

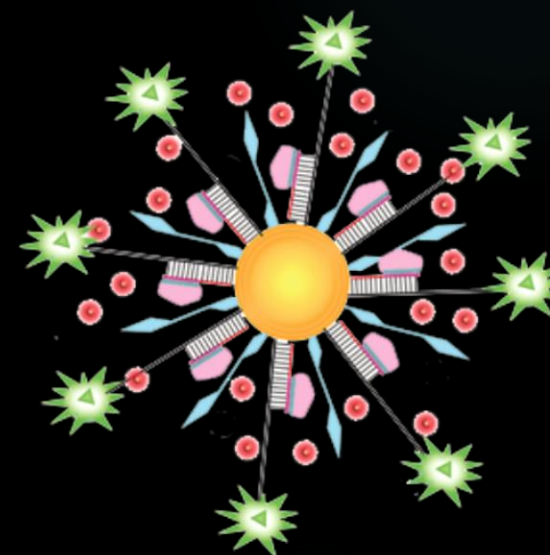
A Telomerase-specific Doxorubicin-releasing Molecular Beacon for Cancer Theranostics

Yi Ma, Zhaohui Wang, Min Zhang, Zhihao Han, Dan Chen, Qiuyun Zhu,
Weidong Gao, Zhiyu Qian, and Yueqing Gu

Angew. Chem. Int. Ed. 2016
doi: 10.1002/anie.201509182

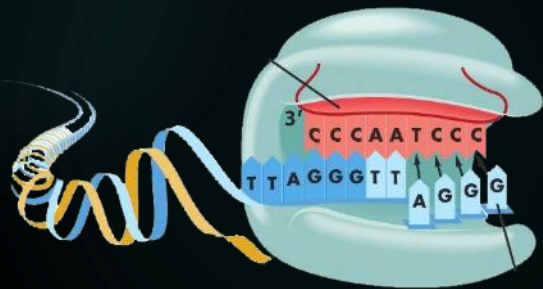
Cserép Gergely

Csoportgyűlés, 2016. február 22.



A Telomerase-specific Doxorubicin-releasing Molecular Beacon for Cancer Theranostics

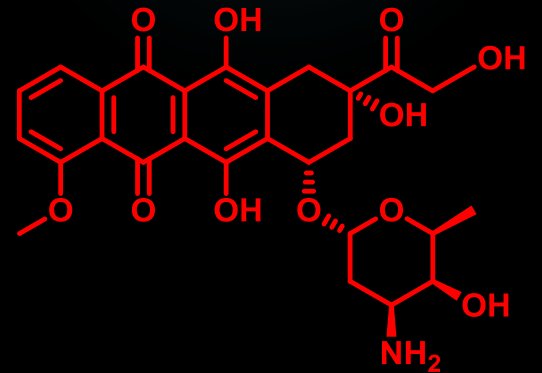
... telomeráz-specifikus, ...



... Doxorubicin felszabadulással hat.



... ami molekuláris „fáklyák”/„bóják” segítségével, ...



Olyan rákdiagnosztikai és kezelési módszer...

A telomerek és a telomeráz

Telomer

DNS-szál két végén található rövid, többszörösen ismétlődő szakasz

- ▶ emlősállatoknál a TTAGGG kód ismétlődik több ezerszer
- ▶ megakadályozza, hogy a kromoszómavégek összetapadjanak
- ▶ a sejtosztódás során védi a DNS-t a folyamatos rövidülés káros hatásaitól
- ▶ minden osztódáskor egyre fogy...

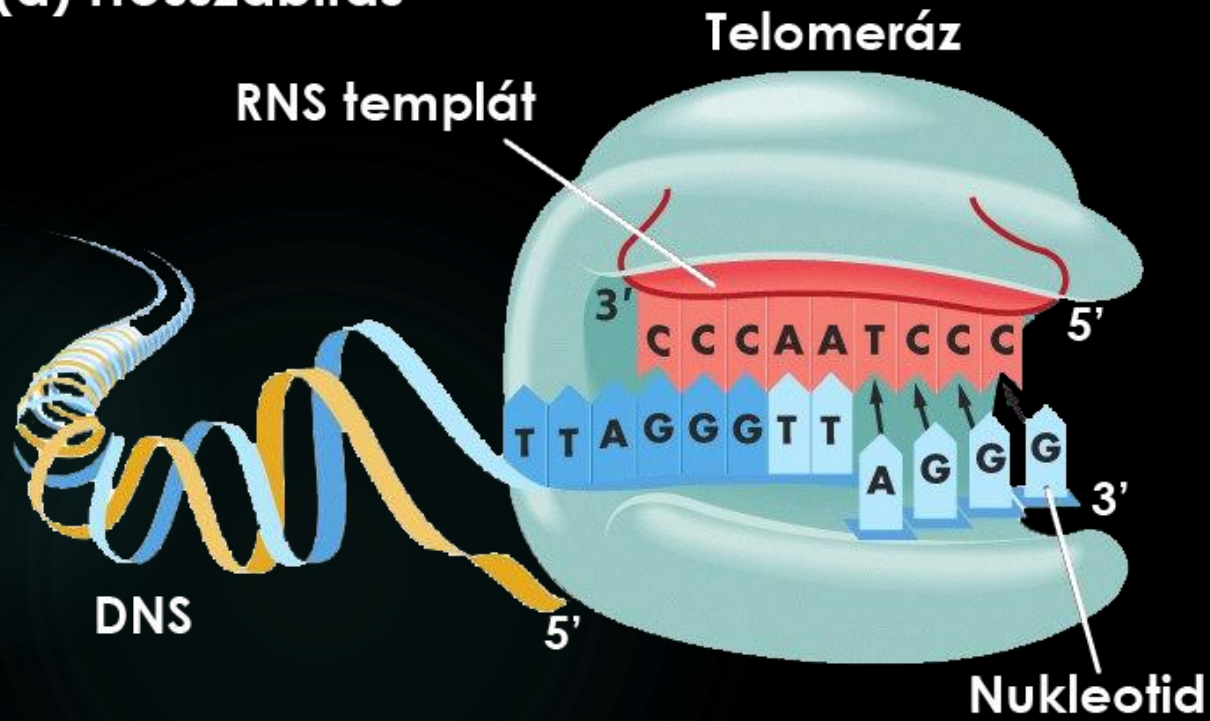
Telomeráz

A kromoszómák telomer 3' végéhez TTAGGG oligonukleotidokat ad hozzá

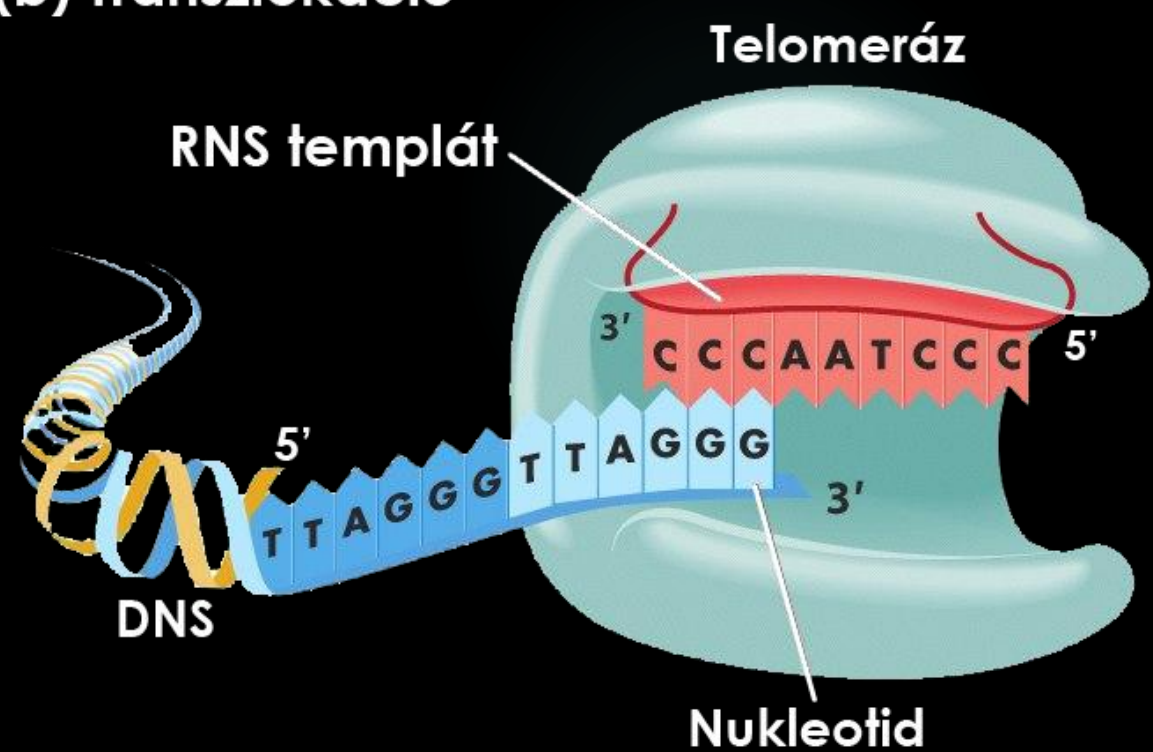
- ▶ RNS-templátot használ, ami az enzim része
- ▶ már meglévő TTAGGG szakaszt használ fel primerként
- ▶ fontos szerepe van a sokszor osztódó őssejtekben
- ▶ tumorok 90%-ában aktív

