabdyti neveiklios FBXW7 ligazės sukeltos melanomos vystymąsi. Kaip jau buvo minėta, vienas svarbiausių FBXW7 reguliatorių yra p53. Dar prieš 40 metų buvo nustatyta, kad p53 yra transkripcijos veiksnys, kuris jungiasi su genų taikinių promotoriais, reguliuoja jų raišką ir tokiu būdu kontroliuoja ląstelių ciklą ir žūtį. Nepakitusiose ląstelėse p53 aktyvumas yra žemas, tačiau dėl neigiamo aplinkos poveikio, esant DNR pažeidimams arba kito tipo

ląstelių stresui, p53 funkcija sustiprėja. p53 slopina ikinavikinių ir navikinių ląstelių augimą ir pašalina jas sukeldamas apoptozę. Dėl p53 funkcionavimo slopinami daugeliui navikų būdingi požymiai – nekontroliuojamas navikinių ląstelių augimas ir atsparumas, angiogenezė, piktybinių ląstelių invazija ir metastazavimas, metabolinis ir genomis nestabilumas. p53 reguliuoja imuninį atsaką, todėl p53 funkcijos slopinimas sukelia navikų atsiradimą ir vystymąsi (191). p53 yra dažniausio gamtinio (laukinio) tipo. Nesant p53 mutacijų navikuose, p53 funkcija yra dažnai sutrikusi dėl skirtingų mechanizmų, kurie lemia p53 funkcijas slopinančių reguliatorių aktyvumo padidėjimą. Vienas iš pagrindinių p53 reguliatorių yra E3 ubikvitino ligazė MDM2 ir jos homologas MDMX (užkodotas MDM4 geno). MDM2 atlieka svarbų vaidmenį ne tik neigiamai reguliuojant naviko slopintojo p53 funkciją, bet ir reguliuojant Notch signalinį kelią. Taigi E3 ubikvitino ligazė MDM2 gali būti patrauklus taikiny s veikiant p53 ir Notch signalinį kelią melanomos atveju. Siekiant paveikti taikinį, tyrėjų dėmesys gali būti nukreiptas į MDM2–p53 sąveikos suardymą arba MDM2 raiškos slopinimą / išveiklinimą, o ne tiesiogiai veikti E3 ubikvitino ligazės aktyvumą. Molekulės, kurios gali slopinti p53 ir MDM2 sąveiką, yra nutlinai. Nutlinas–3 gali neigiamai paveikti MDM2–p53 sąveiką ir tokiu būdu turėti slopinantį poveikį melanomai. Buvo nustatyta, kad nutlinas–3 gali sukelti p53 aktyvinimą ir slopinti melanomos ląstelių augimą (172). Tačiau nėra įrodančių tyrimų rezultatų, kaip keičiasi MDM2 raiška ir funkcija po gydymo nutlinu–3 (17). Kita maža molekulė, slopinanti p53–MDM2 sąveiką, yra RITA. RITA jungiasi su p53 ir taip neleidžia jam jungtis su MDM2, ir tai lemia p53 kaupimąsi ir nuo p53 priklausomą apoptozę navikinėse ląstelėse (170, 171, 177). Atkreiptinas dėmesys, kad veikiant p53 signalinį kelią, galėtų būti atstatyta ir FBXW7 raiška (107, 128).

Taigi rengiant šį darbą ir atliekant eksperimentinius tyrimus buvo siekta įvertinti E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvoklio oridonino ir E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir naviką slopinančio baltymo p53 sąveikos slopiklių nutlinu–3 ir RITA bei jų derinių poveikį žmogaus metastazavusios melanomos ląstelių linijų gyvybingumui ir nustatyti *NUMB*, *FBW7*, *MDM2*, *MDM4*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *CDKN2A*, *CDKN1A*, *BBC3*, *p53*, *c-MYC*, *Jun*, *Parp*, *CCNE1*, *CCND1*, *JAG*, *LNX1* genų raišką po poveikio nutlinu–3, RITA arba oridoninu.

Pirmieji bandymai atlikti naudojant žmogaus metastazavusios melanomos SK–MEL–26 linijos ląsteles, kurios buvo paveiktos skirtingų

koncentracijų MDM2–p53 sąveikos slopikliais nutlinu–3 ir RITA. Nustatytas tik neženklius jų poveikis ląstelių gyvybingumui priklausomai nuo dozės ir ekspozicijos laiko. Efektyviausiai šias ląsteles veikė oridoninas. SK–MEL–26 linijos ląstelių genų raiškos analizė po poveikio MDM2–p53 sąveikos slopikliais nutlinu–3 ir RITA reikšmingų genų raiškos pokyčių taip pat neparodė, buvo nustatyti tik neženklius *p53* ir kitų genų (*NUMB*, *FBW7*, *CDKN1A*, *c-MYC*, *CCND1* ir *Parp*) raiškos pokyčių svyravimai, kurie gali būti siejami su silpnu slopiklių poveikiu SK–MEL–26 linijos ląstelėms. Vienintelis ryškus ir statistiškai reikšmingas buvo *Jun* geno raiškos pokytis, kuro raiška sumažėjo beveik 9 kartus lyginant su nuolatine raiška pasižyminčiais „namų apyvokos“ genais.

Manoma, kad *Jun* genas dalyvauja kancerogenezeje ir jo padėjusi raiška dažnai aptinkama daugelio piktybinių navikų atvejų (120). Yra žinoma, kad *Jun* transkripcijos būdu reguliuoja daugelio genų veiklą, tarp jų ir *MDM2* geno raišką. Nustatyta, kad nuslopinus *Jun*, *MDM2* geno raiška mažėja (192). Kaip anksčiau buvo minėta, slopiklis RITA sąveikauja su *p53* ir blokuoja sąveiką tarp *p53* ir *MDM2*, dėl ko stabdomas *p53* skaidymas ir jo raiška padidėja. Kadangi *p53* sąveikauja su *MDM2* suformuodami neigiamą autoreguliacinę kilpą, didėjant *p53* raiškai, turėtų mažėti *MDM2* raiška. Galima daryti prielaidą, kad šio tyrimo metu, paveikus SK–MEL–26 linijos ląsteles MDM2–p53 sąveikos slopikliais ir sumažėjus *p53* ubikvitilino galimybei, *MDM2* raiška mažėjo kartu ir per *Jun* transkripcijos veiksnio raiškos sumažėjimą.

SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumą veiksmingai slopino E3 ubikvitino ligazės aktyviklis oridoninas. 60  $\mu$ M koncentracijos oridoninas po 48 val. inkubacijos sumažino SK–MEL–26 linijos ląstelių gyvybingumą iki 18 proc. Norint išsiaiškinti oridonino poveikio SK–MEL–26 linijos ląstelėms molekulinis mechanizmas, buvo tirta įvairių genų, susijusių su ląstelės ciklu, ląstelių proliferacija ir apoptoze mRNR raiška. Ypatingas dėmesys buvo skirtas ubikvitino E3 ligazių (*MDM2*, *MDM4*, *FBXW7*, *LNX1*) ir jų substratų (*NOTCH*) genų mRNR raiškai, žinant, kad oridoninas aktyvina ubikvitino ligazę *FBXW7*. Tyrimo metu, paveikus SK–MEL–26 linijos ląsteles E3 ubikvitino ligazės *FBXW7* aktyvikliu oridoninu, statistiškai reikšmingai padidėjo *NOTCH1*, *NOTCH2* ir *NOTCH3* genų raiška lyginant su „namų apyvokos“ genų raiška, o *NOTCH* taikinio – *JAG* geno – raiška 3 kartus sumažėjo. Kaip buvo minėta, *NOTCH* baltymai yra *FBXW7* substratas ir priklausomai nuo audinių tipo gali veikti kaip onkobaltymas arba kaip naviko slopiklis. *FBXW7*

ubikvitilina ir neigiamai reguliuoja Notch signalinį kelią (119). Melnomos atveju Notch kelio raiška padidėja, tai gali būti siejama su *FBXW7* mutacija arba inaktyvacija (9, 119, 120). Taip pat nustatyta, kad Jagged-1 (*JAG1*) viduląstelinis domenas sąveikauja su *NOTCH1* ląstelinio domenu ir stimuliuoja jo skaidymą per *FBXW7* priklausomą proteosominį kelią (121). Tyrimo metu nustatyta sumažėjusi *JAG* raiška, ir tai gali turėti įtakos *NOTCH1* padidėjusiai raiškai.

Po SK-MEL-26 linijos ląstelių poveikio oridoninu taip pat padidėjo ubikvitino ligazių *LNX1* ir *FBXW7* genų raiška. Nors *FBXW7* geno raiška padidėjo neženkliai (2 kartus), tai rodo, kad oridoninas iš dalies aktyvino *FBXW7* funkciją SK-MEL-26 linijos ląstelėse. *LNX1* geno raiška po poveikio SK-MEL-26 linijos ląstelių oridoninu padidėjo beveik 4 kartus. *LNX1* – ubikvitino ligazė, kuri jungiasi prie *NUMB* baltymo ir nukreipia jį proteosominiam skaidymui ir taip reguliuoja *NUMB* / Notch signalinį kelią (193). Notch signalinio kelio metu į citoplazmą patekęs atskeltas viduląstelinis Notch domenas *NICD* gali būti neigiamai reguliuojamas *NUMB* baltymo, dėl ko *NICD* negali jungtis prie transkripcijos veiksnių ir aktyvinti Notch signalinio kelio kaskados (83, 135) Taigi *LNX1* skaidydamas *NUMB* gali aktyvinti Notch signalinį kelią (193). Iš gautųjų rezultatų galima daryti prielaidą, kad atlikto eksperimento metu pakitęs Notch kelio aktyvumas, paveikus ląsteles oridoninu, yra svarbus melanomos ląstelių išlikimui, o *NOTCH* genų padidinta raiška gali būti siejama su *LNX1* padidėjusia raiška ir nepakankamai atstatyta *FBXW7* funkcija, kuris turėtų slopinti Notch signalinį kelią.

Kadangi pirminių preliminarių tyrimų rezultatai parodė, kad SK-MEL-26 linijos ląstelės nebuvo pakankamai jautrios tirtųjų slopiklių poveikiui, tyrimas buvo tęsiamas naudojant kitas ląstelių linijas. Tyrimui buvo parinktos FM-3 ir FM-94 linijų ląstelės, kurios buvo veikiamos *MDM2-p53* sąveikos slopikliais nutlino-3 (30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 16  $\mu$ M) ir RITA (1,6  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M), E3 ubikvitino ligazės *FBXW7* aktyvikliu oridoninu (120  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 30  $\mu$ M), šių slopiklių / aktyvicklio deriniais: nutlino-3 (20  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M); oridonino (30  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M); oridonino (30  $\mu$ M) ir nutlino-3 (20  $\mu$ M); oridonino (30  $\mu$ M), nutlino-3 (20  $\mu$ M) ir RITA (0,5  $\mu$ M).

Apibendrinus gautus FM-94 ir FM-3 linijų ląstelių gyvybingumo rezultatus, pažymėtina, kad, kaip ir tiriant SK-MEL-26 linijos ląsteles, mažiausią poveikį ląstelių gyvybingumui turėjo visų koncentracijų *MDM2-p53* sąveikos slopikliai nutlino-3 ir RITA. Nors galima buvo išvelgti neženkliai didesnę ląstelių gyvybingumo slopinimą esant

didesnėms koncentracijoms ir ilgesnei inkubacijai, pokyčiai nebuvo statistiškai reikšmingi. Atkreiptinas dėmesys, kad po 72 val. buvo stebėtas ir atvirkštinis efektas, kai ląstelių gyvybingumas ne sumažėjo, o padidėjo. Veiksmingiausiai abiejų ląstelių linijų gyvybingumą sumažino E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas.

