

**A TELOMERÁZ FARMAKOLÓGIAI SZABÁLYOZÁSA:  
TELOMERÁZ-FÜGGŐ SEJTHALÁL INDUKCIÓJA  
KIMÉRA OLIGONUKLEOTIDOKKAL ILLETVE  
TRANSZ-RETINSAV/ARZÉN-TRIOXID KOMBINÁCIÓS  
KEZELÉSEL**

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

**Tárkányi Iлона**

Témavezető:  
Dr. Aradi János  
Dr. Evelyne Segal-Bendirdjian

Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum,  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Universite Paris XI,  
Faculte de Medecine Paris-Sud

Debrecen, 2005

## **A humán telomerek szerkezete**

A telomerek az eukarióta kromoszómák végein elhelyezkedő speciális DNS-protein komplexek, melyek fő szerepe a kromoszómák integritásának védelme. Repetitív szakaszokból felépülő 4-18 kilobázis hosszú DNS és telomerkötő fehérjék alkotják. Emberben, hasonlóan a többi gerinceshez, a DNS komponensben a TTAGGG szekvencia ismétlődik. A telomerikus DNS dupla hélixet alkot, kivéve a terminális 50-200 bázispárnnyi szakaszon, ahol a guanilátban gazdag lánc túlnyúlik. Ez a túlnyúló rész visszahurkolódik a duplaszálú telomer-szakaszba.

## **A lineáris kromoszómák „vég-replikációs problémája”**

A lineáris kromoszómák végének replikációja speciális problémát vet fel. A DNS-polimerázok ugyanis nem képesek a késlekedő szál 5' végén az RNS-primert DNS-sel pótolni, illetve maga a priming is random módon történik. Ezek eredményeként minden sejtosztódásnál elvész a kromoszómavég egy 50-200 bp-nyi szakasza. A genetikai információ fokozatos vesztese összeegyeztethetetlen az élettel, tehát a lineáris kromatinállományú organizmusoknak rendelkezniük kell a probléma megoldására alkalmas biokémiai mechanizmussal.

## **Telomer-fenntartó mechanizmusok**

A repetitív szakaszokból felépülő primer DNS struktúra előrevetítette a lehetséges telomer rekonstruáló celluláris megoldásokat. Az embrionális sejtek, a csírasejtek, a regenerálódó, proliferáló szövetek őssejtjei egy speciális, reverz transzkriptázként működő ribonukleoproteint, telomerázt, tartalmaznak, mely 451-tagú RNS- komponensének 11 nukleotidnyi szakaszát használva templátként, képes a telomer-DNS reszintézisére. A működését, nagy vonalakban, úgy kell elképzelni, hogy miután az RNS a túlnyúló egyszálú telomervéghez hibridizálódott, polimeráz aktivitása révén a katalitikus alegység

meghosszabbítja a kromoszómát, amihez templátként az RNS szolgál. Ezt követően a DNS transzlokálódik, s így a vége újabb telomerikus szekvenciákkal egészülhet ki. Amint azt a fentiekből sejteni lehet, az enzim esszenciális alkotórészei, legalább is in vitro, az RNS-komponens (hTR) és a katalitikus alegység (hTERT).

Mind a klinikai mintákban (főleg sarcomákban) mind az in vitro immortalizált sejt kultúrákban megfigyeltek olyan sejtpopulációkat, melyekben érzékeny telomeráz detektáló módszerekkel sem sikerült aktivitást kimutatni. E sejtekben az egyes telomerek hossza igen nagy heterogenitást mutatott és a megrövidült telomerek gyors, szelektív restitúciója volt jellemző. A kísérletes adatok sokasága végül arra a következtetésre juttatta a témával foglalkozókat, hogy a telomeráz mellett létezik egy másik, homológ rekombináción alapuló, telomer-fenntartó biokémiai megoldás is, melyet ALT-nek (Alternative mechanism for Lengthening Telomers) neveztek el. Az a tény azonban, hogy a sejtek jóval ritkábban választják ezt a mechanizmust már előrevetítette azt a ma már elfogadott tényt, hogy a telomeráz szerepe a daganatképződésben túlmutat a telomer reszintézist katalizáló hatásán.

