



ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τίτλος Πτυχιακής: Εφαρμογές της αλληλουχίας RNA ενός κυττάρου
στην ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων

Υποψήφιος: Ιωάννης Κωσταρελόπουλος Π2017186

Επιβλέπων: Αριστείδης Βραχάτης

ΚΕΡΚΥΡΑ ,2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένεια μου και τους καθηγητές μου οι οποίοι με βοήθησαν και στάθηκαν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια του ακαδημαϊκού μου ταξιδιού. Είμαι ευγνώμων για την καθοδήγηση και την υποστήριξη του καθηγητή μου Αριστείδη Βραχάτης, η οποία ήταν ανεκτίμητη στη διαμόρφωση της εκπαιδευτικής μου εμπειρίας και στην προετοιμασία μου για αυτή την εργασία. Είμαι υπερήφανος που υπήρξα μέλος αυτού του ιδρύματος και ανυπομονώ να χρησιμοποιήσω τις γνώσεις και τις δεξιότητες που απέκτησα για να έχω θετικό αντίκτυπο στον κόσμο.

Περιεχόμενα

Κατάλογος εικόνων	4
Περίληψη	5
Abstract.....	6
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	7
1.1 Σημασία της Μοριακής Βιολογίας στην Ανακάλυψη και Ανάπτυξη Φαρμάκων	7
1.2 Ιστορική Εξέλιξη των Τεχνολογιών Sequencing: Από DNA σε RNA.....	9
1.2.1 Αλληλούχιση DNA πρώτης γενιάς.....	9
1.2.2 Αλληλούχιση DNA δεύτερης γενιάς	11
1.2.3 Αλληλούχιση DNA τρίτης γενιάς	12
1.3 Σκοπός και Στόχοι της Πτυχιακής Εργασίας	14
Κεφάλαιο 2: Από το DNA Sequencing στην Single-Cell Τεχνολογία	16
2.1 Εξέλιξη του DNA Sequencing: Από τον Sanger μέχρι την Next-Generation Sequencing	16
2.2 Η Επανάσταση των Microarrays και η Μετάβαση στη RNA-Seq	18
2.2.1 Η Επανάσταση των Microarrays.....	18
2.2.2 Η Μετάβαση στη RNA- Sequencing	20
2.3 Η Ανάδυση της Single-Cell RNA Sequencing	28
Κεφάλαιο 3: Βασικές Αρχές και Τεχνολογίες Single-Cell	30
3.1 Τεχνολογίες και Πλατφόρμες της Single-Cell Ανάλυσης.....	30
3.1.1 Λειτουργικοποίηση επιφάνειας ενός κυττάρου	30
3.1.2 Ενδοκυτταρική ηλεκτροφυσιολογία	33
3.1.3 Απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων υψηλής απόδοσης	36
3.2 Μέθοδοι Δειγματοληψίας και Επεξεργασίας Κυττάρων	37
3.2.1 Πιπέτες.....	37
3.2.2 Nanostraws.....	39
Κεφάλαιο 4: Η Συνεισφορά της scRNA-seq στην Ανακάλυψη Φαρμάκων	41
4.1 Μελέτη Ετερογένειας των Κυττάρων και Εφαρμογές στην Ογκολογία	41
4.1.1 scRNA-seq και τυποποίηση ανοσοκυττάρων	41
4.2 Η σημασία της scRNA-seq στην Ανακάλυψη Νέων Στόχων για Θεραπείες	44
4.3 Σύνδεση μεταξύ Single-Cell Τεχνολογιών και Φαρμακογενομικής	45
Κεφάλαιο 5: Υπολογιστικές Μέθοδοι στον Σχεδιασμό Φαρμάκων	48
5.1 Εισαγωγή στις Υπολογιστικές Τεχνικές στην Βιομηχανία Φαρμάκων	48
5.2 Μοντελοποίηση και Προσομοίωση Δομής - Λειτουργίας Στόχων	49
5.2.1 Επιλογή ενός φαρμακευτικού στόχου	50

5.3 Η Χρήση Αλγορίθμων και Μηχανικής Μάθησης στην Πρόγνωση Φαρμακολογικής Δράσης	51
Συμπεράσματα.....	53

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1 Περιγράμματα δύο τύπων μαζικών βιβλιοθηκών RNAseq. Οι τύποι των βιβλιοθηκών υπαγορεύονται από τον στόχο του πειράματος: οι βιβλιοθήκες μονής σύντομης ανάγνωσης προορίζονται γενικά για τη διαφορική γονιδιακή έκφραση, ενώ οι ζευγαρωμένες βιβλιοθήκες μακράς ανάγνωσης προορίζονται για την ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης παραλλαγών και σημειακών μεταλλάξεων εκτός από την ανάλυση των γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά.....	21
Εικόνα 2 Ροή εργασίας της αλληλουχίας μεμονωμένων κυττάρων 10X genomics. Οι διαδικασίες περιλαμβάνουν επτά βασικά βήματα. Η κατασκευή της βιβλιοθήκης από τα βήματα 1 έως 5 διαρκεί 2 ημέρες. Για την αλληλούχιση χρησιμοποιούνται συνήθως κιτ Novaseq 100 cycle. Η αλληλούχιση ρυθμίζεται ως read1:28 κύκλοι για barcode κυττάρων & UMI, δείκτης i7: 8 κύκλοι για δείκτη δείγματος, ανάγνωση 2: 91 κύκλοι για ένθεμα (6). Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιούνται το Cell Ranger, το Loupe Browser και άλλα εμπορικά ή δημόσια διαθέσιμα λογισμικά (7).	25
Εικόνα 3 Περιγράμματα της χωρικής μεταγραφομικής 10X. Η ροή εργασίας μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια: στη συστοιχία και εκτός της συστοιχίας. Οι εργασίες στη συστοιχία αποτελούνται από την προετοιμασία του δείγματος, τη χρώση και την απεικόνιση, τη διαπερατότητα και τη σύνθεση cDNA (1-4). Οι εργασίες εκτός της συστοιχίας περιλαμβάνουν την κατασκευή βιβλιοθήκης, την αλληλούχιση και την ανάλυση δεδομένων (5-6). Οι ολικές βιβλιοθήκες μεταγραφώματος αλληλουχίζονται με τη χρήση κιτ Novaseq V1.5 100 κύκλων (ανάγνωση 1: 28 κύκλοι, δείκτης i7: 10 κύκλοι, δείκτης i5: 10, ανάγνωση 2: 90 κύκλοι). Τα δεδομένα αναλύονται και απεικονίζονται με τη χρήση των Space Ranger και Loupe Browser. Το Loupe Browser επιτρέπει την άμεση σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης με ιστολογικά δεδομένα	28
Εικόνα 4 Απεικόνιση των μεθόδων ανίχνευσης ενός κυττάρου	32
Εικόνα 5 Διαδικασία scRNA-seq με σταγονίδια.....	37
Εικόνα 6 Σχηματική απεικόνιση των τεχνολογιών κυτταρικής δειγματοληψίας με πιπέτα και της ανάλυσης κατάντη.	38
Εικόνα 7 Χρήση νανοαχύρου προσαρμοσμένη από τους Cao et al., 2019 και Seong et al., 2020.....	40
Εικόνα 8 scRNA-seq για την τυποποίηση ανοσοκυττάρων - Πλεονεκτήματα της τεχνολογίας scRNA-seq για την ταξινόμηση των T-κυττάρων που διεισδύουν στον όγκο και για την παροχή ενός λεπτομερούς τοπίου των συνολικών ανοσοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο.....	42

Περίληψη

Η εμφάνιση της αλληλούχισης RNA ενός κυττάρου (scRNA-seq) έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων, επιτρέποντας τη δημιουργία προφίλ μεμονωμένων κυττάρων υψηλής ανάλυσης. Η παρούσα διατριβή διερευνά τις εφαρμογές του scRNA-seq στην ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων, εστιάζοντας στο ρόλο του στη διαλεύκανση της κυτταρικής ετερογένειας, στον εντοπισμό νέων θεραπευτικών στόχων και στην προώθηση της φαρμακογονιδιοματικής. Το Κεφάλαιο 1 παρέχει μια εισαγωγή στη σημασία της μοριακής βιολογίας στην ανακάλυψη φαρμάκων και στην ιστορική εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχισης, που οδήγησε στην έλευση της αλληλούχισης RNA και στην επακόλουθη εμφάνιση του scRNA-seq. Περιγράφονται οι σκοποί και οι στόχοι της διατριβής. Το κεφάλαιο 2 παρακολουθεί την εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχισης DNA, από την αλληλούχιση Sanger στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς, και εξετάζει τη μετάβαση από την τεχνολογία μικροσυστοιχιών στην RNA-Seq, η οποία έθεσε τις βάσεις για την scRNA-seq. Το Κεφάλαιο 3 εμβαθύνει στις βασικές αρχές και τεχνολογίες της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των διαφόρων πλατφορμών για ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων, των μεθόδων δειγματοληψίας και επεξεργασίας κυττάρων και των τεχνικών για τη λειτουργικότητα της επιφάνειας μεμονωμένων κυττάρων και την ενδοκυτταρική ηλεκτροφυσιολογία. Το Κεφάλαιο 4 διερευνά τη συμβολή του scRNA-seq στην ανακάλυψη φαρμάκων, εστιάζοντας στις εφαρμογές του στη μελέτη της κυτταρικής ετερογένειας στην ογκολογία, στον εντοπισμό νέων θεραπευτικών στόχων και στις επιπτώσεις του στη φαρμακογονιδιοματική. Το Κεφάλαιο 5 εξετάζει τις υπολογιστικές μεθόδους στον σχεδιασμό φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της μοντελοποίησης και προσομοίωσης δομολειτουργικών στόχων και της χρήσης αλγορίθμων και μηχανικής μάθησης στην πρόβλεψη της φαρμακολογικής δράσης. Εν κατακλείδι, η παρούσα διατριβή αναδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο του scRNA-seq στην επανάσταση της ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων, ανοίγοντας το δρόμο για πιο στοχευμένες και εξατομικευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Abstract

The advent of single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) has revolutionised the field of drug discovery and development, enabling high-resolution profiling of individual cells. This thesis explores the applications of scRNA-seq in drug discovery and development, focusing on its role in elucidating cellular heterogeneity, identifying novel therapeutic targets and advancing pharmacogenomics. Chapter 1 provides an introduction to the importance of molecular biology in drug discovery and the historical development of sequencing technologies, leading to the advent of RNA sequencing and the subsequent emergence of scRNA-seq. The aims and objectives of the thesis are outlined. Chapter 2 traces the evolution of DNA sequencing technologies, from Sanger sequencing to next-generation sequencing, and discusses the transition from microarray technology to RNA-Seq, which set the stage for scRNA-seq. Chapter 3 delves into the fundamentals and technologies of single-cell analysis, including the various platforms for single-cell analysis, methods for sampling and processing cells, and techniques for single-cell surface functionalization and intracellular electrophysiology. Chapter 4 explores the contribution of scRNA-seq to drug discovery, focusing on its applications in the study of cellular heterogeneity in oncology, the identification of novel therapeutic targets and its implications for pharmacogenomics. Chapter 5 reviews computational methods in drug design, including the modelling and simulation of structure-functional targets and the use of algorithms and machine learning in the prediction of pharmacological action. In conclusion, this thesis highlights the pivotal role of scRNA-seq in the drug discovery and development revolution, paving the way for more targeted and personalized therapeutic interventions.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Σημασία της Μοριακής Βιολογίας στην Ανακάλυψη και Ανάπτυξη Φαρμάκων

Τις περισσότερες φορές, η ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου ξεκινά όταν οι βασικοί επιστήμονες ανακαλύπτουν έναν βιολογικό στόχο (π.χ. έναν υποδοχέα, ένα ένζυμο, μια πρωτεΐνη, ένα γονίδιο κ.λπ.) που εμπλέκεται σε μια βιολογική διαδικασία που θεωρείται ότι είναι δυσλειτουργική σε ασθενείς με μια ασθένεια όπως η νόσος του Alzheimer (NA). Τα καλύτερα φάρμακα που αποτελούν επαναληπτικές βελτιώσεις των υφιστάμενων φαρμάκων είναι πολύτιμα, καθώς μπορεί να προσφέρουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπάρχοντα φάρμακα όσον αφορά τη δραστηριότητα, την ασφάλεια, την ανεκτικότητα ή την ευκολία, αλλά συνήθως δεν περιλαμβάνουν τον χειρισμό βιολογικών στόχων διαφορετικών από εκείνους που επηρεάζονται άμεσα από τα υπάρχοντα φάρμακα (DiMasi et al., 2010).

Οι αναλύσεις σε όλους τους θεραπευτικούς τομείς δείχνουν ότι η ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου, από τον εντοπισμό του στόχου έως την έγκριση για κυκλοφορία, διαρκεί πάνω από 12 χρόνια και συχνά πολύ περισσότερο. Το κόστος για την ανάπτυξη μιας Νέας Μοριακής Οντότητας (NME- μια ένωση μικρού μορίου) ή μιας Νέας Βιολογικής Οντότητας (NBE- ένα αντίσωμα, μια πρωτεΐνη, μια γονιδιακή θεραπεία ή άλλο βιολογικό φάρμακο) είναι σίγουρα πάνω από 1 δισεκατομμύριο δολάρια και, κατά μέσο όρο, έχει εκτιμηθεί ότι είναι περίπου 2,6 δισεκατομμύρια δολάρια (DiMasi et al., 2016).

Ο Richard Feynman, κάτοχος του βραβείου Νόμπελ Φυσικής του 1965, δήλωσε κάποτε: Αν έπρεπε να αναφέρουμε την πιο ισχυρή υπόθεση από όλες, η οποία μας οδηγεί σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε τη ζωή, αυτή είναι ότι όλα τα πράγματα είναι φτιαγμένα από άτομα και ότι όλα όσα κάνουν τα έμβια όντα μπορούν να γίνουν κατανοητά με βάση το κούνημα και το κούνημα των ατόμων". Μεγάλο μέρος της βιοφυσικής των τελευταίων 50 ετών έχει αφιερωθεί στην καλύτερη κατανόηση της φύσης αυτού του ατομικού πηγαινέλα και κουνήματος. Οι κβαντομηχανικοί νόμοι που διέπουν τις κινήσεις στον μικροσκοπικό κόσμο είναι εκπληκτικά ξένοι για όσους είναι εξοικειωμένοι με τη μακροσκοπική δυναμική. Οι κινήσεις δεν διέπονται από

καθοριστικούς νόμους, αλλά από συναρτήσεις πιθανότητας- οι χημικοί δεσμοί δεν σχηματίζονται μηχανικά, αλλά από μετακινούμενα νέφη ηλεκτρονίων που είναι ταυτόχρονα κύματα και σωματίδια. Όπως το έθεσε εύγλωττα ο Feynman, αυτή είναι "η φύση όπως είναι - παράλογη" (Feynman, 1985).

Η κατανόηση αυτών των παράλογων μοριακών κινήσεων είναι αναμφίβολα σημαντική για την ανακάλυψη φαρμάκων. Η αρχική θεωρία "κλειδώματος και κλειδιού" για τη δέσμευση των συνδέσμων (Fischer, 1894), στην οποία ένας παγωμένος, ακίνητος υποδοχέας θεωρήθηκε ότι μπορεί να φιλοξενήσει ένα μικρό μόριο χωρίς να υποστεί καμία διαμορφωτική αναδιάταξη, έχει εγκαταλειφθεί σε μεγάλο βαθμό υπέρ μοντέλων δέσμευσης που λαμβάνουν υπόψη όχι μόνο τις διαμορφωτικές αλλαγές, αλλά και το τυχαίο κούνημα των υποδοχέων και των συνδέσμων (Teague, 2003).

Η σημασία της μοριακής βιολογίας στην ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων υπογραμμίζεται από την ανάγκη κατανόησης των δυναμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και συνδέσμων. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ("MD"), οι οποίες εισήχθησαν στα τέλη της δεκαετίας του 1970 (McCammon, Gelin, & Karplus, 1977), αναδεικνύονται ως μια κρίσιμη υπολογιστική τεχνική που αντιμετωπίζει τους περιορισμούς των πειραματικών μελετών. Οι προσομοιώσεις MD χρησιμοποιούν προσεγγίσεις της Νευτώνειας φυσικής για την προσομοίωση των ατομικών κινήσεων σε μεγάλα μοριακά συστήματα, μειώνοντας την υπολογιστική πολυπλοκότητα.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία ενός υπολογιστικού μοντέλου με βάση διάφορες πηγές δεδομένων, την εκτίμηση των δυνάμεων που δρουν στα άτομα με τη χρήση εξισώσεων και τη χρήση πεδίων δυνάμεων για την παραμετροποίηση των ενεργειακών όρων. Αυτά τα πεδία δυνάμεων, όπως τα AMBER (Wang et al., 2004), CHARMM (Brooks et al., 1983) και GROMOS (Christen et al., 2005), περιγράφουν τις ατομικές δυνάμεις που διέπουν τη MD.

Στην ανακάλυψη φαρμάκων, οι προσομοιώσεις MD προσφέρουν γνώσεις για τη δυναμική των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης συνδέσμων, δίνοντας έμφαση στη δυναμική φύση των αλληλεπιδράσεων. Οι MD βοηθούν στον εντοπισμό κρυφών και αλλοστερικών θέσεων πρόσδεσης που οι παραδοσιακές μέθοδοι μπορεί να μην εντοπίσουν (Grant et al., 2011). Το σχήμα χαλαρού συμπλέγματος βελτιώνει την εικονική διαλογή λαμβάνοντας υπόψη την ευελιξία του υποδοχέα (Amaro, Baron, & McCammon, 2008). Οι προηγμένοι υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας,

χρησιμοποιώντας αλχημικούς μετασχηματισμούς, παρέχουν ακριβέστερες προβλέψεις της συγγένειας πρόσδεσης, βοηθώντας τη βελτιστοποίηση των φαρμάκων.

Παρά τις επιτυχίες, οι προκλήσεις εξακολουθούν να υφίστανται, απαιτώντας συνεχείς εξελίξεις στα πεδία δυνάμεων, στη δειγματοληψία διαμόρφωσης και στην υπολογιστική αποτελεσματικότητα. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, με συνεχείς βελτιώσεις στην τεχνολογία και τους αλγορίθμους, είναι έτοιμες να διαδραματίσουν ολοένα και πιο ζωτικό ρόλο στη διαμόρφωση του μέλλοντος του σχεδιασμού φαρμάκων με τη βοήθεια υπολογιστή.

1.2 Ιστορική Εξέλιξη των Τεχνολογιών Sequencing: Από DNA σε RNA

1.2.1 Αλληλούχιση DNA πρώτης γενιάς

Η εμφάνιση της αλληλουχίας DNA πρώτης γενιάς σηματοδότησε μια μετασχηματιστική εποχή στη μοριακή βιολογία, η οποία ξεκίνησε από την πρωτοποριακή διαλεύκανση της τρισδιάστατης δομής του DNA από τους Watson και Crick το 1953. Ενώ αυτή η ανακάλυψη έθεσε τα εννοιολογικά θεμέλια για την κατανόηση της αντιγραφής του DNA και της κωδικοποίησης των πρωτεϊνών, η δυνατότητα αλληλουχίας του DNA άργησε να υλοποιηθεί. Οι αρχικές προσπάθειες αλληλούχισης επικεντρώθηκαν σε σχετικά καθαρά είδη RNA, όπως το μικροβιακό ριβοσωμικό ή το transfer RNA και οι μονόκλωνοι βακτηριοφάγοι RNA λόγω της απλότητας και του μικρότερου μήκους τους σε σύγκριση με το ευκαρυωτικό DNA.

Το 1965, ο Robert Holley και ο Fred Sanger πρωτοστάτησαν ανεξάρτητα στις τεχνικές αλληλούχισης για το RNA. Ο Holley και οι συνεργάτες του αλληλούχισαν το πρώτο ολόκληρο νουκλεϊκό οξύ, το tRNA αλανίνης από το *Saccharomyces cerevisiae*, συνδυάζοντας αναλυτική χημεία με επιλεκτικές επεξεργασίες ριβονουκλεάσης. Ταυτόχρονα, ο Sanger και οι συνεργάτες, (1965), του ανέπτυξαν μια μέθοδο βασισμένη σε ραδιοσημασμένα θραύσματα μερικής πέψης, συμβάλλοντας στην αλληλούχιση του ριβοσωμικού και του transfer RNA. Το εργαστήριο του Walter Fiers επέκτεινε αυτές τις τεχνικές για να παράγει την πρώτη πλήρη αλληλουχία γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες το 1972 και, τέσσερα χρόνια αργότερα, το πλήρες γονιδίωμα του βακτηριοφάγου MS2 (Fiers, 1976).

Καθώς οι ερευνητές μετατόπισαν την προσοχή τους στην αλληλούχιση του DNA, οι Ray Wu και Dale Kaiser, (1968), χρησιμοποίησαν την DNA πολυμεράση για να συμπληρώσουν τα 5' προεξέχοντα άκρα του βακτηριοφάγου λ με ραδιενεργά νουκλεοτίδια, πρωτοπορώντας στη χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων για την προετοιμασία της DNA πολυμεράσης. Αυτό επέτρεψε την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη σειρά των νουκλεοτιδίων πέρα από τα τελικά άκρα των γονιδιωμάτων των βακτηριοφάγων. Σημαντική ανακάλυψη ήρθε με την αντικατάσταση της δισδιάστατης κλασματοποίησης με ηλεκτροφόρηση μήκους πολυνουκλεοτιδίων με μονό διαχωρισμό μέσω πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου, παρέχοντας αυξημένη διαχωριστική ικανότητα.

Στα μέσα της δεκαετίας του 1970, ο Alan Coulson και ο Sanger εισήγαγαν το σύστημα "συν και πλην", χρησιμοποιώντας την πολυμεράση του DNA για τη σύνθεση από έναν εκκινητή και ενσωματώνοντας ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια. Η τεχνική αυτή, μαζί με την τεχνική χημικής διάσπασης των Allan Maxam και Walter Gilbert, επηρέασε σημαντικά την αλληλούχιση του DNA. Ο Sanger και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το σύστημα "συν και πλην" για την αλληλούχιση του πρώτου γονιδιώματος DNA, του βακτηριοφάγου φX174, ενώ η μέθοδος των Maxam και Gilbert, η οποία περιελάμβανε τη χημική διάσπαση ραδιοσημασμένου DNA, υιοθετήθηκε ευρέως, σηματοδοτώντας τη γέννηση της αλληλούχισης DNA πρώτης γενιάς (Sanger et al., 1973).