Atlikto ląstelių gyvybingumo tyrimo duomenys patvirtino J. De Lange'o (*J. De Lange*) ir bendraautorių tyrimo, kurio metu buvo analizuojamas nutlino-3 / RITA poveikis uvealinės melanomos ląstelių linijos gyvybingumui, duomenis. Po 60 val. inkubacijos nutlino-3 / RITA poveikis pavienių ląstelių gyvybingumui buvo mažesnis nei veikiant ląsteles slopiklių deriniu 10  $\mu\text{M}$  arba 32  $\mu\text{M}$  koncentracijos nutlino-3 ir 1,6  $\mu\text{M}$  arba 0,8  $\mu\text{M}$  koncentracijos RITA (194). M. Verhaegeno (*M. Verhaegen*) ir bendraautorių duomenimis, veiksmingiausiai melanomos ląstelių augimą slopino 20  $\mu\text{M}$  nutlino-3 koncentracija (195). H. Huang (*H. Huang*), K. Reno (*K. Ren*) ir bendraautorių tyrimų rezultatai parodė, kad melanomos ir limfomos atvejais ląsteles veiksmingiausiai slopino 15  $\mu\text{M}$  ir 20  $\mu\text{M}$  oridonino koncentracijos jau po 24 val. inkubacijos (16, 196). Atlikto tyrimo atveju veiksmingiausią slopinantį poveikį turėjo 60  $\mu\text{M}$  oridonino koncentracijos veikiant tiek FM-94, tiek FM-3 linijų ląsteles. Taigi vadovaujantis atlikto ir kitų autorių tyrimų rezultatais, galima teigti, kad 60  $\mu\text{M}$  oridonino koncentracija yra veiksminga siekiant efektyviai sumažinti tyrimuose *in vitro* melanomos ląstelių gyvybingumą. Iš gautų rezultatų taip pat darytina išvada, kad FBXW7 slopiklis oridoninas gali būti potencialūs terapinis veiksnys, slopinantis melanomos ląstelių gyvybingumą.

Siekiant įvertinti, kokie genai yra aktyvūs arba išaktyvinti paveikus FM-94 ir SK-MEL-26 linijų ląsteles MDM2-p53 sąveikos slopikliais nutlino-3, RITA arba E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikliu oridoninu, buvo atlikta FM-94 ir SK-MEL-26 linijų ląstelių genų raiškos pokyčių analizė. Kaip jau buvo minėta, nutlino-3 jungiasi su MDM2 ir taip neleidžia jam jungtis prie p53, dėl ko slopinama MDM2 funkcija ir atkurama p53 funkcija (75, 170). Vienu autorių duomenimis, MDM2-p53 sąveikos slopiklis nutlino-3 gali suaktyvinti p53 sukeltą apoptozę daugelyje žmogaus navikų ląstelių (169-171), tačiau kitų autorių tyrimai parodė, kad MDM2-p53 sąveikos slopiklis nutlino-3 sukėlė p53 aktyvinimą ir slopino ląstelių augimą, tačiau nesukėlė reikšmingos apoptozės (172). Atlikto tyrimo metu paveikus FM-94 linijos ląsteles MDM2-p53 sąveikos slopikliu nutlino-3, p53 geno raiška lyginant su „namų apyvokos“ (*HPRT1*, *TBP*) genų raiška padidėjo beveik 2 kartus, bet



dar labiau padidėjo *MDM2* ir *BBC3* genų raiška, o *CCNE1* ir *c-MYC* genų raiška beveik 2 kartus sumažėjo. Tyrimų rezultatai parodė, kad *MDM2*–*p53* sąveikos slopiklio nutlino–3 poveikis buvo neveiksmingas slopinant FM–94 linijos ląstelių gyvybingumą, ir tai galėjo lemti didelę *MDM2* geno raišką. *BBC3* genas (angl. *BCL2 binding component 3*, *PUMA*) koduoja BCL–2 šeimai priklausančius baltymus, kurie, tarpininkaujant *p53*, sukelia ląstelių apoptozę (197). Tyrimo metu padidėjusi *BBC3* geno raiška po *MDM2*–*p53* sąveikos slopiklio nutlino–3 poveikio galėtų rodyti, kad buvo aktyvinama *p53* sukelta ląstelių apoptozė.

*CCNE1* (angl. *cyclin E1*) genas koduoja baltymus, priklausančius ciklinų šeimai. Ciklinai veikia kaip CDK kinazių reguliatoriai ir reguliuoja ląstelių ciklą bei užtikrina ląstelės ciklo fazės G1 perėjimą į S fazę. Daugelyje navikų nustatyta padidėjusi šio geno raiška, dėl šios priežasties atsiranda chromosomų nestabilumas ir skatinama kancerogeneze (198). *c-MYC* – transkripcijos veiksnys, kuris reguliuoja ląstelių proliferaciją, apoptozę, metabolizmą ir diferenciaciją ir, kaip jau buvo aptarta, progresuojant melanomai jo raiška didėja. Yra žinoma, kad nutlino–3 gali stabdyti ląstelių ciklą ir proliferaciją (134), todėl gauti tyrimo rezultatai, rodantys, kad paveikus FM–94 ląsteles nutlino–3 sumažėja genų *CCNE1* ir *c-MYC* raiška ir ląstelių gyvybingumas, gali būti siejami su nutlino–3 gebėjimu stabdyti šių ląstelių proliferaciją.

Taigi *MDM2*–*p53* sąveikos slopiklio nutlino–3 poveikis FM–94 linijos ląstelėms galėjo lemti ląstelės ciklo aktyvoklio sumažėjusią *CCNE1* raišką ir apoptozę sukeliančio geno *BBC3* padidėjusią raišką.

Paveikus FM–94 linijos ląsteles *MDM2*–*p53* sąveikos slopikliu RITA, nustatyta statistiškai reikšmingai sumažėjusi *c-MYC* ir *FBW7* genų raiška, neženkliai sumažėjusi *MDM2*, *NUMB* ir *NOTCH1* genų raiška, taip pat statistiškai nereikšmingai padidėjusi *p53* raiška. Kaip rodo ankstesnių tyrimų duomenys, melanomos ląstelėse stebimas sumažėjęs *FBXW7* aktyvumas (9). *c-Myc* yra vienas iš pagrindinių *FBXW7* taikiny, o sumažėjęs *FBXW7* raiškos lygis lemia *c-Myc* padidėjusią raišką. Tai patvirtino ir kitų autorių tyrimų rezultatai, kad metastazavusios melanomos atveju būdinga padidėjusi *c-Myc* raiška (9, 107). Šio darbo tyrimas parodė, kad paveikus FM–94 ląsteles slopikliu RITA *FBXW7* geno raiška statistiškai reikšmingai sumažėjo, todėl galima manyti, kad *MDM2*–*p53* sąveikos slopiklis RITA neturi įtakos *FBW7* geno raiškai. Tačiau, mažėjant *FBXW7* raiškai, turėtų didėti *c-Myc* raiška, tačiau tai nenustatyta darbo tyrime naudojant FM–94 linijas ląsteles. Esama duomenų, kad *c-Myc* raišką taip pat gali padidinti Notch kelio aktyvinimas, todėl sumažėjusi

*NOTCH1* raiška gali lemti ir mažesnę *c-MYC* raišką (120). Taip pat žinoma, kad melanomos atveju Notch signalinio kelio raiška padidėja, ir tai gali būti siejama su *FBW7* mutacija arba inaktyvacija (9, 119, 120). Tyrimas, naudojant neuroblastomos ląsteles, parodė, kad RITA aktyvino *p53*, kuri slopina *c-MYC* (180). Šio tyrimo atveju FM-94 linijos melanomos ląstelių *p53* raiška yra statistiškai nereikšmingai padidėjusi, todėl, viena vertus, negalėjo lemti *c-MYC* geno raiškos sumažėjimo, tačiau, antra vertus, MDM2-p53 sąveikos slopiklis RITA galėjo per tarpinius signalinius kelius nuslopinti *NOTCH1* ir lemti *c-MYC* sumažėjusią raišką, o nereikšmingai sumažėjusi *MDM2*, *NUMB* ir nereikšmingai padidėjusi *p53* genų raiška gali būti siejama su nedideliu slopiklio RITA poveikiu ląstelių gyvybingumui.

FM-94 linijos ląsteles paveikus E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikiu oridoninu statistiškai reikšmingai padidėjo *CCNE1* ir *BBC3* genų raiška ir sumažėjo *c-MYC* geno raiška. *NOTCH1* ir *FBW7* geno raiška lyginant su *HPRT1* geno raiška tik neženkiai sumažėjo. Paveikus melanomos ląsteles E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyvikiu oridoninu, tikėtasi, kad padidės *FBW7* aktyvumas ir sumažės *c-MYC* raiška, tačiau, analizuojant FM-94 linijos ląstelių genų raiškos tyrimo duomenis, gautas statistiškai nereikšmingas *FBW7* geno raiškos sumažėjimas, nors FBXW7 aktyviklis oridoninas veiksmingai slopino ląstelių gyvybingumą. Tačiau, nepaisant *FBW7* geno raiškos sumažėjimo, *c-MYC* geno raiška taip pat sumažėjo. Naujausių tyrimų rezultatai parodė, kad oridoninas gali neigiamai reguliuoti Wnt /  $\beta$ -katenino signalinį kelią, ir tai lemia *GSK3- $\beta$*  aktyvinimą ir *c-MYC* slopinimą (199). Pavienių autorių tyrimai parodė, kad melanomos metu padidėja Wnt /  $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumas (200). Taigi *c-MYC* raiškos sumažėjimas FM-94 linijos ląstelėse gali būti siejamas su *GSK3- $\beta$*  aktyvumo padidėjimu veikiant oridoninui. Analizuojant FM-94 linijos ląstelių, paveiktų FBXW7 aktyvikiu oridoninu, genų raiškos pokyčius, nustatyta padidėjusi *CCNE1* ir *BBC3* genų raiška. Kaip buvo minėta, paveikus FM-94 linijos ląsteles MDM2-p53 sąveikos slopikliu nutlinu-3, padidėjusi *BBC3* geno raiška galėjo būti siejama su padidėjusia *p53* raiška ir su *p53* sukelta ląstelių apoptoze. Visgi paveikus FM-94 linijos ląsteles FBXW7 aktyvikiu oridoninu, *p53* geno raiška nepadidėjo, todėl galima daryti išvadą, kad oridoninas galėjo aktyvinti *BBC3* raišką nuo *p53* nepriklausomu būdu. Tai galima pagrįsti ir ankstesniais mokslininkų atliktų tyrimo rezultatais, kurie parodė, kad *BBC3* geno produktas PUMA (angl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) gali būti aktyvinamas nuo *p53* nepriklausomu

būdu, per kitus transkripcijos veiksnius (197). Ciklinas E yra koduojamas *CCNE1* geno, todėl, esant sumažėjusiai *FBW7* raiškai, turėtų mažėti ciklino-E ir kartu *CCNE1* geno raiška. Tačiau, FM-94 linijos ląsteles paveikus *FBXW7* aktyviu oridoninu, *CCNE1* geno raiška padidėjo, o žinant, kad oridoninas FM-94 ląstelėse neaktyvino *FBW7*, galima daryti išvadą, jog *CCNE1* raiškos padidėjimą galėjo lemti kiti veiksniai, kurie kartu slopino *FBW7*. Atskirų autorių duomenys parodė, kad vienas iš *FBW7* slopinimo veiksnių galėtų būti aktyvus Ras-Raf-MEK-ERK signalinis kelias, ERK kinazė tiesiogiai sąveikauja su *FBW7*, ir tai lemia jo ubikvitinimą ir proteosominį skilimą (201).