A telomerek és a telomeráz

(a) Hosszabítás

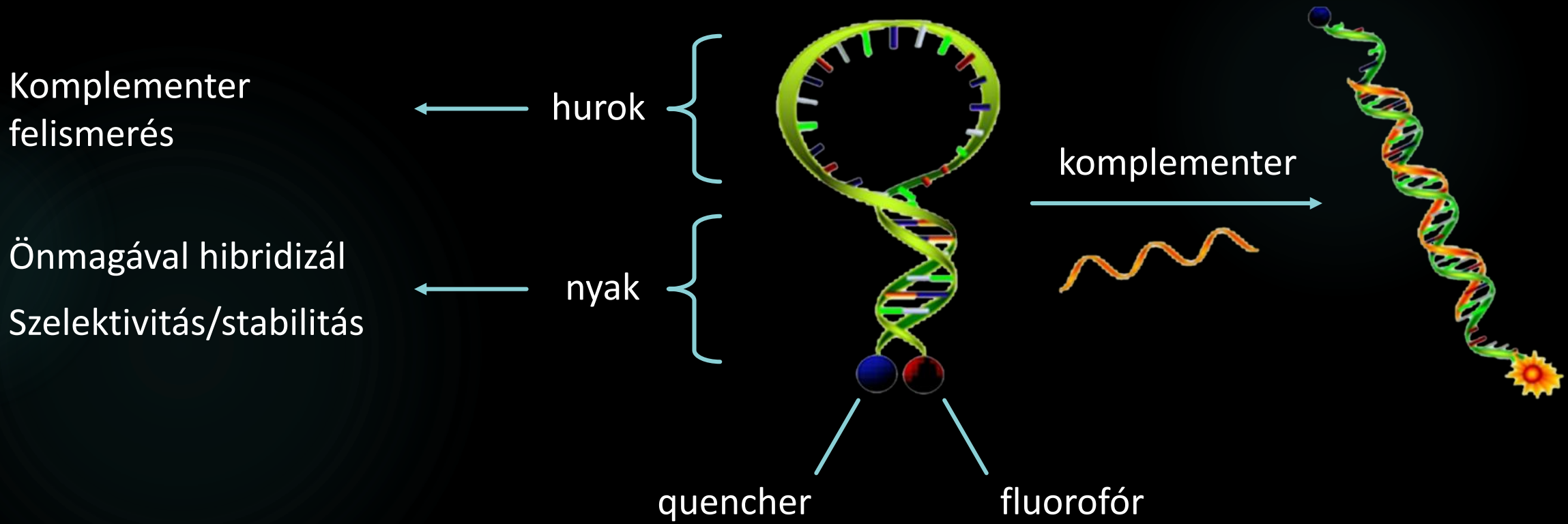


(b) Transzlokáció



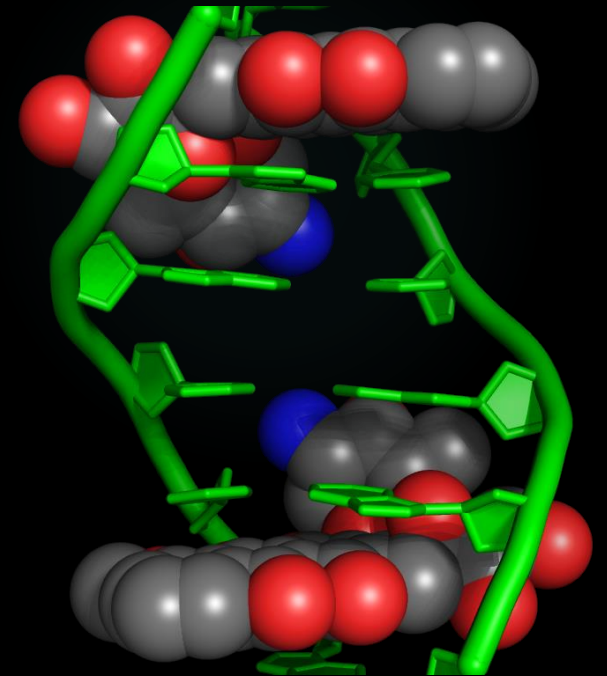
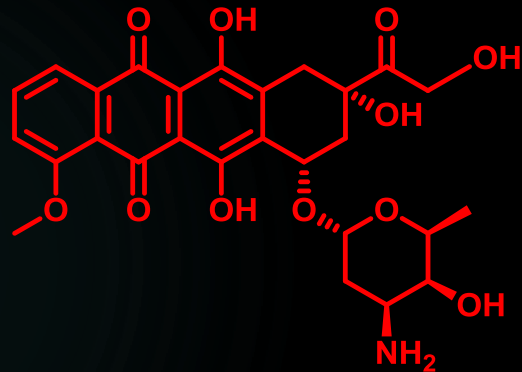
Molecular Beacons (MB) – fáklya, bója, jelzőfény

Szintetikus egyszálú oligonukleotid hajtű mintázattal, 3' és 5' végein fluorofórral és quencherrel



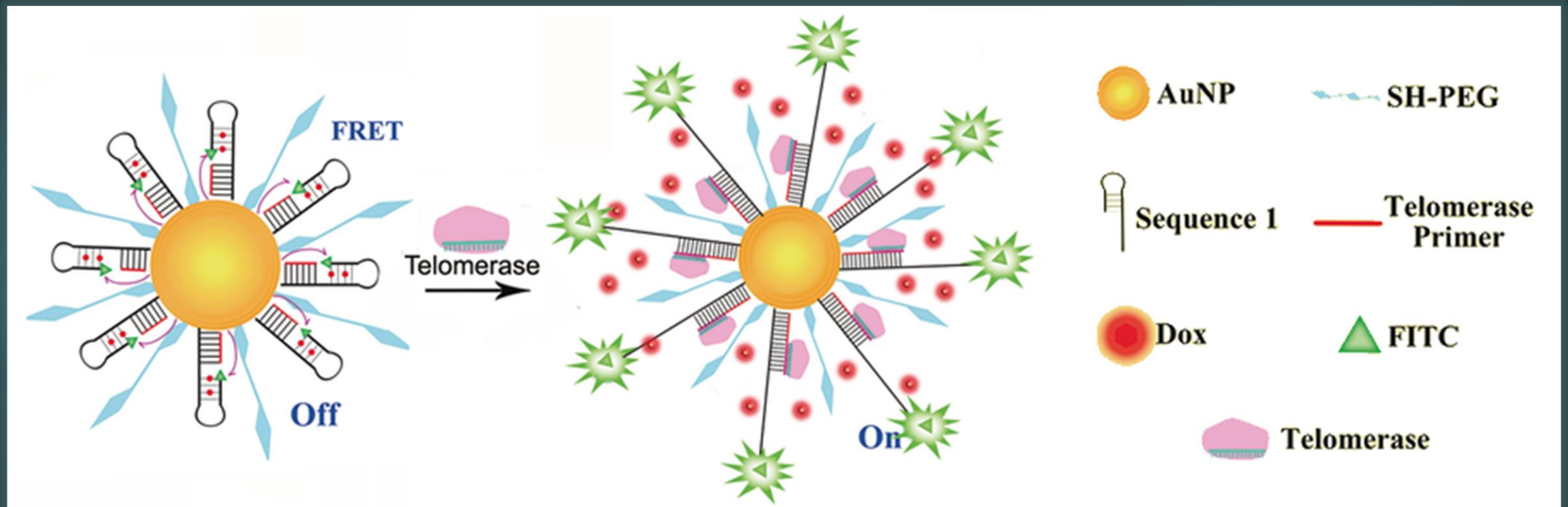
A Doxorubicin (Dox)

- ▶ Gyakran használt rákellenes vegyület, interkalálódik a DNS bázispárjai közé
- ▶ Nem tesz különbséget egészséges és rákos sejt között
- ▶ Célbajuttató konjugátumok / hordozók szükségesek



Célkitűzések (és A Terv)

- ▶ Rákdiagnosztika telomeráz-aktivitás méréssel
- ▶ Szelektív Doxorubicin felszabadulás



Szintézis

Arany nanorészecskék (AuNP): citrát-redukciós módszer

- ▶ HAuCl_4 -oldat + Na-citrát-oldat, 100 °C, 30 min -> 4 °C

MB-funkcionalizálás: SH-végű oligonukleotiddal, Au-SR kötés létrehozásával

- ▶ MB-szekvencia (Seq-1/Seq-2) + telomeráz-primer (TP) hozzáadása az AuNP-oldathoz 80:80:1 arányban, kevertetés sötétben 12 órán át.

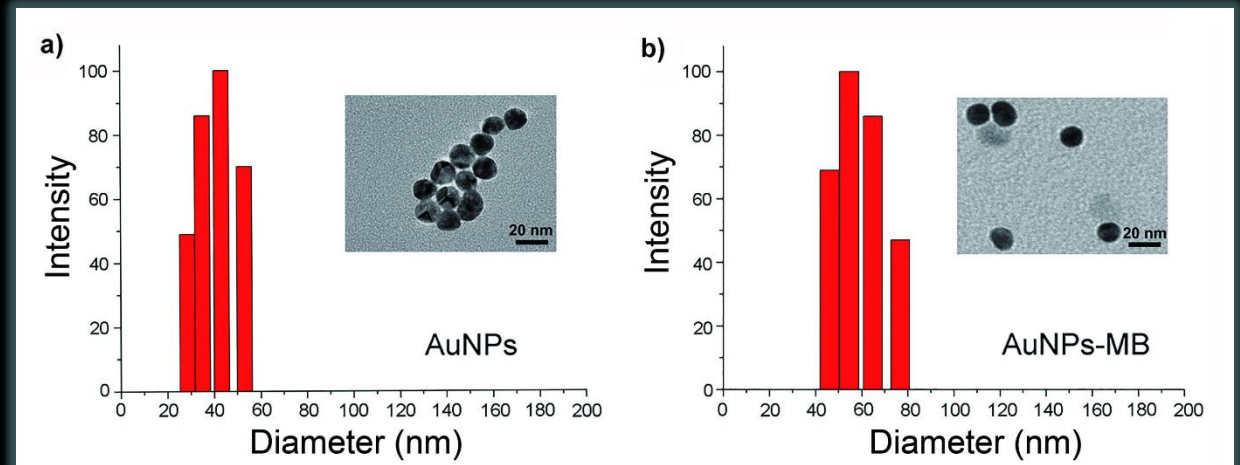
Stabilitás, biokompatibilitás: PEG borítás, Au-SR kötés létrehozásával

- ▶ SH-PEG hozzáadása az előző oldathoz, újabb 12 óra sötétben, majd NaCl-oldattal a végső 0,2 M-os koncentráció beállítása. Tisztítás PBS-ből centrifugálással (12000 rpm / 10 min), végül az AuNPs-MB újraszuszpendálása PBS-ben.