Καθοριστική εξέλιξη το 1977 ήταν η τεχνική "τερματισμού αλυσίδας" ή διδοξυτεμαχισμού του Sanger, με τη χρήση χημικών αναλόγων των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Τα διδοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) με έλλειψη της 3' υδροξυλομάδας σταμάτησαν την επέκταση της αλυσίδας του DNA. Αυτή η τεχνική, γνωστή ως αλληλούχιση Sanger, έγινε η κυρίαρχη μέθοδος για την αλληλούχιση του DNA για χρόνια λόγω της ακρίβειας, της στιβαρότητας και της ευκολίας χρήσης της (Sanger, 1977).

Ακολούθησαν πολυάριθμες βελτιώσεις, συμπεριλαμβανομένης της μετάβασης από τη ραδιοσήμανση στην ανίχνευση με φθορισμό και της ανάπτυξης όλο και πιο αυτοματοποιημένων μηχανημάτων αλληλούχισης DNA. Αυτά τα μηχανήματα παρήγαγαν αναγνώσματα μήκους λίγο μικρότερου από ένα χιλιόγραμμο βάσης, και για την ανάλυση μεγαλύτερων τμημάτων χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές όπως η "αλληλούχιση shotgun" και εξελίξεις στις τεχνολογίες PCR και ανασυνδυασμένου DNA. Το Πρόγραμμα για το Ανθρώπινο Γονιδίωμα επωφελήθηκε σημαντικά από αυτά τα τεχνολογικά βήματα, χρησιμοποιώντας νεότερα μηχανήματα αλληλούχισης

διδεοξυγόνου, όπως η σειρά ABI PRISM, για την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατοντάδων δειγμάτων (Smith, 1986).

Συνοψίζοντας, η αλληλούχιση DNA πρώτης γενιάς, που χαρακτηρίστηκε από το πρωτοποριακό έργο ερευνητών όπως ο Sanger, ο Holley και οι σύγχρονοί τους, έθεσε τις βάσεις για τις επόμενες γενιές τεχνολογιών αλληλούχισης και έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην επανάσταση της γονιδιωματικής, συμβάλλοντας τελικά στην ολοκλήρωση μνημειωδών έργων όπως το Human Genome Project.

1.2.2 Αλληλούχιση DNA δεύτερης γενιάς

Η δεύτερη γενιά της αλληλούχισης του DNA αποτέλεσε μια αλλαγή παραδείγματος στον τομέα, με καινοτομίες όπως η πυροακολουθία που επηρέασε σημαντικά το τοπίο. Ο Pål Nygård, (1985), και οι συνεργάτες του πρωτοστάτησαν στην πυροακολουθία, μια μέθοδο πραγματικού χρόνου που μετρούσε τη σύνθεση πυροφωσφορικών αλάτων. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιούσε μια διαδικασία δύο ενζύμων, όπου η σουλφουρυλάση ATP μετέτρεπε το πυροφωσφορικό σε ATP, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν ως υπόστρωμα για τη λουσιφεράση, παράγοντας φως ανάλογο με τα επίπεδα πυροφωσφορικού.

Η εταιρεία 454 Life Sciences, η οποία αργότερα εξαγοράστηκε από τη Roche, εμπορευματοποίησε με επιτυχία την τεχνολογία πυροαφαίρεσης, οδηγώντας στη δημιουργία των πρώτων μεγάλων εμπορικών μηχανημάτων αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS). Αυτά τα όργανα επέτρεψαν τη μαζική παραλληλοποίηση των αντιδράσεων αλληλούχισης, ενισχύοντας σημαντικά την απόδοση της αλληλούχισης. Η τεχνολογία περιελάμβανε την προσκόλληση DNA σε παραμαγνητικά σφαιρίδια, ακολουθούμενη από PCR γαλακτώματος και πυροαποσυντονισμό. Αυτή η καινοτομία επέτρεψε την ανάγνωση αναγνώσεων μήκους περίπου 400-500 ζευγών βάσεων (bp) (Margulies et al., 2005).

Κατά τα πρώτα χρόνια της αλληλούχισης δεύτερης γενιάς, η μέθοδος Solexa της Illumina αναδείχθηκε σε σημαντικό παίκτη. Χρησιμοποιούσε ενίσχυση γέφυρας σε κυψέλη ροής και αλληλούχιση με χρήση αναστρέψιμων τερματικών dNTPs. Τα μηχανήματα Genome Analyzer (GA) παρήγαγαν αρχικά μικρές αναγνώσεις, μήκους περίπου 35 bp, αλλά προσέφεραν δεδομένα ζευγαρωτού τέλους (Voelkerding, Dames, & Durtschi, 2009).

Μεταξύ του 2004 και του 2010, οι δυνατότητες αλληλούχησης διπλασιάζονταν κάθε πέντε μήνες, ξεπερνώντας την ταχεία ανάπτυξη που παρατηρήθηκε κατά την επανάσταση της πληροφορικής που περιγράφεται από το νόμο του Moore (Stein, 2010). Η επανάσταση της γονιδιωματικής, που τροφοδοτήθηκε από αυτές τις εξελίξεις, άλλαξε δραστικά το κόστος και την ευκολία που σχετίζεται με την αλληλούχηση του DNA.

Η πλατφόρμα αλληλούχησης της Illumina διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία της δεύτερης γενιάς αλληλουχιών DNA, επιτυγχάνοντας σχεδόν μονοπωλιακό καθεστώς (Greenleaf, Sidow, 2014). Ο Genome Analyzer (GAIIx) της εταιρείας, ακολουθούμενος από τα HiSeq και MiSeq, προσέφερε αυξημένο μήκος και βάθος ανάγνωσης, παρέχοντας στους ερευνητές ισχυρά εργαλεία για ποικίλα πειράματα (Quail, 2012).

Παρά την κυριαρχία της Illumina, εμφανίστηκαν και άλλες αξιοσημείωτες τεχνολογίες. Η Applied Biosystems εισήγαγε το σύστημα SOLiD, αλληλούχηση με σύνδεση και ανίχνευση ολιγονουκλεοτιδίων, με ανταγωνιστικά οφέλη κόστους ανά βάση (Glenn, 2011). Η τεχνική DNA nanoballs της Complete Genomic και η τεχνολογία αλληλούχησης μετά το φως της Ion Torrent, ένα άλλο προϊόν της Life Technologies, εισήγαγαν μοναδικές προσεγγίσεις στην αλληλούχηση.

Εν κατακλείδι, η δεύτερη γενιά αλληλούχησης DNA, η οποία χαρακτηρίστηκε από καινοτομίες όπως η πυροακολουθία και ο παραλληλισμός των αντιδράσεων, οδήγησε σε μια επανάσταση της γονιδιωματικής. Η πλατφόρμα αλληλούχησης της Illumina, και ιδίως τα μηχανήματα GA, έπαιξε κεντρικό ρόλο σε αυτή τη μεταμόρφωση, επιτυγχάνοντας αξιοσημείωτη επιτυχία. Ο ταχύς ρυθμός των εξελίξεων κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου αναδεικνύει τη δυναμική φύση των τεχνολογιών αλληλούχησης DNA.

1.2.3 Αλληλούχηση DNA τρίτης γενιάς

Η μετάβαση από την τεχνολογία αλληλούχησης DNA δεύτερης στην τρίτη γενιά αποτελεί αντικείμενο σημαντικής συζήτησης, με τις συζητήσεις να περιστρέφονται γύρω από καθοριστικά χαρακτηριστικά όπως η αλληλούχηση ενός μορίου (SMS), η αλληλούχηση σε πραγματικό χρόνο και η απόκλιση από τις προηγούμενες τεχνολογίες (Gut, 2013). Οι τεχνολογίες τρίτης γενιάς διακρίνονται από την ικανότητά τους να

αλληλουχούν μεμονωμένα μόρια, εξαλείφοντας την ανάγκη ενίσχυσης του DNA που ήταν εγγενής στις προηγούμενες μεθόδους.

Η Helicos BioSciences εισήγαγε την πρώτη τεχνολογία SMS, η οποία εμπορευματοποιήθηκε από την Helicos, λειτουργώντας παρόμοια με την Illumina αλλά χωρίς ενίσχυση γέφυρας. Αυτή η τεχνολογία επέτρεψε την αλληλούχιση μη ενισχυμένου DNA, ξεπερνώντας τις προκαταλήψεις και τα σφάλματα που συνδέονται με την ενίσχυση (Pareek, Smoczynski, Tretyn, 2011). Παρά την πτώχευση της Helicos το 2012 (GenomeWeb, 2012), άλλες εταιρείες συνέχισαν την ανάπτυξη της αλληλούχισης τρίτης γενιάς.

Επί του παρόντος, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία τρίτης γενιάς είναι η πλατφόρμα single molecule real-time (SMRT) της Pacific Biosciences (PacBio). Στις εκτελέσεις SMRT, ο πολυμερισμός του DNA λαμβάνει χώρα σε κυματοδηγούς μηδενικού τρόπου (ZMWs), μικροσκοπικές οπές σε ένα μεταλλικό φιλμ που καλύπτει ένα τσιπ. Ο φωτισμός μεμονωμένων μορίων φθοριοφόρου στον πυθμένα των ZMWs επιτρέπει την παρακολούθηση της επέκτασης της αλυσίδας DNA σε πραγματικό χρόνο. Οι μηχανές PacBio προσφέρουν μοναδικά πλεονεκτήματα, παράγοντας κινητικά δεδομένα για την ανίχνευση τροποποιημένων βάσεων και παράγοντας εξαιρετικά μεγάλες αναγνώσεις, που ξεπερνούν τα 10 kb (van Dijk et al., 2014).

Η αλληλούχιση νανοπόρων αποτελεί έναν ιδιαίτερα αναμενόμενο τομέα για την ανάπτυξη τρίτης γενιάς. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την οδήγηση μονόκλωνου RNA ή DNA μέσω νανοπόρων, όπου το ρεύμα μειώνεται αναλογικά με το μήκος του νουκλεϊκού οξέος. Η Oxford Nanopore Technologies (ONT) υπήρξε πρωτοπόρος σε αυτόν τον τομέα, παρουσιάζοντας αλληλουχιστές νανοπόρων όπως το GridION και το MinION (Eisenstein, 2012). Παρά τις αρχικές ανησυχίες σχετικά με την ποιότητα των δεδομένων, οι εν λόγω αλληλουχιστές αποδείχθηκαν ανατρεπτικοί, προσφέροντας δεδομένα μη ενισχυμένης αλληλουχίας με σημαντικά χαμηλότερο κόστος και ταχύτερο ρυθμό. Το MinION, μια μικρή συσκευή μεγέθους USB, έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία αλληλουχιών αναφοράς βακτηριακού γονιδιώματος, στοχευμένων αμπλικονίων και ικριωμάτων για τη χαρτογράφηση αναγνώσεων Illumina (Loman, Quick, Simpson, 2015). Η ευελιξία των αλληλουχιών νανοπόρων επεκτείνεται στην αποκεντρωμένη και επιτόπια αλληλούχιση, όπως αποδείχθηκε από την ταχεία αλληλούχιση των ιών του Έμπολα στη Γουινέα (Hayden, 2015).

Συμπερασματικά, οι τεχνολογίες αλληλούχισης DNA τρίτης γενιάς, που χαρακτηρίζονται από αλληλούχιση ενός μορίου και απουσία ενίσχυσης του DNA, έχουν σημειώσει σημαντικά βήματα προόδου. Η πλατφόρμα SMRT της PacBio παρέχει μεγάλες αναγνώσεις και κινητικά δεδομένα, ενώ η αλληλούχιση νανοπόρων, ιδίως μέσω του MinION της ONT, προσφέρει ανατρεπτικές δυνατότητες, φέρνοντας επανάσταση στη σύνθεση δεδομένων, στις τοποθεσίες παραγωγής και στα σενάρια ανάπτυξης. Αυτές οι εξελίξεις υπογραμμίζουν το εξελισσόμενο τοπίο των τεχνολογιών αλληλούχισης DNA, ανοίγοντας νέες δυνατότητες για την έρευνα και τις εφαρμογές της γονιδιωματικής.

1.3 Σκοπός και Στόχοι της Πτυχιακής Εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να διερευνήσει και να παρουσιάσει τον μετασχηματιστικό αντίκτυπο των τεχνολογιών ενός κυττάρου, ιδίως των μεθόδων αλληλούχισης RNA ενός κυττάρου (scRNA-seq), σε διάφορα στάδια της διαδικασίας ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων. Η ανάθεση έχει ως στόχο να προβάλει τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι τεχνολογίες ενισχύουν τον εντοπισμό στόχων, τον έλεγχο λειτουργικής γονιδιωματικής, την επιλογή προκλινικών μοντέλων και παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης των φαρμάκων. Επιπλέον, στοχεύει να παρουσιάσει την εφαρμογή του scRNA-seq στην κλινική ανάπτυξη, ιδίως στην ενημέρωση για τη λήψη αποφάσεων μέσω της βελτιωμένης ταυτοποίησης βιοδεικτών για τη στρωματοποίηση των ασθενών και την ακριβή παρακολούθηση της ανταπόκρισης στα φάρμακα και της εξέλιξης της νόσου.

Στόχοι:

1. Εξέταση της αναποτελεσματικότητας στην ανακάλυψη φαρμάκων: Η εργασία αποσκοπεί στη διεξαγωγή μιας έρευνας σχετικά με την αναποτελεσματικότητα της διαδικασίας ανακάλυψης φαρμάκων, η οποία περιλαμβάνει κλιμακούμενο κόστος, παρατεταμένα χρονοδιαγράμματα και αυξημένα ποσοστά φθοράς. Οι προκλήσεις αυτές αποδίδονται στην περιορισμένη κατανόηση της ανθρώπινης βιολογίας και των μηχανισμών που σχετίζονται με ασθένειες.
2. Η ανάδειξη των περιορισμών των παραδοσιακών προσεγγίσεων: Στόχος είναι να διασαφηνιστούν τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με τις συμβατικές τεχνικές μαζικής ανάλυσης, όπως οι μικροσυστοιχίες, η αλληλουχία RNA μαζικής ανάλυσης και η

ποσοτική PCR με αντίστροφη μεταγραφή, στην αξιολόγηση των χαρακτηριστικών των κυττάρων και των ιστών. Αυτό συνεπάγεται ιδιαίτερη έμφαση στην αδυναμία τους να διακρίνουν σήματα από ετερογενείς υποπληθυσμούς ή σπάνιους τύπους κυττάρων.

3. Εισαγωγή στις τεχνολογίες μεμονωμένων κυττάρων: Η εργασία αποσκοπεί στην εισαγωγή και τη συζήτηση σχετικά με την εμφάνιση των τεχνολογιών μεμονωμένων κυττάρων κατά την τελευταία δεκαετία ως βιώσιμη λύση στους περιορισμούς των μαζικών τεχνικών. Υπογραμμίζει τον συμπληρωματικό χαρακτήρα των τεχνολογιών μονού κυττάρου σε σχέση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις και τις δυνατότητές τους να προσφέρουν γνώσεις σε επίπεδο ενός κυττάρου.

4. Έμφαση στις προόδους της scRNA-seq: Ο στόχος περιλαμβάνει την ανάδειξη των σημαντικών εξελίξεων που παρατηρούνται στην αλληλούχηση RNA ενός κυττάρου (scRNA-seq) από την έναρξή της το 2009, ιδίως της ικανότητάς της για τη σκιαγράφηση ολόκληρου του μεταγραφικού προφίλ από ένα μόνο κύτταρο. Η εργασία απεικονίζει τον τρόπο με τον οποίο το scRNA-seq εφαρμόζεται ενεργά στη φαρμακευτική βιομηχανία για την αντιμετώπιση καίριων ερωτημάτων στην ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων.

5. Εξερεύνηση των εφαρμογών σε όλη τη διαδρομή ανακάλυψης φαρμάκων: Η εργασία επιδιώκει να απεικονίσει και να διερευνήσει τις εφαρμογές των τεχνολογιών ενός κυττάρου, κυρίως των μεθόδων scRNA-seq, σε διάφορα στάδια της διαδρομής ανακάλυψης φαρμάκων. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στον ρόλο τους στην ταυτοποίηση στόχων, στον έλεγχο λειτουργικής γονιδιωματικής, στην επιλογή προκλινικών μοντέλων και στην απόκτηση γνώσεων σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης των φαρμάκων.

6. Συζήτηση υπολογιστικών εργαλείων και μεθόδων: Στόχος είναι να διεξαχθεί συζήτηση σχετικά με την ταχεία ανάπτυξη κλιμακούμενων μεθόδων που βασίζονται σε πλάκες και μικρορευστομηχανές, μαζί με υπολογιστικά εργαλεία και μεθόδους. Η συζήτηση αυτή υποστηρίζει την ανάλυση δεδομένων ενός κυττάρου, παρουσιάζοντας τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι εξελίξεις συμβάλλουν στη βελτίωση της κατανόησης της βιολογίας και της φαρμακολογίας των ασθενειών.

7. Εξέταση των προκλήσεων και των μελλοντικών κατευθύνσεων: Η εργασία αποσκοπεί στην κριτική εξέταση των συνεχιζόμενων προκλήσεων που σχετίζονται με τον σχεδιασμό της μελέτης και την προσβασιμότητα των δεδομένων κατά την εφαρμογή των τεχνολογιών μονού κυττάρου στην ανακάλυψη και την ανάπτυξη

φαρμάκων. Επιπλέον, προσπαθεί να προτείνει πιθανές μελλοντικές κατευθύνσεις για την αξιοποίηση των μονοκυτταρικών τεχνικών στη φαρμακευτική βιομηχανία.

Κεφάλαιο 2: Από το DNA Sequencing στην Single-Cell Τεχνολογία

2.1 Εξέλιξη του DNA Sequencing: Από τον Sanger μέχρι την Next-Generation Sequencing

Η απαρχή της αλληλούχησης του DNA μπορεί να αναχθεί στο πρωτοποριακό έργο επιστημόνων όπως ο Robert Holley και ο Fred Sanger στις δεκαετίες του 1960 και 1970. Η μέθοδος τερματισμού αλυσίδας του Sanger, γνωστή και ως αλληλούχηση Sanger, έθεσε τα θεμέλια για την αλληλούχηση DNA όπως την ξέρουμε σήμερα. Η μέθοδος αυτή περιελάμβανε την ενσωμάτωση αλυσοτερματιδίων dideoxynucleotides (ddNTPs) κατά τη σύνθεση του DNA, με αποτέλεσμα την παραγωγή θραυσμάτων DNA διαφορετικού μήκους, τα οποία μπορούσαν να διαχωριστούν και να αναλυθούν για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Η αλληλούχηση Sanger προσέφερε απaráμιλλη ακρίβεια και αποτέλεσε το χρυσό πρότυπο για την αλληλούχηση του DNA για αρκετές δεκαετίες. Ωστόσο, ήταν μια επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία, που συχνά απαιτούσε χειροκίνητη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και αυτοραδιογραφία για την ανάλυση των θραυσμάτων (Men et al., 2008).

Η εμφάνιση των τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) στη δεκαετία του 2000 έφερε επανάσταση στον τομέα της γονιδιωματικής. Οι πλατφόρμες NGS επέτρεψαν τη μαζικά παράλληλη αλληλούχηση τμημάτων DNA, αυξάνοντας σημαντικά την απόδοση και μειώνοντας το χρόνο και το κόστος που σχετίζονται με την αλληλούχηση. Μία από τις πιο ευρέως υιοθετημένες πλατφόρμες NGS είναι η αλληλούχηση Illumina, η οποία χρησιμοποιεί χημεία αναστρέψιμου τερματισμού και ενίσχυση στερεάς φάσης για τη δημιουργία εκατομμυρίων σύντομων αναγνώσεων αλληλούχησης με εξαιρετικά παράλληλο τρόπο. Άλλες τεχνολογίες NGS, όπως η πυροακολουθία 454, η SOLiD αλληλούχηση και η αλληλούχηση Ion Torrent, προσέφεραν εναλλακτικές χημείες και προσεγγίσεις αλληλούχησης, διαφοροποιώντας περαιτέρω το τοπίο της αλληλούχησης (Shendure et al., 2017).

Οι τεχνολογίες NGS διευκόλυναν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος, της στοχευμένης αλληλούχησης, της αλληλούχησης RNA (RNA-Seq) και της επιγενετικής σκιαγράφησης. Αυτές οι εξελίξεις επιτάχυναν τη γονιδιωματική έρευνα και επέτρεψαν τη μελέτη πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών με πρωτοφανή ανάλυση (Ansorge, 2009).

Το τελευταίο σύνορο στην αλληλούχηση DNA αντιπροσωπεύουν οι τεχνολογίες αλληλούχησης τρίτης γενιάς, οι οποίες στοχεύουν να ξεπεράσουν τους περιορισμούς των μεθόδων NGS, όπως τα μικρά μήκη ανάγνωσης και η ανάγκη ενίσχυσης του DNA. Οι πλατφόρμες αλληλούχησης τρίτης γενιάς επιτρέπουν την άμεση αλληλούχηση μεμονωμένων μορίων DNA, προσφέροντας δυνατότητες ανάγνωσης μεγάλου μήκους και αλληλούχησης σε πραγματικό χρόνο (Mardis, 2008).

Πλατφόρμες όπως η αλληλούχιση SMRT της Pacific Biosciences και η αλληλούχιση nanopore της Oxford Nanopore Technologies χρησιμοποιούν καινοτόμες προσεγγίσεις για την αλληλούχιση μορίων DNA σε επίπεδο ενός μορίου. Η αλληλούχιση SMRT χρησιμοποιεί συστοιχίες κυματοδηγών μηδενικού τρόπου (ZMW) και νουκλεοτίδια σημασμένα με φθορισμό για την παρακολούθηση του πολυμερισμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας μακροχρόνιες αναγνώσεις και ανίχνευση τροποποιήσεων βάσεων. Από την άλλη πλευρά, η αλληλούχιση με νανοπόρους χρησιμοποιεί βιολογικούς ή στερεάς κατάστασης νανοπόρους για τη μέτρηση των μεταβολών του ιοντικού ρεύματος καθώς τα μόρια DNA διέρχονται από το νανοπόρο, επιτρέποντας την ταυτοποίηση βάσεων χωρίς την ανάγκη ενίσχυσης ή επισήμανσης. Αυτή η τεχνολογία έχει τη δυνατότητα να φέρει επανάσταση στην αλληλούχιση του DNA με τη φορητότητα, τις μεγάλες αναγνώσεις και τις δυνατότητες αλληλούχισης σε πραγματικό χρόνο (Shendure et al., 2017).