Apibendrinus ląstelių gyvybingumo tyrimus ir palyginus su genų raiškos rezultatais, galima teigti, kad E3 ubikvitino lipazės *FBXW7* aktyviklis oridoninas veiksmingai slopina ląstelių gyvybingumą, aktyvindamas proapoptotinius baltymus ir slopindamas ląstelės ciklo aktyviklį *c-MYC*.

Antrajame etape buvo atlikti displastinių apgamų ir melanomos pacientų mėginių E3 ubikvitino ligazių *FBXW7* ir MDM2 bei jų substratų p53 ir *c-Myc* baltymų raiškos tyrimai. Analizuojant tiriamosios grupės kliniškes ir patologines charakteristikas, nustatyta, kad melanoma dažniau (77 proc.) buvo diagnozuota saulės paveiktoje odos srityje. Tai patvirtina jau seniai žinomą faktą, kad UV spinduliai yra vienas pagrindinių melanomos atsiradimo rizikos veiksnių (21).

Kaip jau buvo minėta, *FBXW7* yra navikų slopiklis, kuris kontroliuoja daugelio onkogenų baltymų lygį. Tačiau nedaug yra žinoma apie paties *FBXW7* reguliavimą navikuose. Reguliavimas gali būti vykdomas transkripciniu ir baltymų lygiu, taip pat potransliacinėmis modifikacijomis, pavyzdžiui, fosforilinimu. Žinoma, kad *FBXW7* reguliacijoje svarbios p53 molekulės, NUMB4, NF-κB1, miR-27 ir miR223 bei kt. (107).

Ankstesni pavienių autorių tyrimai parodė, kad melanomos ląstelėse yra sumažėjęs *FBXW7* aktyvumas (9). Taip pat buvo teigiama, kad *FBXW7* raiška yra ženkliai mažesnė pirminės melanomos atveju negu displastiniuose apgamuose. Metastazavusios melanomos atveju *FBXW7* lygis yra dar mažesnis lyginant su pirminės melanomos forma, o sumažėjusi jo raiška yra susijusi su blogesniu melanoma sergančių pacientų penkerių metų išgyvenamumu. Tolesni *in vitro* tyrimai parodė, kad *FBXW7* slopina melanomos ląstelių migraciją per mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės / tarpląstelinio signalo reguliuojamos kinazės (MAPK / ERK) signalinį kelią. Taigi *FBXW7* nuslopinimas melanomos

ląstelėse lemia padidėjusią ląstelių migraciją ir streso pluošto susidarymą (98).

Šio darbo atlikto tyrimo rezultatai taip pat parodė žemą FBXW7 raiškos lygį progresuojant melanomai, nustatyta statistiškai reikšminga tiesioginė sąsaja tarp žemos FBXW7 baltymo raiškos ir didėjančios melanomos stadijos pagal gylį (pT3 / pT4) ( $p < 0,001$ ). Taigi atlikto tyrimo rezultatai patvirtina ubikvitino ligazių, kaip molekulinį taikinių, priešvėžinei terapijai potencialą.

Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad sumažėjęs FBXW7 raiškos lygis siejamas su melanomos progresavimu ir c-Myc baltymų kaupimusi (9). c-Myc yra vienas svarbiausių FBXW7 taikinių, reguliuojantis daugiau nei 15 proc. genų, dalyvaujančių diferenciacijos, proliferacijos, baltymų sintezės, metabolizmo ir apoptozės procesuose, raišką, o jo funkcijos sutrikimai skatina naviko formavimąsi (94, 120). FBW7 $\alpha$  skatina Myc ubikvitilinimą proteosomose, o FBW7 $\gamma$  ubikvitilina Myc branduolyje ir taip slopina Myc gebėjimą skatinti ląstelių augimą (102–106). Taigi FBXW7 raiškos sumažėjimas lemia c-Myc padidėjusią raišką (107).

Atlikto tyrimo metu, esant pT1 / pT2 stadijų melanomai, c-Myc baltymo raiška buvo neženkliai aukštesnė (70,6 proc.) lyginant su šio baltymo raiška esant melanomai *in situ* ir pT1 stadijos melanomai. Nustatyta glaudi tiesioginė sąsaja tarp FBXW7 ir c-Myc raiškos pokyčių – esant žemai FBXW7 baltymo raiškai c-Myc raiška buvo žema ( $p = 0,01$ ). Šio darbo tyrimo gauti rezultatai skiriasi nuo paskelbtų kitų autorių tyrimų rezultatų. Gautiems rezultatams įtakos galėjo turėti imties dydis, be to, melanoma yra heterogeniškas navikas ir jai išsivystyti ir progresuoti turi reikšmės daugybė genų ir įvairių signalinių kelių sąveika. c-Myc kai kuriais vėžio atvejais gali įgyti funkcijos netekimo mutacijų arba dažniausiai c-Myc raiška labai padidėja. Abiem atvejais tai lemia navikų formavimąsi per sutrikdytą transkripciją, transliaciją ar diferenciaciją (120).

Kaip jau buvo minėta, vienas iš svarbiausių FBXW7 reguliatorių yra p53. p53 yra pagrindinis baltymas navikų slopiklis, kurio geno mutacijų nustatoma daugelio žmonių navikų atvejais (74, 123–125). Ankstesni tyrimai parodė, kad FBXW7 yra nuo p53 priklausomas naviką slopinantis genas, dalyvaujantis naviko vystymesi, o veikiant p53 signalinį kelią gali būti atstatyta FBXW7 raiška (107, 128). Taip pat žinoma, kad melanomos atveju yra padidėjusi laukinio tipo p53 raiška (129). Visgi, atsižvelgiant į melanomos piktybinį pobūdį ir atsparumą gydymui, atrodo, kad p53 neveiksmingas kaip naviko slopiklis melanomos atveju. Nors mechanizmai

dar nėra visiškai aiškūs, buvo įrodyta, kad kai kurie p53 taikiniai melanomos atveju yra išderinti (130, 131).

Nustatyta MDM2 onkobalymo padidinta raiška daugelio žmogaus navikų, turinčių laukinio tipo p53 alelį, atvejais (138). Didelė MDM2 raiška siejama su blogesne ligos prognoze sergant kelių lokalizacijų piktybiniais navikais (89). Piktybinėms melanomoms būdinga padidinta MDM2 raiška. P. Rajabi (*P. Rajabi*) ir bendraautoriai įrodė, kad esama sąsajos tarp MDM2 raiškos lygio ir naviko gylio bei invazijos pirminės odos piktybinės melanomos atveju (139). Viena vertus, 50 proc. melanomos atvejų nustatoma didelė *MDM2* geno raiška, ir tai lemia sustiprėjusią p53 degradaciją, todėl įvyksta naviko ląstelių proliferacija. Antra vertus, nustatyta, kad sumažėjusi MDM2 raiška siejama su melanoma sergančių pacientų geresniu išgyvenamumu (11).

Atlikto tyrimo metu pirminės ir invazinės (pT1–pT4) melanomos atvejais buvo nustatyta aukšta p53 raiška. Melanomos gyliui viršijant daugiau nei 1,0 mm nustatyta statistiškai reikšmingai aukšta p53 baltymo raiška ( $p=0,01$ ), o *FBXW7* raiška metastazavusios melanomos atveju buvo žema. Kitų autorių atliktų tyrimų metu nustatyta, kad *FBXW7* pirmasis egzonas turi p53 surišimo vietą. Patvirtinta, kad po genotoksinio streso sumažėjusią *FBXW7* raišką taip pat gali aktyvinti p53 (95, 120). Šio tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingos sąsajos tarp p53 ir *FBXW7* raiškos pokyčių neparodė, tokiam rezultatui įtakos galėjo turėti tiriamosios grupės imties dydis, taip pat nebuvo įvertinta, ar p53 raiška koreliuoja su p53 funkcionalumu.

Remiantis literatūros duomenimis, p53 ir MDM2 sąveikauja suformuodami neigiamą autoreguliacinę kilpą, kurioje padidėjęs p53 transkripcijos lygis suaktyvina MDM2, ir tai savo ruožtu sumažina p53 lygį (74, 134, 135). Kadangi šio tyrimo metu beveik visų navikų atvejais (97 proc.) buvo nustatyta žema MDM2 baltymo raiška, priešingai nei paskelbta ankstesniuose tyrimuose, rezultatai neparodė reikšmingos sąsajos tarp MDM2 raiškos lygio ir melanomos invazijos, taip pat nenustatyta sąsaja tarp MDM2 žemos raiškos ir p53 raiškos lygio. Tikėtina, kad gautus rezultatus galėjo veikti taip pat tiriamosios grupės imties dydis.

Atsižvelgiant į tai, kad E3 ubikvitino ligazės *FBXW7* raiška yra susijusi su melanomos progresavimu, ateityje tikslinga tęsti tyrimus siekiant išsiaiškinti jos prognozinę ir kaip molekulinio taikinio priešvėžiniam poveikiui svarbą melanomos atveju.

**Tyrimo ribotumas ir ateities perspektyvos.** Šio tyrimo ribotumas iš dalies yra nedidelis, atsižvelgiant į melanomos stadiją pagal gyli (T), tiriamųjų

skaičius atskirose grupėse. Nepakankama imtis, matyt, turėjo įtakos gautiems rezultatams (buvo nustatyti tik tendencingi duomenys;  $p=0,08$ ) ir vertinant FBXW7 baltymo žemos raiškos įtaką pacientų išgyvenamumui.

Ateityje tikslinga tęsti E3 ubikvitino ligazių melanomos audinių raiškos tyrimus, taip pat svarbu ne tik nustatyti naujus potencialius taikinius melanomai gydyti, bet ir įvertinti jų prognozinę reikšmę.

Perspektyvu patikslinti ląstelių žūties mechanizmą ir oridonino poveikį ląstelių ciklui *in vitro* tyrimuose. Šie rezultatai pagilintų žinias apie oridonino, kaip potencialaus terapinio veiksnio, sukeltą poveikį melanomos ląstelėms.

