**MSc Translational Research in Biomedicine**

**Extra Academic Skills- Practical 1**

**Δημητρίου Δέσποινα ΑΜ: 365**

**ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: «ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ 4 ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ADAR1 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΥΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΥΠΟΜΕΘΥΛΙΩΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ».**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) συνιστούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών αιματολογικών νοσημάτων με αυξημένη πιθανότητα εκτροπής σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Η προσέγγιση της αιτιοπαθογένειας των ΜΔΣ κατέδειξε ότι τα νοσήματα αυτά χαρακτηρίζονται από διαταραχές μεθυλίωσης του DNA.1 Σήμερα, θεραπεία εκλογής για τα, κατά την ταξινόμηση, υψηλού κινδύνου ΜΔΣ, αλλά και την ΟΜΛ, αποτελεί η επιγενετική θεραπεία, η οποία στηρίζεται στους υπομεθυλιωτικούς παράγοντες (ΥΜΠ) αζακυτιδίνη (ΑΖΑ) και ντεσιταμπίνη (DAC).2,3 Δεδομένου ότι οι μισοί μόνο ασθενείς ανταποκρίνονται στην υπομεθυλιωτική αγωγή, ενώ οι λοιποί αποτυγχάνουν ή υποτροπιάζουν, γίνονται μελέτες για την ανεύρεση σχετικών για την επιγενετική θεραπεία προγνωστικών βιοδεικτών. Σημειωτέον, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της επιγενετικής θεραπείας παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος.4

Πρόσφατα, αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία εναλλακτικές ισομορφές τεσσάρων αναπτυξιακά ρυθμιζόμενων γονιδίων (CASC15, WDR76, SOBP και BRIP) με ενδεχόμενη ικανότητα πρόβλεψης του αποτελέσματος της θεραπείας με ΥΜΠ.5 Στο πρώτο σκέλος της παρούσας εργασίας στόχος υπήρξε η διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, ενώ στο δεύτερο σκέλος της το ενδιαφέρον στράφηκε στη μελέτη του ενζύμου ADAR1 που καταλύει την υδρολυτική απαμίνωση της αδενοσίνης σε ινοσίνη με υπόστρωμα δίκλωνα μόρια RNA (Α-σε-Ι RNA editing).6,7 Δεδομένα από την διεθνή βιβλιογραφία καταδεικνύουν την A-to-I επεξεργασία του RNA μέσω του ADAR1 ως μια σημαντική οδό στην εξέλιξη πολλών νεοπλασιών και υποστηρίζουν μια αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ ADAR1 και ΥΜΠ.8,9 Έτσι, παράλληλα με την πρώτη υπόθεση, ελέγχθηκε και η συσχέτιση των μεταβολών του ενζύμου ADAR1 με την έκβαση της επιγενετικής θεραπείας σε πρωτογενή δείγματα ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ..

Για το σκοπό αυτό, μονοπύρηνα κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας με φικόλη από προθεραπευτικά δείγματα μυελού των οστών από 54 συνολικά ασθενείς της Αιματολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης υπό θεραπεία με AZA ή DAC. Με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων, απομονώθηκαν αρχέγονα αιμοποιητικά CD34+ κύτταρα και πραγματοποιήθηκε εξαγωγή RNA, σύνθεση cDNA και τέλος ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με ειδικούς εκκινητές έναντι των τεσσάρων επιλεγμένων μεταγράφων CASC15, WDR76, SOBP και BRIP, καθώς και του γονιδίου ADAR1 και των δυο ισομορφών του, ADAR1p150 και ADAR1p110. Το γονίδιο αναφοράς σύμφωνα με το οποίο κανονικοποιήθηκαν τα αποτελέσματα στην qRT-PCR ήταν το GAPDH, ενώ για κάθε διαφορετικό γονίδιο που εξετάστηκε, διενεργήθηκε αντίστοιχο Mann-Whitney U στατιστικό test που έδωσε την ακριβή τιμή σημαντικότητας p.