### **A telomer-hipotézis**

A normál szomatikus sejtek replikatív potenciálja limitált: bizonyos számú osztódás után egy terminális proliferációs stop következik be. Ezen „replikatív öregedés” okát a telomerek felfedezése óta annak tulajdonítják, hogy azok progresszív eróziója egy kritikus hossz elérése után egy máig ismeretlen molekuláris mechanizmus révén az M1 fázisban terminálja a sejtciklust. A p53 és pRB gátlása révén ez a proliferációs limit megkerülhető, ám a sejtpopuláció bizonyos számú duplikáció után egy „krízis”-nek nevezett állapotba lép, melyet igen rövid telomerek, kromoszómális instabilitás, és az apoptózis morfológiai jegyeit magán viselő sejthalál jellemez. Amennyiben a sejtben a telomeráz, vagy az ALT-mechanizmus aktiválódik, az megmenekülhet a sejthaláltól. A hipotézist alátámasztó

kísérletes adatok nem sokáig vártak magukra. Hamar nyilvánvalóvá vált, hogy a normál felnőtt szomatikus sejtek nem tartalmaznak enzimatikusan aktív telomerázt, aminek várható következménye a telomer rövidülése.

Jelen ismereteink szerint az immortalizáció, így egy daganatos betegség kifejlődésének, alapfeltétele a telomer DNS rekonstrukciója. Ezen elméleti megfontolás alapján indult meg a klinikai minták szisztematikus feldolgozása, mely során a tumorok 85-95 %-a telomeráz pozitívnak bizonyult. Humán daganatok vizsgálatával próbáltak arra is választ kapni, hogy a telomer-fenntartás tulajdonságát a daganatképződés és/vagy progresszió mely fázisában szerzik meg a tumorsejtek. A jelenlegi álláspont szerint az aktív telomeráz megjelenése inkább a tumorsejt klonális evolúció fontos állomása, mint a carcinogenesisé.

### **A telomeráz szabályozása**

A szervezet egyes sejtpopulációinak aktuális telomeráz aktivitása az organizmus működését alapvetően befolyásoló tényező. Szabályozása várhatóan több szinten szervezett, és szoros kontroll alatt áll. Az első és legfontosabb szabályozási pont a hTERT transzkripció szintje. Emellett az utóbbi években ismertté vált, hogy egyes telomeráz aktivitást nem mutató normál és tumoros sejtpopulációkban, melyekben a hTERT átíródott, az mRNS alternatív splicing az aktivitás szempontjából esszenciális reverz transzkriptáz motívumok elvesztését eredményezte. A fentiek mellett a más fehérjéknél is szabályozó funkciót hordozó protein foszforiláció szerepét is sikerült kimutatni.

### **Telomeráz szerepe a klinikumban**

A telomeráz és a malignus daganatok közötti összefüggés felismerése óta próbálkoznak a telomeráz diagnosztikus és prognosztikus markerként történő felhasználásával. A kezdeti lelkesedés után, mely a malignus elváltozásokban való

nagyrányú előfordulása alapján „a daganatok diagnosztikus markeré”-vé kívánta előléptetni, ma már nyilvánvaló, hogy csupán a számos molekuláris marker egyikeként értékelhető.

A telomeráz felfedezésének legizgalmasabb klinikai konzekvenciája a telomeráz inhibitorok tumor kemoterápiás hasznosíthatósága.

### **Telomeráz inhibitorok**

A telomeráz-inhibitorok egyik legnagyobb csoportja az oligonukleotid típusúaké. Bár az elmúlt évtizedben az oligonukleotid-alapú gyógyszerek tervezése jelentősen visszaesett azok kedvezőtlen kémiai tulajdonságai miatt, a telomeráz gátlószerei kivételt jelentenek, mivel az enzim integráns RNS-komponense ideális célpontja az oligonukleotid szerkezetű inhibitoroknak. Emellett léteznek hagyományos értelemben vett antiszenszerek is, melyek célpontja a telomeráz katalitikus alegységének mRNS-e. Világszerte folynak kísérletek, melyek célja, hogy az oligonukleotid inhibitorok kémiai tulajdonságait előnyösen módosítsák, főképp, hogy azokat stabilabbá tegyék.