Karakterizálás

AuNP és AuNP-MB karakterizálása

- ▶ Méret meghatározása TEM-mel és a fényszóródás mérésével
- ▶ Átlagos átmérő: 15 nm
- ▶ Hidrodinamikai átmérő:
43,3 nm / AuNP és 51,6 nm / AuNP-MB



Az AuNP-hez kötődött DNS mennyiségének meghatározása

- ▶ A felülúszó vizsgálata alapján (abszorpció): 11% maradt oldatban
- ▶ DNS hasítása DTT-vel, majd az oldat vizsgálata: a felhasznált DNS 88%-át nyerték vissza
- ▶ Átlagosan 70 DNS-szál / AuNP

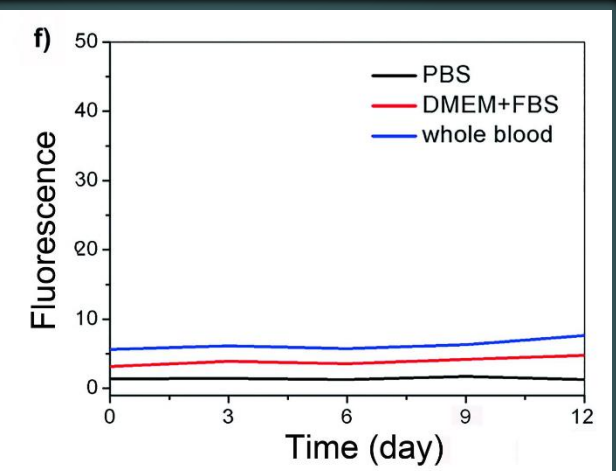
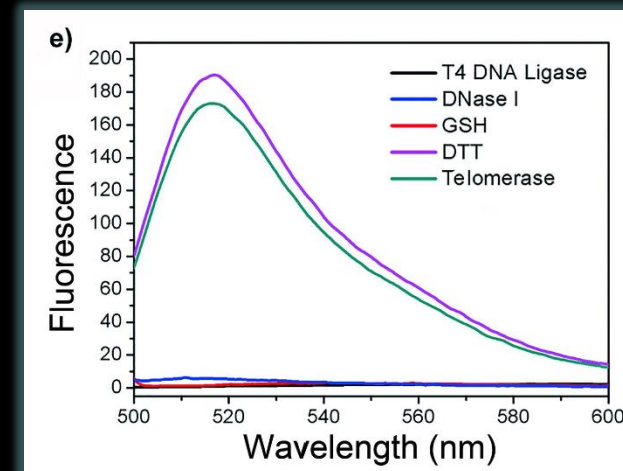
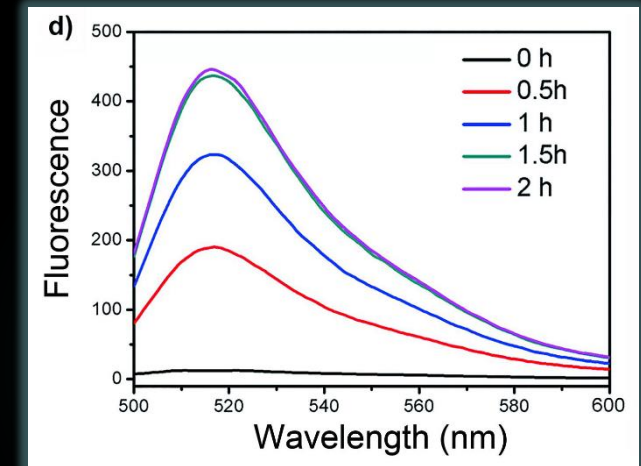
Karakterizálás

Telomeráz hatásának vizsgálata

- ▶ Az FITC fluoreszcenciájának mérésével: telomeráz + dNTP-k hozzáadására a kezdeti 0 érték jelentősen megnő

Stabilitásvizsgálat

- ▶ Oldatban stabil
- ▶ DNase I, T4 DNA ligáz, és GSH hozzáadásának hatására nincs változás
- ▶ DTT hatására jelentősen megnő a fluoreszcencia -> hasad

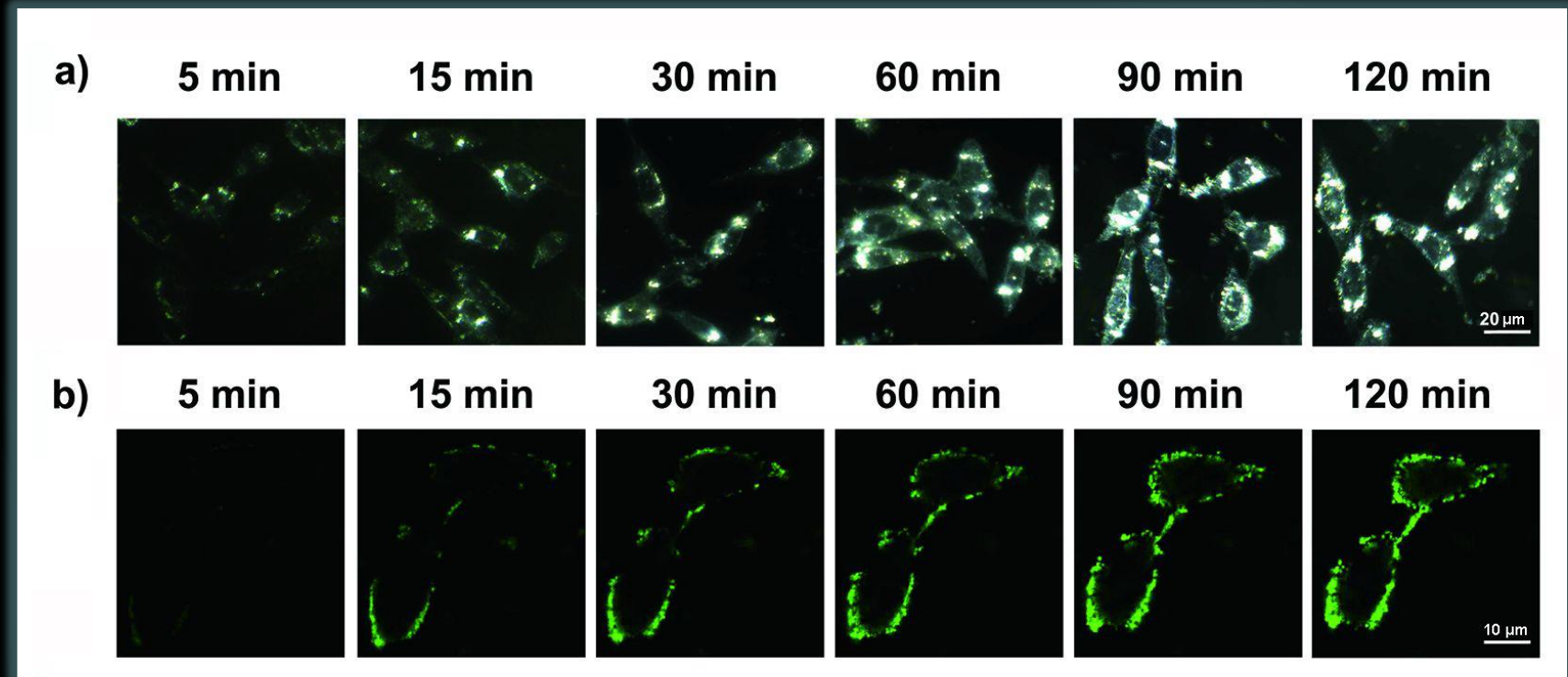


Sejtes vizsgálatok

Sejtfelvétel

- ▶ Rákos sejtvonal (U87)
- ▶ AuNP: hiperszkópia
- ▶ Telomeráz hatása:
konfokális mikroszkópia

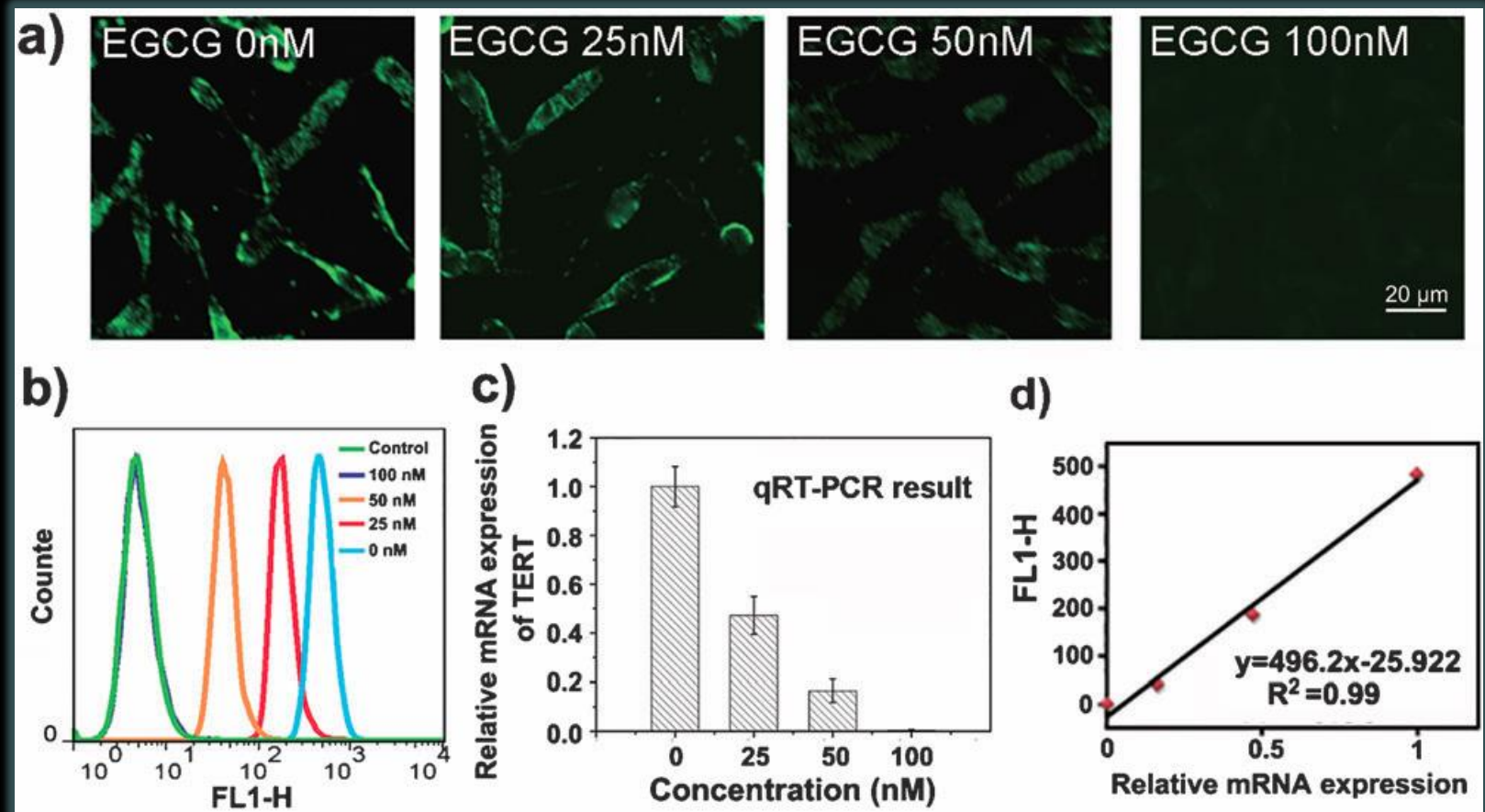
- ▶ Citoplazmában dúsul,
jó egyezés a két mérés
között