Η μελέτη αυτή απέρριψε με τα πειραματικά της ευρήματα την υπόθεση ότι τα προϊόντα από το εναλλακτικό μάτισμα των τεσσάρων προτεινόμενων γονιδίων CASC15, WDR76, SOBP και BRIP ενέχουν προγνωστική αξία στην έκβαση της επιγενετικής θεραπείας, Ειδικότερα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p > 0.05) στην έκφρασή τους ανάμεσα σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (16 ασθενείς ελέγχθηκαν συνολικά) που έλαβαν υπομεθυλιωτική αγωγή και πέτυχαν πλήρη ύφεση (ομάδα CR) σε σχέση με όσους δεν αποκρίθηκαν στην ίδια θεραπεία (ομάδα FAIL), οπότε δεν επιβεβαιώθηκαν τα αρχικά ευρήματα που προέκυψαν από τις αντίστοιχες μελέτες σε μικρότερο αριθμό δειγμάτων. Επιπλέον, δεν βρέθηκε οι εναλλακτικές ισομορφές να διαθέτουν κάποιο κοινό πρότυπο έκφρασης που να επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζουν στην επιγενετική θεραπεία.

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης που εστιάστηκε στη σχέση ADAR1-ΥΜΠ έδειξαν αντιθέτως ότι πράγματι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά (p < 0.05) στην έκφραση του ενζύμου ADAR1 προθεραπευτικά, με την ομάδα των μη αποκρινόμενων στη θεραπεία με ΑΖΑ ή DAC ασθενών να εμφανίζει αυξημένα ποσοστά έκφρασης του ενζύμου (38 ασθενείς ελέγχθηκαν συνολικά). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης συνηγορούν υπέρ της αναφερόμενης και στη βιβλιογραφία διαπίστωσης ότι αποκλειστικά η ισομορφή p150 του ADAR1 σχετίζεται με αυξημένη ογκογονικότητα, εφόσον τα δεδομένα για την ισομορφή p110 δεν αναδείχθηκαν ως στατιστικώς σημαντικά (p> 0.05).

Καταλήγοντας, από την εν λόγω εργασία εξάγεται το συμπέρασμα ότι το ένζυμο ADAR1 συνιστά έναν δυνητικά αξιόλογο βιοδείκτη. Μελλοντικές μελέτες, εστιασμένες και σε άλλους υποπληθυσμούς κυττάρων πέραν των CD34+, δεδομένου ότι η έκφραση και η δραστηριότητα του ADAR1 φαίνεται να σχετίζεται με το επίπεδο της διαφοροποίησης των μυελοειδικών κυττάρων, πιθανότατα θα παρέχουν μια ακόμη πιο λεπτομερή κατανόηση της αλληλεπίδρασης των ΥΜΠ με το ADAR1.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. Corey, S. J. *et al.* Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 118–129 (2007).

2. Estephan, F. & Tiu, R. V. Current and novel therapeutic approaches in myelodysplastic syndromes. *J. Community Support. Oncol.* **12**, 236–249 (2014).

3. Garcia-Manero, G. & Fenaux, P. Hypomethylating agents and other novel strategies in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 516–523 (2011).

4. Odenike, O. Incorporating novel approaches in the management of MDS beyond conventional hypomethylating agents. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2017**, 460–469 (2017).

5. Kazachenka, A. *et al.* Epigenetic therapy of myelodysplastic syndromes connects to cellular differentiation independently of endogenous retroelement derepression. *Genome Med.* **11**, 86 (2019).

6. Kordella, C., Lamprianidou, E. & Kotsianidis, I. Mechanisms of Action of Hypomethylating Agents: Endogenous Retroelements at the Epicenter. *Front. Oncol.* **11**, (2021).

7. Lamers, M. M., van den Hoogen, B. G. & Haagmans, B. L. ADAR1: ‘Editor-in-Chief’ of Cytoplasmic Innate Immunity. *Front. Immunol.* **10**, 1763 (2019).

8. Roulois, D. *et al.* DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell* **162**, 961–973 (2015).

9. Chiappinelli, K. B. *et al.* Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell* **162**, 974–986 (2015).