## IŠVADOS

1. Veiksmingiausiai žmogaus metastazavusios melanomos SK–MEL–26, FM–94 ir FM–3 linijų ląstelių gyvybingumą veikia E3 ubikvitino ligazės FBXW7 aktyviklis oridoninas.
2. Atlikus *in vitro* genų raiškos tyrimus nustatyta:
  - žmogaus metastazavusios melanomos FM–94 linijos ląstelių p53 signalinis kelias yra funkcionalus – MDM2–p53 sąveikos slopiklis nutlinas–3 mažina šių ląstelių gyvybingumą slopindamas ląstelių ciklą ir aktyvindamas apoptozę;
  - aktyviklis oridoninas ne tik aktyvina E3 ubikvitino ligazę FBXW7, slopina ląstelės ciklą, bet ir aktyvina apoptozę.
3. Melanoma sergančiųjų pacientų pooperacinėje medžiagoje nustatyta:
  - mazginės melanomos atveju ir esant didesniai melanomos invazijos gyliui (pT3 ir pT4 stadijos), E3 ubikvitino ligazės FBXW7 raiška yra žema;
  - mazginės melanomos atveju ir esant melanomos gyliui daugiau nei 1,1 mm, p53 naviką slopinančio geno koduojamo baltymo raiška yra aukšta;
  - c–Myc raišką, didėjant melanomos invazijai, reguliuoja ne tik FBXW7 ligazė – netgi esant žemai FBXW7 baltymo raiškai c–Myc raiška yra taip pat žema.
4. E3 ubikvitino ligazės FBXW7 raiškos sumažėjimas, sergant metastazavusia melanoma, patvirtina šio baltymo, kaip molekulinio priešvėžinės terapijos taikinio, potencialą; oridoninas, būdamas FBXW7 aktyviklis, galėtų būti potenciali terapinė priemonė melanomai gydyti.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355:51–65.
2. NVI Vėžio registro duomenys, 2012 m.; Prieiga per internetą: <https://www.nvi.lt/vezio-registras/>.
3. Avilés-Izquierdo JA, Molina-López I, Rodríguez-Lomba E, Marquez-Rodas I, Suarez-Fernandez R, Lazaro-Ochaita P. Who detects melanoma? Impact of detection patterns on characteristics and prognosis of patients with melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(5):967–74.
4. Bowyer S, Prithviraj P, Lorigan P, Larkin J, McArthur G, Atkinson V, et al. Efficacy and toxicity of treatment with the anti-CTLA-4 antibody ipilimumab in patients with metastatic melanoma after prior anti-PD-1 therapy. *Br J Cancer*. 2016;114(10):1084–9.
5. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199–206.
6. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med*. 2015;372(1):30–9.
7. Long G V., Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, De Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: A multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9992):444–51.
8. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1867–76.
9. Aydin IT, Melamed RD, Adams SJ, Castillo-Martin M, Demir A, Bryk D, et al. FBXW7 mutations in melanoma and a new therapeutic Paradigm. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(6):1–8.
10. Lin X, Sun R, Zhao X, Zhu D, Zhao X, Gu Q, et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J Mol Med*. 2017;95(1):53–67.
11. Manfredi JJ. p53-MDM2 Review The Mdm2–p53 relationship evolves. 2010;53:1580–9.
12. Morrow JK, Lin HK, Sun SC, Zhang S. Targeting ubiquitination for



- cancer therapies. *Future Med Chem.* 2015;7(17):2333–50.
13. Palmieri G, Ombra MN, Colombino M, Casula M, Sini MC, Manca A, et al. Multiple molecular pathways in melanomagenesis: Characterization of therapeutic targets. *Front Oncol.* 2015;5(Aug):1–16.
  14. Sczaniecka M, Gladstone K, Pettersson S, McLaren L, Huart AS, Wallace M. MDM2 protein-mediated ubiquitination of NUMB protein: Identification of a second physiological substrate of MDM2 that employs a dual-site docking mechanism. *J Biol Chem.* 2012;287(17):14052–68.
  15. Panayi N, Mendoza E, Breshears E, Burd R. Aberrant death pathways in melanoma. In: Davids LM, editor. *Biology, therapy and management of melanoma.* 2013.
  16. Huang HL, Weng HY, Wang LQ, Yu CH, Huang QJ, Zhao PP, et al. Triggering Fbw7-mediated proteasomal degradation of c-Myc by oridonin induces cell growth inhibition and apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(5):1155–65.
  17. Pishas K, Neuhaus S, Clayer M, Schreiber A, Lawrence D, Perugini M. Nutlin-3a efficacy in sarcoma predicted by transcriptomic and epigenetic profiling. *Cancer Res.* 2014;74(3):921–31.
  18. Houghton AN, Polsky D. Focus on melanoma. *Cancer Cell.* 2002;2:275–8.
  19. International Agency for Research on Cancer. p. [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr).
  20. American Cancer Society. Atlanta, Ga. 2020. p. [www.cancer.org](http://www.cancer.org).
  21. Agency for Research on Cancer (IARC). Solar and ultraviolet radiation. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 55th ed. IARC; 1992.
  22. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—part D: radiation. *Lancet Oncol.* 2009;10:751–2.
  23. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 2005;41(1):45–60.
  24. Whitman DC et al. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control.* 2001;12:69–82.
  25. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL T. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the surveillance, epidemiology, and end results program. *J Investig Dermatol.* 2008;128:243–5.

26. Elwood JM G. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer*. 1998;78:276–80.
27. Garibyan L., Fisher D E. How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2010;12:319–326.
28. Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012;345(7877):1–12.
29. Lazovich DA, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. Indoor tanning and risk of melanoma: A case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(6):1557–68.
30. Stern RS. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:755–61.
31. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: Functional role and pigmentary associations. *Photochem Photobiol*. 2011;87(5):978–87.
32. Palmer JS, Duffy DL, Box NF et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet*. 2000;66:176–186.
33. Haenssle HA, Mograby N, Ngassa A, Buhl T, Emmert S, Schön MP, et al. Association of patient risk factors and frequency of nevus-associated cutaneous melanomas. *JAMA Dermatology*. 2016;152(3):291–8.
34. Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: Diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Aug;45(2):260–76.
35. Tucker MA, Halpern A, Holly EA et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *Jama*. 1997;277(18):1439–44.
36. Goldstein AM, Chan M, Harland M et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet*. 2007;44(2):99–106.
37. Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma; A Global Perspective. *Arch Dermatol*. 2001;137(11):1493–6.
38. Soura E, Eliades P, Shannon K, Stratigos A, Tsao H. Hereditary Melanoma: Update on Syndromes and Management - Genetics of

- familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2006;74(3):395–407.
39. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16(INK4a) binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996;12(1):97–9.
  40. Van Der Leest RJT, Flohil SC, Arends LR, De Vries E, Nijsten T. Risk of subsequent cutaneous malignancy in patients with prior melanoma: A systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2015;29(6):1053–62.
  41. Goggins WB, Tsao H. A population-based analysis of risk factors for a second primary cutaneous melanoma among melanoma survivors. *Cancer.* 2003;97(3):639–43.
  42. Dinh QQ, Chong AH. Melanoma in organ transplant recipients: The old enemy finds a new battleground. *Australas J Dermatol.* 2007;48(4):199–207.
  43. Gordon Spratt EA, Carucci JA. Skin cancer in immunosuppressed patients. *Facial Plast Surg.* 2013;29(5):402–10.
  44. Olsen CM, Knight LL, Green AC. Risk of melanoma in people with HIV/AIDS in the preand post-HAART eras: A systematic review and meta- Analysis of cohort studies. *PLoS One.* 2014;9(4).
  45. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12:390–9, quiz 400–1.
  46. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007;445(7130):843–50.
  47. Bertolotto C. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:1–22.
  48. Clark WJ, Elder D, Guerry DI, Epstein M, Greene M, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984;15:1147–65.
  49. Arrangoiz R. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *J Cancer Treat Res.* 2016;4(1):1.
  50. Clark WHJ. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biological behaviour. *Adv Biol Ski.* 1967;3:621–647.
  51. Reed RJ. Acral lentiginous melanoma. *New Concepts Surg Pathol Ski.* 1976;89–90.
  52. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010(1).
  53. Sinha P, Lattimer C. Malignant melanoma. *Key Top Gen Surg.*

- 2002;179–83.
54. Canadian cancer society. Prieiga per internetą: . www.cancer.ca.
  55. Amin M, Edge S, Greene F, Byrd D, Brookland R, Washington, et al. AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition. Springer. 2017;
  56. Gershenwald J, Scolyer R, Hess K, Al. E. Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. CA CANCER J CLIN. 2017;67:472–492.
  57. van Zeijl MCT, van den Eertwegh AJ, Haanen JB, Wouters MWJM. (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma. Eur J Surg Oncol. 2017;43(3):534–43.
  58. Kim C, Lee CW, Kovacic L, Shah A, Klasa R, Savage KJ. Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide. Oncologist. 2010;15(7):765–71.
  59. Verma S, Petrella T, Hamm C, Bak K, Charette M. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: A clinical practice guideline. Curr Oncol. 2008;15(2):36–40.
  60. Fricker J. New era in metastatic melanoma. Mol Oncol. 2010;4(2):91–7.
  61. Petrella T, Quirt I, Verma S, Haynes AE, Charette M, Bak K. Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma. Curr Oncol. 2007;14(1):21–6.
  62. Hamid O, Boasberg PD, Rosenthal K, O’Day SJ. Systemic treatment of metastatic melanoma: New approaches. J Surg Oncol. 2011;104(4):425–9.
  63. Eggermont AMM. Advances in systemic treatment of melanoma. Ann Oncol. 2010;21(7):339–44.
  64. Niezgoda A, Niezgoda P, Czajkowski R. Novel approaches to treatment of advanced melanoma: A review on targeted therapy and immunotherapy. Biomed Res Int.;2015.
  65. Aplin AE, Weeraratna AT. Key Signaling Pathways in Normal and Neoplastic Melanocytes. Melanoma. 2019;1–19.
  66. Pho L, Champine M, Leachman S, Kohlmann W. Inherited Gene Mutations in Melanoma. In: Genetics of Melanoma, Cancer Genetics, Chapter 5. 2016.
  67. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1978;81:1100–1105.
  68. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas A, Rose I. Proposed role

- of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77:1783–1786.
69. Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin - Proteasome system. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(7):596–613.
  70. Collins G, Tansey W. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16:197–202.
  71. Krogan N, Lam M, Fillingham J, Keogh M, Gebbia M, Li J, et al. Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*. 2004;16:1027–1034.
  72. Lipkowitz S, Weissman AM. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumor suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:629–643.
  73. Kirkin V, Dikic I. Ubiquitin networks in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(1):21–8.
  74. Wade M, Li Y, Wahl G. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Mark*. 2013;13(5):213–23.
  75. Ma J, Guo W, Li C. Ubiquitination in melanoma pathogenesis and treatment. *Cancer Med*. 2017;6(6):1362–77.
  76. Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 194:531–544.
  77. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425–479.
  78. Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell*. 2009;137(1):133–45.
  79. Komander D, Rape M. The Ubiquitin Code. *Annu Rev Biochem*. 2012;81(1):203–29.
  80. Schmitt S, Deshmukh R, Dou P. Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer. *Molecular Mechanisms and Strategies to Overcome Resistance*. In: *Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer*. 2014; 181–204.
  81. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*. 2004;5:417–421.
  82. Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(4):255–61.
  83. Pettersson S, Sczaniecka M, McLaren L, Russell F, Gladstone K, Hupp

- T, et al. Non-degradative ubiquitination of the Notch1 receptor by the E3 ligase MDM2 activates the Notch signalling pathway. *Biochem J.* 2013;450(3):523–36.
84. Jinyuan M, Weinan G, Chunying L. Ubiquitination in melanoma pathogenesis and treatment. *Cancer Med.* 2017;6(6):1362–1377.
  85. Turcu Francisca E, Reyes, Ventii Karen H, WKDW. Nicotine-induced Upregulation of Nicotinic Receptors: Underlying Mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(7):756–765.
  86. Grabbe C, Husnjak K, Dikic I. Europe PMC Funders Group The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. 2013;12(5):295–307.
  87. Nakayama K. Growth and progression of melanoma and non-melanoma skin cancers regulated by ubiquitination. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(3):338–51.
  88. Moretti J, Brou C. Ubiquitinations in the Notch signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):6359–81.
  89. Sun Y. E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia.* 2006;8(8):645–54.
  90. Wenzel DM, Kleivit RE. Following Ariadne’s thread: A new perspective on RBR ubiquitin ligases. *BMC Biol.* 2012;10.
  91. Lorenz S, Cantor AJ, Rape M, Kuriyan J. Macromolecular juggling by ubiquitylation enzymes. *BMC Biol.* 2013;11.
  92. Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* 2004;18(21):2573–80.
  93. Xie C, Wei W, Sun Y. Role of SKP1-CUL1-F-Box-Protein (SCF) E3 Ubiquitin Ligases in Skin Cancer. *J Genet Genomics.* 2013;40(3):97–106.
  94. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: A tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(2):83–93.
  95. Wang Z, Inuzuka H, Zhong J, Wan L, Fukushima H, Sarkar F, et al. Tumor Suppressor Functions of FBW7 in Cancer Development and Progression. *FEBS Lett.* 2012;586(10):1409–18.
  96. Bhaskaran N, van Drogen F, Ng H-F, Kumar R, Ekholm-Reed S, Peter M, et al. Fbw7 and Fbw7 Collaborate To Shuttle Cyclin E1 into the Nucleolus for Multiubiquitylation. *Mol Cell Biol.* 2013;33(1):85–97.
  97. Tan YM, Sangfelt O, Spruck C. The Fbxw7/hCdc4 tumor suppressor in human cancer. *Cancer Lett.* 2008;271(1):1–12.
  98. Cheng Y, Chen G, Martinka M, Ho V, Li G. Prognostic significance

