



Mesane Kanseri Hastaların İdrar Örneklerinde Telomeraz Enzim Aktivitesi

Ayşegül BAYRAMOĞLUOsmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı
Eskişehir-TÜRKİYE

Telomeraz enzimi kendisine ait RNA ve proteinlerden oluşan bir reverse transkriptaz olup telomer boyunun kontrolünden sorumludur. Telomer ise, ökaryot hücre kromozomlarının her iki ucunda bulunan, heterokromatin yapıda özel DNA dizileridir. Telomeraz aktivitesi, tümör hücre ölümsüzlüğü ve karsinogenez sürecinin işleyebilmesi için gereklidir. Çoğu insan kanser hücresinde telomeraz aktivitesinin bulunması, bu enzimin kanser tanısı için diagnostik bir marker olabileceğini düşündürmektedir. Yine, telomeraz aktivitesinin kanserin ilerlemesine uygun şekilde artış göstermesi, tümör seyirinin takibi açısından da prognostik bir marker olabileceği fikrini doğurmuştur. Bu çalışma, mesane kanserli hastaların idrara atılan hücrelerinde, telomeraz aktivitesini belirlemek amacıyla yapıldı. Bu amaçla, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji kliniğine başvuran hastalardan, kontrol grubu olarak mesane kanseri olmayan 7 erkek ve hasta grubu olarak mesane kanseri teşhisi konmuş ve kemoterapi almamış 13 erkek kullanıldı. Deney grubu yaş ortalaması 40 ve üzerindedir. Hücre ekstraktlarının telomeraz aktivitesi, telomer tekrarı çoğalma protokolüne (TRAP) göre ölçüldü. Bunun için, TeloTAGGG Telomerase PCR –ELISAPLUS (Roche) kiti kullanıldı. PCR ürünlerinin doğruluğu için, poliakrilamid jel elektroforez uygulandı ve gümüş boyama ile bantlar görünür hale getirildi. İstatistiksel analiz sonunda, telomeraz aktivitesinin, kontrol grubuna göre, hasta grubunda yüksek olduğu tespit edildi. Çalışma sonuçlarımız, telomeraz aktivitesinin mesane kanserinin teşhisi ve tedaviye verdiği yanıtın takibinde yardımcı olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Telomeraz aktivitesi, TRAP, PCR, Mesane kanseri, İdrar

Telomerase Enzyme Activity Observed In Urine Samples of Bladder Cancer Patients

Telomerase is a reverse transcriptase formed by its own RNA and proteins, and is also responsible from telomere length control. Telomere is a sort of special DNA series with heterochromatin structure occurring at both ends of eucaryot cell chromosomes. Telomerase activity is essential for the immortality of tumor cells, and for the manipulate of carcinogenic process. Therefore this activation is consideration as an indicator for the diagnosis of cancer. Also telomerase activation exhibits an increase in proportion to the development of cancer, has brought attention to the idea that it may be a marker for monitoring the course of the tumour.

This study was planned to determine telomerase in the cells of the urines of bladder cancer patients. For this goal, we used 7 male without diagnosed bladder cancer in control group and 13 male diagnosed with bladder cancer and without chemotherapy in patient group who were referred to the urology clinics of Eskişehir Osmangazi University Medical Faculty. The mean age all of the experiment groups were over the 40 years old. The telomerase of cell extracts were determined by using TRAP method. We used the TeloTAGGG Telomerase PCR –ELISAPLUS (Roche) kit. PCR products, electrophoresis process was applied, and then bands were made noticeable by silver painting. Statistical analysis, it was found that telomerase was higher in urinary bladder cancer patients than the control group. This findings indicate that telomerase could aid in the diagnosis of bladder cancer, and also could help in following the response of the patients to treatment.

Key Words: Telomerase activity, TRAP, PCR, Urinary bladder cancer, Urine.

Giriş

Mesane tümörleri, organizmanın en sık görülen tümörlerindedir. Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür. Mesane kanseri genelde ileri yaş hastalığı olup 40 yaşın altında oldukça nadir 60 yaşın üzerinde ise oldukça fazladır. Günümüzde, sanayileşmedeki hız diğer kanser tiplerinde olduğu gibi mesane kanserinde de yaş sınırını giderek düşürmektedir (1). Mesane kanserinin nedenleri arasında genetik ve çevresel faktörler yer alır. Bu çevresel faktörler arasında sigara, suni tatlandırıcı içeren bazı gıdalar, tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları, uzun süreli böbrek ve mesane taşları ve kataterizasyon gibi yabancı cisimler, pelvise yapılan yüksek doz radyoterapi, uzun süreli phenacetin türü analjezik kullanılması, anilin boyaları, 2-naphthylamine, 4-aminobiphenyl, benzidine ve aromatik aminlerin metabolitleri yer alır (1-3). Mesane tümörlerinin oluşumunda çevresel faktörlerin yanında, 9. kromozomun tamamının ve 17. kromozomun kısa kolunun kaybının rol oynayabileceği de ileri sürülmektedir.