Συνολικά, η εξέλιξη της τεχνολογίας αλληλούχισης DNA από την αλληλούχιση Sanger έως την αλληλούχιση τρίτης γενιάς χαρακτηρίζεται από συνεχή καινοτομία και τεχνολογικές εξελίξεις. Κάθε γενιά τεχνολογίας αλληλούχισης έχει επεκτείνει το πεδίο εφαρμογής και τις δυνατότητες της γονιδιωματικής έρευνας, οδηγώντας σε ανακαλύψεις σε τομείς όπως η γενετική, η μοριακή βιολογία και η εξατομικευμένη ιατρική.

2.2 Η Επανάσταση των Microarrays και η Μετάβαση στη RNA-Seq

2.2.1 Η Επανάσταση των Microarrays

Η έλευση της τεχνολογίας microarray διευκόλυνε τη μετάβαση από τη χαμηλή στην υψηλή απόδοση στην ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, επιτρέποντας στους ερευνητές να εξετάζουν χιλιάδες γονίδια ταυτόχρονα, κάτι που ήταν προηγουμένως αδιανόητο. Αυτή η πρόοδος επέτρεψε έρευνες σε κλίμακα που προηγουμένως ήταν ανέφικτη, μεταβαίνοντας από το επίπονο έργο της μέτρησης των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης ένα προς ένα στην αποτελεσματική αξιολόγηση πολλαπλών γονιδίων παράλληλα. Η μελέτη-ορόσημο που έδειξε ότι το DNA μπορεί να μετατραπεί σε microarrays δημοσιεύθηκε το 1991 από τον Stephen Fodor και τους συναδέλφους του στο Affymax Research Institute. Έδειξαν ότι ένα ποικίλο σύνολο ολιγονουκλεοτιδίων θα μπορούσε να συντεθεί χημικά σε μια γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μέσω φωτολιθογραφίας,

μιας διαδικασίας που χρησιμοποιεί ακριβώς στοχευμένες δέσμες φωτός για να κατευθύνει χημικές αντιδράσεις σε συγκεκριμένα σημεία. Αυτό επιτρέπει τη σμίκρυνση, επειδή η πυκνότητα των σημείων περιορίζεται μόνο από τη διάθλαση του φωτός.

Μια εργασία που δημοσιεύθηκε το 1995 από τον Patrick Brown και τους συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο του Στάνφορντ επέστησε την προσοχή στις συναρπαστικές δυνατότητες της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών. Χρησιμοποίησαν μια microarray από 45 συμπληρωματικά DNA του *Arabidopsis* στα οποία υβριδοποίησαν φθορίζοντος σημασμένο ολικό κυτταρικό αγγελιοφόρο RNA (mRNA). Η ένταση του φθορισμού σε ένα σημείο αντανakλούσε την ποσότητα του υβριδοποιημένου mRNA, η οποία με τη σειρά της αντανakλούσε το επίπεδο του συγκεκριμένου mRNA στο αρχικό δείγμα. Η εργασία αυτή έδειξε για πρώτη φορά ότι η έκφραση πολλών γονιδίων σε ένα μικρό δείγμα μπορούσε να παρακολουθείται ποσοτικά παράλληλα.

Η δημιουργία προφίλ έκφρασης με βάση microarray έχει χρήσιμες εφαρμογές στην ιατρική έρευνα, καθώς αποκαλύπτει μοριακά πορτρέτα της γονιδιακής έκφρασης σε καταστάσεις ασθενειών. Ωστόσο, η χρησιμότητα των microarray δεν περιορίζεται στη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης. Μόλις καθιερώθηκε η τεχνολογία, οι ερευνητές άρχισαν να χρησιμοποιούν microarray για τη μέτρηση άλλων σημαντικών βιολογικών φαινομένων. Για παράδειγμα, τα microarray χρησιμοποιούνται για τον γονότυπο πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου με υβριδοποίηση του DNA ατόμων σε συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά πολυμορφικά αλληλόμορφα. Μια εφαρμογή που ονομάζεται συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός συστοιχιών χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γονιδιωματικών δομικών παραλλαγών, όπως τμήματα του γονιδιώματος που έχουν διαφορετικό αριθμό αντιγράφων σε διαφορετικά άτομα- αυτό επιτυγχάνεται με υβριδισμό του συνολικού γονιδιωματικού DNA σε συστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων που αντιπροσωπεύουν τμήματα DNA κατανεμημένα ομοιόμορφα σε όλο το γονιδίωμα. Τα επιγενετικά σημάδια που σχετίζονται με ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος, όπως οι τροποποιήσεις της χρωματίνης, σκιαγραφούνται με τη χρήση μικροσυστοιχιών σε μια εφαρμογή που ονομάζεται ChIP-chip (Hoheisel, 2006).

Η τεχνολογία microarray έχει εξελιχθεί από μια πρωτοποριακή μέθοδο που εφαρμόστηκε από καινοτόμους στην αιχμή του δόρατος σε μια πανταχού παρούσα τεχνική που επέτρεψε στους ερευνητές να διερευνήσουν "μεγάλα" ερωτήματα στη βιολογία. Αυτή η μικροσκοπική τεχνολογία έχει επιφέρει μια σημαντική επανάσταση.

2.2.2 Η Μετάβαση στη RNA- Sequencing

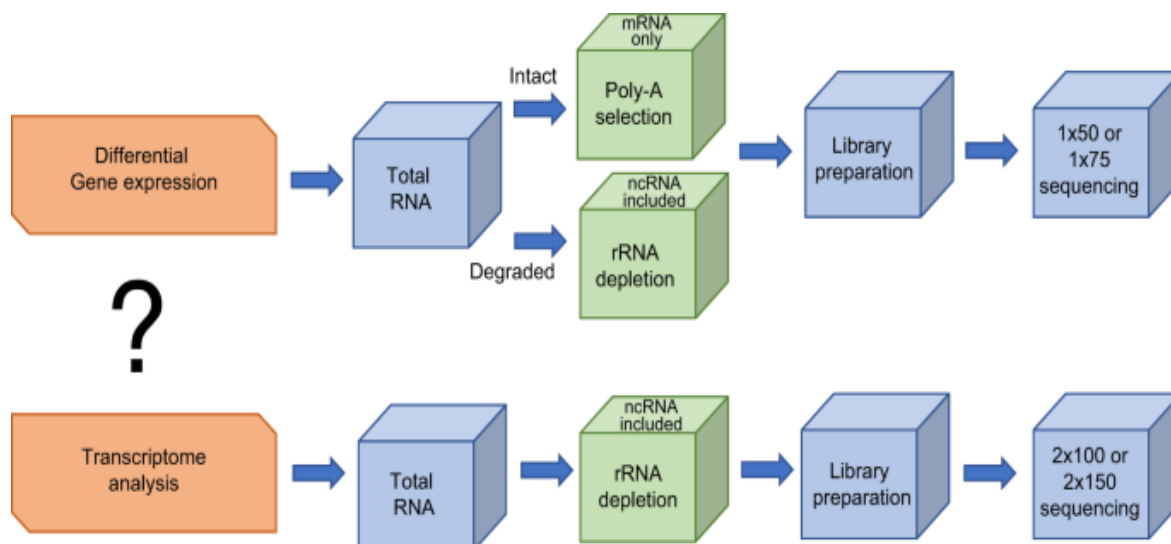
Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) έχει πολλαπλές μορφές και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Η μεταγραφή και η σταθερότητα του RNA ρυθμίζονται στενά σε απόκριση σε φυσιολογικά και παθολογικά ερεθίσματα (Emrich et al., 2007). Η μη φυσιολογική έκφραση του RNA συνδέεται συχνά με την έναρξη, την ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση του καρκίνου στον άνθρωπο. Εκτός από τη μετάλλαξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ογκογονιδίων, η γονιδιακή έκφραση θα μπορούσε να υπερδραστηριοποιηθεί ή να αποσιωπηθεί επιγενετικά, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η ανώμαλη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής ανάπτυξης ή/και μεταγραφικών παραγόντων θα μπορούσε να οδηγήσει σε υψηλό επίπεδο έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Διαφορετικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης μπορεί να αντανακλούν διαφορετικούς υποτύπους καρκίνου, το στάδιο ανάπτυξης του καρκίνου ή το μικροπεριβάλλον του όγκου (Stark, Grzelak, & Hadfield, 2019). Ως εκ τούτου, η RNAseq είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ανάπτυξης του καρκίνου και την ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου.

Bulk RNAseq

Από τότε που η πρώτη βιβλιοθήκη EST αλληλουχήθηκε με τη χρήση του αλληλουχέα 454 της Roche το 2007, το bulk RNAseq έχει γίνει το πιο πολύτιμο και εκτενώς χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου. Οι ποικίλες μεταφραστικές ερευνητικές και δυνητικές κλινικές εφαρμογές του έχουν επισκοπηθεί επαρκώς στο παρελθόν (Ozsolak, & Milos, 2011).

Με βάση τα είδη RNA, η μαζική RNAseq περιλαμβάνει την αλληλούχιση δύο τύπων βιβλιοθηκών: βιβλιοθήκη μόνο mRNA και βιβλιοθήκη ολόκληρου του μεταγραφώματος που περιλαμβάνει όλα τα είδη RNA εκτός από το rRNA. Ανά τύπο αλληλούχισης, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μαζική RNAseq είναι μια σύντομη αλληλούχιση ενός άκρου που επικεντρώνεται σε διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Αυτός ο τύπος αλληλούχισης είναι απλός και οικονομικά αποδοτικός και επικεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό μόνο στο mRNA. Ο λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενος τύπος είναι η αλληλούχιση μακρύτερης αλληλουχίας με ζεύγη άκρων που αποσκοπεί σε πρόσθετη γνώση σχετικά με την εναλλακτική ωρίμανση, τις

σημειακές μεταλλάξεις, τα νέα μεταγράμματα, τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA και τις γονιδιακές συγχωνεύσεις. Αυτός ο τύπος μαζικής RNAseq αλληλουχεί συνήθως βιβλιοθήκες με rRNA που έχουν αφαιρεθεί για πιο ολοκληρωμένες πληροφορίες (Εικ. 1).



Εικόνα 1 Περιγράμματα δύο τύπων μαζικών βιβλιοθηκών RNAseq. Οι τύποι των βιβλιοθηκών υπαγορεύονται από τον στόχο του πειράματος: οι βιβλιοθήκες μονής σύντομης ανάγνωσης προορίζονται γενικά για τη διαφορική γονιδιακή έκφραση, ενώ οι ζευγαρωμένες βιβλιοθήκες μακράς ανάγνωσης προορίζονται για την ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης παραλλαγών και σημειακών μεταλλάξεων εκτός από την ανάλυση των γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά.

Η Bulk RNAseq έχει ευρεία χρησιμότητα στην ταξινόμηση του καρκίνου, στην ανακάλυψη βιοδεικτών και γονιδιακών συγχωνεύσεων, στη διάγνωση ασθενειών και στη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής αγωγής. Η μεταφραστική έρευνα που στοχεύει στην κλινική ογκολογία αφορά κυρίως δύο τομείς. Ο πιο κατατοπιστικός τομέας είναι οι ανακαλύψεις βιοδεικτών για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη του καρκίνου. Έχουν αναπτυχθεί και επικυρωθεί πολυάριθμες υπογραφές με βάση την RNAseq σε πολλούς σημαντικούς τύπους όγκων (Han et al., 2018; Zhou, et al., 2019). Ωστόσο, μόνο λίγες τέτοιες ομάδες υπογραφών έχουν μεταφερθεί επιτυχώς στην κλινική πρακτική λόγω της χαμηλής αναπαραγωγιμότητας. Ένας από τους κύριους λόγους για την κακή απόδοση σε ανεξάρτητους ασθενείς με όγκους είναι η μεροληψία δειγματοληψίας που είναι συνυφασμένη με την ετερογένεια εντός του όγκου (Gyanchandani et al., 2016).

Μια πρόσφατη μελέτη έδωσε μια πολλά υποσχόμενη λύση για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος μέσω μιας νέας στρατηγικής για την επιλογή βιοδεικτών. Αναλύοντας πολλαπλά δεδομένα RNAseq από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, η ομάδα διαπίστωσε ότι τα γονίδια με ομοιογενή έκφραση εντός μεμονωμένων όγκων, παρά την υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των όγκων, έχουν σημαντικά καλύτερο προγνωστικό δυναμικό. Αυτά τα γονίδια "κωδικοποιούν μονάδες έκφρασης του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και συχνά οδηγούνται από κέρδη αριθμού αντιγράφων DNA (Biswas et al., 2019). Μια τέτοια μεταγραφομική υπογραφή ελαχιστοποιεί τη δειγματοληπτική μεροληψία και προσφέρει ισχυρή προγνωστική απόδοση στην επιβίωση του NSCLC. Εάν αυτή η στρατηγική επιλογής είναι εφαρμόσιμη σε άλλους τύπους όγκων, περισσότερες υπογραφές βιοδεικτών μπορούν εύκολα να μεταφραστούν στην κλινική πρακτική.

Ένας άλλος τομέας που αποτελεί αντικείμενο εντατικής κλινικής έρευνας είναι οι ανακαλύψεις γονιδιακών συγχωνεύσεων. Τα γονίδια σύντηξης είναι καλά τεκμηριωμένα ως σημαντικοί οδηγοί του καρκίνου. Ορισμένα επαναλαμβανόμενα γονίδια σύντηξης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικό εργαλείο, όπως η σύντηξη RUNX1-RUNX1T1 για τη διάγνωση της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας, ενώ άλλα μπορούν να θεωρηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες, όπως η σύντηξη TMPRSS2-ERG στον καρκίνο του προστάτη (Font-Tello et al., 2015). Με τη χρήση μαζικής RNAseq, έχουν ανακαλυφθεί πολυάριθμες νέες γονιδιακές συγχωνεύσεις, πολλές από τις οποίες μπορούν να είναι άμεσα ωφέλιμες ως φάρμακα εγκεκριμένα από τον FDA ή να προσφέρουν νέες θεραπευτικές ευκαιρίες (Stransky et al., 2014; Roberts et al., 2014). Ωστόσο, λόγω του υψηλού ποσοστού ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και της χαμηλής ευαισθησίας ανίχνευσης, το διαγνωστικό δυναμικό αυτών των ανακαλύψεων δεν έχει αξιοποιηθεί πλήρως σε κλινικό περιβάλλον.

Παρ' όλα αυτά, πρόσφατα έχουν σημειωθεί μεγάλες πρόοδοι προς την κατεύθυνση της αντιμετώπισης αυτών των δύο εμποδίων. Αναπτύχθηκε ένας νέος αλγόριθμος υπολογιστικής μοντελοποίησης για την ανίχνευση γονιδίων σύντηξης από μαζικά δεδομένα RNAseq, ο οποίος ονομάστηκε Data-Enriched Efficient PrEcise STatistical fusion detection (DEEPEST). Ο DEEPEST είναι σε θέση να ελαχιστοποιήσει αποτελεσματικά τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και να βελτιώσει την ευαισθησία ανίχνευσης (Dehghanasiri, et al., 2019). Επιπλέον, οι Heyer EE et al., (2019), ανέφεραν μια στοχευμένη τεχνική RNAseq που προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και μειωμένο θόρυβο υποβάθρου. Η ευρεία υιοθέτηση αυτών των νέων μεθοδολογιών θα

διευκολύνει την ακριβή ανίχνευση γεγονότων γονιδιακής σύντηξης για κλινικές εφαρμογές.

Ένα πολύτιμο δυναμικό της bulk RNAseq εξακολουθεί να μην έχει εκτιμηθεί επαρκώς. Επειδή το bulk RNAseq περιλαμβάνει ποικίλους τύπους ειδών RNA και ανιχνεύει πολλαπλές μορφές γονιδιωματικών μεταβολών σε ανάλυση μίας βάσης, πολλές από τις οποίες δεν ανιχνεύονται με την προσέγγιση DNA ή άλλες παραδοσιακές μεθόδους (Gambino et al., 2015), υπόσχεται πολλά για την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών και πολυδύναμων κλινικών εφαρμογών. Η FoundationOne Heme είναι ένα τέτοιο εξαιρετικό παράδειγμα. Αυτή η κλινική εξέταση ανιχνεύει διάφορες γονιδιακές συγχωνεύσεις, υποκαταστάσεις, indels και CNVs και χρησιμοποιείται για την επιλογή θεραπείας, την πρόγνωση και τη διάγνωση σε πολλαπλούς τύπους όγκων. Η ευρεία υιοθέτηση αυτής της εξέτασης LDT σε κλινικά εργαστήρια απέδειξε ότι το πολύπλευρο, στοχευμένο πάνελ RNAseq έχει ευρεία κλινική χρησιμότητα στην κλινική ογκολογία.

Η Bulk RNAseq χρησιμοποιεί έναν ιστό ή κυτταρικό πληθυσμό ως αρχικό υλικό και έχει ως αποτέλεσμα ένα μείγμα διαφορετικών προφίλ γονιδιακής έκφρασης από το υπό μελέτη υλικό. Τα μεταγραφικά προγράμματα των όγκων είναι εξαιρετικά ετερογενή τόσο μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, λόγω σωματικών γενετικών αλλοιώσεων, όσο και εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, που προκύπτει από τη σημαντική διήθηση του στρώματος και άλλων κυτταρικών τύπων στον όγκο. Τα πραγματικά σήματα που οδηγούν την καρκινογένεση ή τη θεραπευτική αντίσταση από έναν σπάνιο κυτταρικό πληθυσμό ή τύπο κυττάρων μπορεί να αποκρύπτονται από ένα μέσο προφίλ γονιδιακής έκφρασης από το μαζικό RNAseq. Αυτή η βιολογική πρόκληση αποτέλεσε καταλύτη για τη γέννηση του scRNAseq, μιας εναλλακτικής τεχνολογίας RNAseq (Cabanski et al., 2014).

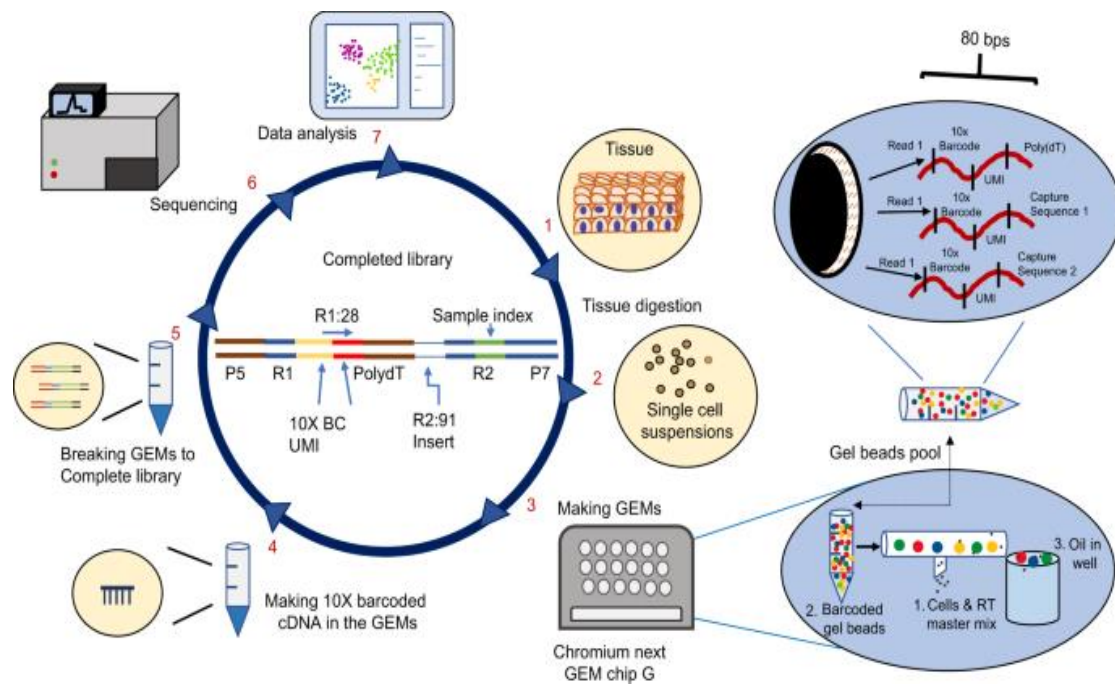
Sequencing RNA ενός κυττάρου (scRNAseq)

Κάθε καρκινικό κύτταρο είναι μοναδικό με ξεχωριστές σωματικές αλλοιώσεις, μεταγραφικές ρυθμίσεις και επιγενετικές τροποποιήσεις. Οι διαφορές μεταξύ των κυττάρων είναι ακόμη μεγαλύτερες για το RNA, δεδομένου ότι όλες αυτές οι αλλαγές θα αντανakλώνται πιθανότατα στο επίπεδο του RNA. Επιπλέον, το RNA είναι πιο ευάλωτο στην επίδραση των μικρο- και μακροπεριβαλλοντικών ερεθισμάτων. Δεδομένης της εξαιρετικής μεταγραφικής ποικιλομορφίας σε κλίμακα μεμονωμένου κυττάρου, τα καρκινικά κύτταρα αξίζουν και απαιτούν εξατομικευμένη θεραπεία σε

επίπεδο μεταγραφώματος. Αυτή η απαίτηση διευκόλυνε την ανάπτυξη διαφόρων τεχνολογιών scRNAseq (Haque et al., 2017; Choi et al., 2020). Ωστόσο, καμία από αυτές δεν εφαρμόστηκε ευρέως στη μεταφραστική ή κλινική έρευνα μέχρι την πρόσφατη ανάπτυξη του συστήματος χρωμίου 10X genomics, το οποίο προκάλεσε την ταχεία υιοθέτηση αυτής της επαναστατικής τεχνολογίας.