A telomeráz egyéb típusú gátlószereinek fejlesztése a mai napig is kevés eredményt hozott. A jelenleg talán legígéretesebb terület a telomeráz legfontosabb szabályozási lépését, a transzkripciót, illetve a permisszív kromatin szerkezetet kialakító mechanizmusok gátlása természetes és szintetikus hormonokkal.

### **Acut Promyelocytás Leukemia és terápiája**

Az acut promyelocytás leukemia az acut myeloid leukemiák egyik altípusa, melyet az éretlen sejtek felszaporodása mellett disszeminált intravaszkuláris koaguláció és a t(15;17) transzlokáció jellemez, mely a PML-RAR $\alpha$  onkoprotein létrejöttét eredményezi. Ez az aberráns transzkripciós faktor ligand hiányában illetve fiziológiás transz-retinsav (ATRA) koncentráció esetén is gátolja a transzkripció iniciációját és hiszton-deacetilázok

megkötésével segíti a non-permisszív kromatin-szerkezet fenntartását. Farmakológias retinsav-koncentrációk mellett azonban képes aktivációs komplexek kötésére, így a normál myeloid differenciációs program beindítására. A jelen klinikai gyakorlatban az ATRA ezen leukemia típusban az első választandó szer, általában kemoterápiával kiegészítve, mivel a monoterápia az esetek nagy részében szekunder retinoid rezisztencia kialakulását indukálja. A terápiában további előrelépést jelentett, amikor monoterápiaként, majd az ATRA-val kombinációban az arzén-trioxid is kiegészítette a gyógyszerek palettáját. Tekintettel a betegség jó prognózisára, állandó kutatás folyik alacsony toxicitású protokollok kifejlesztésére.

## CÉLKITŰZÉSEK

Irodalmi adatok szerint az anti-templát foszforotioát oligonukleotidok kompetitív módon viselkednek telomeráz-szubsztrát primerekkel szemben, ami felvetette a primer-kötő helynek nevezett, rendszeren a meghosszabbítandó DNS-hez kapcsolódó, fehérje motívummal való kölcsönhatásuk lehetőségét.

Célunk volt olyan oligonukleotid típusú telomeráz gátlószerek előállítását, melyek a jól ismert templát ellen irányuló DNS szekvencia mellett egy olyan szakaszt is tartalmaznak, melyek kölcsönhatásba lépnek a reverz transzkriptázokkal, így feltehetően a telomerázzal is.

- 1) Szintetizálni kívántunk olyan 13-tagú oligonukleotidokat, melyek 3' illetve 5' végükön egy  $(s^4dU)_n$  ( $n=4, 8, 16, 24$ ) láncot hordoznak, és meg kívántuk határozni a részlegesen tisztított telomeráz enzimen mérhető  $IC_{50}$  értéküket. Specificitásuk karakterizálására a HIV reverz transzkriptázon is mértük gátló hatásukat.
- 2) Célunk volt megvizsgálni az inhibitorok sejtbe illetve sejtmagba történő felvételét a legkedvezőbb farmakológiai tulajdonságokat mutató származék fluoreszcensen jelzett változatával.
- 3) A leghatékonyabb bejuttatási módszert használva tesztelni kívántuk a kiméra oligonukleotidokat immortális sejt kultúrákon, hogy meggyőződjünk telomeráz függő sejthalált okozó képességükről.

Az akut promyelocytás leukémia (APL) klinikai terápiája a retinoid gyógyszerekre épül. A transz-retinsavról (ATRA) bebizonyosodott, hogy a differenciációt okozó hatásától függetlenül is képes a telomeráz leregulálására, így figyelmünket elsősorban az ATRA más típusú telomeráz gátlószerekkel való kombinálásának lehetősége keltette fel. Kísérleteinkben elsősorban az ATRA és az  $As_2O_3$  feltehető szinergizmusára összpontosítottuk, mivel használatuk mind kombinációs, mind szekvenciális terápiaként előnyösnek bizonyult.

