

Streszczenie

Telomeraza jest kompleksem rybonukleoproteinowym o aktywności odwrotnej transkryptazy, który katalizuje wydłużanie telomerowych zakończeń chromosomów. Aktywność tego enzymu jest niewykrywalna w większość ludzkich komórek somatycznych ze względu na represję transkrypcyjną jej katalitycznej podjednostki hTERT (ang. *human telomerase reverse transcriptase*) podczas wczesnego rozwoju zarodkowego. W ponad 90% nowotworów podjednostka hTERT ulega nadekspresji, a jej aktywacja jest podstawowym etapem kancerogenezy. Ponadto, istnieje coraz więcej dowodów na istnienie niekanonicznych, poza-telomerowych funkcji podjednostki hTERT w komórkach nowotworowych. Przypuszczalnie, niektóre z nich są związane z modyfikacjami oporności na leki, potencjału proliferacyjnego i zdolności adhezyjnych, co promuje inwazyjny wzrost i przeżycie komórek nowotworowych. Najnowsze dane literaturowe ujawniają jej onkogenny charakter, który obejmuje zaangażowanie w proces naprawy uszkodzeń DNA, funkcję mitochondriów, transkrypcję genów, mechanizm przerzutowania itp. Taka charakterystyka powoduje, że telomeraza jest postrzegana jako ważny i stosunkowo specyficzny marker komórek nowotworowych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była identyfikacja mechanizmów uwrażliwienia nowotworów na terapię przeciwnowotworową i modyfikacji zdolności migracyjnych poprzez obniżenie ekspresji i aktywności telomerazy w modelu raka piersi. Badania obejmowały wykorzystanie interferencji RNA skierowanej przeciwko hTERT w celu modulacji oporności na leki, proliferacji i potencjału adhezyjnego w liniach komórkowych MCF7 i MDA-MB-231. Komórki poddano transdukcji wektorem lentiwirusowym zawierającym shRNA hTERT, a jako modelowy środek przeciwnowotworowy wybrano doksorubicynę.

Pierwszy etap obejmował stworzenie stabilnego i wydajnego protokołu transdukcji. Natomiast model eksperymentalny został wybrany na podstawie badań wstępnych i rozległych danych literaturowych, potwierdzających podwyższoną ekspresję i aktywność telomerazy w komórkach raka piersi. Efektywność systemu wyciszającego hTERT oceniono na poziomie transkryptu i białka. Dodatkowo spadek aktywności telomerazy sprawdzono za pomocą testu TRAP. Badanie wykazało, że obniżenie poziomu hTERT przy wykorzystaniu systemu lentiwirusowego wywołało wyraźne obniżenie przeżywalności komórek raka piersi. Ponadto, wyniki MTT i testu klonogenności wykazały również, że zredukowana aktywność telomerazy doprowadziła do uwrażliwienia komórek na doksorubicynę.

W następnym etapie aby zidentyfikować wpływ na potencjał proliferacyjny w komórkach raka piersi, przeprowadzono długoterminową ocenę czasu podwojenia. Zaobserwowano znaczne zmniejszenie potencjału proliferacyjnego komórek obu linii. Komórki MCF7 utraciły zdolność do przeżycia po 9 tygodniach od procesu transdukcji, a komórki MDA-MB-231 wykazały wydłużony czas podwojenia, ale ich potencjał podziałowy został podtrzymany. Przeprowadzono analizę cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej, aby wyjaśnić te rozbieżności między wykorzystanymi liniami komórkowymi. Dane wykazały wzrost odsetka komórek linii MCF7 w populacji G0/G1 i spadek w fazie S/G2. W przypadku komórek linii MDA-MB-231 zaobserwowano wzrost frakcji komórek martwych. Dodatkowo w obu przypadkach poziom markera proliferacji, białka Ki-67 uległ obniżeniu. Efektowi temu towarzyszył znaczny spadek zdolności do adhezji i migracji (badanych za pomocą testów funkcjonalnych), a także zmiany w odpowiednich szlakach przekazywania sygnału. Przejawiało się to znacznym spadkiem w poziomach poszczególnych białek (β 1-integryny, paksyliny, c-Src, FAK) wraz ze zmniejszeniem ich fosforylacji.

Ostatni etap obejmował identyfikację, typu śmierci komórkowej. W komórkach linii MCF7 odnotowano akumulację β -galaktozydazy, tj. głównego markera starzenia wraz ze wzrostem poziomu białka p21. Dodatkowo w komórkach MDA-MB-231 aktywacji uległ proces autofagii. Odnotowano podwyższony poziom markerów tego procesu tj. Atg5, bekliny-1, LC3 II / LC3 I oraz znaczny spadek białka p62.

Wyniki te dostarczają nowych dowodów na poparcie niekanonicznej funkcji hTERT. Ostatnie badania wykazały, że w komórkach pozbawionych ekspresji tej podjednostki doszło do zasadniczych zmian w obrębie zmniejszonej ruchliwości i onkogenności. Korelacja ta pozostaje jednak niewyjaśniona. Obecnie jest to nadal nowa koncepcja i do tej pory tylko kilka pozycji literaturowych podjęło tę tematykę. Uzyskane wyniki powinny przyczynić się do zrozumienia roli telomerazy w nowotworach i zwiększenia skuteczności eliminacji komórek nowotworowych, szczególnie tych wykazujących oporność na stosowaną terapię, czy o znacznym stopniu agresywności. Zbadanie sposobu zaangażowania podjednostki hTERT w regulację procesów adhezji i migracji może stanowić obiecujący fundament dla rozwoju bardziej efektywnych terapii przeciwnowotworowych celujących, również w mechanizm przerzutowania.

Poznań, 03.06.2020 r.

Aleksandra Romanowska-Dębska