Το σύστημα χρωμίου 10X genomics προσφέρει μια ολοκληρωμένη και ολοκληρωμένη λύση για την ταχεία ανάλυση προφίλ γονιδιακής έκφρασης έως και 20.000 μεμονωμένων κυττάρων σε μία μόνο δοκιμή. Το σύστημα αποτελείται από το Chromium Controller ή το Chromium X για την κατάτμηση μεμονωμένων κυττάρων, το Chromium Connect για την αυτοματοποιημένη κατασκευή βιβλιοθήκης και διάφορα πακέτα λογισμικού (cell ranger, loupe browser και cloud analysis) για την ανάλυση δεδομένων. Η βασική τεχνολογία της πλατφόρμας μεμονωμένων κυττάρων 10X είναι η δυνατότητα δημιουργίας εκατοντάδων χιλιάδων μικροσταγονιδίων μεμονωμένων κυττάρων, που ονομάζονται GEM, στο τσιπ μικρορευστομηχανικής Chromium.

Κάθε GEM περιέχει ένα μεμονωμένο κύτταρο, μίγματα αντίστροφης μεταγραφής και ένα σφαιρίδιο πηκτής συζευγμένο με εκατομμύρια αλληλουχίες ολιγόμορφων 80 ζευγών βάσεων. Κάθε αλληλουχία oligo περιλαμβάνει μια αλληλουχία προσαρμογέα i7 για την αλληλούχιση Illumina, έναν κυτταρικό barcode 10x για την αποκωδικοποίηση της προέλευσης του RNA, μια τυχαία μοριακή ετικέτα για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση της μοναδικής μεταγραφής mRNA (UMI) και έναν εκκινητή oligo-dT για τη σύνδεση του mRNA. Κάθε σφαιρίδιο πηκτής έχει ένα μοναδικό κυτταροειδικό γραμμωτό κώδικα 10x, αλλά όλες οι αλληλουχίες ολιγοδεσμών στο ίδιο σφαιρίδιο περιέχουν πανομοιότυπο γραμμωτό κώδικα 10x. Υπάρχουν 3,6 εκατομμύρια διαφορετικά σφαιρίδια πηκτής για να εξασφαλιστεί ότι κάθε ένα από τα GEM έχει μοναδικό γραμμωτό κώδικα 10x. Έτσι, το τσιπ μικρορευστομηχανικής κατέχει το κλειδί για την κατασκευή GEMs μεμονωμένων κυττάρων, ενώ ο ειδικός για κάθε κύτταρο γραμμωτός κώδικας 10x στο σφαιρίδιο πηκτής είναι ο κώδικας για την αναγνώριση και τον διαχωρισμό των mRNAs από μεμονωμένα κύτταρα. Η λύση των κυττάρων αρχίζει αμέσως μετά την ενθυλάκωση των κυττάρων. Η λεπτομερής ροή εργασίας περιγράφεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2 Ροή εργασίας της αλληλουχίας μεμονωμένων κυττάρων 10X genomics. Οι διαδικασίες περιλαμβάνουν επτά βασικά βήματα. Η κατασκευή της βιβλιοθήκης από τα βήματα 1 έως 5 διαρκεί 2 ημέρες. Για την αλληλούχηση χρησιμοποιούνται συνήθως κιτ Novaseq 100 cycle. Η αλληλούχηση ρυθμίζεται ως read1:28 κύκλοι για barcode κυττάρων & UMI, δείκτης i7: 8 κύκλοι για δείκτη δείγματος, ανάγνωση 2: 91 κύκλοι για ένθεμα (6). Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιούνται το Cell Ranger, το Loupe Browser και άλλα εμπορικά ή δημόσια διαθέσιμα λογισμικά (7).

Από το 2017, το scRNAseq έχει γίνει ένα από τα πιο δημοφιλή γονιδιωμικά εργαλεία για την ανάλυση της ετερογένειας του μεταγραφώματος, ανακαλύπτοντας σπάνιους κυτταρικούς τύπους και κυτταρικές καταστάσεις στους όγκους. Οι όγκοι είναι μεταγραφικά ετερογενείς. Αυτά τα διαφοροποιημένα μεταγραφικά προγράμματα παρέχουν στους όγκους μια πλαστικότητα που τους επιτρέπει να προσαρμόζονται σε διάφορα περιβάλλοντα και να προάγουν την καρκινογένεση και την αντίσταση στη θεραπεία (McGranahan, & Swanton, Clonal, 2017). Αυτή η πολύπλοκη ετερογένεια οφείλεται εν μέρει στα ίδια τα κύτταρα του όγκου, που προέρχονται από γενετικές παραλλαγές μεταξύ των κυττάρων, καθώς και από αποκρίσεις σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η προερχόμενη από τα καρκινικά κύτταρα ετερογένεια είναι συχνά μορφολογικά δυσδιάκριτη.

Η scRNAseq προσφέρει μια άνευ προηγουμένου ευκαιρία και έχει αποδείξει τη χρησιμότητά της στην ανάλυση της ενδο-καρκινικής ετερογένειας σε ανάλυση ενός κυττάρου σε πρωτογενές γλοιοβλάστωμα, καρκίνο του παχέος εντέρου³⁰ και πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) ή καρκίνο του στόματος (Puram et al., 2017). Μια τέτοια ανατομία δεν είναι μόνο σημαντική για τη θεμελιώδη

βιολογία του όγκου, αλλά είναι επίσης αποτελεσματική για την αποκρυπτογράφηση σπάνιων ανθεκτικών στη θεραπεία κυτταρικών πληθυσμών και τη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής στρατηγικής (Kim et al., 2016). Η μερική επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάβαση (p-EMT) έχει αναγνωριστεί ότι σχετίζεται με λεμφαδενική μετάσταση και δυσμενή παθολογικά χαρακτηριστικά. Τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το πρόγραμμα p-EMT βρέθηκε ότι υπάρχουν στο διηθητικό μέτωπο του HNSCC (Puram et al., 2017). Πρώιμα πειράματα scRNA-seq διαπίστωσαν την παρουσία σπάνιων stem-like κυττάρων με ιδιότητες ανθεκτικότητας στη θεραπεία και ενός δευτερεύοντος κυτταρικού πληθυσμού που εκφράζει υψηλά επίπεδα AXL και ανέπτυξε ανθεκτικότητα στα φάρμακα μετά από θεραπεία με αναστολείς RAF ή MEK στο μελάνωμα (Tirosh et al., 2016). Παρομοίως, εντοπίστηκαν επίσης διάφορες ειδικές για την ανοχή στα φάρμακα παραλλαγές RNA σε μια κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού με ανοχή στα φάρμακα, οι οποίες απουσίαζαν από τις κυτταρικές σειρές ελέγχου. Αυτές οι σπάνιες παραλλαγές με σημαντικές επιπτώσεις είναι απρόσιτες με την κλασική μαζική RNAseq.

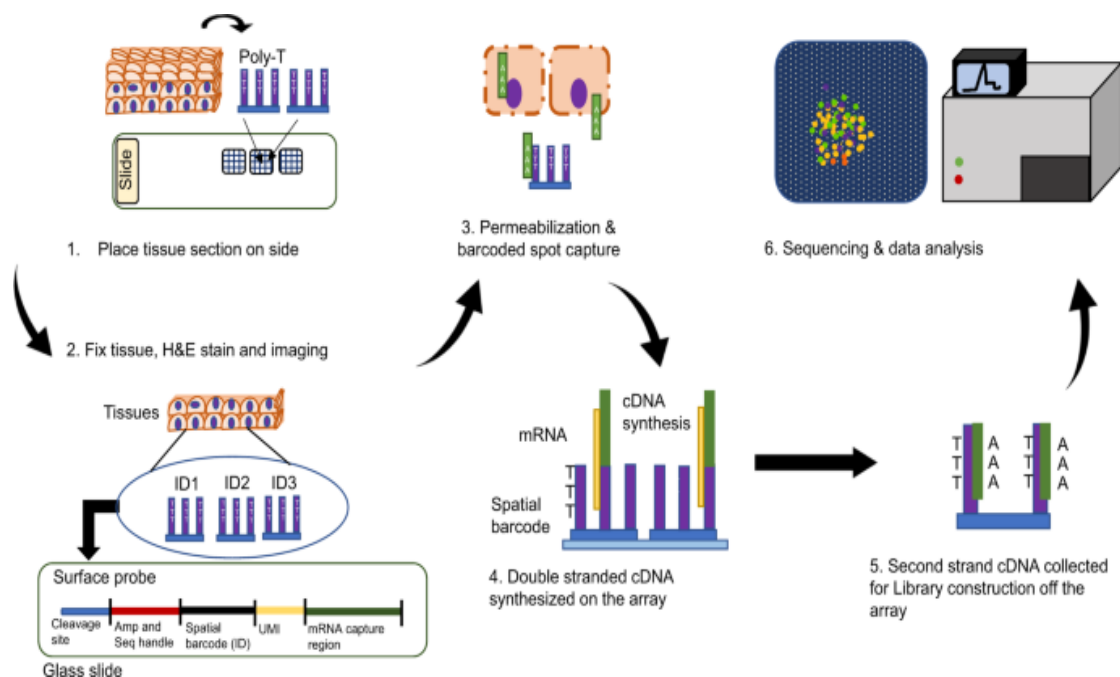
Χωρική sequencing RNA (spRNASeq)

Η spRNAseq είναι μια πρόσφατα αναπτυχθείσα μετασχηματιστική τεχνολογία. Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της σφαιρικής μεταγραφικής ανάλυσης του bulk RNAseq και του in situ υβριδισμού, παρέχοντας δεδομένα ολόκληρου του μεταγραφώματος με χωρικές πληροφορίες. Οι όγκοι αποτελούνται από διάφορους τύπους κυττάρων που συχνά επικοινωνούν με ιδιαίτερα δομημένο τρόπο τόσο χωρικά όσο και χρονικά. Το ξεκλείδωμα αυτών των πολύπλοκων χωρικών δομών μας επιτρέπει να κατανοήσουμε πώς τα καρκινικά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους, διαφεύγουν από την ανοσολογική επιτήρηση, αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα και τελικά κάνουν μεταστάσεις. Συνεπώς, για την πλήρη κατανόηση της καρκινογένεσης και τον σχεδιασμό αποτελεσματικών στρατηγικών θεραπειάς, είναι απαραίτητη η χωρική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (Salmen et al., 2018).

Δύο χωρικές τεχνολογίες RNAseq είναι διαθέσιμες σήμερα στο εμπόριο: το 10X spatial transcriptomics της 10X Genomics και το digital spatial profiler της Nanostring Technologies. Η 10X spatial transcriptomics αναπτύχθηκε αρχικά από την Spatial Transcriptomics και βελτιώθηκε περαιτέρω μετά τη συγχώνευσή της με την 10X Genomics το 2018. Η πρώτη πλατφόρμα 10X visium spatial transcriptomics κυκλοφόρησε στα τέλη του 2019. Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιεί τη δύναμη των

κλασικών μικροσυστοιχιών και τη σύγχρονη τεχνολογία barcoding της 10x Genomics για την ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος (Zhu et al., 2020).

Η ροή εργασίας ξεκινά με την απεικόνιση της φρεσκοκατεψυγμένης τομής ιστού που τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο πλάκα χωρικής γονιδιακής έκφρασης visium. Η αντικειμενοφόρος πλάκα visium είναι λειτουργική με τυπωμένους ανιχνευτές σύλληψης ολιγοειδών. Η σύνθεση των ανιχνευτών είναι παρόμοια με εκείνη των αλληλουχιών ολιγόμορφων που επικαλύπτονται στα σφαιρίδια πηκτής, όπως περιγράφεται στην ενότητα scRNAseq. Αφού η τομή ιστού σταθεροποιηθεί, χρωματίζεται και απεικονιστεί, περαιώνεται για να απελευθερώσει RNA που θα συνδεθεί με παρακείμενους ανιχνευτές σύλληψης για τη σύνθεση cDNA επί της αντικειμενοφόρου πλάκας. Το δίκλωνο cDNA, που φέρει τον χωρικό γραμμωτό κώδικα, μετουσιώνεται και το cDNA της δεύτερης αλυσίδας συλλέγεται για την προετοιμασία βιβλιοθήκης εκτός διαφάνειας (Εικ. 3). Η τεχνολογία αυτή δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, εκτός από τα παραδοσιακά εργαλεία ιστολογίας, και μπορεί εύκολα να υιοθετηθεί από τις υπάρχουσες εργαστηριακές υποδομές. Η πλατφόρμα visium που κυκλοφορεί σήμερα δεν είναι σε θέση να προσφέρει ανάλυση ενός κυττάρου, καθώς περιορίζεται από το μέγεθος και την απόσταση των σημείων. Ωστόσο, η χωρική ανάλυση έχει πλέον βελτιωθεί πειραματικά κατά 1 400x46 και αναμένουμε ότι σύντομα θα ακολουθήσει ένα εμπορικό προϊόν με ανάλυση ενός κυττάρου.



Εικόνα 3 Περιγράμματα της χωρικής μεταγραφομικής 10X. Η ροή εργασίας μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια: στη συστοιχία και εκτός της συστοιχίας. Οι εργασίες στη συστοιχία αποτελούνται από την προετοιμασία του δείγματος, τη χρώση και την απεικόνιση, τη διαπερατότητα και τη σύνθεση cDNA (1-4). Οι εργασίες εκτός της συστοιχίας περιλαμβάνουν την κατασκευή βιβλιοθήκης, την αλληλούχιση και την ανάλυση δεδομένων (5-6). Οι ολικές βιβλιοθήκες μεταγραφώματος αλληλουχίζονται με τη χρήση kit Novaseq V1.5 100 κύκλων (ανάγνωση 1: 28 κύκλοι, δείκτης i7: 10 κύκλοι, δείκτης i5: 10, ανάγνωση 2: 90 κύκλοι). Τα δεδομένα αναλύονται και απεικονίζονται με τη χρήση των Space Ranger και Loupe Browser. Το Loupe Browser επιτρέπει την άμεση σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης με ιστολογικά δεδομένα

2.3 Η Ανάδυση της Single-Cell RNA Sequencing

Η εμφάνιση της αλληλουχίας RNA ενός κυττάρου (scRNA-Seq) αντιμετωπίζει θεμελιώδεις προκλήσεις στην κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο ενός κυττάρου. Ενώ η συνολική περιεκτικότητα σε RNA σε ένα κύτταρο θηλαστικών είναι σχετικά χαμηλή, αποτελούμενη από περίπου 10 πικογραμμάρια, με μόνο ένα κλάσμα να αντιπροσωπεύει μεταγραφικό RNA, το scRNA-Seq επιτρέπει τη σκιαγράφηση της δραστηριότητας γονιδιακής έκφρασης σε μεμονωμένα κύτταρα ξεπερνώντας τους περιορισμούς τόσο στην ποσότητα του δείγματος όσο και στις προκαταλήψεις ενίσχυσης που είναι εγγενείς στις παραδοσιακές μεθόδους αλληλούχισης μεταγραφώματος. Η ροή εργασίας του scRNA-Seq περιλαμβάνει την απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων, την αντίστροφη μεταγραφή, τη σύνθεση cDNA, την κατασκευή βιβλιοθήκης, την αλληλούχιση υψηλής απόδοσης και την επακόλουθη ανάλυση δεδομένων (Kolodziejczyk et al., 2016).

Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του scRNA-Seq, ο Tang (2009) πρωτοστάτησε στην ανάλυση μεμονωμένων βλαστομερών από έμβρυα ποντικών σε πρώιμο στάδιο, θέτοντας τα θεμέλια για τις μετέπειτα εξελίξεις. Με την πάροδο των ετών, οι ερευνητές πειραματίστηκαν με διάφορες τεχνολογικές καινοτομίες για τη βελτίωση της απομόνωσης μεμονωμένων κυττάρων και της ενίσχυσης cDNA, οδηγώντας στην ανάπτυξη πολλαπλών μεθόδων scRNA-Seq, όπως οι STRT-seq, Smart-seq και 10× Genomics.

Οι μέθοδοι απομόνωσης μεμονωμένων κυττάρων έχουν εξελιχθεί από παραδοσιακές τεχνικές όπως η σειριακή αραίωση και η διαλογή κυττάρων με ενεργοποίηση φθορισμού (FACS) σε πιο αποτελεσματικές πλατφόρμες όπως τα συστήματα που βασίζονται στη μικρορευστολογία. Η μικρορευστομηχανική, ειδικότερα, προσφέρει ακριβή έλεγχο του χειρισμού των μεμονωμένων κυττάρων, βελτιώνοντας σημαντικά την αποτελεσματικότητα της απομόνωσης (Yang, Zhu, & Liu, 2022).

Η κατασκευή βιβλιοθηκών cDNA αποτελεί βασική πρόκληση στην scRNA-Seq. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της ενίσχυσης με βάση την PCR και της ενίσχυσης με μεταγραφή *in vitro*. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR είναι κυρίαρχες, αν και υποφέρουν από σφάλματα ενίσχυσης και προκαταλήψεις. Για τον μετριασμό αυτών των ζητημάτων, έχουν εισαχθεί μοναδικά μοριακά αναγνωριστικά (UMI) για την ακριβή ποσοτικοποίηση των μεταγράφων κατά την αντίστροφη μεταγραφή.

Η ανάλυση δεδομένων στην scRNA-Seq περιλαμβάνει διάφορα στάδια, συμπεριλαμβανομένης της ευθυγράμμισης των θραυσμάτων αλληλούχισης, του ελέγχου ποιότητας, της κανονικοποίησης, της διόρθωσης παρτίδας, της μείωσης της διαστατικότητας και της ανάλυσης κατάντη. Με την έλευση του scRNA-Seq, οι ερευνητές μπορούν πλέον να αποκαλύπτουν τα μοριακά προφίλ υποομάδων κυττάρων, να ελέγχουν για πρώιμες ασθένειες, να αξιολογούν κλινικές καταστάσεις και να διαφωτίζουν μηχανισμούς φαρμάκων με πρωτοφανή ανάλυση.

Μεταξύ των πλατφορμών scRNA-Seq, η 10× Genomics έχει αναδειχθεί ως δημοφιλής επιλογή λόγω της υψηλής απόδοσης και της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας. Ωστόσο, οι πρόσφατες εξελίξεις, όπως η VASA-seq, προσφέρουν βελτιωμένη ευαισθησία, κάλυψη του μεταγραφώματος και ανίχνευση μη κωδικοποιητικού RNA.

Οι εφαρμογές του scRNA-Seq καλύπτουν διάφορα ερευνητικά πεδία, συμπεριλαμβανομένης της εμβρυϊκής ανάπτυξης, της ανάπτυξης ιστών και οργάνων, της βιολογίας όγκων και της ανοσολογίας. Στην εμβρυϊκή έρευνα, το scRNA-Seq επιτρέπει την ταξινόμηση των κυττάρων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, την παρακολούθηση της δέσμησης της γενεαλογικής γραμμής και τον εντοπισμό βασικών ρυθμιστικών γονιδίων. Ομοίως, στις μελέτες ανάπτυξης ιστών και οργάνων, το scRNA-Seq παρέχει πληροφορίες για τη δυναμική των κυτταρικών πληθυσμών και τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης κατά την οργανογένεση (Salmen et al., 2022).

Συνοπτικά, το scRNA-Seq έχει φέρει επανάσταση στην κατανόηση της κυτταρικής ετερογένειας και της δυναμικής της γονιδιακής ρύθμισης σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, ανοίγοντας το δρόμο για πρωτοποριακές ανακαλύψεις σε διάφορα βιολογικά πλαίσια.

Κεφάλαιο 3: Βασικές Αρχές και Τεχνολογίες Single-Cell

3.1 Τεχνολογίες και Πλατφόρμες της Single-Cell Ανάλυσης

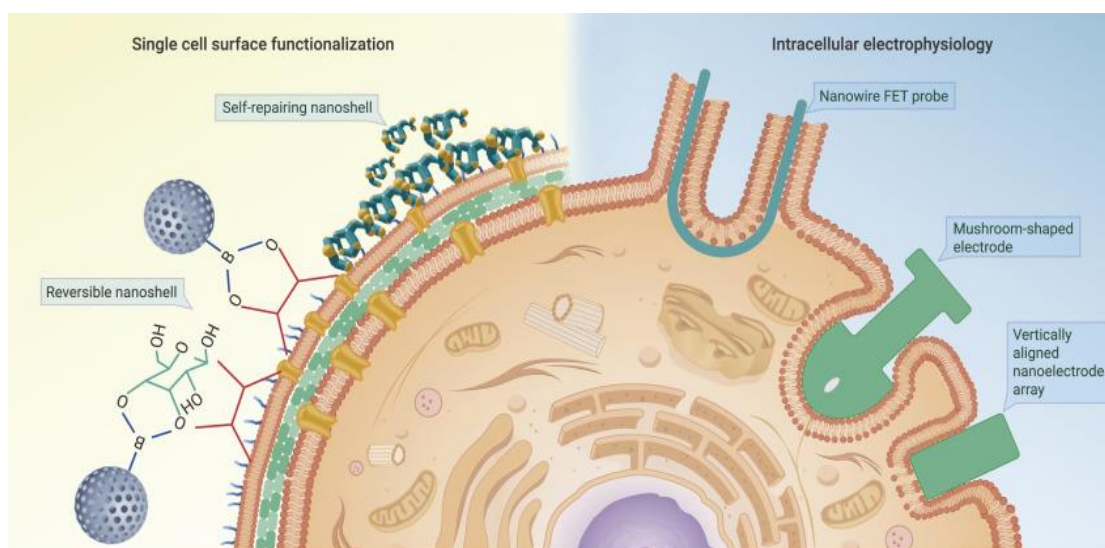
Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί όλο και περισσότερες τεχνολογίες μονοκυττάρων, όπως η λειτουργικότητα της επιφάνειας ενός κυττάρου, η ενδοκυτταρική ηλεκτροφυσιολογία, η απομόνωση ενός κυττάρου και η αλληλούχιση ενός κυττάρου. Αν και η αλληλούχιση ενός κυττάρου είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη και γνωστή, η ανάπτυξή της δεν μπορεί να γίνει χωρίς άλλες τεχνολογίες ενός κυττάρου, όπως η απομόνωση ενός κυττάρου.