- of Fbw7 in human melanoma and its role in cell migration. *J Invest Dermatol.* 2013;133(7):1794–802.
99. Busino L, Millman SE, Scotto L, Kyratsous CA, Connor OO, Hoffmann A, et al. Survival Mechanism in Multiple Myeloma. *2012;14(4):375–85.*
  100. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(6):1–14.
  101. Sato M, Rodriguez-Barrueco R, Yu J, Do C, Silva JM, Gautier J. MYC is a critical target of FBXW7. *Oncotarget.* 2015;6(5):3292–305.
  102. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 $\gamma$ . *J Cell Biol.* 2008;182(1):19–26.
  103. Grim JE, Gustafson MP, Hirata RK, Hagar AC, Swanger J, Welcker M, et al. Isoform- and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Biol.* 2008;181(6):913–20.
  104. Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JA, Harper JW, Eisenman RN, et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(24):9085–90.
  105. Welcker M, Orian A, Grim JE, Eisenman RN, Clurman BE. A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr Biol.* 14:1852–1857.
  106. Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.* 2004;23(10):2116–25.
  107. Wang L, Ye X, Liu Y, Wei W, Wang Z. Aberrant regulation of FBW7 in cancer. *Oncotarget.* 2014;5(8):2000–15.
  108. Becker W. Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle.* 2012;11(18):3389–94.
  109. Crusio KM, King B, Reavie LB, Aifantis I. The ubiquitous nature of cancer: The role of the SCFFbw7 complex in development and transformation. *Oncogene.* 2010;29(35):4865–73.
  110. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* (80). 1999;284(5415):770–6.
  111. Reichrath J, Reichrath S. Notch-signaling and nonmelanoma skin cancer: An ancient friend, revisited. *Adv Exp Med Biol.*

- 2012;727:265–71.
112. Massi D, Tarantini F, Franchi A, Paglierani M, Di Serio C, Pellerito S, et al. Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2006;19(2):246–54.
  113. Pinnix CC, Herlyn M. The many faces of Notch signaling in skin-derived cells. *Pigment Cell Res.* 2007;20(6):458–65.
  114. Hardy KM, Kirschmann DA, Seftor EA, Margaryan N V, Postovit L, Strizzi L, et al. Facilitates Manifestation of the Aggressive Melanoma Phenotype. 2011;70(24):10340–50.
  115. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: A new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene.* 2003;22(43):6598–608.
  116. O’Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to  $\gamma$ -secretase inhibitors. *J Exp Med.* 2007;204(8):1813–24.
  117. Palomero T, Wei KL, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18261–6.
  118. Tamagnone L, Zacchigna S, Rehman M. Taming the Notch transcriptional regulator for cancer therapy. *Molecules.* 2018;23(2):1–17.
  119. Öberg C, Li J, Pauley A, Wolf E, Gurney M, Lendahl U. The Notch Intracellular Domain is Ubiquitinated and Negatively Regulated by the Mammalian Sel-10 Homolog. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35847–53.
  120. Davis RJ, Welcker M, Clurman BE. Tumor suppression by the Fbw7Ubiquitin ligase: Mechanisms and opportunities. *Cancer Cell.* 2014;26(4):455–64.
  121. Kim MY, Jung J, Mo JS, Ann EJ, Ahn JS, Yoon JH, et al. The intracellular domain of Jagged-1 interacts with Notch1 intracellular domain and promotes its degradation through Fbw7 E3 ligase. *Exp Cell Res.* 2011;317(17):2438–46.
  122. Lerner M, Lundgren J, Akhoondi S, Jahn A, Ng HF, Moqadam FA, et al. MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression. *Cell Cycle.* 2011;10(13):2172–83.
  123. Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: A collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget.* 2012;3(3):228–35.



124. Madan E, Gogna R, Bhatt M, Pati U, Kuppusamy P, Mahdi AA. Regulation of glucose metabolism by p53: Emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget*. 2011;2(12):948–57.
125. Muller PAJ, Vousden KH. P53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*. 2013;15(1):2–8.
126. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network : Article : *Nature*. *Nature*. 2000;408(6810):307–10.
127. Rozan LM, El-Deiry WS. p53 downstream target genes and tumor suppression: A classical view in evolution. *Cell Death Differ*. 2007;14(1):3–9.
128. Mao JH, Perez-Iosada J, Wu D, DelRosario R, Tsunematsu R, Nakayama KI, et al. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature*. 2004;432(7018):775–9.
129. Houben R, Hesbacher S, Schmid CP, Kauczok CS, Flohr U, Haferkamp S, et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One*. 2011;6(7):1–7.
130. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 2001;409(6817):207–11.
131. Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene*. 2005;24(6):1111–6.
132. Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(1):96–107.
133. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2 - Master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*. 2000;242(1–2):15–29.
134. Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2007;13(1):23–31.
135. Nag S, Zhang X, Srivenugopal KS, Wang M-H, Wang W, Zhang R. Targeting MDM2-p53 Interaction for Cancer Therapy: Are We There Yet? *Curr Med Chem*. 2014;21(5):553–74.
136. Sun Y, Klauzinska M, Lake R, Lee J, Santopietro S, Raaf A, et al. Trp53 regulates Notch4 signaling through Mdm2. *J CellSci*. 2011;124(7):1067–1076.
137. Rennstam K, McMichael N, Berglund P, Honeth G, Hegardt C, Rydén L, et al. Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer.

- Breast Cancer Res Treat. 2010;122(2):315–24.
138. Li Q, Lozano G. Molecular pathways: Targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):34–41.
  139. Rajabi P, Karimian P, Heidarpour M. The relationship between MDM2 expression and tumor thickness and invasion in primary cutaneous malignant melanoma. *J Res Med Sci.* 2012;7(5):452–5.
  140. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):875–85.
  141. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007;26(22):3100–12.
  142. Carlino MS, Long G V., Kefford RF, Rizos H. Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;96(3):385–98.
  143. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* 2002;8(12):3728–33.
  144. Yu FW, Chen CJ, Kiejda KA, Gillespie S, Xu DZ, Hersey P. Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4934–42.
  145. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007;445(7130):851–7.
  146. Hodis E, Watson IR, Kryukov G V., Arola ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150(2):251–63.
  147. Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Testori A, Maio M, Hogg D, et al. V600E Mutation. *N Engl J Med.* 2013;364(26):2507–16.
  148. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2135–47.
  149. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma (Clinical Cancer Research (2011) 17 (229-235)). *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1641.
  150. Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy. *Dermatol Res Pract.* 2012;2012(1):10–5.

151. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick D, Cooper Z, Messiaen L, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov.* 2013;3:338–349.
152. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res.* 2014;74(8):2340–50.
153. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Wu C, Mccusker JP, et al. HHS Public Access. 2016;47(9):996–1002.
154. Whittaker S, Theurillat J, Van Allen E, Al. E. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov.* 2013;3:350–362.
155. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6821–8.
156. Handolias D, Salemi R, Murray W, Tan A, Liu W, Viros A, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(2):210–5.
157. Bogenrieder T, Herlyn M. The molecular pathology of cutaneous melanoma. *Cancer Biomarkers.* 2011;9(1–6):267–86.
158. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J.* 2012;18(2):142–7.
159. Xing, F et al. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene.* 2012;31(4):446–457.
160. Shull AY, Latham-Schwark A, Ramasamy P, Leskoske K, Oroian D, Birtwistle MR, et al. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One.* 2012;7(8):1–10.
161. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 2003;22(20):3113–22.
162. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2003;63(11):2881–90.
163. Nogueira C, Kim K, Sung H, Paraiso K, Dannenberg J, Bosenberg M, et al. Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene.* 2010;29:6222–6232.
164. Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya R, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* 2014;4:80–93.

165. Mattern MR, Eddins MJ, Agarwal S, Sterner DE, Kodrasov MP, Kumar KGS, et al. Proteasome Inhibitors Versus E3 Ligase Inhibitors for Cancer Therapy. In: Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer, Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics Chapter 12 Springer International Publishing Switzerland. 2014.
166. Zhao Y et al. Diastereomeric spirooxindoles as highly potent and efficacious MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2013;135(19):7223–7234.
167. Vassilev L et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* (80- ). 2004;303(5659):844–848.
168. Zhao Y, Sun Y. Cullin-RING ligases as attractive anti-cancer targets. *Curr Pharm Des.* 2013;19(18):3215–25.
169. Tabe Y, Sebasigari D, Jin L, Rudelius M, Davies-Hill T, Miyake K, et al. MDM2 antagonist Nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):933–42.
170. Gu L, Zhu N, Findley HW, Zhou M. MDM2 antagonist nutlin-3 is a potent inducer of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with wild-type p53 and overexpression of MDM2. *Leukemia.* 2008;22(4):730–9.
171. Van Maerken T, Ferdinande L, Taideman J, Lambertz I, Yigit N, Vercruysse L, et al. Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(22):1562–74.
172. Tseng HY, Jiang CC, Croft A, Tay KH, Thorne RF, Yang F, et al. Contrasting effects of nutlin-3 on TRAIL- and docetaxel-Induced apoptosis due to upregulation of TRAIL-R2 and Mcl-1 in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(12):3363–74.
173. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. P53 family and cellular stress responses in cancer. *Front Oncol.* 2014;4(OCT):1–15.
174. Worrall C, Suleymanova N, Crudden C, Trocoli Drakensjö I, Candrea E, Nedelcu D, et al. Unbalancing p53/Mdm2/IGF-1R axis by Mdm2 activation restrains the IGF-1-dependent invasive phenotype of skin melanoma. *Oncogene.* 2017;36(23):3274–86.
175. Burgess A, Chia KM, Haupt S, Thomas D, Haupt Y, Lim E. Clinical overview of MDM2/X-targeted therapies. *Front Oncol.* 2016;6(JAN):1–7.
176. Khurana A, Shafer DA. <p>MDM2 antagonists as a novel treatment option for acute myeloid leukemia: perspectives on the therapeutic