- 1) Be kívántuk bizonyítani, hogy az ATRA / $As_2O_3$  terápia sikere, legalább is részben, annak köszönhető, hogy szinergista módon képesek a telomeráz expressziójának csökkentésére.
- 2) Céljaink között szerepelt, hogy feltérképezzük, elégséges-e ez telomer-rövidülés és következményes sejthalál előidézésére olyan APL sejtvonalakban, melyekben retinoidok nem képesek differenciálódás előidézésére.
- 3) Korábbi kutatások az ATRA / $As_2O_3$  szinergizmusának szinte egyetlen okaként a PML-RAR $\alpha$  modulálását/lebontását jelölték meg. Miután ez utóbbi szerepe a telomeráz szabályozásában nem valószínű, fontos a retinoidok telomerázra gyakorolt repressziós hatásának okát megvizsgálnunk, hogy megtaláljuk a farmakológiai konvergencia lehetséges pontjait.



## ANYAGOK, MÓDSZEREK

### **A telomeráz részleges tisztítása**

A részlegesen tisztított telomerázt a HL-60 sejtextraktumából állítottuk elő  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapással illetve azt követő DEAE-Sepharose ioncserélő kromatográfiás tisztítással.

### **Oligonukleotidok**

Az inhibitor oligonukleotidokat és jelzett variánsait laborunkban állítottuk elő standard foszforamidit kémiával, a Pharmacia Gene Assembler Plus oligonukleotid szintetizáló készülékkel. Tisztításuk anioncserélő kromatográfiával történt.

### **Inhibitorok kinetikai paramétereinek mérése**

Az oligonukleotid inhibitorok gátlási kinetikájának mérésekor a Two-Primer Telomeric Repeat Amplification Protocol-t (TP-TRAP assay) használtuk. Az  $\text{IC}_{50}$  értékeket grafikusán határoztuk meg a GraphPAD Prism 2.01 program segítségével.

### **Oligonukleotidok felvételének vizsgálata**

A431 sejteket kezeltünk Cy5 jelölt kiméra oligonukleotidokkal és Oligofectamine<sup>TM</sup>-nal. A kezelést követően a sejteket fixáltuk, majd a sejtmagot etidium-bromiddal, a sejtmembránt Alexa Fluor 488 jelzett EGF-receptor elleni antitestekkel jelöltük. Az inhibitorok sejtben való elhelyezkedését konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal néztük.

### **Hosszú-távú oligonukleotid kezelés**

293T sejteket kezeltünk különböző koncentrációjú inhibitorral kationos lipidek jelenlétében. A kultúrákat 48-72 óránként sejtszámlálást követően passzáltuk és ismét kezeltük. Telomeráz aktivitásukat TRAP-assay segítségével mértük.

### **Szenescencia vizsgálata**

A szenescencia detektálása a szenescencia-függő béta-galaktozidáz aktivitás citokémiai kimutatásával történt.

### **Acut promyelocytas leukemia sejtvonalak kezelése**

Az NB4-R1/R2/R1<sup>SFD</sup> retinoid rezisztens acut promyelocytas leukemia sejteket 1 $\mu$ M ATRA és/vagy 0,2  $\mu$ M As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kombinációjával kezeltük.

A kezelések hatásának követésére a következő módszereket alkalmaztuk:

- 1) Sejtszámlálás Coulter counterrel
- 2) Real-time kvantitatív PCR (LightCycler technológia és LightCycler teloTTAGGG hTERT Kit, Roche Diagnostics) a telomeráz katalitikus alegység (hTERT) expressziójának mérésére.
- 3) TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol)-assay a telomeráz aktivitás mérésére. (TRAPeze Elisa Telomerase Detection Kit, Qbiogen)
- 4) Telomeráz-specifikus sejtválaszként az átlagos telomer-hosszt követtük TRF (Terminal Restriction Fragment)-analízis (TeloTTAGGG Telomere Length Assay, Roche Diagnostics) segítségével.

### **A DNS-metiláció hatásának követése**

A DNS metiláció hatását a metilációt gátló 5'-azacitidines kezelés után, a hTERT expressziójának real-time kvantitatív PCR segítségével történő meghatározásával detektáltuk.