3.1.1 Λειτουργικοποίηση επιφάνειας ενός κυττάρου

Εμπνευσμένη από τα χαρακτηριστικά των κυττάρων στους ζωντανούς οργανισμούς, έχει αναπτυχθεί η λειτουργικότητα της επιφάνειας ενός κυττάρου, κατά την οποία τα μεμονωμένα κύτταρα επικαλύπτονται από νανοδομημένα υλικά για να ενισχύσουν τη σταθερότητα και τη δραστηριότητα των κυττάρων και να προικίσουν τα κύτταρα με αβιοτικές λειτουργίες που είναι εντελώς διαφορετικές από τις αρχικές τους εξειδικεύσεις. Η επιφανειακή λειτουργικοποίηση μεμονωμένων κυττάρων έχει χαρακτηριστικά τόσο βιολογικών όσο και αβιοτικών συστατικών (Kim et al., 2018). Ως εκ τούτου, ο συνδυασμός θα μπορούσε να επιτύχει το αποτέλεσμα "ένα συν ένα μεγαλύτερο από δύο". Η ενσωμάτωση των ζωντανών κυττάρων και των υλικών θα μπορούσε να επιτύχει τον κυτταρικό χειρισμό που είναι περισσότερο προσανατολισμένος, με σκοπό τον ακριβή έλεγχο, στις εφαρμογές ενός κυττάρου. Το επιφανειακά λειτουργικό μεμονωμένο κύτταρο θα μπορούσε να εκτελεί μη φυσικές λειτουργίες που έχουν σημασία για τη δημιουργία νέων λειτουργιών για πολλαπλές εφαρμογές (Ryu et al., 2017). Αυτοί οι προηγμένοι τεχνολογικοί στόχοι έχουν γίνει σημαντικοί ως αποτέλεσμα της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, η οποία προκαλεί υπερβολική κατανάλωση ενέργειας και βιομάζας, μόλυνση του περιβάλλοντος και προβλήματα υγείας (Shi et al., 2019).

Παρά τις δυνητικές εφαρμογές, η λειτουργικοποίηση της επιφάνειας ενός κυττάρου συχνά περιορίζει την κυτταρική δραστηριότητα και οδηγεί στην κατάσταση "τεχνητού λήθαργου" που επηρεάζει τις μακροπρόθεσμες κυτταρικές λειτουργίες. Επιπλέον, τα νανοδομημένα κελύφη που σχηματίζονται στην επιφάνεια ενός μεμονωμένου κυττάρου μέσω αυτοσυναρμολόγησης είναι εύθραυστα, οδηγώντας σε χαμηλή απόδοση και μειωμένες λειτουργίες. Η δυναμική τεχνολογία κελύφους σε μια επιφάνεια ενός κυττάρου δεν μπορεί μόνο να ενισχύσει τη σταθερότητα του κυττάρου και να δημιουργήσει αβιοτικές λειτουργίες, αλλά και να αποικοδομήσει τα κελύφη για να ενεργοποιήσει τις κυτταρικές λειτουργίες που απαιτούνται (Li et al., 2017), η οποία είναι γνωστή ως η μελλοντική λειτουργικότητα της επιφάνειας ενός κυττάρου. Τα βιοϋβριδικά νανοκελύφη, τα οποία αποτελούνται από νανοσωματίδια χρυσού και μόρια αμινοξέων, υφίστανται δομοδιαμορφωτική εναπόθεση στις επιφάνειες των κυττάρων μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Αυτό το μοναδικό σύστημα είναι το πρώτο παράδειγμα ενός δυναμικού, αυτοεπιδιορθούμενου νανοϋλικού (Εικόνα 4). Κατά την ανάπτυξη και τη διαίρεση του εγκλωβισμένου μεμονωμένου κυττάρου, τα βιοϋβρίδια εναποτίθενται στην επιφάνεια του νεογέννητου κυττάρου, σχηματίζοντας ένα συμπληρωματικό νανοκύτταρο. Πολύ πρόσφατα, αναφέρθηκε μια δυναμική

αναστρέψιμη τεχνολογία κυτταρικού κελύφους που βασίζεται στη χημεία κλικ για την ανάπτυξη ενός έξυπνου ελέγχου συναρμολόγησης-διάσπασης-ανασυναρμολόγησης ενός μεσοπορώδους νανοκελύφους στην επιφάνεια ενός μεμονωμένου κυττάρου ζύμης, ρυθμίζοντας το πρόσθετο επίπεδο γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας (Εικόνα 4). Η μέθοδος που βασίζεται στη χημεία κλικ θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ευέλικτη για την εισαγωγή προστατευτικών καψουλών και ελεγχόμενης συναρμολόγησης-διάσπασης νανολειτουργικότητας γύρω από μεμονωμένα κύτταρα στο πλαίσιο βιοτεχνολογικών προσπαθειών (Geng et al., 2019).



Εικόνα 4 Απεικόνιση των μεθόδων ανίχνευσης ενός κυττάρου

Μεμονωμένα κύτταρα σε νανοκύτταρα, τα οποία έχουν βιώσιμα, καθαρά και πράσινα πλεονεκτήματα, κυκλοφορούν ήδη στην αγορά για τη μετατροπή της βιομάζας. Για να προωθηθεί περαιτέρω η ανάπτυξη της επιφανειακής λειτουργικότητας των μεμονωμένων κυττάρων σε βιομηχανικές και βιοϊατρικές εφαρμογές, απαιτείται συνεχής πρόοδος στο σχεδιασμό και τη βελτίωση αυτών των συστημάτων. Πώς μπορεί η αυτοεπιδιορθούμενη δυναμική διαδικασία των νανοϋλικών να εξελιχθεί από τον τεχνητό έλεγχο σε αυτόνομη ρύθμιση με βάση τα φυσικά κύτταρα; Τα υλικά με αυτοκαταλυτικό πολλαπλασιασμό για την κατασκευή νανοκελύφους για ζωντανά κύτταρα παρέχουν μια πιθανή εναλλακτική λύση, όπως τα μικκύτταρα με κατάλυση και αυτοκαταλυτικό πολλαπλασιασμό (Kahana, & Lancet, 2021). Έτσι, θα μπορούσε να ληφθεί ένα νανοκύτταρο με αυτοκαταλυτικό πολλαπλασιασμό για τη λειτουργικοποίηση κυττάρων που μπορεί να λειτουργήσει δυναμικά τα κύτταρα στο χρόνο.

3.1.2 Ενδοκυτταρική ηλεκτροφυσιολογία

Η καταγραφή ηλεκτροφυσιολογικών σημάτων υψηλής πιστότητας από ηλεκτρογενετικά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν καλή ηλεκτρική σύζευξη με το κύτταρο και παρέχουν ακριβή ανάγνωση σε όλο το δυναμικό εύρος των τάσεων που παράγονται από τα κύτταρα χωρίς παραμόρφωση της ανάγνωσης με την πάροδο του χρόνου, είναι κρίσιμη για την εμβάθυνση της κατανόησης των κυτταρικών συμπεριφορών σε κλίμακες που κυμαίνονται από μεμονωμένα κύτταρα έως κυτταρικά δίκτυα. Λαμβάνοντας ως παράδειγμα τη νευρωνική ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή, για να ληφθούν οι πιο πλούσιες σε πληροφορίες ενδείξεις για τη λεπτομερή χαρτογράφηση των εγκεφαλικών λειτουργιών και/ή τον λεπτομερή έλεγχο των νευρωνικών προσθετικών, τα ηλεκτρονικά ηλεκτρόδια ή οι ανιχνευτές πρέπει να παρέχουν πρόσβαση σε ενδοκυτταρικά σήματα από μεμονωμένους έως πολλαπλούς νευρώνες που αποτελούν ένα νευρωνικό κύκλωμα. Οι συμβατικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούν συστοιχίες μικροηλεκτροδίων που βρίσκονται έξω από την κυτταρική μεμβράνη υποφέρουν σημαντικά στην ποιότητα του σήματος και είναι τυφλές σε γεγονότα κάτω του κατωφλίου (Chen, Canales, & Anikeeva, 2017).

Η τεχνική patch-clamp είναι μια ευέλικτη ηλεκτροφυσιολογική τεχνική που αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και αποτελεί το ιστορικό χρυσό πρότυπο για τη μελέτη της λειτουργίας μεμονωμένων ή πολλαπλών διαύλων ιόντων σε ζώντες ιστούς. Έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών, από την αξιολόγηση των λειτουργικών συνεπειών των γονιδιακών μεταλλάξεων των ιοντικών διαύλων έως τον τρόπο με τον οποίο οι ηλεκτροφυσιολογικές αρχές και τεχνολογίες μπορούν να εφαρμοστούν στην ανθρώπινη υγεία. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη μελέτη ηλεκτρογενών κυττάρων, όπως οι νευρώνες, τα καρδιομυοκύτταρα, οι μυϊκές ίνες και τα ωκύτταρα, και μπορεί επίσης να εφαρμοστεί στη μελέτη βακτηριακών διαύλων ιόντων σε ειδικά παρασκευασμένους γιγαντιαίους σφαιροπλάστες. Ανάλογα με τα ερευνητικά ενδιαφέροντα, μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικές διαμορφώσεις patch-clamp. Για παράδειγμα, η διαμόρφωση που συνδέεται με το κύτταρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της συμπεριφοράς μεμονωμένων διαύλων ιόντων στο τμήμα της μεμβράνης που συνδέεται με το ηλεκτρόδιο, ενώ το patch ολόκληρου του κυττάρου επιτρέπει τη μελέτη της ηλεκτρικής συμπεριφοράς ολόκληρου του κυττάρου, αντί των ρευμάτων μεμονωμένων διαύλων.

Από την άλλη πλευρά, η τεχνική patch-clamp ολόκληρου του κυττάρου αποτελεί το ιστορικό χρυσό πρότυπο για την ενδοκυτταρική ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή (Hamill et al., 1981). Ένα γυάλινο τριχοειδές γεμάτο με τεχνητό ενδοκυτταρικό διάλυμα και ένα σύρμα με επικάλυψη AgCl που εισάγεται στον μικροχειριστή συνδέεται στενά με τη μεμβράνη του μονοκύτταρου, σχηματίζοντας αντίσταση $>1\text{ GW}$ (η λεγόμενη σφράγιση giga-ohm) μεταξύ της πιπέτας και της μεμβράνης. Μόλις εφαρμοστεί η αρνητική πίεση, δημιουργείται μια οπή στη μεμβράνη του κυττάρου, οδηγώντας στην ανταλλαγή ενδοκυτταρικών και τεχνητών ενδοκυτταρικών διαλυμάτων. Στη συνέχεια, η καθαρή δυναμική των ρευμάτων και των τάσεων που παράγονται μέσω όλων των ιοντικών διαύλων μπορεί να μετρηθεί από το σύρμα με επικάλυψη AgCl.

Παρόλο που η τεχνική patch-clamp έχει χρησιμεύσει ως το κύριο εργαλείο για τη μελέτη της ανάλυσης υψηλής πιστότητας των ηλεκτρικών ιδιοτήτων και της λειτουργικής συνδεσιμότητας των ηλεκτρογενών κυττάρων για πολλά χρόνια, εξακολουθούν να υφίστανται αρκετοί περιορισμοί: πρώτον, θεωρείται επεμβατική προσέγγιση, καθώς η patch clamp ολόκληρου του κυττάρου συνεπάγεται καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και ανταλλαγή διαλυμάτων μεταξύ του ενδοκυττάρου χώρου και της δεξαμενής της πιπέτας, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία του κυττάρου. Επιπλέον, η ολόσωμη κυτταρική τοποθέτηση απαιτεί μεγάλη επιδεξιότητα και είναι πολύ δύσκολο να χρησιμοποιηθεί σε παράλληλη καταγραφή μεγάλης κλίμακας.

Για να ξεπεραστούν οι παραπάνω προκλήσεις, έχουν προταθεί διάφορες στρατηγικές επανεξετάζοντας τον σχεδιασμό των ηλεκτροδίων patch-clamp ή αναπτύσσοντας νέες τεχνικές που μιμούνται τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά κλίμακας νανομέτρου που απαντώνται φυσικά στα μικροπεριβάλλοντα ενός κυττάρου. Για παράδειγμα, εμπνευσμένα από το σχήμα των δενδριτικών αγκαθιών, έχουν αναπτυχθεί εξωκυτταρικά ηλεκτρόδια χρυσού σε σχήμα μανιταριού μεγέθους μικρομέτρου (Εικόνα 4) για να επιτρέψουν "ενδοκυτταρικές" καταγραφές μονοφασικών δυναμικών δράσης και υποκατωφλιακής δραστηριότητας, με βάση την ενισχυμένη σύζευξη μεταξύ κυττάρων και εξωκυτταρικών ηλεκτροδίων (Shmoel et al., 2016). Επιπλέον, η ανάπτυξη κάθετα ευθυγραμμισμένων συστοιχιών νανοηλεκτροδίων και ανιχνευτών νανοσυρμάτων με τρανζίστορ επίδρασης πεδίου (FET) έχουν επίσης συμβάλει καθοριστικά στη δυνατότητα υψηλής ποιότητας ενδοκυτταρικών καταγραφών. Το μικρό άκρο τους με χαρακτηριστικά νανοκλίμακας μπορεί να διεισδύσει στις

κυτταρικές μεμβράνες με ελάχιστη παρεμβατικότητα και να αποκτήσει στενότερη επαφή με τα κύτταρα, μειώνοντας έτσι σημαντικά τις διεπιφανειακές ρωγμές και την αντίσταση επαφής.

Η ανάπτυξη εργαλείων ενδοκυτταρικής ηλεκτροφυσιολογίας με στοιχεία καταγραφής σε μέγεθος νανοκλίμακας θα μπορούσε να διευρύνει τα όρια της χωροχρονικής ανάλυσης μειώνοντας παράλληλα την επεμβατικότητα, γεγονός που θα μπορούσε να προσφέρει μια βαθύτερη κατανόηση των ηλεκτρογενών κυττάρων σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου έως ιστού, καθώς και να παρέχει νέες ποσοτικές παραμέτρους στη μελέτη της υποκυτταρικής/μοριακής ηλεκτροφυσιολογίας. Ειδικότερα, η σταθερή καταγραφή και η ανάκριση των ίδιων μεμονωμένων νευρώνων στα νευρωνικά δίκτυα και των πολλαπλών ακραίων δενδριτών σε έναν μόνο νευρώνα υπόσχονται να βοηθήσουν στην αποκρυπτογράφηση πολύπλοκων νευρολογικών διαταραχών, οι οποίες αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας έτσι την προηγμένη διεπαφή εγκεφάλου-μηχανής με υψηλότερη ανάλυση και ίσως τελικά να φέρουν τα "cyborgs" στην πραγματικότητα.

Οι ενδοκυτταρικές ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές μέσω κάθετα ευθυγραμμισμένων συστοιχιών νανοηλεκτροδίων θα μπορούσαν να επιτευχθούν είτε με αυθόρμητη διείσδυση ενός μεμονωμένου κυττάρου είτε με υποβοηθούμενη διείσδυση ενός μεμονωμένου κυττάρου (Spira, & Hai, 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αυθόρμητη διείσδυση μιας μεμβράνης ενός μεμονωμένου κυττάρου συμβαίνει σπάνια ή μπορεί να συμβεί μόνο αμέσως μετά την επιμετάλλωση και πριν από την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης της μεμβράνης, οδηγώντας τελικά στην απόρριψη του καθετήρα και την επανασφράγιση της μεμβράνης. Ο ηλεκτροπορισμός με τη χρήση ενός ή πολλαπλών παλμών υψηλής τάσης ή η οπτοπορεία με τη βοήθεια πλασμονικών εφαρμόζεται συνήθως για να διευκολυνθεί η διείσδυση νανοανιχνευτών και να ενισχυθούν οι ενδοκυτταρικές καταγραφές (McGuire, Santoro, & Cui, 2018).

Η ηλεκτρική, φωτοθερμική και φωτοηλεκτρική διέγερση θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη ρύθμιση της ηλεκτρικής δραστηριότητας ενός μεμονωμένου κυττάρου. Μέσω του κατάλληλου γεωμετρικού και κυκλωματικού σχεδιασμού, καθώς και της βελτιστοποίησης της φυσικής διεπιφάνειας σύζευξης κυττάρου-ηλεκτροδίου, μπορούν να επιτευχθούν αξιοπρεπείς ενδοκυτταρικές καταγραφές δυναμικών δράσης και σημάτων υποκατωφλίου με κάθετα ευθυγραμμισμένες συστοιχίες νανοηλεκτροδίων. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος των ακροδεκτών τους οδηγεί συνήθως

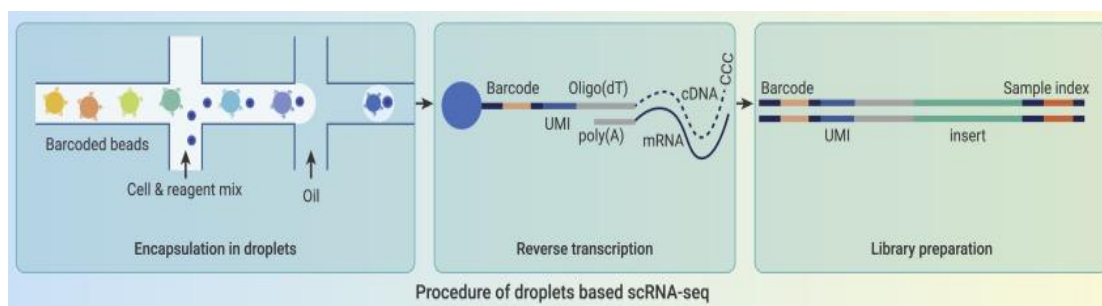
σε υψηλή αντίσταση ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα την απώλεια σήματος σε πλάτος και σχήμα (Abbott, Ye, Ham, & Park, 2018).

Οι ανιχνευτές FET νανοσυρμάτων, από την άλλη πλευρά, μπορούν να ανιχνεύσουν ενδοκυτταρική τάση ανεξάρτητα από την αντίσταση των ηλεκτροδίων, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη πιστότητα των ηλεκτροφυσιολογικών σημάτων των καλλιεργημένων πρωτογενών νευρώνων και των καρδιομυοκυττάρων που χτυπούν (Εικόνα 4). Η υψηλής ποιότητας καταγραφή οφείλεται στο μέγεθος του FET σε νανοκλίμακα, το οποίο επιτρέπει την εισαγωγή του στο κυτταρόλυμα, με αποτέλεσμα αμελητέα αντίσταση πρόσβασης, και στη διαμόρφωση αντίστασης σφράγισης gigaohm έναντι της μεμβράνης ενός κυττάρου. Η πρόσφατα αναπτυχθείσα τεχνική συναρμολόγησης και συμπίεστικής κάμψης νανοσυρμάτων με ελεγχόμενο σχήμα και ντετερμινιστική συναρμολόγηση θα μπορούσε να ξεπεράσει το πρόβλημα της επεκτασιμότητας, το οποίο συνήθως συνδέεται με τους ανιχνευτές FET νανοσυρμάτων. Σε συνδυασμό με πλατφόρμες καταγραφής *in vivo*, αυτές οι εξελίξεις μπορούν να επιτρέψουν τη διερεύνηση της δυναμικής στον εγκέφαλο και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων διεπαφών εγκεφάλου-μηχανής με πρωτοφανή ανάλυση και ακρίβεια (Zhang et al., 2020).

3.1.3 Απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων υψηλής απόδοσης

Για να απομονωθεί ένας συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός από ένα κυτταρικό μείγμα σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, είναι αναμφισβήτητη ζωτικής σημασίας η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών τεχνικών απομόνωσης μεμονωμένων κυττάρων. Η πρώτη απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων βασίστηκε στη χειροκίνητη πιετοποίηση για την ανάλυση μόνο μιας χούφτας κυττάρων. Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε η διαλογή κυττάρων με ενεργοποίηση φθορισμού (FACS) ως μια εύκολη στην εφαρμογή εναλλακτική λύση για την απομόνωση κυττάρων σε πλάκες μικροκυττάρων. Μια περαιτέρω αύξηση της απόδοσης σε περίπου χίλια κύτταρα επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός ολοκληρωμένου ρευστομηχανικού κυκλώματος. Στη συνέχεια, η εφαρμογή της ρομποτικής χειρισμού υγρών αύξησε τον αριθμό των κυττάρων που μπορούσαν να μετρηθούν σε μία μόνο εκτέλεση σε αρκετές χιλιάδες. Πιο πρόσφατα, εμφανίστηκαν οι τεχνολογίες νανοσταγονιδίων και πικο-πηγαδιών για την απομόνωση δεκάδων χιλιάδων κυττάρων κάθε φορά, πραγματοποιώντας πραγματικά τη "διαλογή κυττάρων υψηλής απόδοσης" (Fan, Fu, & Fodor, 2015).

Οι μικρορευστομηχανικές πλατφόρμες σταγονιδίων ενθυλακώνουν με ακρίβεια μεγάλο αριθμό μεμονωμένων κυττάρων σε θαλάμους αντίδρασης νανολίτρων- τέτοιες πλατφόρμες είναι ιδανικές για απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων υψηλής απόδοσης και μεταγενέστερες επεξεργασίες. Ειδικότερα, οι μικρορευστομηχανικές πλατφόρμες σταγονιδίων ενθυλακώνουν τυχαία μεμονωμένα κύτταρα σύμφωνα με την κατανομή Poisson. Τα χαρακτηριστικά υψηλής απόδοσης των σταγονιδίων νανολίτρων ελαχιστοποιούν τον απαιτούμενο όγκο αντιδραστήριου αντίδρασης, ενώ βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης εντός ενός σταγονιδίου (Εικόνα 5). Χρειάζονται περισσότερες βελτιώσεις για την επιτάχυνση της έρευνας στον τομέα των μεμονωμένων κυττάρων, όπως περισσότερες πολυλειτουργικές δυνατότητες χειρισμού μεμονωμένων κυττάρων και περισσότερα υπολογιστικά εργαλεία για τον εντοπισμό της ετερογένειας των μεμονωμένων κυττάρων. Η εισαγωγή αλγορίθμων μηχανικής μάθησης θα αυτοματοποιούσε τον διαχωρισμό μεμονωμένων κυττάρων για την ανάπτυξη πιο βελτιστοποιημένων συστημάτων με το κλειδί στο χέρι για την έγκαιρη διάγνωση ασθενειών, την αξιολόγηση της διαλογής φαρμάκων και την ιατρική ακριβείας (Xia et al., 2021).