Sejtes vizsgálatok

Telomeráz hatásának bizonyítása

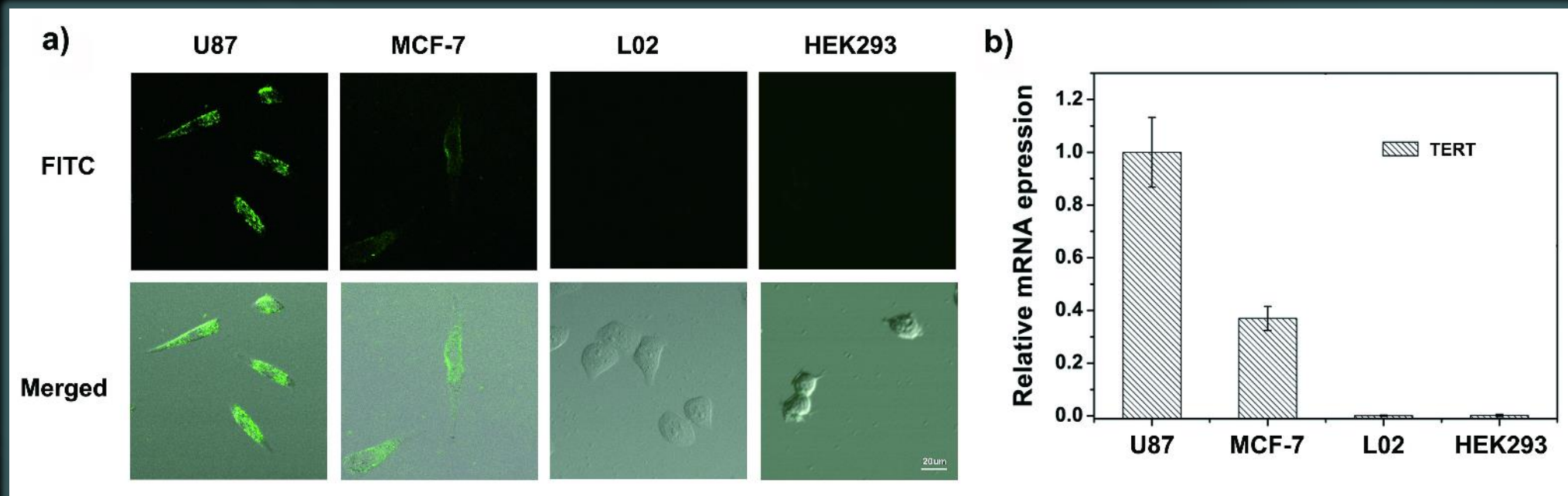
- ▶ Rákos sejtvonal (U87)
- ▶ Epigallocatechin gallate (EGCG) telomeráz-gátló adagolása



Sejtes vizsgálatok

Különböző sejtek vizsgálata

- ▶ U87 (human malignant glioma cells) és MCF-7 (human breast cancer cells) rákos sejtek
- ▶ L02 (human hepatocytes) és HEK293 (human embryonic kidney cells) egészséges sejtek
- ▶ Fluoreszcencia és telomeráz aktivitás csak a rákos sejtekben

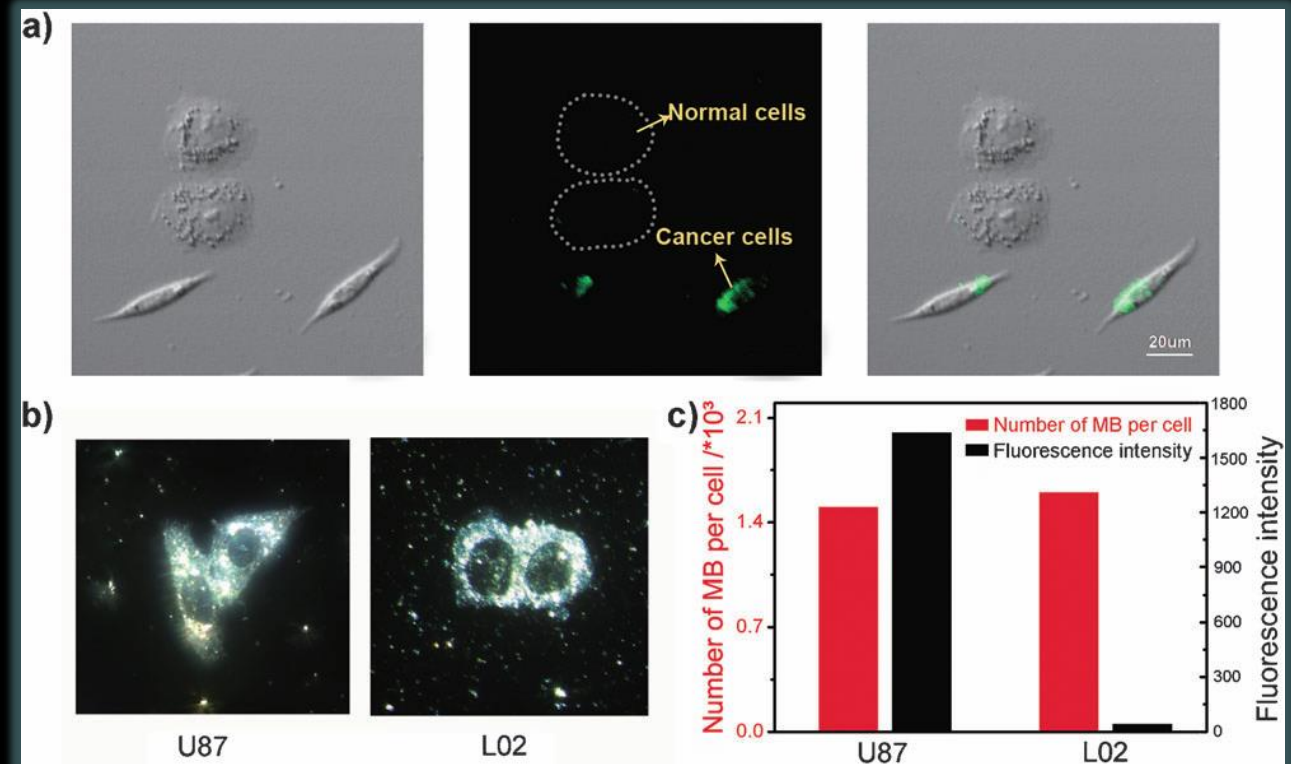


TERT: mRNS, mennyisége arányos a telomeráz aktivitással

Sejtes vizsgálatok

Kevert sejt kultúrák vizsgálata

- ▶ U87 és L02 sejt vonalak ko-kultúrája
- ▶ AuNP-MB mindkettőbe bejut (hiperszkópia és ICP-AES)
- ▶ Fluoreszcencia csak a rákos sejtekben
- ▶ Jó megkülönböztető képesség és lehetőség az aktív telomerázzal rendelkező sejtek kimutatására / elkülönítésére



AuNP-MB mint Doxorubicin-hordozó

Feltöltés Doxorubicinnal (Dox-AuNP-MB)

- ▶ Dox-oldat hozzáadása az AuNP-MB TRIS pufferes oldatához/szuszpenziójához, rázás egy éjszakán át, tisztítás centrifugálással

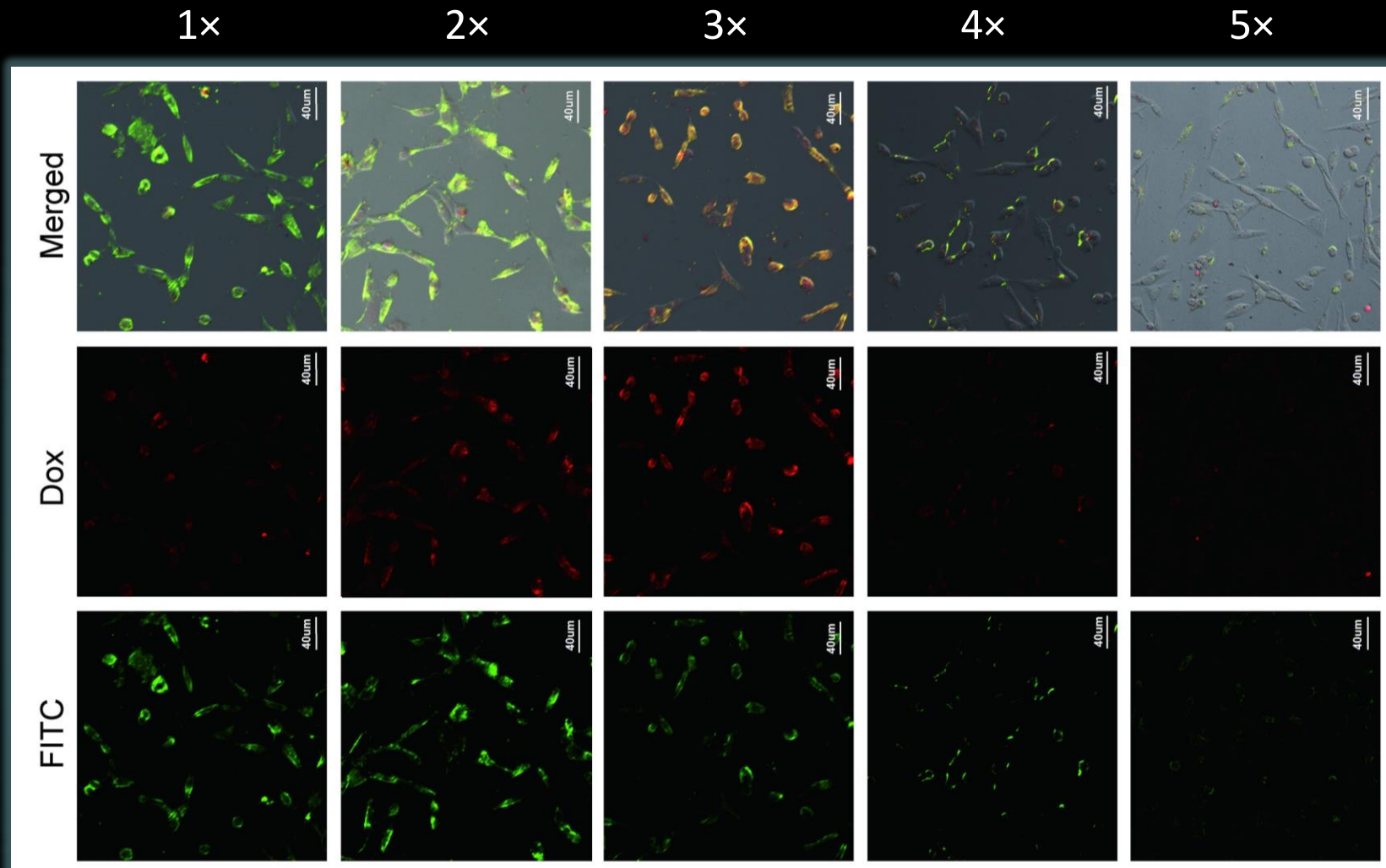
Töltöttség meghatározása

- ▶ A felülúszóban maradt Dox koncentrációja alapján (fluoreszcencia)
- ▶ Átlagosan 156 Dox / Dox-AuNP-MB

