



Nörofibromatozis Tip1 Hastalarında Telomeraz Aktivitesi

Telomerase Activity in Patients with Neurofibromatosis Type 1

Serhan Küpeli

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Onkoloji ve Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Adana, Turkey

ABSTRACT

In various studies short telomere length and low telomerase activity have been shown to have a protective role in some types of cancer. Patients with NF1 are under risk of developing certain types of cancer. Malignant tumors such as brain tumors, malignant peripheral nerve sheath tumors, optic gliomas, soft tissue sarcomas and benign tumors such as neurofibromas and hamartomas are among them. Interestingly, prognosis is generally better in patients with NF1 than those without NF1. In the present review, we aimed to delineate telomerase activity in patients with NF1 with various types of cancer. Measurement of telomerase activity in patients with NF1 can be a diagnostic marker for tumorigenesis.

Key words: Neurofibromatosis Type 1, telomerase activity, tumors.

ÖZ

Çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda kısa telomer uzunluğu ve düşük telomeraz aktivitesinin bazı kanser tiplerinde koruyucu etkisi olduğundan bahsedilmektedir. Nörofibromatozis Tip-1 (NF1) hastalarının bazı kanser türleri için yüksek risk altında olduğu bilinmektedir. Beyin tümörleri, malign periferik sinir kılıfı tümörleri, optik gliom, yumuşak doku sarkomları gibi malign tümörler ve nörofibromlar ve hamartomlar gibi benign olanlar bunlar arasında sayılabilir. İlginç olarak NF1 hastalarında ortaya çıkan kanserlerde prognoz genel olarak aynı tanımlı NF1 olmayan hastalara göre daha iyi olmakta ve sağkalım daha uzun olmaktadır. Bu derlemede NF1 hastalarındaki telomeraz aktivitesinin gelişebilecek kanserlerle olan ilişkisi literatür bilgileri ışığında irdelenmiştir. NF1 hastalarında benign veya malign tümör gelişimi açısından telomeraz aktivitesi ölçümü tümör belirleyici işlevi görebilir.

Anahtar kelimeler: Nörofibromatozis Tip1, telomeraz aktivitesi, tümörler.



Giriş

Birçok kanser türünde yapılan çalışmalar telomeraz aktivitesi ve malignite arasında güçlü bir ilişki olabileceğini göstermiştir. İnsan kromozomlarının sonu 15 kilobaza kadar uzayabilen basit telomerik tekrar dizilerinden (5'-TTAGGG- 3') oluşur¹. Telomerik baz dizileri hücre DNA'yı kararlı halde tutar ve onları yeni kombinasyonlardan (end to end fusion) ve enzimatik yıkımlardan korur². DNA polimerazlar DNA sentezini 5'→3' doğrultusunda gerçekleştirirken başlangıç için bir RNA primerine gereksinim duyarlar. Bu primerin atılmasıyla oluşan boşluk başka bir mekanizmayla yeniden doldurulmazsa, her hücre bölünmesinden sonra bir miktar telomerik kısalma ortaya çıkar. Hücre ve organizma yaşlanmasında, ana nedenin bu telomerik kısalma olduğu ileri sürülmüştür¹.

Bu kaybı önlemenin yollarından biri telomeraz enziminin aktivite göstermesidir. Telomeraz bir ribonükleoprotein kompleksidir. Kromozom sonlarına (TTAGGG)n den oluşan hegzomerik tekrarları ekleyerek telomer uzunluğunu kararlı halde tutar. Enzim yapısında telomerik dizilere kalıplık yapacak 159 nükleotidlik bir RNA içerir. Diğer iki önemli bileşen ise "reverse" transkriptaz ve "Protein 1"dir³⁻⁵. Bu derlemede NF1 hastalarındaki telomeraz aktivitesinin benign veya malign tümörlerle olan ilişkisinin literatür bilgileri ışığında irdelenmesi amaçlanmıştır.