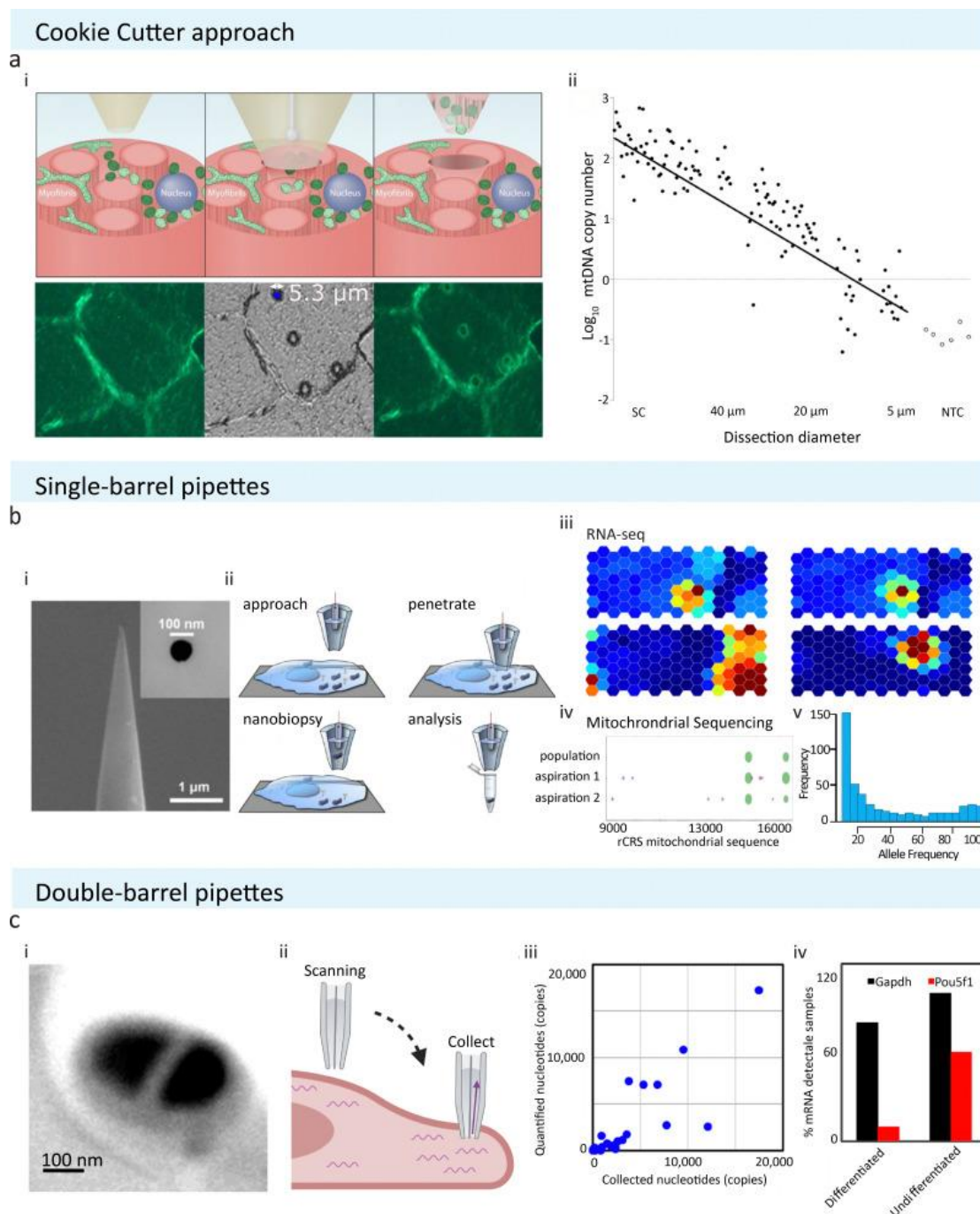
Εικόνα 5 Διαδικασία scRNA-seq με σταγονίδια

3.2 Μέθοδοι Δειγματοληψίας και Επεξεργασίας Κυττάρων

3.2.1 Πιπέτες

Οι πιπέτες είναι συνήθως λεπτές, κοίλες βελόνες που τραβιούνται από τριχοειδή από βοριοπυριτικό γυαλί ή χαλαζία. Οι νανοπιπέτες μπορούν να τραβηχτούν με ελεγχόμενα μεγέθη πόρων σε ένα ευρύ φάσμα διαμέτρων (συνήθως 50 nm-5 μ m) και ταξινομούνται ως μικρο- ή νανοπιπέτες εάν έχουν διάμετρο πόρων πάνω ή κάτω από 100 nm, αντίστοιχα. Έχουν αναφερθεί διαφορετικές προσεγγίσεις για την εξαγωγή τοπικών

κυτταρικών δειγμάτων με τη χρήση μικρο- και νανοπιπετών, όπως η ηλεκτρική διαβροχή σε συνδυασμό με τη μικροσκοπία αγωγιμότητας ιόντων σάρωσης (SICM) και η αναρρόφηση με αρνητική πίεση. Αυτές οι πιπέτες μπορεί να είναι είτε μονής είτε διπλής ράβδου (Εικόνα 6) και είναι διαθέσιμες στο εμπόριο ή μπορούν να κατασκευαστούν από τριχοειδή με τη χρήση ενός εξολκέα λείζερ (Bury et al., 2022).

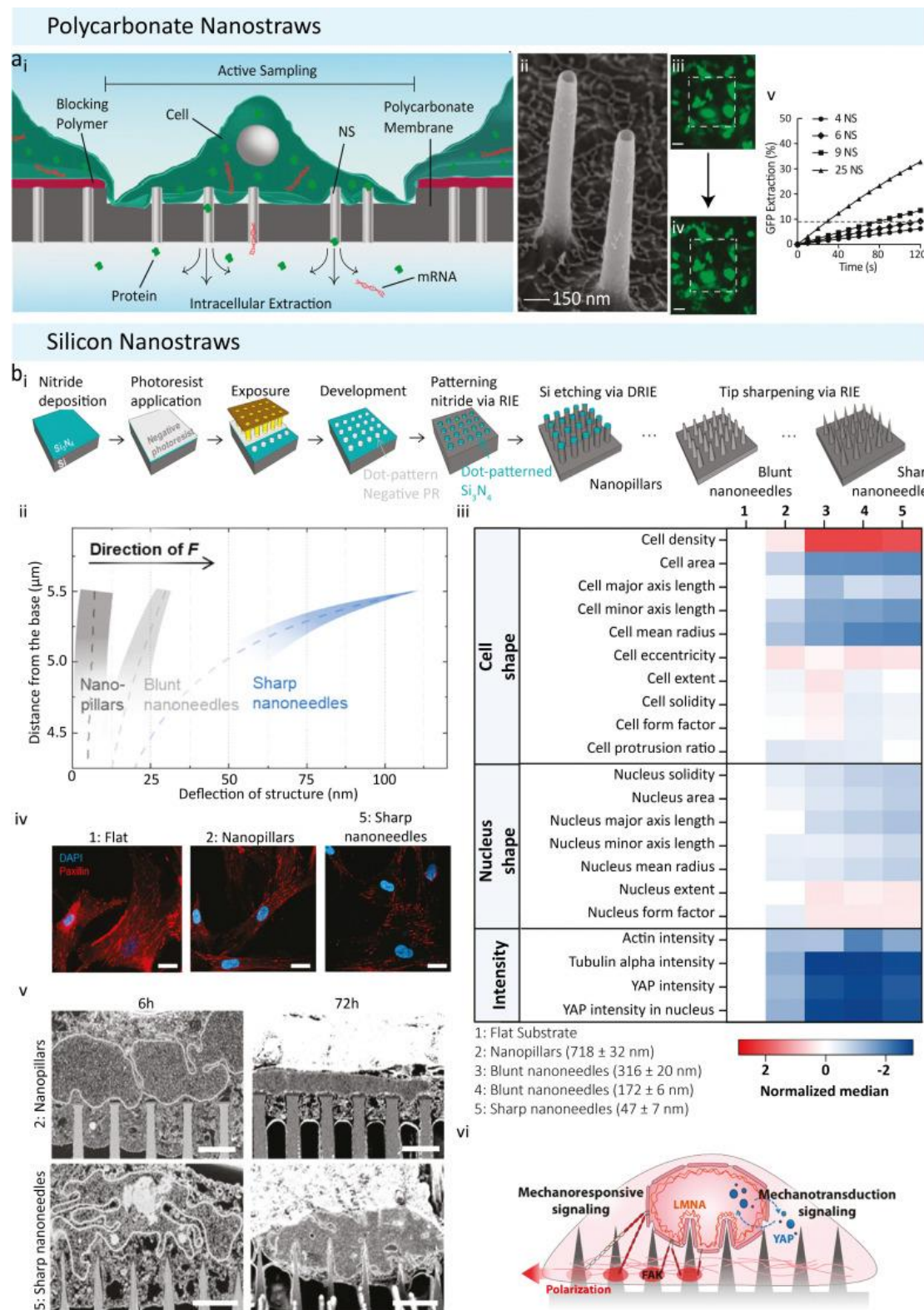


Εικόνα 6 Σχηματική απεικόνιση των τεχνολογιών κυτταρικής δειγματοληψίας με πιπέτα και της ανάλυσης κατάντη.

3.2.2 Nanostraws

Μια εναλλακτική μη καταστροφική προσέγγιση έναντι των νανοπιπετών είναι η πλατφόρμα νανοστρόφιγγας (NS). Είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές στη διείσδυση στην κυτταρική μεμβράνη και στην παροχή άμεσης ρευστής ενδοκυτταρικής πρόσβασης σε ζωντανά κύτταρα. Τα NS είναι κοίλες δομές που μοιάζουν με σωλήνες (διάμετροι μεταξύ 20 και 700 nm, μήκος 1 έως 3 μm), οι οποίες είναι ενσωματωμένες σε μεμβράνη συμβατή με την κυτταρική καλλιέργεια. Υπάρχουν δύο τύποι NS: με βάση το πολυκαρβονικό (Εικ. 7(α)) και με βάση το πυρίτιο (Εικ. 7 (β)). Τα πολυκαρβονικά NS κατασκευάζονται από μεμβράνες πολυκαρβονικού που έχουν χαραχθεί με τροχιά, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για εφαρμογές κυτταροκαλλιέργειας. Διάφορες μέθοδοι για την κατασκευή αυτών των τύπων NS έχουν αναφερθεί στο παρελθόν (He et al., 2020).

Αυτά τα NS έχουν συνήθως διάμετρο 150 nm και μήκος 1-3 μm (Εικ. 7 (α)-ii). Τοποθετούνται στον πυθμένα γυάλινων κυλίνδρων διαμέτρου 2 έως 5 mm, που ταιριάζουν σε πλάκα 48 ή 96 κοιλοτήτων για κυτταρικές καλλιέργειες. Ένα λεπτό στρώμα Al_2O_3 εναποτίθεται στην πολυκαρβονική μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένων των τροχιών που έχουν χαραχθεί με τροχιά, οι οποίες με τη σειρά τους γίνονται τα τοιχώματα των NS μέσω προσεκτικής χάραξης. Ο άλλος τύπος NS κατασκευάζεται από πλακίδια πυριτίου χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση φωτολιθογραφίας από πάνω προς τα κάτω (Εικ. 7 (β)-i). Αυτό επιτρέπει την κατασκευή λεπτότατα ρυθμιζόμενων πυλώνων με διάμετρο που κυμαίνεται από 20 nm έως 700 nm (Seong et al., 2020). Αυτά τα NS πυριτίου έχουν μήκος 5 μm και είναι τοποθετημένα σε ομοιόμορφες τετράγωνες συστοιχίες με απόσταση 2 μm , καθιστώντας τα κατάλληλα για μια ποικιλία βιολογικών εφαρμογών και επιτρέποντας βαθύτερη διείσδυση στα κύτταρα, εάν απαιτείται.



Εικόνα 7 Χρήση νανοαχύρου προσαρμοσμένη από τους Cao et al., 2019 και Seong et al., 2020

Κεφάλαιο 4: Η Συνεισφορά της scRNA-seq στην Ανακάλυψη Φαρμάκων

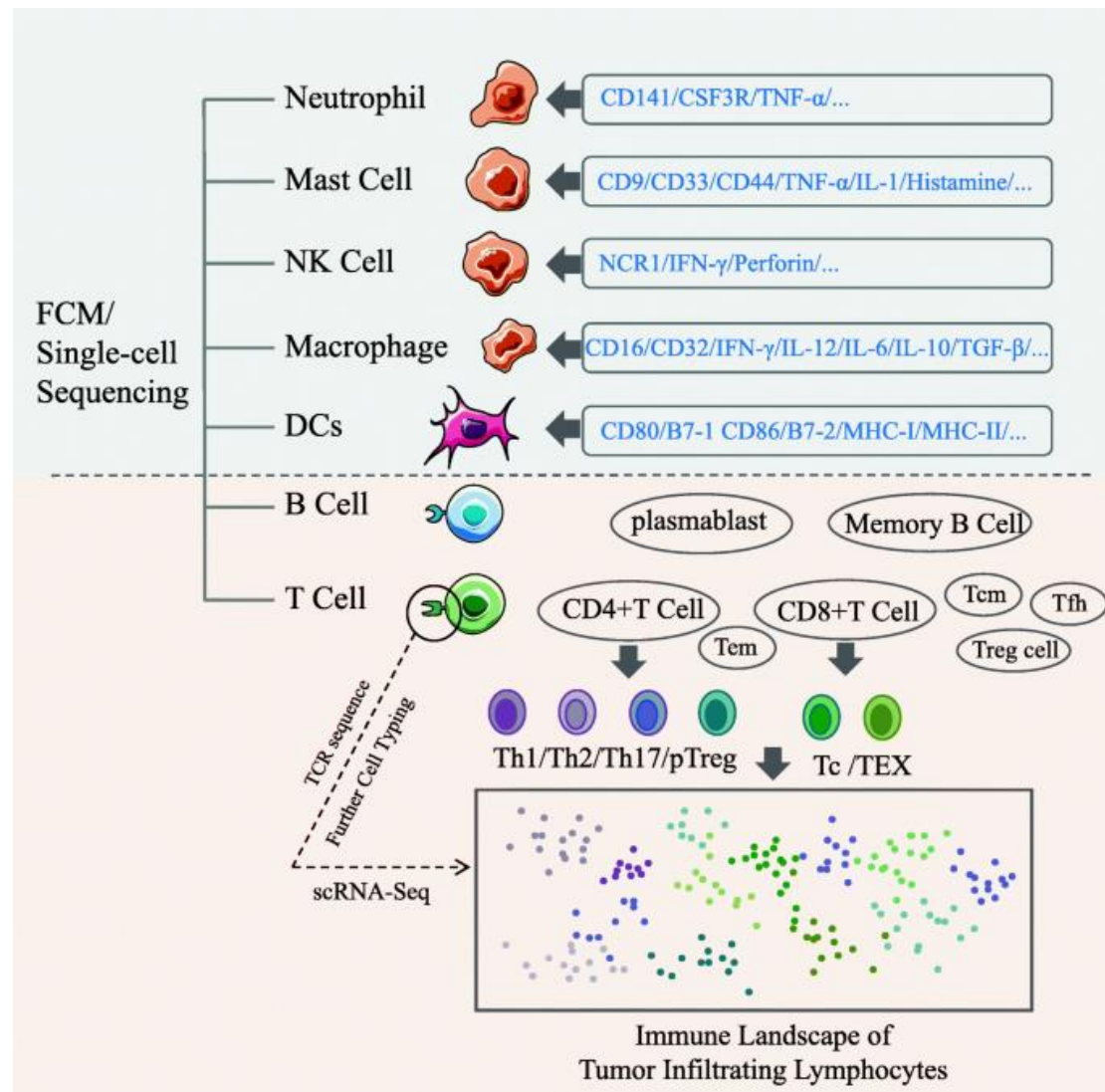
4.1 Μελέτη Ετερογένειας των Κυττάρων και Εφαρμογές στην Ογκολογία

Οι καρκίνοι είναι μια ομάδα ετερογενών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από την απόκτηση λειτουργικών ικανοτήτων κατά τη μετάβαση από τη φυσιολογική στη νεοπλασματική κατάσταση. Ισχυρά πειραματικά και υπολογιστικά εργαλεία μπορούν να εφαρμοστούν για τη διαλεύκανση των μηχανισμών εμφάνισης, εξέλιξης, μετάστασης και αντίστασης στα φάρμακα- ωστόσο, οι προκλήσεις παραμένουν. Οι τεχνικές αλληλούχισης RNA Bulk αντανakλούν μόνο τη μέση γονιδιακή έκφραση σε ένα δείγμα, καθιστώντας δύσκολη την κατανόηση της ετερογένειας του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Η εμφάνιση και η ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης RNA ενός κυττάρου (scRNA-seq) έχουν παράσχει ευκαιρίες για την κατανόηση λεπτών αλλαγών στη βιολογία του όγκου με τον εντοπισμό διακριτών κυτταρικών υποπληθυσμών, την ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών γονιδιωματικών μεταλλάξεων. Πρόσφατα, η τεχνολογία scRNA-seq χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε μελέτες καρκίνου για τη διερεύνηση της ετερογένειας του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, γεγονός που έχει αυξήσει την κατανόηση της καρκινογένεσης και της εξέλιξης (Heinrich et al., 2021).

4.1.1 scRNA-seq και τυποποίηση ανοσοκυττάρων

Η ετερογένεια του όγκου περιλαμβάνει πολλές πτυχές, μεταξύ των οποίων η ανοσολογική ετερογένεια είναι μια σημαντική πτυχή, η οποία σχετίζεται με την αντίσταση στα φάρμακα και την ανοσοθεραπεία. Όπως φαίνεται στην Εικ. 8 φαίνεται, το scRNA-seq επιβεβαιώνει ότι οι ιστοί του όγκου περιέχουν σύνθετα ανοσολογικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των έμφυτων ανοσολογικών κυττάρων, όπως τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (iDCs), τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα (aDCs), τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα, τα μαστοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα κύτταρα φυσικών δολοφόνων (NK, NKCD56 dim cell, NKCD56 bright cell), προσαρμοστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα T βοηθητικά κύτταρα Th1 και Th2, ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg), CD8 + T κύτταρα, κεντρικά T

κύτταρα μνήμης (Tcm), T κύτταρα effector μνήμης (Tem), T βοηθητικά κύτταρα θυλακίου (Tfh) και γδ T κύτταρα, κ.λπ. (Bindea et al., 2013).



Εικόνα 8 scRNA-seq για την τυποποίηση ανοσοκυττάρων - Πλεονεκτήματα της τεχνολογίας scRNA-seq για την ταξινόμηση των T-κυττάρων που διεισδύουν στον όγκο και για την παροχή ενός λεπτομερούς τοπίου των συνολικών ανοσοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο

Η ανοσολογική ετερογένεια αντικατοπτρίζεται στο βαθμό της ανοσολογικής διήθησης και στον τύπο των ανοσολογικών κυττάρων. Υπάρχουν εμφανείς ατομικές διαφορές σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους όγκου και αναπτυξιακό στάδιο του καρκίνου. Το μελάνωμα και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) χαρακτηρίζονται από υψηλή διήθηση από T κύτταρα, ενώ τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο (TIL) παρατηρούνται σπάνια σε όγκους μη ευαίσθητους στην ανοσοθεραπεία, όπως ο καρκίνος των ωοθηκών και ο καρκίνος του προστάτη (Shembrey et al., 2019). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο βαθμός διήθησης των T κυττάρων στους ιστούς του όγκου σχετίζεται στενά με την επιβίωση και την

ανοσοθεραπεία των ασθενών. Γενικά, τα CD8⁺ κυτταροτοξικά T κύτταρα σχετίζονται με μεγαλύτερη περίοδο επιβίωσης χωρίς νόσο. Όσο υψηλότερος είναι ο βαθμός διήθησης των CD8⁺ T κυττάρων, τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση] (Zheng et al., 2022). Τα Treg κύτταρα έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα και η ποσότητα των Treg κυττάρων στους όγκους σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την ευαισθησία της ανοσοθεραπείας. Οι Woosung et al. πραγματοποίησαν scRNA-seq σε ιστούς όγκων 11 ασθενών με καρκίνο του μαστού και έδειξαν ότι τα TIL περιλάμβαναν κυρίως T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Τα περισσότερα από τα T κύτταρα και τα μακροφάγα παρουσίασαν ανοσοκατασταλτικά χαρακτηριστικά, με τα T κύτταρα να εμφανίζουν εξαντλητικό φαινότυπο και τα μακροφάγα φαινότυπο M2 (Li et al., 2022). Αυτό υπέδειξε ότι η scRNA-seq θα μπορούσε να βρει σημαντικές υποομάδες κυττάρων και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικό μέσο για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερης στοχευμένης θεραπείας για τύπους όγκων που δεν είναι ευαίσθητοι στην ανοσοθεραπεία, όπως ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Chung et al., 2017).

Με υψηλότερη ακρίβεια ανίχνευσης, το scRNA-seq μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακριβή ταξινόμηση των καρκινικών κυττάρων και ιδίως για τον εντοπισμό των διακριτών μορφών ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των βοηθητικών T κυττάρων, των κυτταροτοξικών T κυττάρων και άλλων T κυττάρων. Οι Zhang et al., (2015), έλαβαν 11 T κύτταρα από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και μελέτησαν συστηματικά την κατανομή στους ιστούς, την κλωνική επέκταση, τη μετανάστευση και την αναπτυξιακή μετάβαση ή διαφοροποίηση. Η ανάλυση των ιδιαίτερα εκφρασμένων γονιδίων και των ειδικών αλληλουχιών των υποδοχέων των T κυττάρων (TCR) των διαφόρων T κυττάρων μπορεί να ταξινομήσει περαιτέρω τα T κύτταρα των ασθενών και να απεικονίσει το ανοσολογικό τοπίο εντός του όγκου. Επομένως, η scRNA-seq επιτρέπει την ανάλυση των ειδικών χαρακτηριστικών των διαφόρων ανοσοκυττάρων που διηθούν τον όγκο, σχεδιάζοντας έτσι στοχευμένες θεραπείες και βελτιωμένες ανοσοθεραπείες για την επίτευξη καλύτερων και ευρύτερων κλινικών θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Οι Yu Pan et al., (2019), προσδιόρισαν τα υποσύνολα των ανοσολογικών κυττάρων που διηθούνται από τον όγκο μετά από θεραπεία με anti-CD47 με scRNA-seq και αποκάλυψαν ότι οι αριθμοί των CD4⁺ T κυττάρων και των CD8⁺ T κυττάρων αυξήθηκαν σημαντικά, ενώ εκείνος των Treg κυττάρων μειώθηκε, τα οποία αύξησαν την ευαισθησία των όγκων στην ανοσοθεραπεία. Εδώ, η τεχνολογία scRNA-seq είχε ένα μοναδικό πλεονέκτημα σε

σύγκριση με τη συνολική ανάλυση αλληλουχίας των υποομάδων κυττάρων. Τα πειραματικά δεδομένα αντανακλούσαν με ακρίβεια τις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος του όγκου που προκλήθηκαν από τη θεραπεία με αντι-CD47, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η ανοσοθεραπεία με αντι-CD47 αύξησε την αντικαρκινική δράση των ανοσοκυττάρων και μείωσε τον αριθμό των μακροφάγων που σχετίζονται με την ανοσοκαταστολή. Επιπλέον, έδειξε ότι τόσο η έμφυτη όσο και η προσαρμοστική ανοσία έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην ανοσοθεραπεία κατά του CD47.