### **Kromatin Immunprecipitáció (ChIP)**

A ChIP assay-t a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate) segítségével végeztük el, az amplifikált génszakasz a hTERT promoter -712/-435 szakaszának felelt meg.

## EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### TELOMERÁZ FÜGGŐ SEJTHALÁL TELOMERÁZ GÁTLÓ KIMÉRA OLIGONUKLEOTIDOK HATÁSÁRA

#### 1) 3' illetve 5' végi (s<sup>4</sup>dU)<sub>n</sub> hatása a 13-tagú antiszensz telomeráz gátló hatására

Korábbi kísérletsorozatok a 35-tagú 4-tio-dezoxiuridilát homooligomert [(s<sup>4</sup>dU)<sub>35</sub>] a HIV-reverz transzkriptáz potens gátlószereként azonosították, majd bizonyítást nyert, hogy ezen oligonukleotid a telomeráz enzimet is hatékonyan gátolja.

Megfigyeléseink alapján terveztünk egy olyan oligonukleotid családot, mely a telomeráz RNS-komponensének templát szakaszára irányuló 13-tagú komplementer részből és annak 3' illetve 5' végéhez kapcsoltn, a protein alegységet célzó, feltehetően hamis szubsztrátként működő, különböző hosszúságú 4-tio-dezoxiuridilát szakaszból áll. Kontrollként a kiméra csak antiszensz és csak kémiaiilag módosított részét tartalmazó inhibitorok is elkészültek. Az antiszensz rész szekvencia specificitását olyan molekulákkal ellenőriztük, melyben az inhibitorok antiszensz szakaszát kevert (scrambled) szekvenciát hordozó szakasszal helyettesítettük. Az oligonukleotidok tesztelését HL-6O sejtekből származó részlegesen tisztított telomeráz enzimen végeztem az úgynevezett Two-primer TRAP-assay segítségével. A kapott aktivitásértékek alapján meghatároztam az egyes származékokra vonatkozó IC<sub>50</sub> értékeket. Az inhibitorok specificitását úgy vizsgáltuk, hogy HIV reverz transzkriptáz gátló hatásukat is mértük. Kísérleteim során az inhibitorokat a telomerázzal illetve reverz transzkriptázzal mintegy 10 percig előinkubáltam, mivel előzetes méréseink alapján ez szükséges a maximális hatás kifejlődéséhez.

A szekvencia-specifikus oligonukleotidok esetén a gátlóhatás a tiolált (4-tio-dezoxiuridilát) szakasz hosszával növekedett mind az 5', mind a 3' végi módosítás esetén. A módosított bázisokat 5' végen tartalmazók hatékonysága azonban tendenciaszerűen

meghaladta a 3' módosítottakét. A tiolált szakasz 5' végi beépítésével az inhibíció a hagyományos, templát-régiót célzó antiszenszhez képest is növekszik, és ez nem a tiolálás során az antiszenszben bekövetkező, esetleges váratlan kémiai átalakulással magyarázható, amint ezt kontrolljaink is igazolták. A kevert szekvencia önmagában hatástalan telomeráz-gátlás szempontjából, és a tiolált szakasz növelésével is rendre gyengébben gátol, mint szekvencia-specifikus párja. A homo-oligomerek esetén csak a nagyobb lánchosszúak esetén láthattunk inhibíciót. A hosszú (n=16, 24) kémiaiilag módosított szakaszt tartalmazó molekulák esetén azt is megállapíthattuk, hogy bár telomeráz gátló hatásuk jobb, mint rövidebb párjaiké, ám specifitásuk alacsony, melyet az egyidejű reverz transzkriptázt gátló aktivitás emelkedése jelzett. Eredményeink megerősítik a „kettős támadáspont” hipotézisünket, miszerint a  $(s^4dU)_nAS$  szerkezetű kimérák antiszensz (AS) része a telomeráz RNS templát régiójával alkot kettős hélixet, míg az  $(s^4dU)_n$  szakasz a fehérjével lép kapcsolatba, és e két kölcsönhatás erősíti egymást. Tekintve, hogy az antiszensz rész 3' végét olyan telomer szekvenciák alkotják, melyeket az enzim szubsztrátként használhat, felvetődött, hogy ennek a gátlásban is szerepe lehet. Bár nem zárhattuk ki azt a lehetőséget, hogy a telomeráz meg tudja hosszabbítani az ilyen típusú molekulákat, az inhibitorok 3' funkcióját kémiaiilag blokkolva meggyőződünk arról, hogy ennek a gátlásban szerepe nincs.