- potential of idasanutlin (RG7388). *Onco Targets Ther.* 2019;Volume 12:2903–10.
177. Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LGGC, Masucci M, et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med.* 2004;10(12):1321–8.
  178. Enge M, Bao W, Hedström E, Jackson SP, Moumen A, Selivanova G. MDM2-Dependent Downregulation of p21 and hnRNP K Provides a Switch between Apoptosis and Growth Arrest Induced by Pharmacologically Activated p53. *Cancer Cell.* 2009;15(3):171–83.
  179. Roh JL, Ko JH, Moon SJ, Ryu CH, Choi JY, Koch WM. The p53-reactivating small-molecule RITA enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer Lett.* 2012;325(1):35–41.
  180. Burmakin M, Shi Y, Hedström E, Kogner P, Selivanova G. Dual targeting of wild-type and mutant p53 by small molecule RITA results in the inhibition of N-Myc and key survival oncogenes and kills neuroblastoma cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res.* 2013;19(18):5092–103.
  181. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget.* 2017;8(5):8921–46.
  182. Zhao CY, Grinkevich VV., Nikulenkov F, Bao W, Selivanova G. Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA. *Cell Cycle.* 2010;9(9):1847–55.
  183. Eldridge AG, O'Brien T. Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system. *Cell Death Differ.* 2010;17(1):4–13.
  184. Zhen T, Wu CF, Liu P, Wu HY, Zhou GB, Lu Y, et al. Targeting of AML1-ETO in t(8;21) leukemia by oridonin generates a tumor suppressor-like protein. *Sci Transl Med.* 2012;4(127).
  185. Huang H, Weng H, Zhou H, Qu L. Attacking c-Myc: targeted and combined therapies for cancer. *Curr Pharm Des.* 2014;20:6543–6554.
  186. Ding Y, Ding C, Ye N, Liu Z, Wold E, Chen H, et al. Discovery and development of natural product oridonin-inspired anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2016;122:102–117.
  187. Ikezoe T, Chen SS, Tong XJ, Heber D, Taguchi H, Koeffler HP. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells. *Int J Oncol.* 2003;23(4):1187–93.
  188. Weng H, Huang H, Dong B, Zhao P, Zhou H, Qu L. Inhibition of miR-

- 17 and miR-20a by oridonin triggers apoptosis and reverses chemoresistance by derepressing BIM-S. *Cancer Res.* 2014;74(16):4409–19.
189. Li CY, Wang Q, Shen S, Wei XL, Li GX. Oridonin inhibits migration, invasion, adhesion and TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells by inhibiting the activity of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *Oncol Lett.* 2018;15(1):1362–72.
190. McConkey D, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 2008;11(4–5):164–179.
191. Sanz G, Singh M, Peugot S, Selivanova G. Inhibition of p53 inhibitors: progress, challenges and perspectives. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(7):586–99.
192. Wang B, Shen ZL, Gao ZD, Zhao G, Wang CY, Yang Y, et al. MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway. *Cell Cycle.* 2015;14(7):1046–58.
193. Nie J, McGill MA, Dermer M, Dho SE, Wolting CD, McGlade CJ. LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* 2002;21(1–2):93–102.
194. De Lange J, Verlaan-De Vries M, Teunisse AFAS, Jochemsen AG. Chk2 mediates RITA-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2012;19(6):980–9.
195. Verhaegen M, Checinska A, Riblett M, Wang S, Soengas M. E2F1-Dependent Oncogenic Addiction of Melanoma Cells to MDM2. *Oncogene.* 2012;31(7):828–41.
196. Akhter R, Sanphui P, Biswas SC. The essential role of p53-up-regulated modulator of apoptosis (Puma) and its regulation by FoxO3a transcription factor in  $\beta$ -amyloid-induced neuron death. *J Biol Chem.* 2014;289(15):10812–22.
197. Pils D, Bachmayr-Heyda A, Auer K, Svoboda M, Auner V, Hager G, et al. Cyclin E1 (CCNE1) as independent positive prognostic factor in advanced stage serous ovarian cancer patients-A study of the OVCAD consortium. *Eur J Cancer.* 2014;50(1):99–110.
198. Bu H, Liu D, Cui J, Cai K, Shen F. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is involved in induction of apoptosis by oridonin in colon cancer COLO205 cells. *Transl Cancer Res.* 2019;8(5):1782–94.
199. Paluncic J, Kovacevic Z, Jansson PJ, Kalinowski D, Merlot AM,

- Huang MLH, et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(4):770–84.
200. Ji S, Qin Y, Shi S, Liu X, Hu H, Zhou H, et al. ERK kinase phosphorylates and destabilizes the tumor suppressor FBW7 in pancreatic cancer. *Cell Res.* 2015;25(5):561–73.

## PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI

### *Straipsniai disertacijos tema*

1. Kristina Bielskienė, Lida Bagdonienė, **Julija Mozūraitienė**, Birutė Kazbarienė, Ernestas Janulionis. E3 ubiquitin ligases as drug targets and prognostic biomarkers in melanoma. *Medicina*, 2015, 1 (51), 1–9.
2. **Julija Mozūraitienė**, Kristina Bielskienė, Vydmantas Atkočius, Danutė Labeikytė. Molecular alterations in signal pathways of melanoma and new personalized treatment strategies: Targeting of Notch. *Medicina*, 2015, 3 (51), 133–145.
3. Andrė Lideikaitė, **Julija Mozūraitienė**, Simona Rūta Letautienė. Analysis of prognostic factors for melanoma patients. *Acta Medica Lituanica*. 2017. Vol. 24. No. 1. P. 25–34.
4. **Julija Mozūraitienė**, Živilė Gudlevičienė, Ieva Vincerževskienė, Aida Laurinavičienė, Justinas Pamedys. A study of the expression of FBXW7 and MDM2 E3 ubiquitin ligases and their c-Myc and p53 substrates in patients with dysplastic nevus or melanoma. – Priimtas spausdinimui į žurnalą „Oncology Letters“ redakcijai.

### *Pranešimai mokslinėse konferencijose*

1. **Julija Mozūraitienė**, Vilius Vilčinskas, Lida Bagdonienė, Danutė Labeikytė, Kristina Bielskienė. „The evolution of melanoma treatment and new personalized treatment strategies: targeting of Notch“. Tarptautinė konferencija „Evoliucinė medicina: šiuolaikinių sveikatos problemų evoliuciniai mechanizmai ir dėsningumai“ („*Evolutionary medicine: pre-existing mechanisms and patterns of current health issues*“). Vilnius, 2016 (Elektroninis pranešimas).
2. **Julija Mozūraitienė**, Aistė Petrovaitė, Kristina Bielskienė, Živilė Gudlevičienė „Effect of FBW7 activator oridonin and MDM2 inhibitors nutlin-3/RITA on human melanoma cell lines.“ *Evolutionary medicine: health and diseases in changing environment*. Vilnius, 2018 (Elektroninis pranešimas).
3. **Julija Mozūraitienė**, Aistė Petrovaitė, Andrė Lideikaitė, Kristina Bielskienė, Živilė Gudlevičienė. „The expression of genes in FM 94 melanoma cell line after exposure with nutlin-3, RITA, oridonin and cisplatin“. EADV kongresas, Madridas, 2019 (Elektroninis pranešimas).



### *Tezės*

1. **Julija Mozūraitienė**, Vilius Vilčinskas, Lida Bagdonienė, Danutė Labeikytė, Kristina Bielskienė. The evolution of melanoma treatment and new personalized treatment strategies: targeting of notch. Tarptautinė konferencija „Evoliucinė medicina: šiuolaikinių sveikatos problemų evoliuciniai mechanizmai ir dėsningumai“. 2016. 06. Tezių abstraktų knyga.
2. Andrė Lideikaitė, **Julija Mozūraitienė**, Simona Rūta Letautienė. Prognostinių faktorių įtaka melanomos išgyvenamumui. Studentų mokslinės veiklos LXIX konferencija, 2017.05.18-05.26, Vilnius, Tezių abstraktų knyga, 199 psl.
3. Aurėja Bareikytė, Živilė Gudlevičienė, **Julija Mozūraitienė**, Kristina Bielskienė. Naujausias odos melanomos gydymas. Studentų mokslinės veiklos LXIX konferencija, 2017.05.18-05.26, Vilnius, Tezių abstraktų knyga, 373 psl.
4. **Julija Mozūraitienė**, Aistė Petrovaitė, Kristina Bielskienė, Živilė Gudlevičienė. „Effect of FBW7 activator oridonin and MDM2 inhibitors nutlin-3/RITA on human melanoma cell lines“. Acta Medica Lituanica. 2018. Vol. 25. P 67.

# PRIEDAI

## 1 priedas. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą



### VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt.

Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.

Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. mf@mf.vu.lt

### VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

## LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2016-12-13 Nr.158200-16-878-387

Tyrimo pavadinimas:

**E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose**

Protokolo Nr.:

II-2016-5

Versija:

4

Data:

2016-12-07

Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:

4

Versija:

Data:

2016-12-07

Pagrindinis tyrėjas:

**Kristina Bielskienė**

Įstaigos pavadinimas:

Nacionalinis Vėžio Institutas

Padalinio pavadinimas:

Mokslinių tyrimų centras

Adresas:

P. Baublio g. 3b, Vilnius

Įstaigos pavadinimas:

VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos

Padalinio pavadinimas:

Valstybinis patologijos centras

Adresas:

P. Baublio g. 5, Vilnius

Leidimas galioja iki:

**2020-12-31**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2016/12), vykusio 2016 m. gruodžio 13 d. sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	prof.dr. Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	taip
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	ne
4	Genovaitė Bulzgytė	slauga	taip
5	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	taip
6	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
7	Eglė Zubiene	psichologija	taip
8	prof. Saulius Vosylius	medicina	taip
9	Ugnė Šakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkė



Vilniaus regioninis  
biomedicininių  
tyrimų etikos  
komitetas

Laura Malinauskienė

## 2 priedas. Pažyma dėl leidimo atlikti asmens duomenų tvarkymo veiksmus



### VALSTYBINĖ DUOMENŲ APSAUGOS INSPEKCIJA

Nacionaliniam vėžio institutui  
(per E. pristatymo informacinę sistemą  
ir el. paštą: kristina.bielskiene@mvil.lt)

Pagr. tyrėja: gyd. K. Bielskienė

#### SPRENDIMAS DĖL LEIDIMO NACIONALINIAM VĖŽIO INSTITUTUI ATLIKTI ASMENS DUOMENŲ TVARKYMO VEIKSMUS

2017 m. vasario 13 d. Nr. 2R-997 (2.6-1.)  
Vilnius

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, išnagrinėjusi Nacionalinio vėžio instituto 2017-01-11 pateiktą Pranešimą dėl išankstinės patikros (toliau – Pranešimas) (Inspekcijoje gauta 2017-01-12, reg. Nr. 1R-296) ir 2017-02-07 raštu Nr. 3R-282 pateiktus Pranešimo patikslinimus (Inspekcijoje gauta 2017-02-07, reg. Nr. 1R-1037) dėl asmens duomenų tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo tikslu,

#### n u s t a t ė,

kad Pranešime ir jo patiksliniuose nurodyti asmens duomenų tvarkymo veiksmai atitinka Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatyme nustatytus asmens duomenų tvarkymo ir duomenų subjektų teisių įgyvendinimo reikalavimus bei numatytas tinkamas organizacines ir technines duomenų saugumo priemones.

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, vadovaudamasi Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 33 straipsniu, Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos direktoriaus 2016 m. birželio 22 d. įsakymu Nr. IT-23 patvirtintų Išankstinės patikros atlikimo taisyklių 12 ir 19.2 punktais,

#### n u s p r e n d ė i a

Nacionaliniam vėžio institutui išduoti leidimą atlikti Pranešime ir jo patiksliniuose nurodytų asmens duomenų apie sveikatą tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo „E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų melanomos pacientų ėminiuose“ (Protokolo Nr. II-2016-5) tikslu, veiksmus.

Šis sprendimas Administracinių bylų teisenos įstatymo nustatyta tvarka per vieną mėnesį nuo jo įteikimo dienos gali būti skundžiamas Vilniaus apygardos administraciniam teismui.