Töltöttség optimalizálása

- ▶ Meghosszabbított telomer-szakasz (2x - 5x), számítások alapján 2x és 3x jó, 4x és 5x túl stabil
- ▶ Átlagosan 306 Dox / Dox*2-AuNP-MB

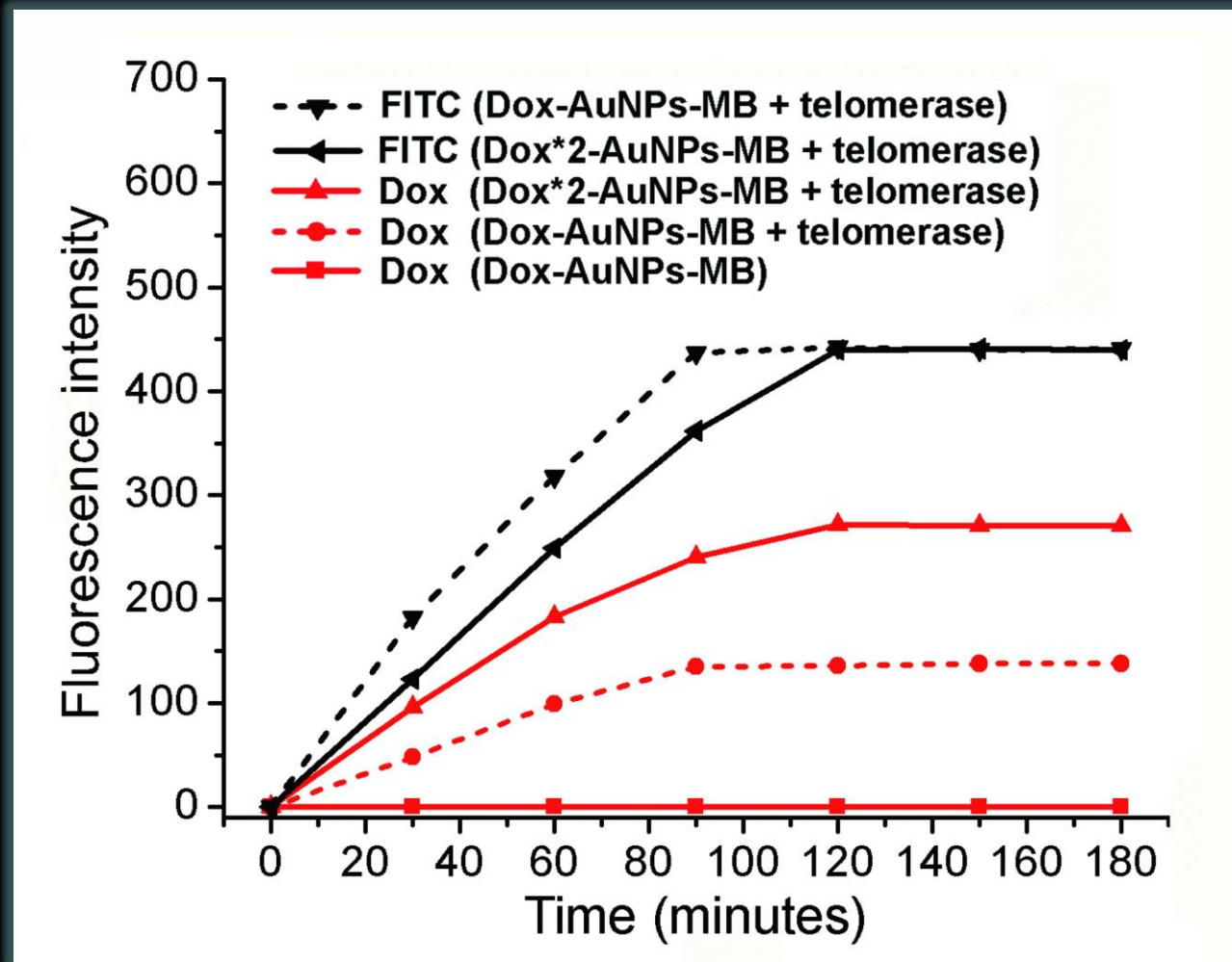
AuNP-MB mint Doxorubicin-hordozó



Doxorubicin felszabadulás

In vitro

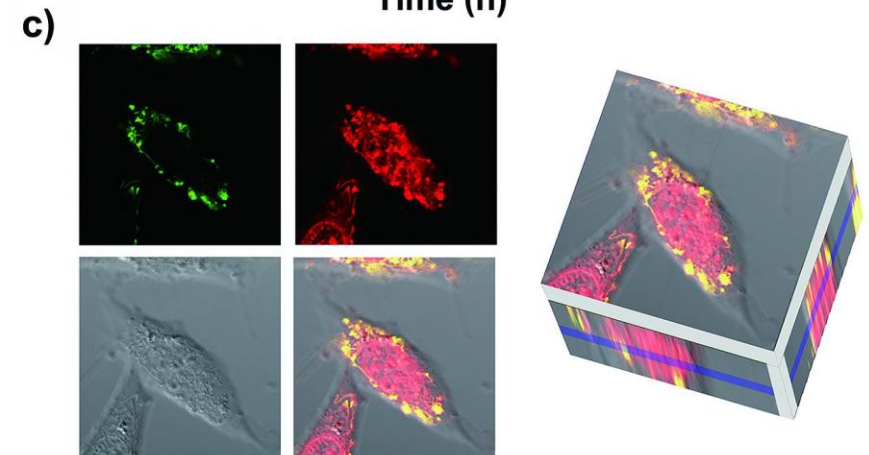
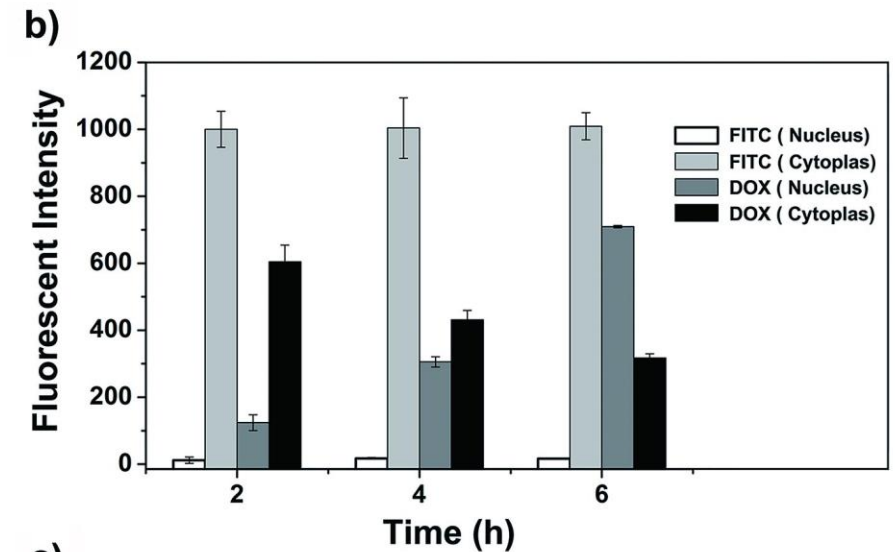
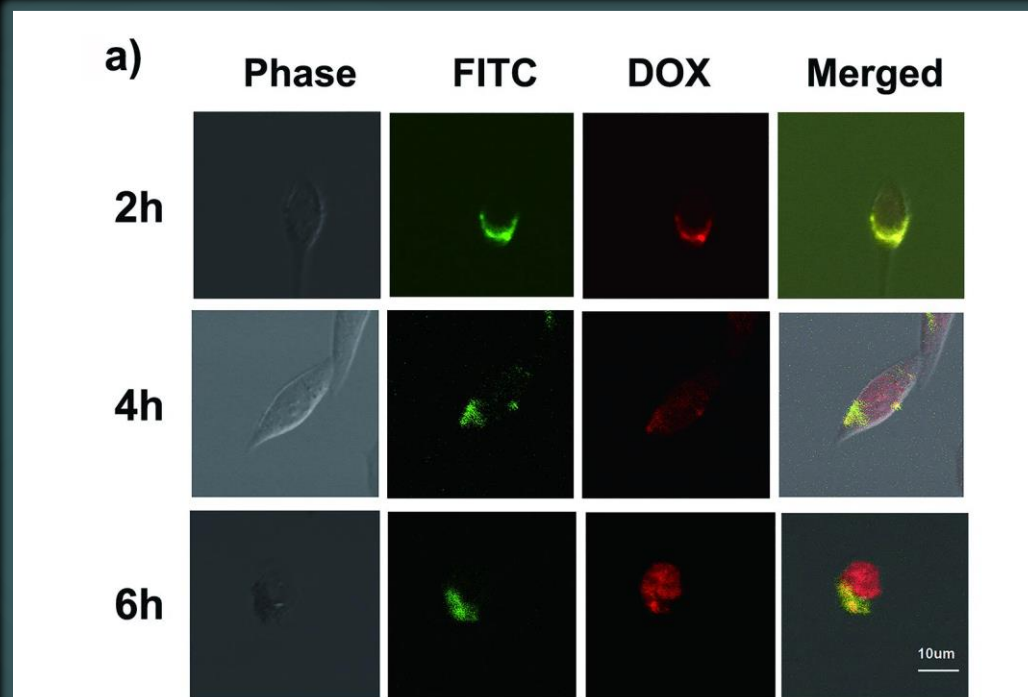
- ▶ TRIS puffer
- ▶ telomeráz + dNTP