Tanım

Son yıllarda birçok kanser türünde yapılan çalışmalar telomeraz aktivitesi ve malignite arasında güçlü bir ilişki olabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle telomeraz enzimi yaygın kullanıma aday bir tümör belirleyici haline gelmiştir⁶⁻⁹. Telomeraz, telomerik DNA sentezleyen özelleşmiş bir "reverse transkriptaz" olup fonksiyonel telomerlerin devamlılığında görev alır¹⁰. İnsanlarda telomeraz aktivitesi esas olarak eşey hücrelerinde ve kök hücrelerde mevcut olup diferansiye somatik hücrelerde telomeraz ekspresyonu saptanamamakta ve hücre bölünmesiyle birlikte telomerlerde sürekli bir kısalma meydana gelmektedir. Bunun dışında lenfositlerde de düşük seviyelerde de olsa telomeraz aktivitesinin saptanabildiği gösterilmiştir^{11,12}. Çoğu kanser türünde ve kök hücrelerde telomeraz aktivitesi genellikle hücrenin proliferasyon durumu ile korelasyon göstermektedir. Bu enzimin varlığı sınırsız proliferasyon için olmazsa olmaz bir gerekliliktir¹³. Telomeraz aktivitesinin yeniden kazanılmasının ve bu sayede telomer uzunluğunun korunmasının kanser hücrelerinin ölümsüzlük kazanmasında rolü olabileceği düşünülmektedir.

Telomerler kromozomların uçlarını kaplayan 1500-15000 baz çifti uzunluğunda olabilen ardışık nükleotid dizileridir. Telomerler dokuların mitotik aktivitesine ve yaşam şekline bağlı olarak yılda ortalama 15-28 baz çifti kısalırlar. Kısa telomer uzunluğunun bu nedenle kümülatif hücresel yaşlanmanın, artmış kanser riskinin ve kanser sonrası artmış erken ölüm riskinin bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir¹⁴. Çeşitli kanser türlerinde ve normal popülasyonda telomer uzunlukları çalışılmış ve bazı çalışmalarda kısa telomer uzunluğunun artmış kanser riski ve kısa sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise kısa telomer uzunluğu ve düşük telomeraz aktivitesinin bazı kanser tiplerinde koruyucu etkisi olduğundan bahsedilmektedir¹⁵.

Nörofibromatozis Tip 1

Nörofibromatozis Tip-1 (NF1) kansere yatkınlık yaratan bir sendrom olup "cafe au-lait" lekeleri, aksiller ve inguinal çillenme, "Lisch" nodülleri, dermal ve/veya pleksiform nörofibromlar ile karakterizedir. Bu hastaların bazı kanser türleri için yüksek risk altında olduğu bilinmektedir¹⁶. Beyin tümörleri, malign periferik sinir kılıfı tümörleri, optik gliom, yumuşak doku sarkomları gibi malign tümörler ve nörofibromlar ve hamartomlar gibi benign olanlar bunlar arasında sayılabilir. ilginç olarak NF1 hastalarında ortaya çıkan kanserlerde prognoz genel olarak aynı tanımlı NF1 olmayan hastalara göre daha iyi olmakta ve sağkalım daha uzun olmaktadır. Bu durum NF1 hastalarında telomeraz aktivitesinin sağlıklı bireylere göre daha fazla veya az olup olmadığı konusunda soru işareti yaratmaktadır.

Telomeraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Lökositlerin Ayrılması

Telomeraz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler RNA'nın izole edilmesi ve mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesi basamaklarını içermektedir¹⁷. Periferik kanda hTERT mRNA çalışması "real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction" (RT-PCR) yöntemiyle ve "Light Cycler 480" sistemi kullanılarak yapılabilmektedir. Bu amaçla NF1 hastalarından ve kontrollerden elde edilen periferik kandan öncelikle kırmızı kan hücre parçalayıcı yöntemle lökositler ayrılır. Başlangıç hacmi hesaplanırken $10.000/WBC = X \mu l$ formülü kullanılır. Hesaplanan hacim ependorf tüplerinde iki katı miktarda kırmızı kan hücresi eklenerek "shaker" üzerinde 10 dakika bekletilir. 10 dakika sonra ependorflar 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 900 μl kırmızı kan hücresi eklenir. "Shaker" üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra ependorflar tekrar 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj

edilerek süpernatant tamamen atılır ve pellet üzerine 500 µl % 0.9'luk NaCl eklenir. Ependorflar 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra % 0.9'luk NaCl tüpten tamamen atılır. Pellet üzerine 400 µl "High Pure RNA izolasyon kiti" içerisinde bulunan "Lysis Buffer" eklenir.