## 2) Oligonukleotid inhibitorok felvétele élő sejtekbe

Előzetes méréseink alapján sejt-kultúrában történő vizsgálatra az  $(s^4dU)_4AS$  vagy  $(s^4dU)_8AS$  ( $IC_{50} = 134$  és  $38$  nM) molekulák a legalkalmasabbak. Tekintve, hogy az  $(s^4dU)_{35}$  és általában az oligonukleotidok sejtbe történő felvétele általában nem megfelelő, megvizsgáltuk a kimérák kationos lipidek (Oligofectamine™) segítségével bejutatható-e a sejtekbe illetve a sejtmagba. Elkészítettük az  $(s^4dU)_4AS$  és  $(s^4dU)_8AS$  fluoreszcencián (Cy5) jelzett változatait és a molekulák bejutását konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal

tanulmányoztuk. A látott kép azt bizonyította, hogy kezelt sejtekben az inhibitorok mind a citoszolban, mind a sejtmagban jelen vannak, így sejtes rendszerekben is használhatók telomeráz gátlására.

### 3) Telomeráz pozitív sejtek hosszú távú inhibitor-kezelése

A telomeráz aktivitás gátlása nem vezet a sejtek azonnali elhalásához. A telomer-  
fenntartó mechanizmus eliminálása csupán lehetőséget teremt a telomerek replikáció-függő  
megrövidülésére. Érthető tehát, hogy a telomeráz inhibitorok fenotípusban is megjelenő  
hatásának vizsgálatához az adott szer folyamatos adagolására van szükség hosszú időn  
keresztül. Kísérleteink során a 293T (humán embrionális vese) sejtek rövid telomerű variánsát  
kezeltük 1-3  $\mu\text{M}$   $(\text{s}^4\text{dU})_8\text{AS}_{(2\text{PS})}$ -sel kationos lipidek jelenlétében, a kezeléseket 48-72h-ként  
ismételve. Az  $(\text{s}^4\text{dU})_8\text{AS}_{(2\text{PS})}$  a kinetikai méréseknél használt  $(\text{s}^4\text{dU})_8\text{AS}$ -tól mindössze  
annyiban különbözik, hogy a stabilitás növelésére a 3' végen az utolsó két internukleotid  
kötést foszforotioátra változtattuk. A 3  $\mu\text{M}$  inhibitorral kezelt sejtek telomeráz aktivitása a  
kezelést követő 24 órában mintegy 75%-kal csökkent, és 72 óra múlva is csupán a kezeletlen  
sejtek 50%-ának felelt meg. A kevert szekvenciát tartalmazó  $[(\text{s}^4\text{dU})_8\text{SCR}_{(2\text{PS})}]$  kontroll esetén  
csupán 10%-nyi csökkenést tapasztaltunk 24h múlva. A kezelés hatásának bizonyítékeként a  
3  $\mu\text{M}$   $(\text{s}^4\text{dU})_8\text{AS}_{(2\text{PS})}$ -sel kezelt sejtek proliferációja lelassult, majd 20-25 nap múlva a  
populáció teljesen kihalt. A telomeráz-függő sejthalálhoz morfológiailag hagyományosan a  
szeneszcenciát kapcsolják, ám mára világossá vált, hogy ez korántsem törvényszerű és az  
aktuális sejt molekuláris háttere függvényében eltérő lehet. Kísérleteink során olyan  
sejtvonalat használtunk, mely a T-antigén miatt a p53 fehérje funkcionálisan inaktívnak  
tekinthető. Mivel a szeneszcencia p53 hiányában gyakran elmarad, így nem meglepő módon  
kísérleteinkben is ezt tapasztaltuk.