Doxorubicin felszabadulás

U87 sejtvonala

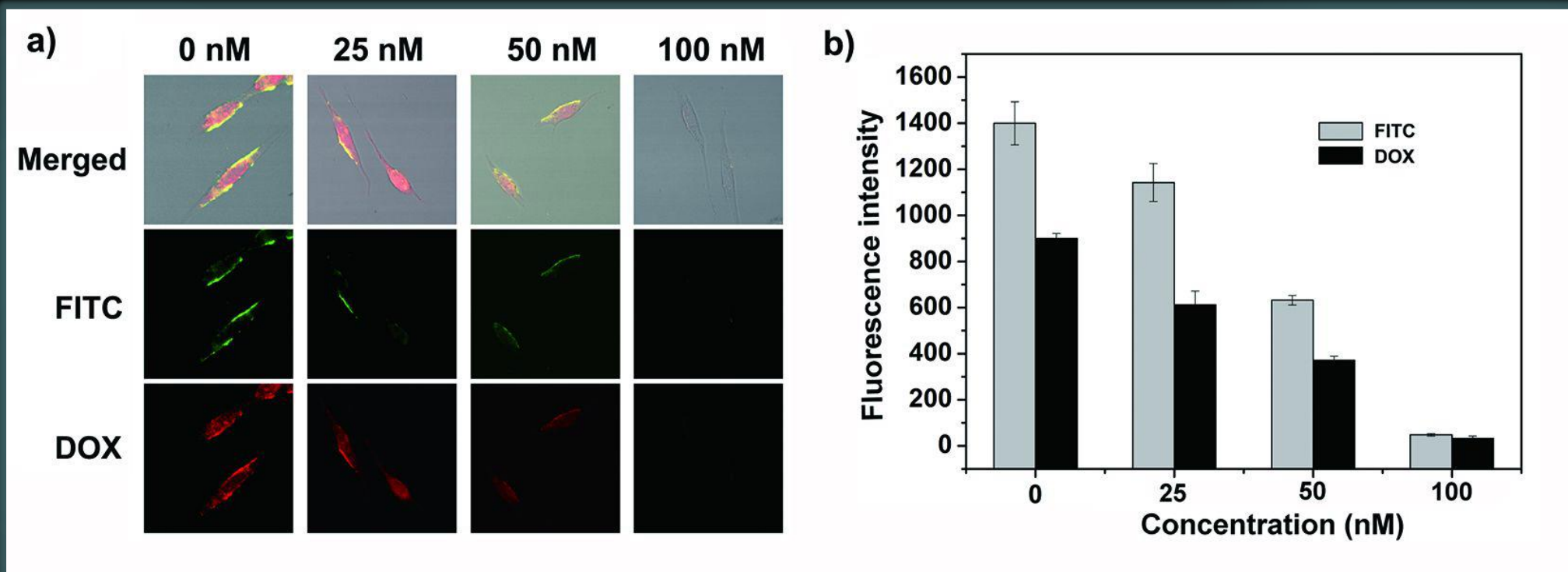
- ▶ 2 h: FITC és Dox is a citoplazmában
- ▶ 6 h: Dox lassan átmegy a magba



Doxorubicin felszabadulás

Dox felszabadulás vs telomeráz aktivitás

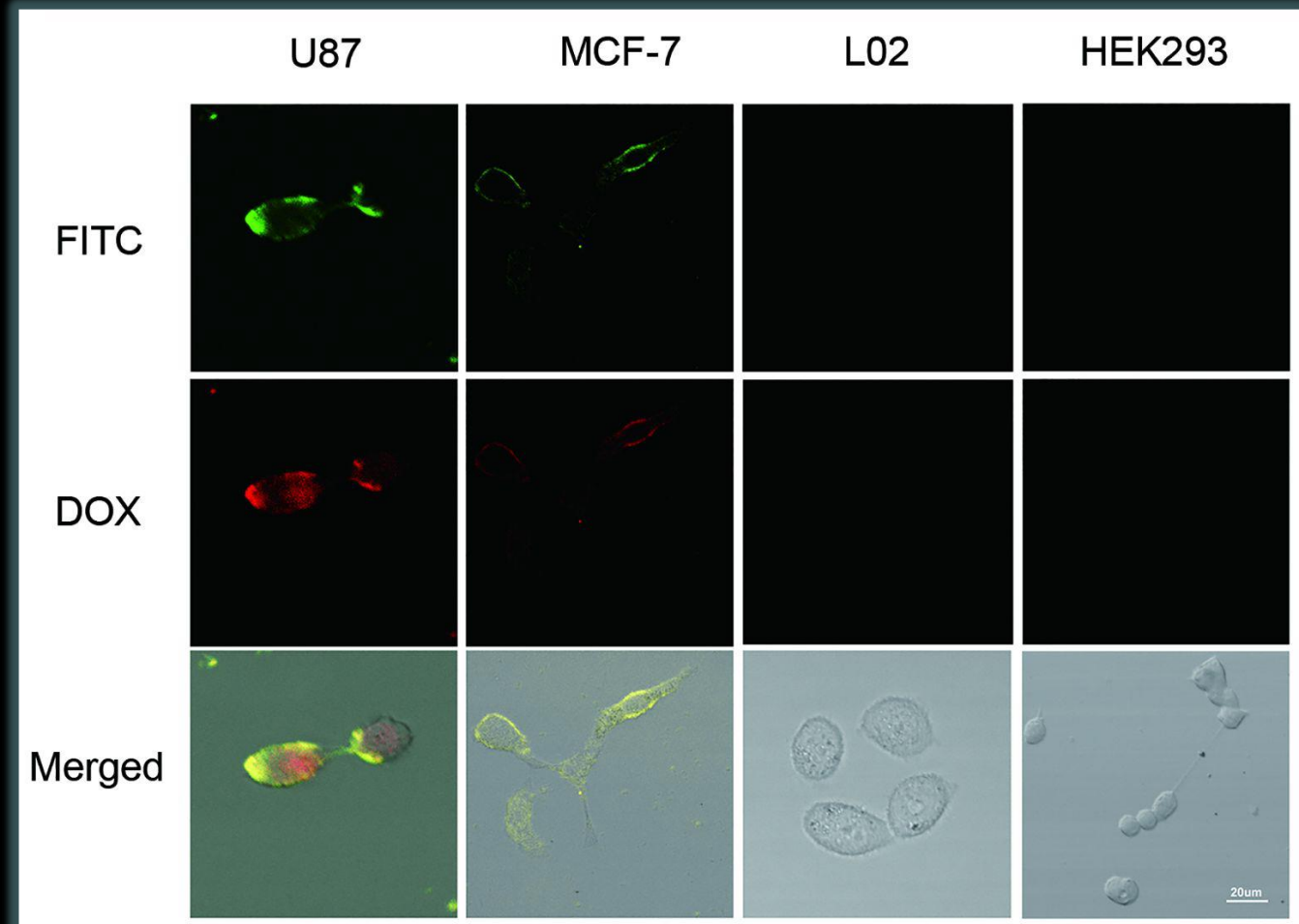
- ▶ Rákos sejtvonal (U87) + epigallocatechin gallate (EGCG) telomeráz-gátló adagolása
- ▶ FITC és Dox fluoreszcenciája se jelenik meg



Doxorubicin felszabadulás

Dox felszabadulás vs telomeráz aktivitás

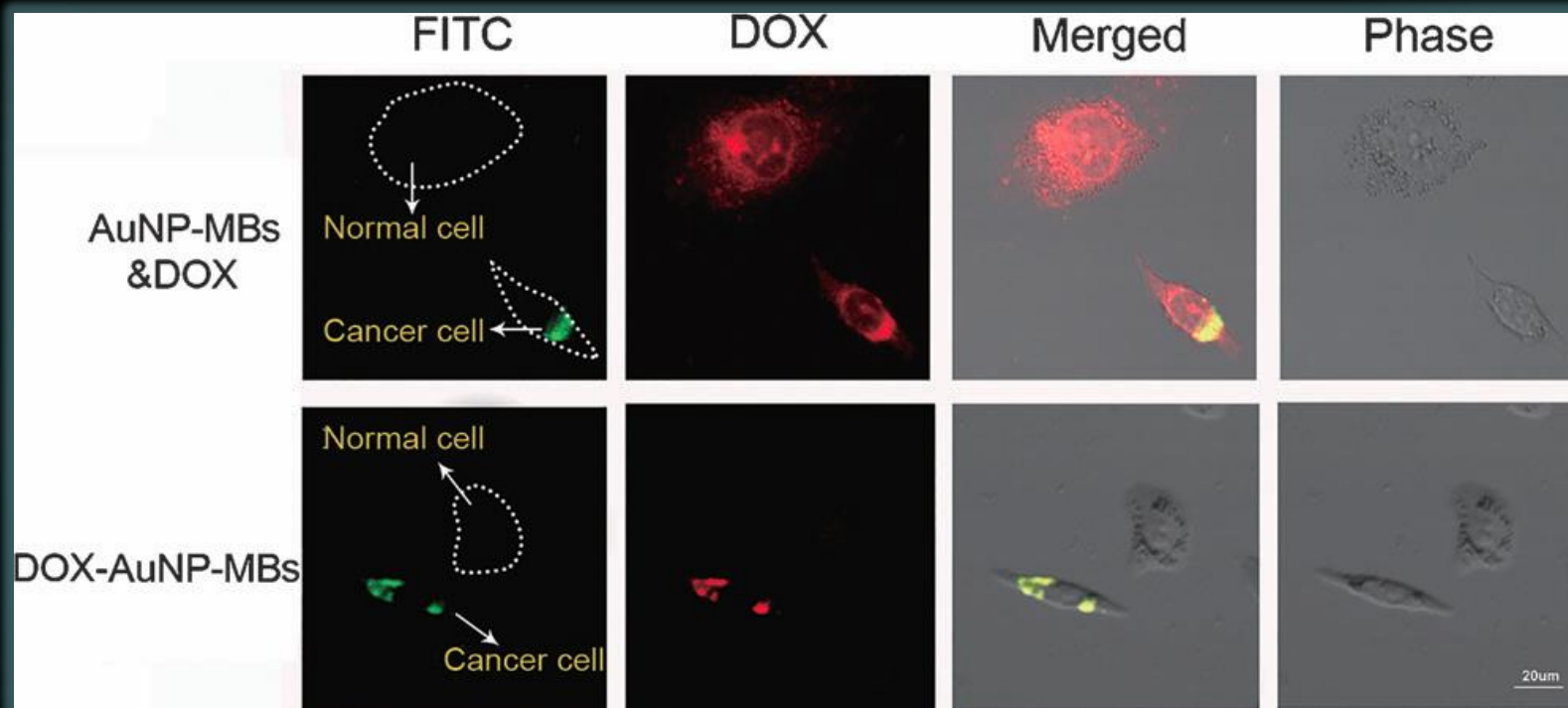
- ▶ U87 és MCF-7 rákos sejtek,
L02 és HEK293 egészséges sejtek