Direktorius



*Algirdas Kunčina*

dr. Algirdas Kunčina

D. Almaniėnė, tel. (8 5) 2197277, el. p. dovile.almaniene@ada.lt

Biudžetinė įstaiga  
A. Juozapavičiaus g. 6  
LT-09310 Vilnius

Tel. (8 5) 279 1445  
Faks. (8 5) 261 9494  
El. p. ada@ada.lt

Duomenys kaupiami ir saugomi  
Juridinių asmenų registre  
Kodas: 182607912

### 3 priedas. Pažymos dėl leidimo atlikti biomedicininį tyrimą papildymo



#### VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT- 01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt.  
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.  
Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. mf@mf.vu.lt

#### VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

Biomedicininio tyrimo .. E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose “  
2017-03- Nr. 158200-878-PP1-05  
pagrindinei tyrėjai *K.Bielskienei*

#### DĖL LEIDIMO Nr. 158200-16-878-387 PAPILDYMO Nr.1

#### PRITARIMAS

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas susipažino su jūsų prašymu leisti papildyti 2016-12-13 išduotą leidimą Nr. 158200-16-878-387.

Komiteto posėdžio, vykusio 2017-03-07 metu pritarta jūsų prašymui ir pritarta atliekant tyrimą:

1. vadovautis protokolo Nr. II-2016-5, versija Nr.5 (2017-02-14);
2. teikti tiriamiesiems IASF v.5 (2017-02-14).

Pirmininkas



Saulius Vosylus



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

---

**Biomedicininio tyrimo**

2018-12-04 Nr.158200-16-878-PP2-111

„E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose“

**pagrindinei tyrėjai Kristinai Bielskienei**

**Dėl leidimo Nr. 158200-16-878-387 papildymo Nr. 2**

**PRITARIMAS**

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas susipažino su Jūsų prašymu leisti keisti/papildyti biomedicininio tyrimo „E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose“, leidimą Nr. 158200-16-878-387, išduotą 2016-12-13 d.

Komiteto posėdžio, vykusio 2018 gruodžio 4 d. metu nutarta pritarti Jūsų prašymui:

1. Vadovautis atnaujintu protokolu (Nr. II-2016-5, versija Nr. 6, data 2018-10-18)
2. Vadovautis Informuoto asmens sutikimo forma dalyvauti NVI Biobanko veikloje (patvirtinta NVI direktoriaus 2017-06-27 įsakymu Nr.R8-368).

Pirmininkas



prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

---

Viešoji įstanga  
Universiteto g. 3  
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi  
Juridinių asmenų registre  
Kodas 211950810

Komiteto duomenys:  
M. K. Čiurlonio g. 21, LT-03101 Vilnius  
Tel. (8 5) 268 6998; el. p. rbtek@mf.vu.lt  
www.mf.vu.lt/content/vrbtek/naujienos

#### 4 priedas. **Asmens informavimo forma**

### **ASMENS INFORMAVIMO FORMA**

**I. Tyrimų centras:** Nacionalinis vėžio institutas (NVI)

**II. Tyrimų centras:** Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialas, Valstybinis patologijos centras

E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose II-2016-5 2017-02-14, 5 versija
---

Šio Asmens informavimo formos tikslas yra supažindinti Jus su tyrimu, kad galėtumėte nuspręsti, ar norite jame dalyvauti. Jei perskaičius šią Asmens informavimo formą, informacija, susijusi su atliekamu tyrimu, Jums bus neaiški ir Jūs turėsite papildomų klausimų, turite teisę kreiptis į tyrėją arba jo atstovą, kad suteiktų Jums visą norimą papildomą informaciją.

Kviečiame Jus sutikti dalyvauti moksliniame tyrime "E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose" ir duoti operacijos metu Jums pašalinto navikinio audinio mėginį, kuris liks po visų Jums atliktų reikalingų diagnostinių procedūrų (pvz. histologinis tyrimas – galutinei diagnozei nustatyti).

#### **Mokslinio tyrimo tikslas**

Melanoma – viena agresyviausių odos vėžio formų. Pastaraisiais metais pasaulyje taikomi nauji vaistai melanomos gydymui, kurie pradinio gydymo metu yra efektyvūs, tačiau pasižymi dideliu toksiškumu, greitai išsivysto atsparumas preparatams. Todėl aktualu ieškoti naujų gydymo galimybių. Pasaulyje suintensyvėjo domėjimasis E3 ligazių bei šių fermentų slopiklių panaudojimu vėžio gydymui. E3 ligazės – tai yra fermentai (baltymai), kurie reguliuoja kitų mūsų organizme esančių baltymų kiekį, aktyvumą bei degradaciją (sunaikinimą). Literatūros duomenimis, jau nustatyta, kad kai kurių šių ligazių (fermentų) kiekis melanomos ląstelėse mažėja melanomai progresuojant, o kitų kiekis, atvirkščiai, melanomai progresuojant – didėja. Šio tyrimo metu planuojame ištirti šių ligazių genus ir baltymus, kurių kiekis kinta progresuojant ligai. Tai galėtų būti naujos gydymo galimybės gydant melanomą bei nauji prognostiniai žymenys (rodikliai) ligos eigai numatyti.

Šis tyrimas atliekamas Nacionalinio vėžio instituto Mokslinių tyrimų centre ir Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filiale, Valstybiniame patologijos centre.

Šio biomedicininio tyrimo tikslas – nustatyti FBW7 ir MDM2 E3 ubikvitino ligazių vaidmenį vystantis melanomai ir pasiūlyti galimas naujas

gydymo galimybes. Atlikti pacientų stebėseną ir statistiškai įvertinti, ar yra ryšys tarp minėtų ligazių (fermentų) kiekio ir ligos eigos ir pacientų išgyvenamumo. Tyrimo metu bus nustatoma E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 raiška mRNR ir baltymų lygmenyje tiriant pacientų displastinių apgamų ir melanomos ėminius (navikinis audinys po operacinio pašalinimo).

**RNR** – tai ribonukleino rūgštis, kuri yra visų gyvų organizmų ląstelėse. RNR grandinėje yra užkoduota genetinė informacija. Mūsų organizmo ląstelės naudoja RNR (mRNR), kad programuoti (reguluoti) baltymų gamybą. **Baltymai** įeina į ląstelių ir audinių sudėtį, jų pagalba formuojami ląstelių ir audinių griaučiai, reguliuojama normali organizmo veikla, kovojama su infekcijomis, atliekamos sudėtingos cheminės reakcijos ir kita. Baltymų kiekis gali pasikeisti tam tikrų ligų metu, taip pat ir onkologinių. Nustatant baltymų kiekio pokyčius prie tam tikrų onkologinių ligų, galima prognozuoti ligos eigą, parinkti tinkamus vaistus gydymui. Pavyzdžiui, šio tyrimo metu mes pašalintame navike nustatysime tam tikro baltymo kiekį ir taip pat mRNR, kuri atsakinga būtent už šio baltymo gamybą, kiekį. Tokiu būdu gausime informaciją apie baltymų ir mRNR kiekį iš daugelio tokių pačių navikų (šiuo atveju, melanomos arba displastinio apgamo) ir galėsime padaryti išvadą, ar tam tikro baltymo arba mRNR kiekis įtakoja ligos atsiradimą ir progresavimą. Tokia informacija padės mokslininkams labiau suprasti procesus, kurie vyksta naviko ląstelėse, o ateityje ir kurti vaistus.

Beveik kiekvienas žmogus savo odoje turi nuo kelių iki kelių dešimčių apgamų. **Apgamai** tai nuo šviesiai iki tamsiai rudos spalvos dėmelės arba mazgeliai, išsidėstę įvairiose mūsų odos vietose. Paprastai tam tikram žmogui būdingi maždaug panašūs, vienodos spalvos ir formos apgamai. Apgamai gali būti įgimti, su kuriais gimstam, arba įgyti, kurie atsiranda vėliau. Apgamai laikomi gėrybiniais navikais. Tipinis gėrybinis apgamas – vienodos nuo rusvai rudos iki tamsiai rudos spalvos dėmelė arba mazgelis, jo kraštai lygūs, simetriški. **Displastinis apgamas** – tai pigmentinis apgamas su atipijos požymiais, jų kraštai gali būti nelygūs, forma nesimetriška, turi iškart dvi arba daugiau spalvų. Tokie apgamai yra pavojingi tuo, kad iš jų gali išsivystyti melanoma. **Melanoma** – tai agresyviausias ir pavojingiausias piktybinis odos navikas, todėl diagnozavus displastinį apgamą jį būtina pašalinti chirurginiu būdu, kad išvengtų melanomos atsiradimo rizikos. Melanomos pagrindinis gydymo būdas taip pat chirurginis, tačiau operuojama plačiau. Medikamentinis (chemoterapija) gydymas taikomas pažengus ligai, kai išplinta metastazės.

**Jei Jūs sutiksitate dalyvauti tyrime ir pasakysite TAIP**

Dalyvavimas tyrime yra savanoriškas. Tyrime kviečiami dalyvauti visi pacientai nuo 18 metų, kuriems NVI diagnozuota odos melanoma arba displastinis apgamas. Planuojama, kad tyrime dalyvaus apie 100 pacientų. Tyrimo trukmė 4 metai.

Visos su moksliniu tyrimu susijusios procedūros asmeniui bus atliekamos atvykus į NVI gauti reikalingas standartinio gydymo ar diagnostikos procedūras.

Prieš pradėdant gydymą, bus išsamiai ištirta Jūsų sveikatos būklė. Jums bus atlikti visi reikalingi tyrimai. Įprastai Jums paskirto operacinio gydymo metu bus pašalintas navikas (melanoma arba displastinis apgamas). Biopsinė arba pooperacinė medžiaga (navikas) bus tirama gydytojų patologų Valstybiniame patologijos centre įprastine tvarka. Jeigu galutinė patologinė diagnozė bus odos melanoma arba displastinis apgamas, likutinė šio darinio dalis, kuri bus nereikalinga Jūsų tyrimams, bus užšaldoma arba parafinizuota (įdėta į parafiną) ir perduodama tyrėjams mokslininkams į Mokslinių tyrimų centrą. Taip pat iš ligos istorijos bus patikslinta ir surinkta papildoma informacija apie Jūsų gydymą ir perduota tyrėjams. Patikslinta informacija gali būti apie Jūsų amžių, diagnozę, ligos istoriją, medikamentinį gydymą bei atsaką į skirtą gydymą.

Kai Jūsų mėginiai ir su jais susijusi papildoma klinikinė informacija bus perduota tyrėjams, mėginiai bus apdoroti, užšaldyti ir saugomi iki tyrimo pradžios. Informacija apie Jūsų mėginį ir ligos istoriją, neatskleidžiant jokių asmeninių duomenų, bus patalpinta tam skirtoje mokslinių tyrimų kompiuterinėje duomenų bazėje. Jūsų mėginiams bus tik suteiktas tam tikras identifikacinis numeris, neatskleidžiant jokios informacijos apie jus.

Vėliau, panaudojus specialius biocheminius diagnostinius metodus (tyrimus), iš Jūsų užšaldytos pooperacinės medžiagos (naviko), bus nustatyti tam tikri baltymai ir genai, kurie gali būti susiję su Jūsų ligos eiga.

### **Ar aš turėsiu kažkokios naudos atiduodamas savo audinius?**

Jei nuspręsite dalyvauti moksliniame tyrime, šis dalyvavimas gali būti naudingas Jums, nes šio tyrimo rezultatai padės mokslininkams tyrėjams ir sveikatos priežiūros specialistams geriau suprasti ir stebėti Jūsų ligos eigą, geriau ištirti šios ligos molekulinis procesus, prognozuoti tolimesnę ligos eigą. Taip pat šių rezultatų pagalba bus kuriamos ir vystomos pažangesnės melanomos diagnostikos, gydymo ir priežiūros strategijos.

### **Ar man bus mokama už tyrimą?**

Dalyvaudamas šiame projekte Jūs negausite jokio užmokesčio.