## TELOMERÁZ FÜGGŐ SEJTHALÁL INDUKCIÓJA TRANSZ-RETINSAV/ARZÉN-TRIOXID KOMBINÁCIÓS KEZELÉSEL

### **1) ATRA /As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kombinációs kezelés hatása retinoid rezisztens promyelocytás leukemia sejtvonalak telomeráz expressziójára**

Az acut promyelocytás leukemia sejtek többsége, illetve az NB4 APL sejtvonal sejtjei is, transz-retinsavval granulocytákká differenciálhatók. Bebizonyosodott azonban, hogy a hosszú távú ATRA kezelés olyan sejtvonalakban (NB4-LR1) is sejthalálhoz vezethet, melyek rezisztensek a retinoidok terminális differenciációt okozó hatására. Ezt a hatást egyértelműen a telomeráz transzkripciós downregulációjával magyarázták. Hasonló hatás volt elérhető szintetikus RAR $\alpha$  és RXR-agonisták kombinációjával nem csak az NB4-LR1 sejtekben, hanem az NB4-LR2 sejtekben is, melyek a PML-RAR $\alpha$  egy mutáns formáját hordozzák, így retinoidokra hagyományosan nem reagálnak. Az NB4-LR1<sup>SFD</sup> vonal sejtjei azonban erre a kezelésre sem reagálnak. Mivel ismertük az ATRA /As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kombináció klinikai hatékonyságát és korábbi közleményekben mindkettőt kapcsolatba hozták a telomeráz katalitikus alegységének (hTERT) transzkripciós szabályozásával, sejtjeinket (NB4-LR1/LR2/LR1<sup>SFD</sup>) terápiás tartományú (1  $\mu$ M) transz-retinsavval és/vagy szubterápiás dózisu (0,2  $\mu$ M) arzenittel kezeltük. A sejtekben egyértelműen kimutatható volt a telomeráz fehérje mRNS-ének csökkenése, mely a sejtben mérhető telomeráz-aktivitás csökkenéséhez, majd a telomerek rövidüléséhez vezetett.

### **2) Hosszú távú ATRA /As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> expozíció hatása a sejtek viabilitására**

A szerek folyamatos adagolása mellett azt tapasztaltuk, hogy a kombináció mindhárom retinoid-rezisztens kultúrában csökkentette a sejtek életképességét, mely végül a teljes populáció kihalásához vezetett. Azon tény, hogy tapasztalt hatás a telomeráz gátlásával függ össze, megerősítettük ektópiásan telomerázt expresszáló klónok segítségével, amelyekben a kezelés hónapok múlva sem vezetett sejthalálhoz.

E megfigyelések klinikai jelentősége abban rejlik, hogy felvetik egy időben kiterjesztett, csökkentett dózisú terápiás protokoll létjogosultságát. Alátámasztja ezt az a nemrégiben napvilágot látott klinikai tanulmány is, mely a hagyományos ATRA és kemoterápia, illetve az ATRA /As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> relapszusban történő alkalmazása helyett az ATRA /As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kombinációt első helyen alkalmazó indukciós és fenntartó kezelések előnyösebb voltát ismertette.

### **3) A kromatinszerkezet változásának szerepe a hTERT expresszió ATRA illetve ATRA /As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kezelés hatására bekövetkező csökkenésében**

Tekintve, hogy a retinoid receptorok szerepe illetve a PML-RAR $\alpha$  onkoprotein hatása összefügg a kromatinszerkezet módosításával, és irodalmi adatok szerint a hTERT promoterének epigenetikus változásai oki tényezőként szerepelnek a telomeráz szöveti differenciáció során tapasztalt csökkenésében, megvizsgáltuk a DNS-metiláció és a hiszton-acetiláció szerepét kezelésünk során. A DNS metilációját gátló 5'-azacitidinnel történő kezelés hatását vizsgálva megállapíthattuk, hogy a metilációnak sem a sejtvonalak saját hTERT-expressziójának fenntartásában, sem a kezelés okozta változásokban nincs szerepe. A hTERT promoteréhez tartozó hisztonok acetilációját nézve kromatin immunprecipitáció segítségével, első eredményeink fényében, a következő feltételezésünk alakult ki. A NB4 sejtek differenciálódása során már órák múlva tapasztalható a proximális hisztonok deacetilációja, míg a differenciáció jeleit nem mutató NB4-LR1-ben ez csak napok múlva jelentkezik, ekkor azonban jól látható a kombinációs kezelés okozta jelentősebb csökkenés a retinoidokhoz képest. Az NB4-LR2 populációban több napos kezelés után sem találtunk eltérést a hisztonok vizsgált kovalens módosításaiban. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy mutáns PML-RAR $\alpha$  onkoproteinje kevésbé képes nukleoprotein-komplexek aktiválására. Az NB4-LR1<sup>SFD</sup> estén a hiszton-acetiláció változása sem a hTERT promóterén sem a pozitív kontrollként használt RAR $\alpha$  célgén (RAR $\beta$ ) promóterén nem következett be.