Doxorubicin felszabadulás

Kevert sejtkultúrák vizsgálata

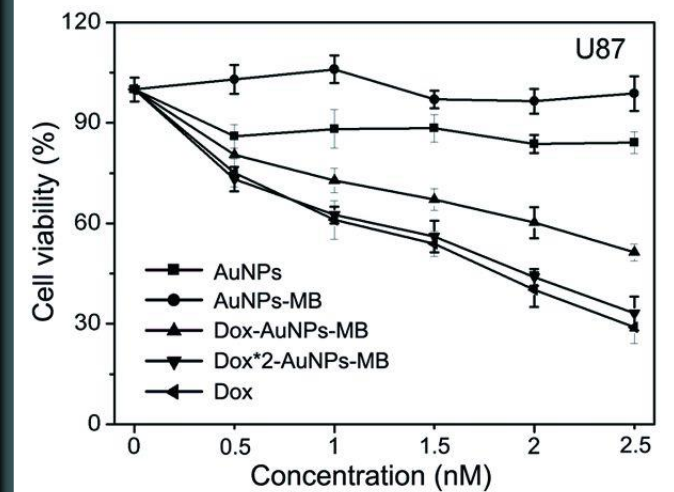
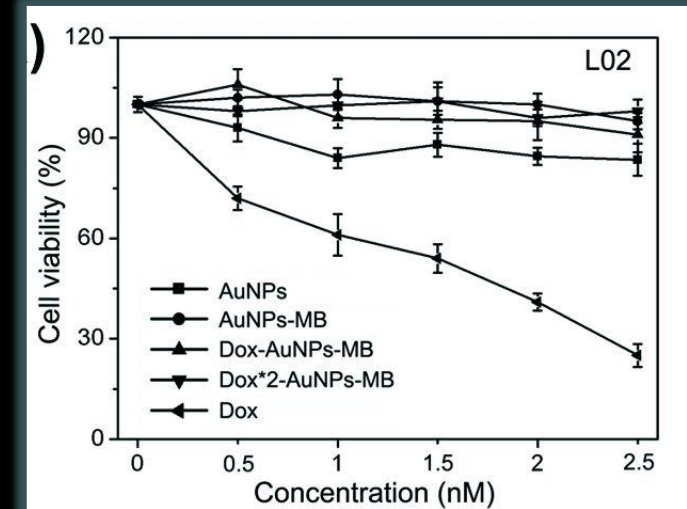
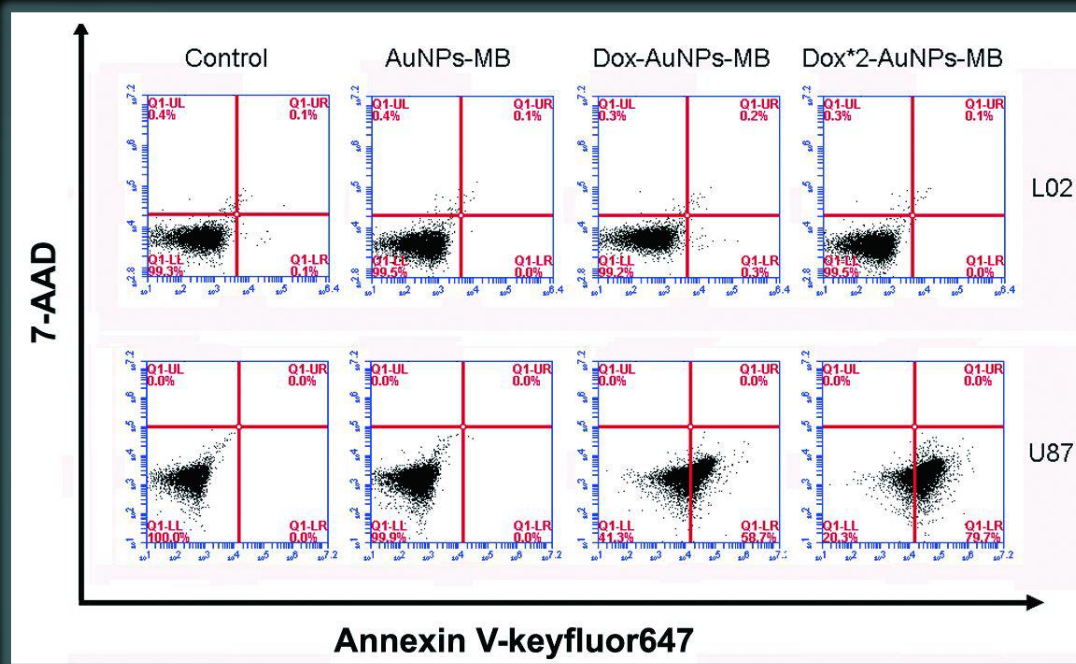
- ▶ U87 és L02 sejtvonalak ko-kultúrája
- ▶ Dox és AuNP-MB keveréke: Dox fluoreszcenciája mindkettőben; Dox-AuNP-MB: csak a rákos sejtekben



Tumor inhibíció és mellékhatások

MTT teszt és áramlási citometria

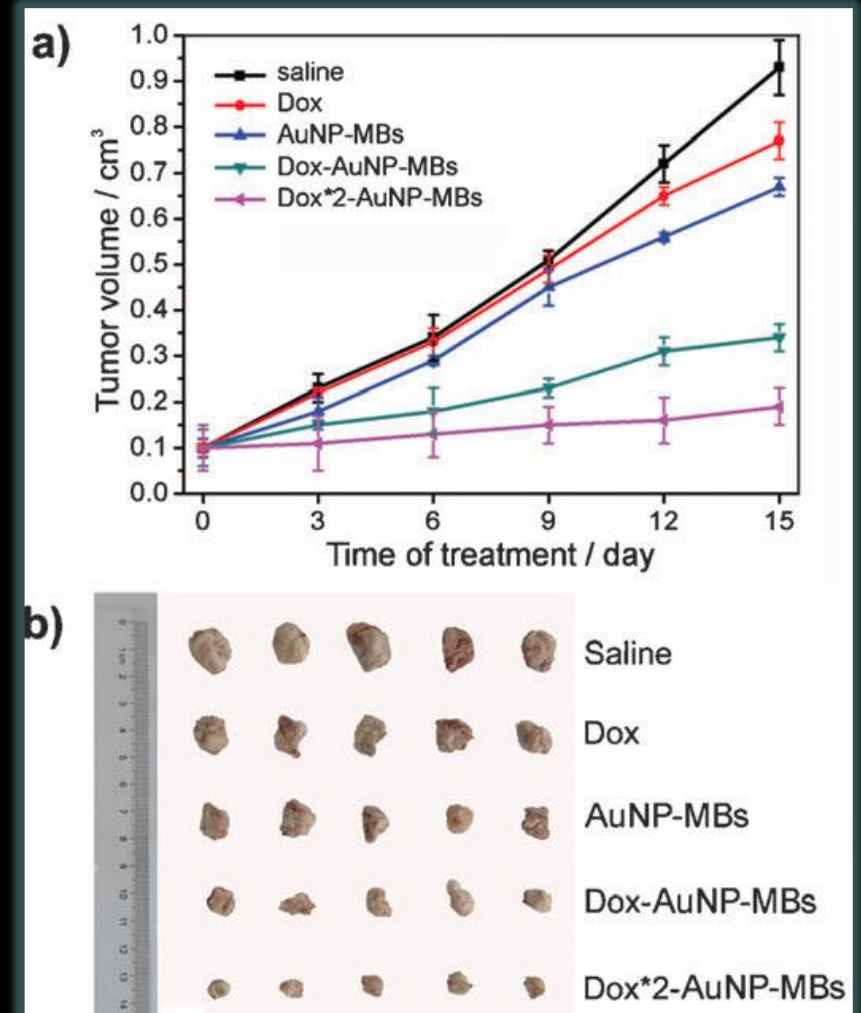
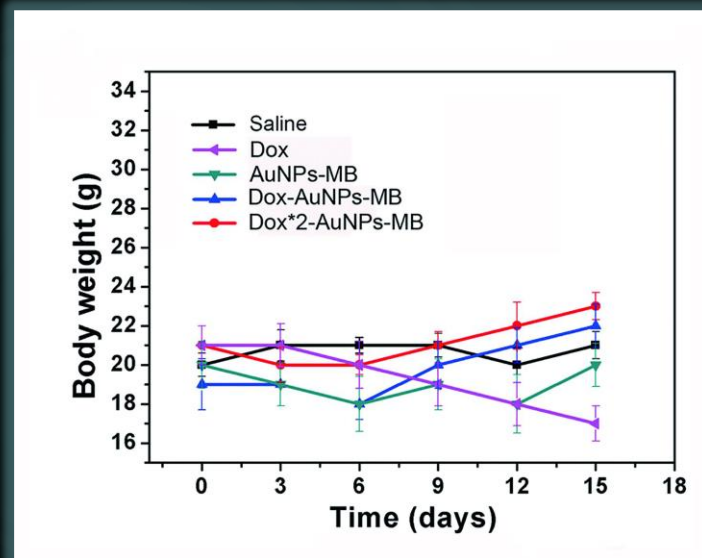
- ▶ U87: jelentős sejthalál, Dox*2-AuNP-MB jobb, mint Dox-AuNP-MB
- ▶ L02: nincs szignifikáns csökkenés a túlélésben