4.2 Η σημασία της scRNA-seq στην Ανακάλυψη Νέων Στόχων για Θεραπείες

Η αλληλούχιση RNA ενός κυττάρου (scRNA-seq) έχει αναδειχθεί σε ισχυρό εργαλείο στη βιοϊατρική έρευνα, ιδίως για την ανακάλυψη νέων στόχων για θεραπείες. Η παραδοσιακή αλληλούχιση μαζικού RNA παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τα μέσα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης σε ένα δείγμα, αλλά δεν έχει την ανάλυση για την αποκάλυψη της κυτταρικής ετερογένειας. Αντίθετα, η scRNA-seq επιτρέπει τη σκιαγράφηση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, επιτρέποντας στους ερευνητές να αναλύουν πολύπλοκα βιολογικά συστήματα με πρωτοφανή κοκκομετρία (Tan et al., 2024).

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα του scRNA-seq είναι η ικανότητά του να εντοπίζει σπάνιους κυτταρικούς πληθυσμούς και να χαρακτηρίζει την κυτταρική ετερογένεια εντός ιστών ή δειγμάτων ασθενειών. Αυτή η ετερογένεια αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, όπου υποπληθυσμοί κυττάρων με διαφορετικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης μπορεί να οδηγούν στην εξέλιξη του όγκου, τη μετάσταση και την αντίσταση στη θεραπεία. Καταγράφοντας το μεταγραφικό τοπίο μεμονωμένων κυττάρων, το scRNA-seq μπορεί να αποκαλύψει νέους τύπους κυττάρων, μεταβατικές καταστάσεις και μονοπάτια σηματοδότησης που διαφορετικά αποκρύπτονται σε μαζικές αναλύσεις (Van de Sande et al., 2023).

Στο πλαίσιο της ανακάλυψης φαρμάκων και της ανάπτυξης θεραπειών, το scRNA-seq υπόσχεται πολλά. Με τη σκιαγράφηση του μεταγραφώματος κυττάρων από υγιείς και ασθενείς ιστούς, οι ερευνητές μπορούν να εντοπίσουν δυσρυθμισμένα γονίδια και μονοπάτια που μπορεί να χρησιμεύσουν ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Επιπλέον, το

scRNA-seq μπορεί να αποκαλύψει μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την αντίσταση στα φάρμακα, επιτρέποντας την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων στρατηγικών θεραπείας (Tan et al., 2024).

Μια άλλη πολύτιμη εφαρμογή του scRNA-seq στην ανακάλυψη στόχων είναι ο εντοπισμός δεικτών ειδικών για τον κυτταρικό τύπο. Με τον εντοπισμό γονιδίων που εκφράζονται επιλεκτικά σε σχετικούς με την ασθένεια τύπους κυττάρων, οι ερευνητές μπορούν να σχεδιάσουν στοχευμένες θεραπείες που εξαλείφουν ή τροποποιούν ειδικά αυτά τα κύτταρα, ενώ παράλληλα προστατεύουν τους υγιείς ιστούς (Sun et al., 2023). Η προσέγγιση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ανοσοθεραπεία, όπου η στόχευση συγκεκριμένων υποομάδων ανοσοποιητικών κυττάρων μπορεί να ενισχύσει τις ανοσολογικές αποκρίσεις κατά του όγκου (Van de Sande et al., 2023).

Επιπλέον, το scRNA-seq διευκολύνει την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών στόχων με τη διαλεύκανση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και των δικτύων σηματοδότησης που ρυθμίζουν τις διαδικασίες της νόσου. Αναλύοντας τα πρότυπα έκφρασης των συνδέσμων, των υποδοχέων και των μεταγενέστερων επιδραστικών παραγόντων σε μεμονωμένα κύτταρα, οι ερευνητές μπορούν να εντοπίσουν βασικούς κόμβους σε μονοπάτια σηματοδότησης που μπορούν να τροποποιηθούν φαρμακολογικά (Tan et al., 2024).

Συνολικά, η σημασία του scRNA-seq για την ανακάλυψη νέων στόχων για θεραπείες έγκειται στην ικανότητά του να ξετυλίγει την πολυπλοκότητα των κυτταρικών οικοσυστημάτων, να εντοπίζει μεταβολές που αφορούν συγκεκριμένες ασθένειες σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου και να αποκαλύπτει νέους μοριακούς στόχους και μονοπάτια που μπορούν να αξιοποιηθούν για θεραπευτική παρέμβαση. Καθώς οι τεχνολογίες scRNA-seq συνεχίζουν να εξελίσσονται και να γίνονται πιο προσιτές, θα διαδραματίσουν αναμφίβολα καθοριστικό ρόλο στην επιτάχυνση της ανάπτυξης προσεγγίσεων ιατρικής ακριβείας για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών.

4.3 Σύνδεση μεταξύ Single-Cell Τεχνολογιών και Φαρμακογενομικής

Η φαρμακογονιδιωματική, η μελέτη του τρόπου με τον οποίο η γενετική σύσταση ενός ατόμου επηρεάζει την ανταπόκρισή του στα φάρμακα, έχει φέρει επανάσταση χάρη στις εξελίξεις στις τεχνολογίες μεμονωμένων κυττάρων. Αυτές οι τεχνολογίες επιτρέπουν στους ερευνητές να διερευνήσουν τα γενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά

των μεμονωμένων κυττάρων με πρωτοφανή ανάλυση, παρέχοντας πληροφορίες για την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικής, μεταβολισμού των φαρμάκων και θεραπευτικών αποτελεσμάτων (Gandhi et al., 2022).

Μία από τις βασικές εφαρμογές των μονοκυτταρικών τεχνολογιών στη φαρμακογονιδιωματική είναι ο χαρακτηρισμός της κυτταρικής ετερογένειας εντός ιστών και πληθυσμών ασθενών. Οι παραδοσιακές προσεγγίσεις αλληλούχισης όγκου συχνά αποκρύπτουν την ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων και των γενετικών προφίλ που υπάρχουν σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Αντίθετα, οι τεχνολογίες ενός κυττάρου, όπως η αλληλούχιση RNA ενός κυττάρου (scRNA-seq) και ο γονότυπος ενός κυττάρου, επιτρέπουν τη σκιαγράφηση προφίλ μεμονωμένων κυττάρων, επιτρέποντας στους ερευνητές να εντοπίζουν σπάνιους κυτταρικούς υποπληθυσμούς και να κατανοούν πώς οι γενετικές παραλλαγές συμβάλλουν στη μεταβλητότητα της φαρμακευτικής απόκρισης (Gorenjak et al., 2023).

Αναλύοντας τα μεταγραφώματα ή τα γονιδιώματα μεμονωμένων κυττάρων, οι ερευνητές μπορούν να αποκαλύψουν γενετικές παραλλαγές, πρότυπα γονιδιακής έκφρασης και μοριακές οδούς που σχετίζονται με τον μεταβολισμό, την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα των φαρμάκων. Για παράδειγμα, οι μελέτες scRNA-seq έχουν εντοπίσει πρότυπα έκφρασης συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων ενζύμων που μεταβολίζουν φάρμακα, μεταφορέων και στόχων φαρμάκων, ρίχνοντας φως στους μηχανισμούς που διέπουν τις δια-ατομικές διαφορές στην ανταπόκριση στα φάρμακα (Gandhi et al., 2022).

Οι μονοκυτταρικές τεχνολογίες διαδραματίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο στην κατανόηση της δυναμικής της κυτταρικής απόκρισης στα φάρμακα με την πάροδο του χρόνου. Παρακολουθώντας τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, τα επίπεδα πρωτεϊνών και τα μονοπάτια σηματοδότησης σε επίπεδο ενός κυττάρου, οι ερευνητές μπορούν να διευκρινίσουν πώς τα μεμονωμένα κύτταρα σε έναν πληθυσμό προσαρμόζονται στην έκθεση σε φάρμακα και να εντοπίσουν παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της θεραπείας. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να ενημερώσουν για την ανάπτυξη εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπείας προσαρμοσμένων στο γενετικό προφίλ και τα χαρακτηριστικά της νόσου ενός ατόμου (Gorenjak et al., 2023).

Επιπλέον, οι τεχνολογίες μεμονωμένων κυττάρων προσφέρουν νέες ευκαιρίες για τη φαρμακογονιδιωματική ανακάλυψη και την ταυτοποίηση βιοδεικτών. Με την ενσωμάτωση δεδομένων αλληλούχισης ενός κυττάρου με δεδομένα κλινικών

αποτελεσμάτων και φαρμακευτικής ανταπόκρισης, οι ερευνητές μπορούν να εντοπίσουν γενετικούς δείκτες και μοριακές υπογραφές που προβλέπουν την αποτελεσματικότητα, την τοξικότητα και τις ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων. Αυτοί οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στρωματοποίηση πληθυσμών ασθενών, την καθοδήγηση θεραπευτικών αποφάσεων και την ανάπτυξη συνοδών διαγνωστικών για προσεγγίσεις ιατρικής ακριβείας (Gandhi et al., 2022).

Συνοπτικά, η σύνδεση μεταξύ των μονοκυτταρικών τεχνολογιών και της φαρμακογονιδιωματικής είναι καθοριστική για την προώθηση της κατανόησης των γενετικών καθοριστικών παραγόντων της μεταβλητότητας της φαρμακευτικής ανταπόκρισης και την καθοδήγηση της ανάπτυξης εξατομικευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Με την αποκάλυψη της πολυπλοκότητας της κυτταρικής ετερογένειας και των μοριακών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανταπόκριση στα φάρμακα, οι μονοκυτταρικές τεχνολογίες ανοίγουν το δρόμο για αποτελεσματικότερες και ασφαλέστερες φαρμακολογικές θεραπείες προσαρμοσμένες στους μεμονωμένους ασθενείς.

Κεφάλαιο 5: Υπολογιστικές Μέθοδοι στον Σχεδιασμό Φαρμάκων

5.1 Εισαγωγή στις Υπολογιστικές Τεχνικές στην Βιομηχανία Φαρμάκων

Οι υπολογιστικές τεχνικές έχουν μεταμορφώσει τον τρόπο με τον οποίο σχεδιάζονται και αναπτύσσονται τα φάρμακα, προσφέροντας μια αποτελεσματική και οικονομικά αποδοτική εναλλακτική λύση σε σχέση με τις συμβατικές προσεγγίσεις. Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες υπολογιστικές τεχνικές στο σχεδιασμό φαρμάκων είναι η μοριακή πρόσδεση. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός μικρού μορίου (ligand) και μιας πρωτεΐνης (υποδοχέα) με τη μοντελοποίηση των τρισδιάστατων δομών τους. Οι πληροφορίες αυτές χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τον εντοπισμό των πιο σταθερών θέσεων πρόσδεσης για το ligand και για την πρόβλεψη της συγγένειας του ligand για τον υποδοχέα (Fan, Fu, & Zhang, 2019).

Μια άλλη σημαντική τεχνική είναι η προσομοίωση μοριακής δυναμικής. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει τη μοντελοποίηση των κινήσεων των ατόμων και των μορίων σε ένα σύστημα, παρέχοντας πληροφορίες για τη δυναμική και τη σταθερότητα του συστήματος. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό πιθανών φαρμακευτικών στόχων, τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των υφιστάμενων φαρμάκων (Hollingsworth, & Dror, 2018).

Εκτός από τη μοριακή πρόσδεση και την προσομοίωση μοριακής δυναμικής, υπάρχουν και άλλες υπολογιστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως στο σχεδιασμό φαρμάκων. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα μοριακά γραφικά, η μοριακή μοντελοποίηση, η μοριακή μηχανική και η κβαντομηχανική. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό για να παρέχουν μια ολοκληρωμένη κατανόηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων που είναι ζωτικής σημασίας για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων (Hehre, 2003).

Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα των υπολογιστικών τεχνικών στον σχεδιασμό φαρμάκων είναι η ικανότητά τους να ελέγχουν γρήγορα μεγάλο αριθμό πιθανών φαρμάκων, εξοικονομώντας χρόνο και πόρους σε σύγκριση με τις παραδοσιακές πειραματικές μεθόδους. Οι υπολογιστικές τεχνικές επιτρέπουν επίσης την πρόβλεψη

πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων, μειώνοντας τον κίνδυνο ανεπιθύμητων παρενεργειών και αυξάνοντας την πιθανότητα επιτυχίας στις κλινικές δοκιμές.

Εν κατακλείδι, οι υπολογιστικές τεχνικές έχουν καταστεί απαραίτητο εργαλείο στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων. Με την ικανότητά τους να προβλέπουν αποτελεσματικά τις μοριακές αλληλεπιδράσεις και να εντοπίζουν πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους, οι τεχνικές αυτές έχουν φέρει επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο σχεδιάζονται και αναπτύσσονται τα φάρμακα. Ως ερευνητής που εργάζεται σε αυτόν τον τομέα, είμαι βέβαιος ότι οι υπολογιστικές τεχνικές θα συνεχίσουν να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανακάλυψη νέων και καινοτόμων φαρμάκων για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

5.2 Μοντελοποίηση και Προσομοίωση Δομής - Λειτουργίας Στόχων

Η διαδικασία του σχεδιασμού φαρμάκων με βάση τη δομή είναι επαναληπτική, και συχνά περνάει από πολλαπλούς κύκλους προτού ένα βελτιστοποιημένο μονοπάτι περάσει σε κλινικές δοκιμές φάσης I. Ο πρώτος κύκλος περιλαμβάνει την κλωνοποίηση, τον καθαρισμό και τον προσδιορισμό της δομής της πρωτεΐνης-στόχου ή του νουκλεϊκού οξέος με μία από τις τρεις κύριες μεθόδους: Κρυσταλλογραφία ακτίνων X, NMR ή μοντελοποίηση ομολογίας. Χρησιμοποιώντας αλγόριθμους υπολογιστών, ενώσεις ή τμήματα ενώσεων από μια βάση δεδομένων τοποθετούνται σε μια επιλεγμένη περιοχή της δομής. Οι ενώσεις αυτές βαθμολογούνται και κατατάσσονται με βάση τις στερικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις τους με την περιοχή-στόχο και οι καλύτερες ενώσεις δοκιμάζονται με βιοχημικές δοκιμασίες. Στον δεύτερο κύκλο, ο προσδιορισμός της δομής του στόχου σε σύμπλοκο με ένα πολλά υποσχόμενο στοιχείο από τον πρώτο κύκλο, με τουλάχιστον μικρομοριακή αναστολή *in vitro*, αποκαλύπτει περιοχές της ένωσης που μπορούν να βελτιστοποιηθούν για να αυξηθεί η δραστηριότητα. Οι πρόσθετοι κύκλοι περιλαμβάνουν τη σύνθεση του βελτιστοποιημένου κύριου συστατικού, τον προσδιορισμό της δομής του νέου συμπλόκου στόχου: κύριου συστατικού και την περαιτέρω βελτιστοποίηση της κύριας ένωσης. Μετά από αρκετούς κύκλους της διαδικασίας σχεδιασμού φαρμάκων, οι βελτιστοποιημένες ενώσεις παρουσιάζουν συνήθως αξιοσημείωτη βελτίωση στη δέσμευση και, συχνά, στην εξειδίκευση για τον στόχο.

5.2.1 Επιλογή ενός φαρμακευτικού στόχου

Η επιλογή ενός φαρμακευτικού στόχου γίνεται κυρίως σε βιολογική και βιοχημική βάση. Το ιδανικό μακρομόριο-στόχος για το σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή είναι ένα μακρομόριο που συνδέεται στενά με την ανθρώπινη ασθένεια και δεσμεύει ένα μικρό μόριο προκειμένου να επιτελέσει μια λειτουργία. Το μόριο-στόχος έχει συνήθως έναν καλά καθορισμένο θύλακα πρόσδεσης. Άλλα σχεδιασμένα μικρά μόρια μπορούν να ανταγωνιστούν, σε ένα απαιτούμενο επίπεδο ισχύος, το φυσικό μικρό μόριο προκειμένου να τροποποιήσουν τη λειτουργία του στόχου. Πολλοί καλοί στόχοι φαρμάκων είναι πρωτεΐνες- ωστόσο, ο σχεδιασμός φαρμάκων κατά στόχων RNA με καλά καθορισμένη δευτεροταγή δομή, όπως το βακτηριακό ριβόσωμα και τμήματα του γονιδιώματος του HIV, έχει επίσης αποδειχθεί αποτελεσματικός. Πρόσφατες ανασκοπήσεις αναδεικνύουν ορισμένα από τα υπό εξέλιξη έργα που βασίζονται στη δομή του RNA. Στις ασθένειες που προκαλούνται από τη δυσλειτουργία ανθρώπινων πρωτεϊνών, τα φάρμακα μικρών μορίων κατά των υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCRs) αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το 25% των φαρμάκων που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά (Hopkins, & Groom, 2002). Τα μικρά μόρια που ρυθμίζουν τη λειτουργία των διαύλων ιόντων, των πρωτεασών, των κινασών και των υποδοχέων πυρηνικών ορμονών αποτελούν άλλο ένα 22% της αγοράς.

Ο στόχος στην ανάπτυξη φαρμάκων κατά των στόχων που αναφέρονται παραπάνω είναι συχνά η τροποποίηση της λειτουργίας της ανθρώπινης πρωτεΐνης- ο στόχος στην ανάπτυξη φαρμάκων κατά των παθογόνων οργανισμών είναι η πλήρης αναστολή, που οδηγεί στο θάνατο του παθογόνου. Οι στόχοι των αντιμικροβιακών φαρμάκων πρέπει να είναι απαραίτητοι, να έχουν μοναδική λειτουργία στο παθογόνο, να υπάρχουν μόνο στο παθογόνο και να μπορούν να ανασταλούν από ένα μικρό μόριο. Ο στόχος θα πρέπει να είναι απαραίτητος, δεδομένου ότι αποτελεί μέρος ενός κρίσιμου κύκλου στο κύτταρο, και η εξάλειψή του θα πρέπει να οδηγεί στο θάνατο του παθογόνου. Ο στόχος θα πρέπει να είναι μοναδικός: κανένα άλλο μονοπάτι δεν θα πρέπει να είναι σε θέση να συμπληρώσει τη λειτουργία του στόχου και να ξεπεράσει την παρουσία του αναστολέα. Εάν το μακρομόριο πληροί όλα τα περιγραφόμενα κριτήρια για να αποτελέσει στόχο φαρμάκου αλλά λειτουργεί τόσο σε υγιή ανθρώπινα κύτταρα όσο και σε παθογόνο, η εξειδίκευση μπορεί συχνά να κατασκευαστεί στον αναστολέα με την εκμετάλλευση δομικών ή βιοχημικών διαφορών μεταξύ της παθογόνου και της ανθρώπινης μορφής. Τέλος, το μόριο-στόχος θα πρέπει να μπορεί να ανασταλεί με τη δέσμευση ενός μικρού

μορίου. Τα ένζυμα αποτελούν συχνά εξαιρετικούς φαρμακευτικούς στόχους, επειδή οι ενώσεις μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να ταιριάζουν στον θύλακα του ενεργού κέντρου.

Οι στόχοι για τον καρκίνο μπορεί να είναι δύσκολοι επειδή οι στόχοι είναι συχνά σωματικές κυτταρικές μεταλλάξεις πρωτεϊνών που ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες, με αποτέλεσμα την απώλεια μιας λειτουργίας. Φυσικά, είναι δύσκολο για ένα μικρό μόριο να ενισχύσει την ανάκτηση μιας λειτουργίας. Ωστόσο, όπως επισημαίνεται σε μια προοπτική από τον Kaelin, (1999), η απώλεια λειτουργίας σε ένα μόριο συχνά συσχετίζεται με την απόκτηση λειτουργίας σε ένα άλλο. Η διάσπαση των ογκογόνων συμπλόκων είναι ένα άλλο δύσκολο πρόβλημα για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων. Για παράδειγμα, μια χρωμοσωμική μετατόπιση στον πυρήνα συνδετικού παράγοντα β προκαλεί το σχηματισμό μιας νέας χιμαιρικής πρωτεΐνης που δεσμεύει τις απαραίτητες υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα (Lukasik et al., 2002). Παρά τη δυσκολία σχεδιασμού ενός μικρού μορίου για τη διακοπή μιας ανεπιθύμητης πρωτεϊνικής σύνδεσης, η ειδική διεπαφή μεταξύ της πρωτεΐνης σύντηξης και του παράγοντα μεταγραφής παρέχει έναν στόχο που μπορεί να αξιοποιηθεί. Τέλος, η κακοήθεια συχνά μεταβάλλει τον στόχο από τη φυσιολογική του συμπεριφορά, γεγονός που οδηγεί σε ενδιαφέρον για τον σχεδιασμό εξειδίκευσης για την κακοήθη κατάσταση.