Feltételezhető, hogy ezen sejtekben, ahol a retinoid rezisztencia oka még nem karakterizált genetikailag, az all-transz retinsav szignalizációs útvonalán egy olyan defektus lehet, mely nem csupán a telomeráz fehérje génjét érinti. Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy az ATRA/As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kezelés hatása nem vezethető vissza kizárólagosan a kromatinszerkezet módosulására.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az telomeráz gátlására irányuló kísérletek legtöbbje egyetlen terápiás célpont gátlását vizsgálta, ugyanakkor ésszerűnek látszik az a feltételezés, hogy a szelektivitás és hatékonyság javulása, sőt az *in vivo* rezisztencia kifejlődésének csökkenése szempontjából is előnyösebb az egyes stratégiák kombinálása, akár a telomeráz holoenzim különböző komponenseinek egyidejű gátlásával (oligonukleotid kimérák), akár ugyanazon célpontot támadó eltérő hatásmechanizmusú szerek kombinációjával (ATRA /As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Tekintve a telomeráz kulcsszerepét az immortalis állapot fenntartásában a daganatok több szabályozási ponton is túlbiztosítják a telomeráz háztartásukat. A telomeráz gátlása során elengedhetetlen a küszöbértékek figyelembe vétele, azaz mennyire kell a transzkripciót csökkenteni, hogy az enzimaktivitásban is megjelenjen, és mennyire kell az aktivitást csökkenteni, hogy az a termék (azaz a telomer-végi szakaszok) csökkenésében is jelentkezzen. A gátló gyógyszerek esetén tehát csak akkor beszélhetünk sikeres próbálkozásról amennyiben képesek vagyunk a célhatás, azaz a sejthalál kimutatására, ami sokszor hónapokat vesz igénybe.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkámat az alábbiakban tudnám összefoglalni:

### I.

1. Terveztünk egy olyan oligonukleotid családot, mely a telomeráz RNS-komponensének templát szakaszára irányuló 13-tagú komplementer részből és annak 3' illetve 5' végéhez kapcsoltan, a protein alegységet célzó, feltehetően hamis szubsztrátként működő, különböző hosszúságú 4-tio-dezoxiuridilát szakaszból áll, és in vitro karakterizáltuk inhibíciós paramétereiket.
2. Kimutattuk a potens és specifikus hatásúnak bizonyult  $(s^4dU)_8AS_{(2PS)}$  sejtbe való felvételét.
3.  $(s^4dU)_8AS_{(2PS)}$ -t hosszú távú kezelésként alkalmazva az immortális sejtpopuláció teljes kihalását is elő tudtuk idézni.

### II.

1. Kimutattuk, hogy az arzén-trioxid és az transz-retinsav szinergista módon csökkenti a telomeráz-expressziót még a retinoid rezisztens promyelocytás leukemia sejtvonalakban is. Az expresszió csökkenése a telomeráz aktivitást jelentősen csökkentette, mely a telomerek lerövidülését idézte elő.
2. A hosszú távú, alacsony dózisban alkalmazott kombináció elégségesnek bizonyult a sejtvonalak teljes elölésére.
3. Megállapítottuk, hogy az ATRA/ $As_2O_3$  kezelés szinergista hatása nem vezethető vissza kizárólagosan a kromatinszerkezet módosulására.