RNA İzolasyonu

Lökositlerden RNA izolasyonu amacıyla örnek sayısı kadar filtreli ve "collection" tüpleri hazırlanarak numaralandırılır. Hazırlanan karışım filtreli tüpler içerisine konularak tüplerin kapakları kapatılır. 8000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra "collection" tüpler boşaltılır. Filtreli tüpler "collection" tüplere aktarılır ve her bir örneğe 90 µl "DNase incubation buffer" ve 10 µl DNase I eklenerek 15 dakika inkübasyona bırakılır. Filtreli tüplerin içine 0.5 ml "wash buffer I" konularak 8000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilir. "Collection" tüpleri boşaltılarak filtreli tüpler tekrar "collection" tüplerine aktarılır. Filtreli tüplerin içine 0.5 ml "wash buffer II" konularak 8000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilir. "Collection" tüpleri boşaltılarak filtreli tüpler tekrar "collection" tüplerine aktarılır. Sonraki aşamada filtreli tüplerin içine 0.2 ml "wash buffer II" konularak 13.000 rpm'de 2 dakika çevrilir ve "collection" tüpleri atılır. Filtreli tüpler kapaklı ependorf tüplerine aktarılır. Her örneğe 50-100 µl "elution buffer" eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika çevrilir. Elde edilen RNA'lar direkt -80 °C'de saklanır.

cDNA Eldesi

cDNA sentezi aşamasında -80 °C'den çıkarılan RNA'lar oda sıcaklığında bekletilerek çözündürülür. "Transcriptor First Strand cDNA" sentez kiti kullanılarak cDNA sentezine başlanır. Her bir örnek için 9 µl "pure total RNA" ve 2 µl "random hexamer" primer ve 0.5 µl "PCR grade water" eklenerek 13 µl total hacim elde edilir. Bu karışım "thermal cycler"da 10 dakika bekletilir. Çıkan ürüne 4 µl "Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer", 0.5 µl "protector RNA'se inhibitor", 2 µl "deoxynucleotide mix", 0.5 µl "Transcriptor Reverse Transcriptase" eklenerek 20 µl'lik hacim elde edilir. Bu karışım "thermal cycler"da 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 60 dakika, 85 °C'de 5 dakika bekletilerek cDNA'lar elde edilir.

Real Time PCR Aşaması

"Real Time PCR" aşamasında her bir örnek için 0.5 µl primer (hTERT geni), 0.5 µl "probe" (Real Time Ready), 10 µl "probe master", 4 µl "grade water" eklenerek 15 µl total hacim elde edilir. Bu karışımlara 5er µl cDNA eklenerek "Light Cycler 480" sistemine ait "plate"ler üzerinde "Real Time PCR Heat" protokolü ile çalışılır. Denatürasyon basamağında 1 "cycle" 95 °C'de 10 dakika

bekletilir. Amplifikasyon (annealing) basamağında 45 "cycle" 95 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 saniye bekletilir ve 72 °C'de okuma alınır. "Cooling" basamağında ise 40 °C'de 1 dakika bekletilir. Sonuçların doğru karşılaştırılması ve yorumlanabilmesi amacıyla beta aktin primeri kullanılır. Çalışma bitiminde örneklerin $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine bakılarak sonuçlar değerlendirilir.

Telomeraz Aktivitesi ve Tümörlerle İlişkisi

Telomeraz aktivitesi birçok malign tümörde gösterilmiş olup tanısız anlamda ve prognozu tahmin etmede faydalı olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar telomeraz aktivitesi ve malignite arasında güçlü bir ilişki olabileceğini ortaya koymuş ve telomeraz enzimi yaygın kullanıma aday bir tümör belirleyici haline gelmiştir⁶⁻⁹. Telomeraz aktivitesi ile "telomeraz reverse transkriptaz" (TERT) ekspresyonu arasında da korelasyon olduğu bildirilmiştir^{18,19}. Nörofibromatozis Tip-1 (NF1) kansere yatkınlık yaratan bir sendrom olup "café au-lait" lekeleri, aksiller ve inguinal çillenme, "Lisch" nodülleri, dermal ve/veya pleksiform nörofibromlar ile karakterizedir. Bu hastaların bazı kanser türleri için yüksek risk altında olduğu bilinmektedir. Beyin tümörleri, malign periferik sinir kılıfı tümörleri, optik gliom, yumuşak doku sarkomları gibi malign tümörler ve nörofibromlar ve hamartomlar gibi benign olanlar bunlar arasında sayılabilir. İlginç olarak NF1 hastalarında ortaya çıkan kanserlerde prognoz genel olarak aynı tanı NF1 olmayan hastalara göre daha iyi olmakta ve sağkalım daha uzun olmaktadır.