Šio tyrimo metu nėra jokių tikimybių, kad Jūs galėsite būti pažeistas fiziškai ar psichologiškai, nes Jūsų asmeninis dalyvavimas projekte yra minimalus.



### **Ar yra kokias nors rizikas man dalyvaujant šiame tyrime?**

Sutikdamas atiduoti savo pooperacinę medžiagą (odos navikas) moksliniams tyrimams Jūs niekuo nerizikuojate, jums nekyla jokios grėsmės dėl paskirto ar galimo skirti tolesnio Jūsų gydymo. Tyrimui yra paimami tik po operacijos likę biologiniai audiniai, kurių jau nebereikia ištyrimui. Taip pat mes neprašome Jūsų saugoti šių mėginių. Sutikdami dalyvauti šiame biomediciniame tyrime, Jūs sutinkate, kad po operacijos likę Jūsų audiniai bus užšaldomi ir saugomi Mokslinių tyrimų centre ir bus naudojami šio biomedicininio tyrimo tikslais.

### **Žalos, patirtos dalyvaujant tyrime, atlyginimas.**

Jeigu tyrimo metu Jums bus padaryta kokias nors žalos, žalos, susijusios su moksliniu tyrimu, atlyginimas bus kompensuotas LR įstatymuose ir teisės aktuose numatyta tvarka.

### **Jeigu aš nenoriu dalyvauti tyrime? Ar turiu kitą pasirinkimo galimybę?**

Jūsų apsisprendimas dalyvauti šiame tyrime yra laisvas, tik Jūsų asmeninis sprendimas leis mums įtraukti Jus į tyrimą. Atsisakymas dalyvauti šiame tyrime niekaip nepakeis numatyto ar jums jau paskirto gydymo ar ištyrimo taktikos.

### **Jeigu aš pakeisiu savo nuomonę ir norėsiu atsiimti savo mėginius?**

Jūs galite pasitraukti iš mokslinio tyrimo bet kuriuo metu, nerizikuodami Jūsų būsima medicinine priežiūra.

Jeigu Jūs pakeisite savo nuomonę ir nebenorėsite dalyvauti šiame tyrime, prašome susisiekti su pagrindiniu tyrėju ar kitais žemiau nurodytais asmenimis, pakvietusiais Jus dalyvauti tyrime, ir bet kokiu metu Jūs galėsite būti išbrauktas iš tyrimo. Jūsų mėginiai nebus renkami ir panaudojami tyrimui, nebus renkama jokia papildoma informacija apie Jūsų ligą, Jūsų mėginiai bus sunaikinti. Tačiau jeigu Jūs apsigalvosite nedalyvauti tyrime, kai jau su Jūsų mėginiais bus atlikti tyrimai ir mėginiai jau bus panaudoti, tuomet Jūsų mėginių sunaikinimas bus neįmanomas.

### **Ar mokslininkai tyrėjai žinos visą informaciją apie Jus, kas Jūs esate?**

Ne. Mokslininkai tyrėjai, kurie tyrinės Jūsų audinius, nežinos nei Jūsų vardo, nei pavardės. Jūs turite teisę į privatumą ir Jūsų privatumo teisė nebus pažeista. Visa su Jumis susijusi informacija bus laikoma konfidencialia ir nebus atskleidžiama, vadovaujantis galiojančiais įstatymais.

Jūsų naviko audiniai, medicininė informacija (ligos diagnozė, nustatymo data, taikytas gydymas, ligos eiga – duomenys iš Jūsų NVI medicininės kortelės) apie Jus bus užkoduota ir tyrėjams bus perduodamas tik suteiktas kodas. Tik Mokslinių tyrimų centras žinos ir saugos Jūsų asmeninę informaciją, kurios pagalba galima bus Jus identifikuoti (pvz., Jūsų vardas, pavardė, adresas,

telefono Nr.). Jūs turite teisę susipažinti su savo asmens duomenimis ir teisę reikalauti ištaisyti neteisingus, neišsamius, netikslius savo asmens duomenis. Pagrindinė tyrėja dr. Kristina Bielskienė ir gydytoja dermatologė-onkologė Julija Mozūraitienė saugos šią informaciją, kuri bus suderinta su Jums suteiktu identifikaciniu kodu. Kiti tyrimo dalyviai neturės prieigos prie Jūsų asmeninės informacijos.

Publikuojant mokslinius straipsnius, kuriuose gali būti skelbiami šio tyrimo rezultatai, Jūsų vardas ar pavardė niekur nebus atskleisti.

Pasirašydami šią sutikimo formą, Jūs sutinkate, kad gauti duomenys (informacija) būtų panaudojami mokslinių tyrimų tikslais, neatskleidžiant Jūsų tapatybės.

Tyrimo protokolai bus saugomi NVI dokumentų archyve, vadovaujantis kasmet tvirtinamais dokumentacijos planais. Bylų saugojimo terminai nurodomi vadovaujantis Lietuvos Respublikos dokumentų ir archyvų įstatymo ir Bendrųjų dokumentų saugojimo terminų rodykle.

Tyrimas baigiamas 2020.12 mėn., ir iš karto asmens duomenys bus sunaikinami. Duomenų valdytojo (NVI) patvirtintas rašytinis dokumentas, reglamentuojantis duomenų saugą - 2016 m. rugsėjo 6 d. NVI direktoriaus įsakymas Nr.R8-226 „Dėl Nacionalinio Vėžio Instituto informacinės sistemos nuostatų ir duomenų saugos nuostatų patvirtinimo“.

#### **Ar tyrėjai susisieks su manimi papildomai?**

Prieš tai nurodytų tyrimo centrų personalas gali papildomai su Jumis susisiekti ir paprašyti patikslinti kokios nors trūkstamos informacijos. Kiti tyrėjai neturės jokios galimybės su Jumis kontaktuoti.

#### **Ar aš gausiu informaciją apie tolesnį mano biologinių mėginių panaudojimą?**

Tyrimo rezultatai bus prieinami mokslininkams tyrėjams, šių duomenų analizė atneš platesnę naudą melanoma sergantiems pacientams. Jais remiantis bus kuriamos naujos vėžio diagnostikos ir gydymo strategijos ateities kartų onkologiniams ligoniams. Jūs turite teisę gauti informaciją apie Jūsų mėginio tyrimo rezultatus. Jei norėsite sužinoti apie Jūsų mėginio tyrimo rezultatus, prašome kreiptis į tyrėjas dr. Kristiną Bielskienę arba gydytoją Juliją Mozūraitienę (kontaktinė informacija nurodyta žemiau).

#### **Kas yra atsakingi asmenys už šį tyrimą?**

Šis tyrimas atliekamas Nacionaliniame vėžio institute ir Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filiale, Valstybiniame patologijos centre. Pagrindinė tyrėja Mokslinio tyrimo centro mokslo darbuotoja dr. Kristina Bielskienė, taip pat tyrėja gydytoja dermatovenerologė – onkologė Julija Mozūraitienė.

Iškylus bet kokiems klausimams, prašome kreiptis į jas. Tel. (8 5) 2190909, El. P. [kristina.bielskiene@nvi.lt](mailto:kristina.bielskiene@nvi.lt); [julija.mozuraitiene@nvi.lt](mailto:julija.mozuraitiene@nvi.lt).

**Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti šį tyrimą:** gautas 2016 Adresas: M.K. Čiurlionio 21/27, 228 kab., LT-03101, Vilnius, Tel./faksas: (8 5) 2686998, el. paštas: [rbtek@mf.vu.lt](mailto:rbtek@mf.vu.lt)

**Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimas duomenų valdytojui (NVI) atlikti asmens duomenų tvarkymą:** gautas 2016 Adresas: A. Juozapavičiaus g. 609310 Vilnius  
Tel. (8 5) 279 1445, Vieno langelio tel. (8 5) 271 2804, Faks. (8 5) 261 9494, El. p. [ada@ada.lt](mailto:ada@ada.lt)

## 5 priedas. **Informuoto asmens sutikimo forma**

### **INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA**

Pasirašydamas(-a) šią formą, Jūs patvirtinate, kad perskaitėte ir supratote Jums pateiktą Asmens informavimo formą ir savo noru sutinkate dalyvauti

E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose  
II-2016-5  
2017-02-14, 5 versija

Nacionalinio vėžio institute ir Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filiale, Valstybiniame patologijos centre vykdomame moksliniame tyrime „E3 ubikvitino ligazių FBW7 ir MDM2 bei jų substratų raiškos tyrimai displastinių apgamų ir melanomos pacientų ėminiuose“, kurio tikslas – nustatyti FBW7 ir MDM2 E3 ubikvitino ligazių vaidmenį vystantis melanomai ir pasiūlyti galimas naujas gydymo galimybes. Sutinkate, kad po operacijos likę Jūsų biologiniai audiniai būtų užšaldomi ir saugomi NVI Mokslinių tyrimų centre, tyrimo metu gauti duomenys apie onkologinę ligą, diagnostiką ir gydymą bus saugomi vadovaujantis Lietuvos respublikos Asmens duomenų apsaugos įstatymu, o paimti Jūsų biologiniai mėginiai ir klinikinė informacija bus panaudota atliekant mokslinį tyrimą. Jūsų asmeninė informacija (vardas, pavardė, asmens kodas, gyvenamoji vieta, kt.) nebus atskleista ir panaudota.

Pasirašydamas(-a) šią formą, Jūs patvirtinate, kad NVI personalas Jums paaiškino šios veiklos pobūdį, procedūras, naudą ir riziką, atsakė į visus Jūsų pateiktus klausimus.

Jūs supratote, kad galite pasitraukti iš mokslinio tyrimo bet kuriuo metu ir kad toks Jūsų veiksmas nepaveiks Jūsų tolesnio medicininio gydymo bei priežiūros.

Jūs gausite pasirašytą šios Informuoto asmens sutikimo formos kopiją.

Pasirašydamas(-a) šią formą, Jūs leidžiate naudoti gautus iš Jūsų mėginius ir su jais susijusią klinikinę informaciją neatskleidžiant Jūsų tapatybės.

Aš, žemiau pasirašęs, pareiškiu:

1. Sutinku, kad po operacijos likę mano biologiniai audiniai būtų užšaldomi ir saugomi NVI Mokslinių tyrimų centre.

Taip  Ne

2. Sutinku, kad po operacijos likę mano biologiniai audiniai būtų panaudoti moksliniam tyrimui:

Taip  Ne

3. Informaciją apie mano dalyvavimą moksliniame tyrime leidžiu suteikti:

---

*Vardas, pavardė (didžiosiomis spausdintinėmis raidėmis), tel. Nr.*

---

*Tyrimo dalyvio parašas data*

---

*Tyrimo dalyvio vardas, pavardė (didžiosiomis spausdintinėmis raidėmis)*

Aš, žemiau pasirašęs, išsamiai paaiškinau visą svarbią su moksliniu tyrimu susijusią informaciją aukščiau nurodytam tyrimo Dalyviui

---

*Sutikimą gaunančio gydytojo vardas, pavardė, parašas, spaudas, data*

*Kontaktiniai asmenys (informacijos pasiteiravimui):*

NVI Biobanko mokslo darbuotoja

Dr. Kristina Bielskienė

Tel.: 8(5)2190909

el. paštas: [kristina.bielskiene@nvi.lt](mailto:kristina.bielskiene@nvi.lt)

NVI Konsultacinės poliklinikos

Gydytoja dermatovenerologė – onkologė Julija Mozūraitienė, el. paštas:

[julija.mozuraitiene@nvi.lt](mailto:julija.mozuraitiene@nvi.lt)

## UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p.: [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 30 egz.