Tumor inhibíció és mellékhatások

In vivo

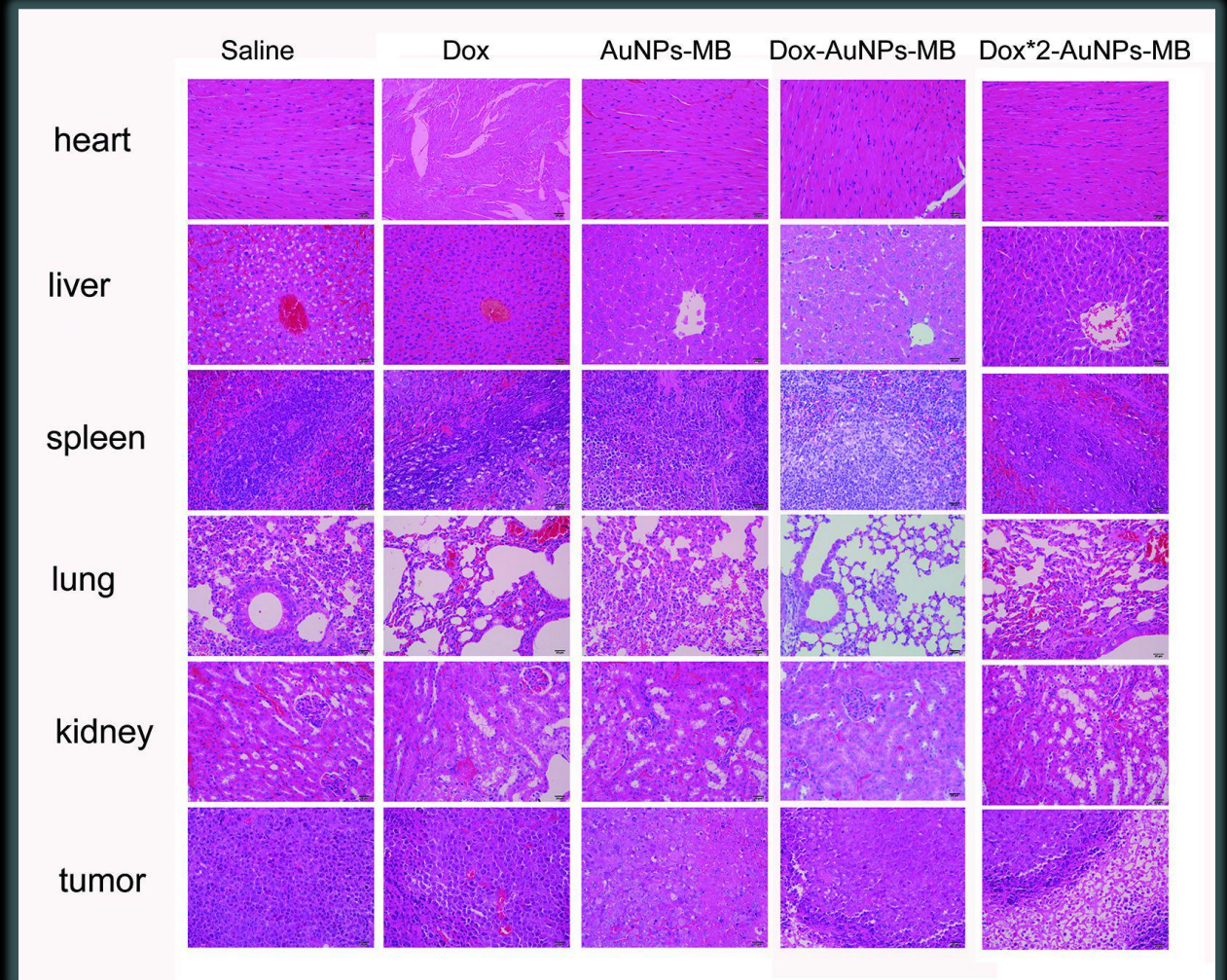
- ▶ Immundeficiens csupasz egerekbe oltott tumorsejtek
- ▶ Tumor növekedés követése (kimetszés):
Dox alig hat, Dox*2-AuNP-MB a legjobb
- ▶ Testtömegben nincs jelentős változás



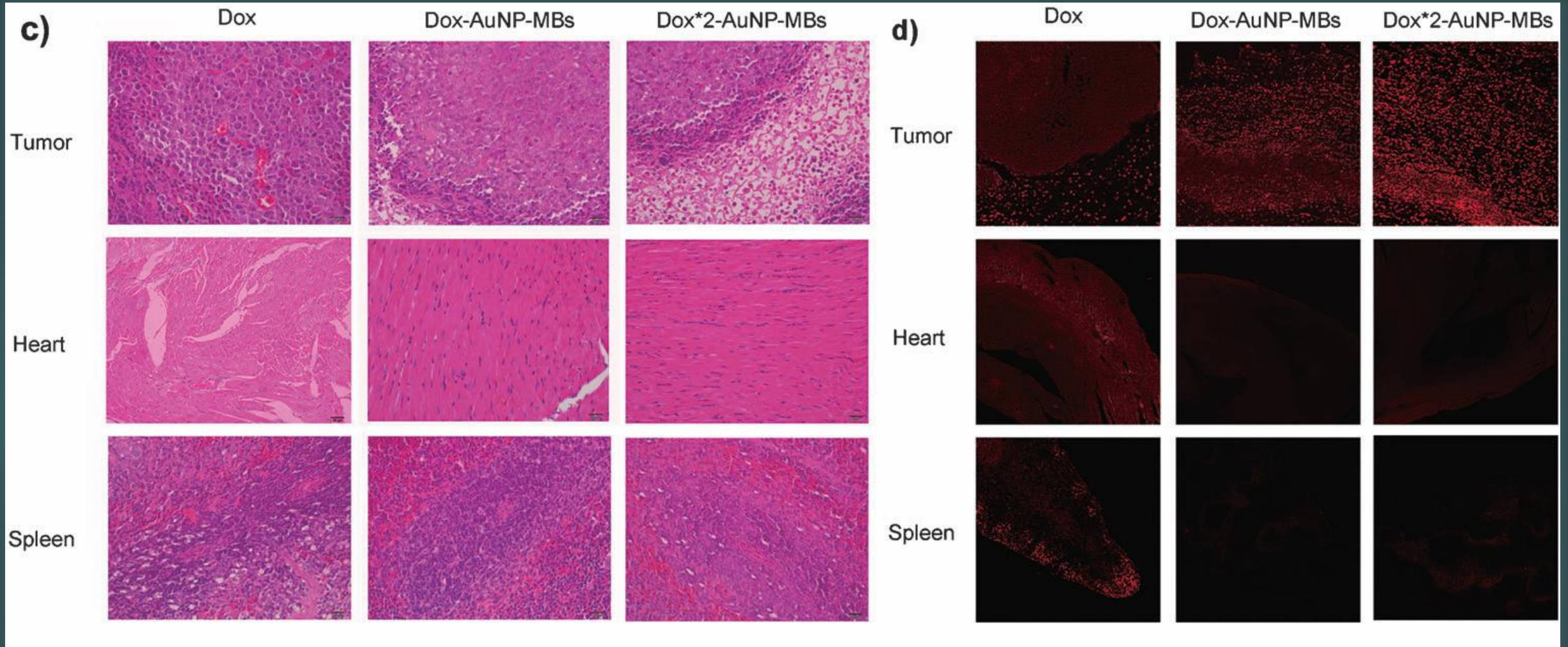
Tumor inhibíció és mellékhatások

In vivo

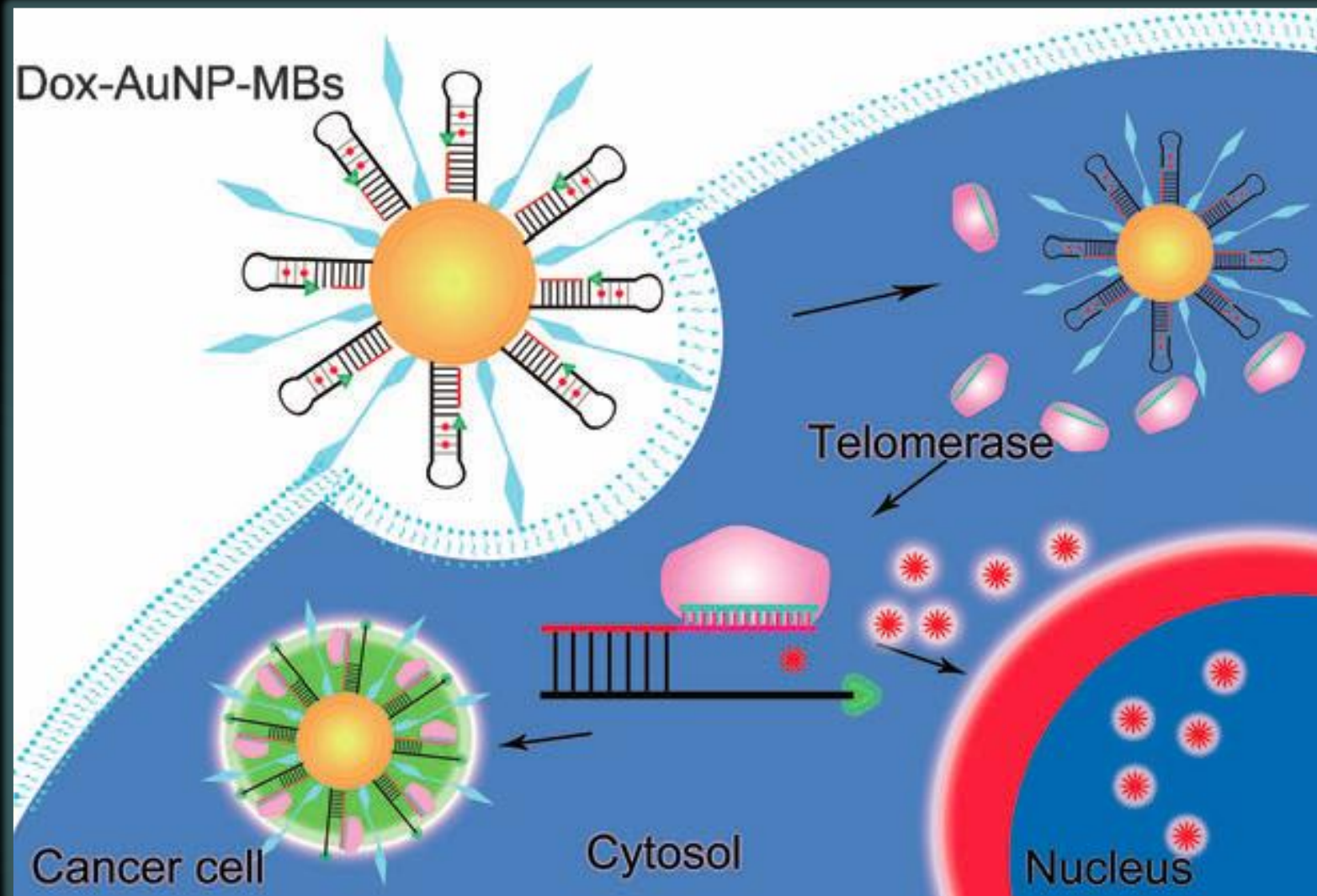
- ▶ Feláldozás és a különböző szervek / szövetek vizsgálata
- ▶ Dox: szív és lépkárosodás, tumorban alig történt változás
- ▶ Dox*2-AuNP-MB: nincs mellékhatás, és sok halott sejt a tumorban
- ▶ A szabad Dox eloszlása (fluoreszcencia alapján) összhangban áll ezzel



Tumor inhibíció és mellékhatások



Összefoglalás



Kiegészítés

- ▶ **Seq1:** 5'-FITC-AGGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTAACTCTGCTCGACGGATT-SH-3'
- ▶ **Seq2:** 5'-FITC-AGGGTTAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTAACCTAACTCTGCTCGACGGATT -SH-3'
- ▶ **Seq3:** 5'-FITC-
AGGGTTAGGGTTAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTAACCTAACCTAACTCTGCTCGACGGATTSH-3'
- ▶ **Seq4:** 5'-FITC-
AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTAACCTAACCTAACCTAACTCT
GCTCGACGGATT-SH-3'
- ▶ **Seq4:** 5'-FITC-
AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTAACCTAACCTAACCT
AACCTAACTCTGCTCGACGGATT-SH-3'
- ▶ **Telomerase primer (TP):** 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'