Mantripragada ve arkadaşları NF1 hasta grubunda MPSKT örneklerinde telomeraz aktivitesini çalışmışlar ve kontrol grubu olarak yine NF1 ilişkili benign tümörü olan hastaları kullanmışlar. MPSKT'lerde telomeraz aktivitesi pozitifliğini %61 olarak saptamışlar ve benign tümürlü hastaların hiçbirinde telomeraz aktivitesi saptanamamıştır⁶. Benzer şekilde Levy ve arkadaşları NF1 hasta grubunda malign tümörü olanlarda benign tümörü olanlara oranla oldukça fazla TERT ekspresyonu olduğunu saptamışlardır²⁰.

Bazı yazarlar telomeraz aktivitesi tayini için periferik kan örneklerinden de yararlanılabileceğini belirtmişlerdir. Periferik kanda mononükleer hücreler "soluble" faktörlerin veya metastatik lenf nodlarındaki tümör hücrelerinin antijenik uyarımıyla aktive olabilmektedir. Lee ve arkadaşlarının çalışmasında da baş-boyun kanseri olan hastalar çalışılmış ve telomeraz aktivitesinin periferik kanda mononükleer hücrelerde çalışılabileceği gösterilmiştir. Tümör progresyonunu belirlemede ve prognozu tahmin etmede önemli bir belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür²¹.

Sonuç

Düşük dereceli tümörlerde artmış TERT ekspresyonunun saptanması yüksek dereceli tümörlere progresyon açısından uyarıcı olabilir. Ayrıca birçok kanser tipinde telomeraz bazlı terapötik ajanların kullanımı açısından yararlı olabilir.

Kaynaklar

1. Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem*. 1997;43:708-14.
2. Rhyu M. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87: 884-94.
3. Feng J, Funk WD, Wang S, Weinrich S, Avilion A, Chiu C et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995;269:1236-41.
4. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Program AE et al. A mammalian telomerase-associated protein. *Science*. 1997;275:973-7.
5. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH; Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homolog from fission yeast and human. *Science*. 1997;277:955-9.
6. Mantripragada KK, Caley M, Stephens P, Jones CJ, Kluwe L, Guha A et al. Telomerase activity is a biomarker for high grade malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1 individuals. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:238-46.
7. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33:787-91.
8. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266: 2011-5.
9. Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:90-2.
10. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;350:569-73.
11. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 1995;155:3711-5.
12. Ge P, Zhang B, Zhang J, Gao Z, He W. Telomerase activity of peripheral blood mononuclear cells from patients with laryngeal carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2004;27:191-4.
13. Meeker AK, Coffey DS. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62:1323-31.
14. Weischer M, Nordestgaard BG, Cawthon RM, Freiberg JJ, Tybjærg-Hansen A, Bojesen SE. Short telomere length, cancer survival, and cancer risk in 47102 individuals. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:459-68.
15. Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, et al. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:1238-50.

16. İncecik F, Altunbaşak Ş, Hergüner MÖ, Bayram İ, Küpeli S, Demirbilek H. Oncologic manifestations in children with neurofibromatosis type 1 in Turkey. *Turk J Pediatr.* 2013;55:266-70.
17. Gül I, Dündar O, Bodur S, Tunca Y, Tütüncü L. The status of telomerase enzyme activity in benign and malignant gynaecologic pathologies. *Balkan Med J.* 2013;30:287-92.
18. Liu Y, Snow BE, Hande MP, Yeung D, Erdmann NJ, Wakeham A et al. The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. *Curr Biol.* 2000;10:1459–62.
19. Tomoda R, Seto M, Tsumuki H, Iida K, Yamazaki T, Sonoda J et al. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression are correlated with clinical aggressiveness in soft tissue tumors. *Cancer.* 2002;95:1127–33.
20. Levy P, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G et al. Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RTPCR. *Mol Cancer.* 2004;3:20.
21. Lee BJ, Wang SG, Choi JS, Lee JC, Goh EK, Kim MG. The prognostic value of telomerase expression in peripheral blood mononuclear cells of head and neck cancer patients. *Am J Clin Oncol.* 2006;29:163-7.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Serhan Küpeli
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Pediatrik Onkoloji ve Pediatrik Kemik İliği Nakil
Ünitesi,
Adana, Turkey
E-mail: serhankupeli@cu.edu.tr

Geliş tarihi/ Received: 14.11.2017**Kabul tarihi/Accepted:** 18.12.2017