5.3 Η Χρήση Αλγορίθμων και Μηχανικής Μάθησης στην Πρόγνωση Φαρμακολογικής Δράσης

Η τεχνητή νοημοσύνη (TN) έχει μεταμορφώσει τη φαρμακολογική έρευνα μέσω της μηχανικής μάθησης, της βαθιάς μάθησης και της επεξεργασίας φυσικής γλώσσας. Αυτές οι εξελίξεις έχουν επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ανακάλυψη, την ανάπτυξη φαρμάκων και την ιατρική ακριβείας. Οι αλγόριθμοι τεχνητής νοημοσύνης αναλύουν τεράστια βιοϊατρικά δεδομένα εντοπίζοντας πιθανούς στόχους φαρμάκων, προβλέποντας την αποτελεσματικότητα και βελτιστοποιώντας τις κύριες ενώσεις. Η τεχνητή νοημοσύνη έχει ποικίλες εφαρμογές στη φαρμακολογική έρευνα, συμπεριλαμβανομένης της ταυτοποίησης στόχων, της επαναχρησιμοποίησης φαρμάκων, της εικονικής διαλογής, του *de novo* σχεδιασμού φαρμάκων, της πρόβλεψης τοξικότητας και της εξατομικευμένης ιατρικής. Η τεχνητή νοημοσύνη βελτιώνει την επιλογή ασθενών, τον σχεδιασμό δοκιμών και την ανάλυση δεδομένων σε πραγματικό χρόνο σε κλινικές δοκιμές, οδηγώντας σε βελτιωμένα αποτελέσματα

ασφάλειας και αποτελεσματικότητας. Η επιτήρηση μετά την κυκλοφορία στην αγορά χρησιμοποιεί συστήματα βασισμένα στην ΤΝ για την παρακολούθηση ανεπιθύμητων συμβάντων, την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων φαρμάκων και την υποστήριξη των προσπάθειών φαρμακοεπαγρύπνησης (Gupta et al., 2021).

Τα μοντέλα μηχανικής μάθησης εξάγουν μοτίβα από πολύπλοκα σύνολα δεδομένων, επιτρέποντας ακριβείς προβλέψεις και τεκμηριωμένη λήψη αποφάσεων, επιταχύνοντας έτσι την ανακάλυψη φαρμάκων. Η βαθιά μάθηση, συγκεκριμένα τα νευρωνικά δίκτυα συνελίξεων (CNN), υπερέχει στην ανάλυση εικόνων, βοηθώντας τον εντοπισμό βιοδεικτών και τη βελτιστοποίηση της φαρμακευτικής σύνθεσης. Η επεξεργασία φυσικής γλώσσας διευκολύνει την εξόρυξη και την ανάλυση της επιστημονικής βιβλιογραφίας, ξεκλειδώνοντας πολύτιμες γνώσεις και πληροφορίες (Carracedo-Reboredo et al., 2021).

Ωστόσο, η υιοθέτηση της τεχνητής νοημοσύνης στη φαρμακολογική έρευνα εγείρει ηθικούς προβληματισμούς. Η διασφάλιση του απορρήτου και της ασφάλειας των δεδομένων, η αντιμετώπιση της μεροληψίας και της διαφάνειας των αλγορίθμων, η λήψη συγκατάθεσης μετά από ενημέρωση και η διατήρηση της ανθρώπινης εποπτείας στη λήψη αποφάσεων αποτελούν κρίσιμες ηθικές ανησυχίες. Η υπεύθυνη ανάπτυξη της τεχνητής νοημοσύνης απαιτεί ισχυρά πλαίσια και κανονισμούς (Gupta et al., 2021).

Το μέλλον της ΤΝ στη φαρμακολογική έρευνα είναι πολλά υποσχόμενο, με την ενσωμάτωση με αναδυόμενες τεχνολογίες όπως η γονιδιωματική, η πρωτεωμική και η μεταβολωμική να προσφέρουν τη δυνατότητα εξατομικευμένης ιατρικής και στοχευμένων θεραπειών. Η συνεργασία μεταξύ ακαδημαϊκών, βιομηχανίας και ρυθμιστικών φορέων είναι απαραίτητη για την ηθική εφαρμογή της ΤΝ στην ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων. Η συνεχής έρευνα και ανάπτυξη τεχνικών ΤΝ και τα ολοκληρωμένα προγράμματα κατάρτισης θα δώσουν τη δυνατότητα στους επιστήμονες και τους επαγγελματίες του τομέα της υγείας να αξιοποιήσουν πλήρως τις δυνατότητες της ΤΝ, οδηγώντας σε βελτιωμένα αποτελέσματα για τους ασθενείς και καινοτόμες φαρμακολογικές παρεμβάσεις (Carracedo-Reboredo et al., 2021).

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, οι εφαρμογές της αλληλούχισης RNA ενός κυττάρου (scRNA-seq) στην ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων υπόσχονται τεράστια επανάσταση στον τομέα αυτό. Μέσω της ολοκληρωμένης σκιαγράφησης προφίλ μεμονωμένων κυττάρων, το scRNA-seq επιτρέπει στους ερευνητές να ξεδιαλώνουν την πολυπλοκότητα της κυτταρικής ετερογένειας, να εντοπίσουν νέους θεραπευτικούς

στόχους και να προωθήσουν την κατανόηση της φαρμακογονιδιωματικής. Με τη διαλεύκανση του μοριακού τοπίου διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών εντός όγκων και άλλων καταστάσεων νόσου, το scRNA-seq προσφέρει πρωτοφανείς γνώσεις σχετικά με τους υποκείμενους μηχανισμούς εξέλιξης της νόσου και της θεραπευτικής ανταπόκρισης. Η γνώση αυτή μπορεί να καθοδηγήσει την ανάπτυξη ακριβέστερων και αποτελεσματικότερων θεραπειών προσαρμοσμένων σε μεμονωμένους ασθενείς. Επιπλέον, η ενσωμάτωση δεδομένων scRNA-seq με υπολογιστικές μεθόδους ενισχύει περαιτέρω την ικανότητά μας να σχεδιάζουμε και να βελτιστοποιούμε θεραπευτικές παρεμβάσεις. Οι υπολογιστικές τεχνικές επιτρέπουν τη μοντελοποίηση και την προσομοίωση δομολειτουργικών στόχων, διευκολύνοντας την πρόβλεψη των φαρμακολογικών δράσεων και επιταχύνοντας τη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων.

Συνολικά, ο συνεργιστικός συνδυασμός της τεχνολογίας scRNA-seq και των υπολογιστικών προσεγγίσεων έχει τη δυνατότητα να μεταμορφώσει το τοπίο της ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων, εγκαινιάζοντας την εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής και των στοχευμένων θεραπειών. Η συνεχής πρόοδος σε αυτούς τους τομείς θα οδηγήσει αναμφίβολα στην καινοτομία και σε βελτιωμένα αποτελέσματα για τους ασθενείς που παλεύουν με ένα ευρύ φάσμα ασθενειών.

Βιβλιογραφία

Abbott, J., Ye, T., Ham, D., & Park, H. (2018). Optimizing nanoelectrode arrays for scalable intracellular electrophysiology. **Accounts of Chemical Research**, 51, 600-608.

Amaro, R. E., Baron, R., & McCammon, J. A. (2008). An improved relaxed complex scheme for receptor flexibility in computer-aided drug design. **Journal of*

- Computational Aided Molecular Design, 22*(9), 693–705.
<https://doi.org/10.1007/s10822-007-9159-2>
- Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, 25(4), 195-203.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A. C., et al. (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*, 39, 782–795.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.003>.
- Biswas, D., et al. (2019). A clonal expression biomarker associates with lung cancer mortality. *Nature Medicine*, 25, 1540–1548.
- Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983). CHARMM - a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4*(2), 187-217.
<https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>
- Bury, A. G., Pyle, A., Marcuccio, F., Turnbull, D. M., Vincent, A. E., Hudson, G., & Actis, P. (2022). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(18), 5483–5492. doi: 10.1007/s00216-022-03944-5.
- Cabanski, C. R., et al. (2014). cDNA hybrid capture improves transcriptome analysis on low-input and archived samples. *Journal of Molecular Diagnostics*, 16, 440–451.
- Cao, Y. H., Ma, E. B., Cestellos-Blanco, S., Zhang, B., Qiu, R. Y., Su, Y. D., Doudna, J. A., & Yang, P. D. (2019). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 7899–7904. doi: 10.1073/pnas.1818553116.
- Carracedo-Reboredo, P., Liñares-Blanco, J., Rodríguez-Fernández, N., Cedrón, F., Novoa, F. J., Carballal, A., ... & Fernandez-Lozano, C. (2021). A review on machine learning approaches and trends in drug discovery. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 4538-4558.
- Chen, R., Canales, A., & Anikeeva, P. (2017). Neural recording and modulation technologies. *Nat. Rev. Mater.*, 2, 16093.
- Choi, J. R., Yong, K. W., Choi, J. Y., & Cowie, A. C. (2020). Single-cell RNA sequencing and its combination with protein and DNA analyses. *Cells*, 9, Article 1130.
<https://doi.org/10.3390/cells9051130>

- Christen, M., Hünenberger, P. H., Bakowies, D., Baron, R., Bürgi, R., Geerke, D. P., ... van Gunsteren, W. F. (2005). The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *Journal of Computational Chemistry*, 26*(16), 1719-1751. <https://doi.org/10.1002/jcc.20303>
- Chung, W., Eum, H. H., Lee, H. O., Lee, K. M., Lee, H. B., Kim, K. T., et al. (2017). Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun*, 8, 15081. <https://doi.org/10.1038/ncomms15081>.
- Dehghannasiri, R., et al. (2019). Improved detection of gene fusions by applying statistical methods reveals oncogenic RNA cancer drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 15524–15533.
- DiMasi, J. A., Feldman, L., Seckler, A., & Wilson, A. (2010). Trends in risks associated with new drug development: success rates for investigational drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 87(3), 272-277.
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47, 20-33.
- Eisenstein, M. (2012). Oxford nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. *Nature Biotechnology*, 30, 295–296. [Link](#)
- Emrich, S. J., Barbazuk, W. B., Li, L., & Schnable, P. S. (2007). Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Research*, 17, 69–73.
- Fan, H. C., Fu, G. K., & Fodor, S. P. A. (2015). Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*, 347(6222), 1258367.
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7, 83-89.
- Fan, X., Zhang, X., Wu, X., Guo, H., Hu, Y., Tang, F., et al. (2015). Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos. *Genome Biol*, 16, 148. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0706-1>.
- Feynman, R. P. (1985). **QED: The Strange Theory of Light and Matter.** Princeton, NJ: Princeton University Press.

Fiers, W. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260, 500–507. [URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v260/n5551/abs/260500a0.html>]

Fischer, E. (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27, 2985-2993. <https://doi.org/10.1002/cber.18940270364>

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., & Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251, 767–773.

Font-Tello, A., et al. (2015). Association of ERG and TMPRSS2-ERG with grade, stage, and prognosis of prostate cancer is dependent on their expression levels. *The Prostate*, 75, 1216–1226.

Gambino, G., Tancredi, M., Falaschi, E., Aretini, P., & Caligo, M. A. (2015). Characterization of three alternative transcripts of the BRCA1 gene in patients with breast cancer and a family history of breast and/or ovarian cancer who tested negative for pathogenic mutations. *International Journal of Molecular Medicine*, 35, 950–956.

GenomeWeb. (2012). Helicos BioSciences Files for Chapter 11 Bankruptcy Protection. [Link](#)

Geng, W., Jiang, N., Qing, G. Y., et al. (2019). Click reaction for reversible encapsulation of single yeast cells. *ACS Nano*, 13(12), 14459-14467.

Gandhi, M., Bakhai, V., Trivedi, J., Mishra, A., De Andrés, F., Llerena, A., ... & Nair, S. (2022). Current perspectives on interethnic variability in multiple myeloma: Single cell technology, population pharmacogenetics and molecular signal transduction. *Translational Oncology*, 25, 101532.

Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11, 759–769. [Link](#)

Gorenjak, M., Goričan, L., Gole, B., Prosenc, U., Melén, E., Kabesch, M., ... & Potočnik, U. (2023). Exploration of Pharmacogenomic Biomarkers in Chronic Immune Diseases Using Single-Cell RNA Sequencing. In *4th Belgrade Bioinformatics Conference* (Vol. 4, pp. 55-56). Belgrade: Institute of molecular genetics and genetic engineering.

- Grant, B. J., Lukman, S., Hocker, H. J., Sayyah, J., Brown, J. H., McCammon, J. A., & Gorfe, A. A. (2011). Novel allosteric sites on Ras for lead generation. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018599>
- Greenleaf, W. J., & Sidow, A. (2014). The future of sequencing: Convergence of intelligent design and market Darwinism. *Genome Biology*, 15, 303.
- Gupta, R., Srivastava, D., Sahu, M., Tiwari, S., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2021). Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery. *Molecular diversity*, 25, 1315-1360.
- Gut, I. G. (2013). New sequencing technologies. *Clinical and Translational Oncology*, 15, 879–881. [Link](#)
- Gyanchandani, R., et al. (2016). Intratumor heterogeneity affects gene expression profile test prognostic risk stratification in early breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 22, 5362–5369.
- He, G., Hu, N., Xu, A. M., Li, X. L., Zhao, Y. L., & Xie, X. (2020). Adv. Funct. Mater., 30, 1909890. doi: 10.1002/adfm.201909890.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., et al. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.
- Han, L. O., Li, X. Y., Cao, M. M., Cao, Y., & Zhou, L. H. (2018). Development and validation of an individualized diagnostic signature in thyroid cancer. *Cancer Medicine*, 7, 1135–1140.
- Haque, A., Engel, J., Teichmann, S. A., & Lonnberg, T. (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Medicine*, 9(1), 75.
- Hehre, W. J. (2003). *A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations* (Vol. 2). Irvine, CA: Wavefunction.
- Heinrich, S., Craig, A. J., Ma, L., Heinrich, B., Greten, T. F., & Wang, X. W. (2021). Understanding tumour cell heterogeneity and its implication for immunotherapy in liver cancer using single-cell analysis. *Journal of Hepatology*, 74(3), 700-715.

- Heyer, E. E., et al. (2019). Diagnosis of fusion genes using targeted RNA sequencing. *Nature Communications*, 10, 1388.
- Hoheisel, J. D. (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nature Reviews Genetics*, 7*, 200–210.
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.
- Hopkins, A., & Groom, C. (2002). The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 727-730.
- Kahana, A., & Lancet, D. (2021). Self-reproducing catalytic micelles as nanoscopic protocell precursors. *Nat. Rev. Chem*, 5, 870-878.
- Kaelin, Jr., W. G. (1999). Choosing anticancer drug targets in the postgenomic era. *Journal of Clinical Investigation*, 104(11), 1503-1506.
- Kim, K. T., et al. (2016). Application of single-cell RNA sequencing in optimizing a combinatorial therapeutic strategy in metastatic renal cell carcinoma. *Genome Biology*, 17, 80.
- Kim, B. J., Cho, H., Park, J. H., et al. (2018). Strategic Advances in Formation of Cell-In-Shell Structures: From Syntheses to Applications. *Advanced Materials*, 30, Article e1706063.
- Kolodziejczyk, A. A., Kim, J. K., Svensson, V., Marioni, J. C., & Teichmann, S. A. (2015). The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Molecular Cell*, 58*(4), 610–620. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.005.
- Li, W., Liu, Z., Liu, C., et al. (2017). Manganese dioxide nanozymes as responsive cytoprotective shells for individual living cell encapsulation. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(45), 13661-13665.
- Li, H., Gharamah, A. A., Hambrook, J. R., Wu, X., & Hanington, P. C. (2022). Single-cell RNA-seq profiling of individual *Biomphalaria glabrata* immune cells with a focus on immunologically relevant transcripts. *Immunogenetics*, 74(1), 77-98.
- Loman, N. J., Quick, J., & Simpson, J. T. (2015). A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nature Methods*, 11–14. [Link](#)

Lukasik, S., Zhang, L., Corpora, T., Tomanicek, S., Li, Y., Kundu, M., ... & Biltonen, R. (2002). Altered affinity of CBFb-SMMHC for Runx1 explains its role in leukemogenesis. *Nature Structural Biology*, 9(9), 674-679.

Madison, J. T., & Holley, R. W. (1965). The presence of 5,6-dihydrouridylic acid in yeast “soluble” ribonucleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18, 153–157.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W., & Attiya, S. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376–380. [Link](#)

Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.

McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. **Nature*, 267,* 585-590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>

McGuire, A. F., Santoro, F., & Cui, B. (2018). Interfacing cells with vertical nanoscale devices: applications and characterization. **Annual Review of Analytical Chemistry**, 11, 101-126.

McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell*, 168(4), 613–628.

Men, A. E., Wilson, P., Siemering, K., & Forrest, S. (2008). Sanger DNA sequencing. *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*, 1-11.

Nyrén, P. L., & Lundin, A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Analytical Biochemistry*, 509, 504–509. [Link](#)

Ozsolak, F., & Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, 12, 87–98.

Pan, Y., Lu, F., Fei, Q., Yu, X., Xiong, P., Yu, X., et al. (2019). Single-cell RNA sequencing reveals compartmental remodeling of tumor-infiltrating immune cells induced by anti-CD47 targeting in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol*, 12, 124. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0822-6>.

Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52, 413–435. [Link](#)

Puram, S. V., et al. (2017). Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell*, 171(7), 1611–1624 e1624.

Quail, M. A. (2012). A tale of three next-generation sequencing platforms: Comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences, and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13, 341. [Link](#)

Roberts, K. G., et al. (2014). Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 371, 1005–1015.

Ryu, S., Kim, H., Kang, S., et al. (2017). Reversible cell layering for heterogeneous cell assembly mediated by ionic cross-linking of chitosan and a functionalized cell surface membrane. *Chemistry of Materials*, 29(13), 5294–5305.

Sanger, F., Brownlee, G., & Barrell, B. (1965). A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 13, 373–IN4. [URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283665801048>]

Sanger, F., Donelson, J. E., Coulson, A. R., Kossel, H., & Fischer, D. (1973). Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage f1 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 1209–1213.

Sanger, F. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265, 687–695. [URL: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nucleotide+sequence+of+bacteriophage+PhiX174#3>]

Salmen, F., et al. (2018). Barcoded solid-phase RNA capture for Spatial Transcriptomics profiling in mammalian tissue sections. *Nature Protocols*, 13(11), 2501–2534.

Salmen, F., De Jonghe, J., Kaminski, T. S., Alemany, A., Parada, G. E., Verity-Legg, J., ... & Brekel, F. V. D. (2022). High-throughput total RNA sequencing in single cells using VASA-seq. *Nature Biotechnology*, 40*(12), 1780–1793. doi: 10.1038/s41587-022-01361-8.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467–470.

- Seong, H., Higgins, S. G., Penders, J., Armstrong, J. P. K., Crowder, S. W., Moore, A. C., Sero, J. E., Becce, M., & Stevens, M. M. (2020). ACS Nano, 14, 5371–5381. doi: 10.1021/acsnano.9b08689.
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 550(7676), 345–353.
- Shembrey, C., Huntington, N. D., & Holland, F. (2019). Impact of Tumor and Immunological Heterogeneity on the Anti-Cancer Immune Response. *Cancers (Basel)*, 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11091217>.
- Shi, P., Zhao, N., Coyne, J., & Wang, Y. (2019). DNA-templated synthesis of biomimetic cell wall for nanoencapsulation and protection of mammalian cells. *Nature Communications*, 10, 2223.
- Shmoel, N., Rabieh, N., Ojovan, S. M., et al. (2016). Multisite electrophysiological recordings by self-assembled loose-patch-like junctions between cultured hippocampal neurons and mushroom-shaped microelectrodes. *Scientific Reports*, 6, 27110.
- Smith, L. M. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321, 674–679. [URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v321/n6071/abs/321674a0.html>]
- Spira, M. E., & Hai, A. (2013). Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nature Nanotechnology*, 8, 83–94.
- Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*, 20, 631–656.
- Stransky, N., Cerami, E., Schalm, S., Kim, J. L., & Lengauer, C. (2014). The landscape of kinase fusions in cancer. *Nature Communications*, 5, 4846.
- Stein, L. (2010). The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biology*, 11, 207. [Link](#)
- Sun, B., Xun, Z., Zhang, N., Liu, K., Chen, X., & Zhao, H. (2023). Single-cell RNA sequencing in cancer research: discovering novel biomarkers and therapeutic targets for immune checkpoint blockade. *Cancer Cell International*, 23(1), 313.

- Tan, C. L., Lindner, K., Boschert, T., Meng, Z., Rodriguez Ehrenfried, A., De Roia, A., ... & Green, E. W. (2024). Prediction of tumor-reactive T cell receptors from scRNA-seq data for personalized T cell therapy. *Nature Biotechnology*, 1-9.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., ... & Surani, M. A. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods*, 6*, 377–382. doi: 10.1038/nmeth.1315.
- Teague, S. J. (2003). Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2,* 527-541. <https://doi.org/10.1038/nrd1129>
- Tirosh, I., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*, 352(6282), 189–196.
- Van de Sande, B., Lee, J. S., Mutasa-Gottgens, E., Naughton, B., Bacon, W., Manning, J., ... & Ferran, E. (2023). Applications of single-cell RNA sequencing in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(6), 496-520.
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30. [Link](#)
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55, 641–658. [Link](#)
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25*(9), 1157-1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
- Wu, R., & Kaiser, A. (1968). Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology*, 35, 523–537.
- Xia, H. M., Wu, J. W., Zheng, J. J., et al. (2021). Nonlinear microfluidics: device physics, functions, and applications. *Lab Chip*, 21, 1241-1268.
- Yang, Y., Zhu, Q. Y., & Liu, J. L. (2021). Deciphering mouse uterine receptivity for embryo implantation at single-cell resolution. *Cell Proliferation*, 54*, e13128. doi: 10.1111/cpr.13128.
- Zhang, A., Zhao, Y., You, S. S., & Lieber, C. M. (2020). Nanowire probes could drive high-resolution brain-machine interfaces. *Nano Today*, 31, 100821.

Zheng, M., Hu, Z., Zhou, W., Kong, Y., Wu, R., Zhang, B., ... & Zhao, M. (2022). Single-cell transcriptome reveals immunopathological cell composition of skin lesions in subacute cutaneous lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 245, 109172.

Zhou, J. G., et al. (2019). Development and validation of an RNA-seq-based prognostic signature in neuroblastoma. *Frontiers in Oncology*, 9, 1361.

Zhu, C., Preissl, S., & Ren, B. (2020). Single-cell multimodal omics: the power of many. *Nature Methods*, 17(1), 11–14.