Yazışma Adresi

Ayşegül BAYRAMOĞLU
Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı
22100
Eskişehir-TÜRKİYE
atbayramoglu@yahoo.com

Bunlara ilaveten p53 mutasyonları da özellikle ileri evre ve yüksek dereceli tümörlerin oluşumunda etkili olmaktadır (1,4). Ayrıca, telomer boyunun belirli bir uzunlukta kalmasını sağlayan telomeraz enzim aktivitesinin de hematolojik malignansi, primer akciğer kanseri, hepatoselüler karsinom, gastrik karsinom, prostat kanseri, beyin tümörleri, meme kanseri, endometrial kanser gibi mesane kanserinde de arttığı belirlenmiştir (4-13).

Telomerler, ökaryot kromozomların her iki ucunda yer alan heterokromatin yapıda tekrarlayan DNA dizileri ve telomer bağlı proteinlerden oluşur. Genç ve bölünmekte olan soma hücrelerinde belli bir uzunluğu olan telomer boyu her hücre bölünmesinde giderek kısalır. Buna bağlı olarak da hücre bölünmesi sona erer ve hücreler yaşlılık dönemine girerler (6,7,14-23). Telomeraz enzim kompleksi ise, bir ribonükleoprotein olup, kendisine ait RNA ve proteinlerden oluşur. Bir revers transkriptaz olan telomeraz RNA'sı 1,5 telomer DNA tekrarına komplementer dizisini kullanarak telomer DNA tek dalını sentezler. İnsan telomeraz RNA komplementer dizisi 3' - AUCCCAAUC-5' 'dir. Telomeraz enzimi sayesinde, her hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kaybı telafi edilerek, hücrenin yaşam süresi uzatılır (6,7, 14-23).

Telomer uzunluğu ve dolayısıyla bu uzunluğun korunmasında görevli olan telomer bağlı proteinler ve telomeraz enzim aktivitesi hakkında elde edilecek her çeşit bilgi, kanserin moleküler düzeyi, erken teşhisi ve tedavisi konusunda önemli derecede yol gösterici olabilir.

Biz bu çalışmamızda, mesane kanserli hastaların idrara atılan hücrelerinde telomeraz enzim aktivitesini TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) tekniği ile belirlemeyi ve böylece kanseri moleküler açıdan ele alan bilgilere katkıda bulunmayı amaçladık.

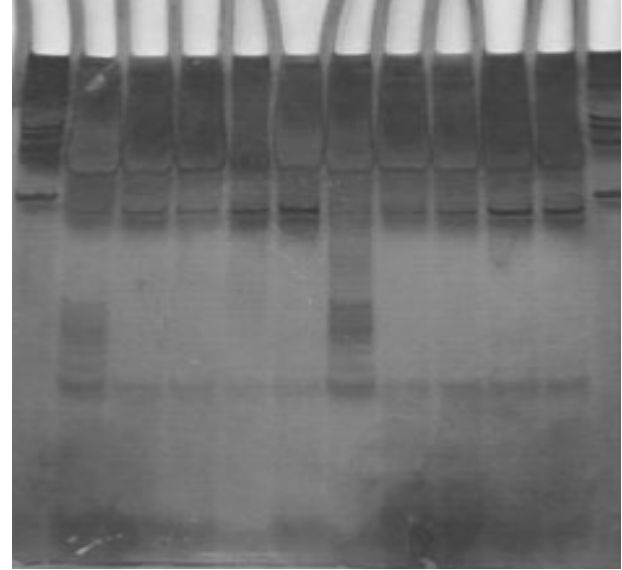
Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, kontrol amacıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalın' da mesane kanseri tanısı konmamış 40 yaşın üstünde 7 erkek birey ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalın' da mesane kanseri tanısı konmuş 40 yaşın üzerinde olan, kemoterapi almamış 13 mesane kanserli erkek hasta olmak üzere toplam 20 kişiden, en az 30 ml idrar örneği alınarak yapıldı.

Alınan idrar örneği, 20 dakika içinde soğutmalı santrifüjde +4 °C 'de 2000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 2 kere 10 mM PBS (pH: 7.4) ile yıkandı (30). Elde edilen hücre ekstraktı, ölçüm yapılıncaya kadar - 80 OC 'de saklandı. Telomeraz aktivitesi Kim N.W' nin TRAP yöntemine (28) göre ölçüldü. Bunun için TeloTAGGG Telomerase PCR – ELISAPLUS (Roche) kiti kullanıldı. Elde edilen hücre ekstraktlarına kit'de verilen yöntemle PCR işlemi yapıldı. Bunun için Tablo 1'de verilen amplifikasyon şartları uygulandı. Elde edilen PCR ürünlerine hibridizasyon-ELISA işlemleri yapıldı ve ELISA okuyucuda A450nm-A690nm 'de okutulmuş telomeraz aktivitesi

taayin edildi. %20 poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutulan PCR ürünleri, gümüş boyama yöntemi ile boyanıp görünür hale getirilerek telomeraz enzim aktivitesini gösteren bantlar elde edildi (Şekil 1).

Elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel olarak, student t-testi ile değerlendirildi.



M A B C D E F G H I K

Şekil 1. PCR sonrası, poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.

M: Marker, A,F: Pozitif kontrol, B-E: Hasta grubu, G-K: Kontrol grubu.

Bulgular

Çalışmamızda; kontrol olarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalın'da mesane kanseri tanısı konmamış 40 yaşın üstünde 7 erkek birey ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalın'da mesane kanseri tanısı konmuş 40 yaşın üzerinde olan, kemoterapi almamış 13 mesane kanserli hastadan alınan idrar örneklerinden elde edilen hücre ekstraktlarında, TeloTAGGG Telomerase PCR–ELISAPLUS (Roche) kit metoduna uygun olarak telomeraz aktivite düzeylerinin ölçülmesi sonunda, kontrol grubunda telomeraz aktivitesi $0,31 \pm 0,076$, hasta grubunda $23,8 \pm 5,25$ olarak belirlendi. Kontrol grubuna göre hasta grubundaki telomeraz aktivitesi artışı, istatistiksel olarak önemli bulundu ($P < 0,01$) (Tablo 2).

Tartışma

Papanicolaou ve Marshall 1945 yılında idrarı santrifüj edip içine dökülen kanser hücrelerini tanımlayarak mesane kanserinin sitolojik olarak test edilebileceğini açıkladılar. Bu yöntemle mesane kanseri teşhisindeki hassasiyetin %40 civarında olduğunu tespit ettiler (30). Daha sonra Yoshida ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada, tümör dokularının ve vücut sıvıları içine dökülen kanser hücrelerinin tanımlanması için, onlarda telomeraz aktivite tayininin hassas bir marker olabileceğini ileri sürdüler (27).

Tablo 1. Amplifikasyon Ürünü Elde Etme Programı.

Adım	Zaman	Sıcaklık (+)	Devir sayısı
1.Primer uzaması	30 dak.	25°C	
2.Telomeraz inaktivasyonu	5 dak.	94°C	
3. Amplifikasyon			30
Denaturasyon	30s	94°C	
Annealing	30s	50°C	
Polimerizasyon	90s	72°C	
Son uzatma	10 dak.	72°C	
4. Bekletme		4°C	

Tablo 2. Kontrol ve Hasta Grubunda Telomeraz Enzimi Aktivite Ortalamaları.

Grup	N	Telomeraz Aktivitesi
Kontrol	7	0,31 ± 0,076
Hasta	13	23,8 ± 5,25

P<0,01

Kim ve arkadaşları, telomeraz aktivite tayini için kolay ve yüksek hassasiyete sahip TRAP (Telomer tekrar çoğalma protokolü) metodunu buldular (28). Daha sonraki çalışmalarda bir çok araştırmacı, malign tümörlerin hemen hemen tüm tiplerinde, % 90'dan fazla sıklıkta, telomeraz aktivitesinin belirlenmesi için bu metodu kullandı (4, 5, 8, 27-34).

Yapılan bir çok çalışmada, mesane kanserinin erken evrelerinde, telomeraz aktivite tayininin teşhis için kullanışlı bir marker olabileceği ileri sürülmüştür (4, 5, 8, 27-37). Yokota, Kanda ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada, mesane kanserli kişilerin idrarından elde edilen kanserli hücrelerdeki telomeraz aktivitesinin, sağlıklı kişilere oranla yüksek seviyede olduğunu belirtmişlerdir (5). Telomeraz aktivitesinin belirlenmesi sayesinde, diğer bir çok kanserde olduğu gibi mesane kanserinin, erken aşamalarda teşhis edilebileceği, minimal yayılma gösteren düşük seviyeli mesane

Kaynaklar

- Anafarta K, Göğüş O, Arıkan N. Temel Üroloji. Ankara : Güneş Kitap Evi, 1998.
- Bozkırlı İ. Yeni Üroloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1987.
- Yaman LS, Göğüş O, Müftüoğlu ve ark. Üroloji. Ankara: Güneş Kitap Evi, 1989.
- Kinoshita H, Ogawa O, Mishina M, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. Journal of the National Cancer Institute 1997; 89: 724-729.
- Yokota K, Kanda K, Inoue Y, et al. Semi- quantitative analysis of telomerase activity in exfoliated human urothelial cells and bladder transitional cell carcinoma. British Journal of Urology 1998; 82: 727-732.
- Eissa S, Labib R, Mourad S, et al. Comparasion Of Telomerase Activity And Matrix Metalloproteinase -9 In Voided Urine And Bladder Wash Samples As A Useful Diagnostic Tool For Bladder Cancer. European Urology 2003; 44: 687- 684.
- Landman J, Chang Y, Kavalier E, et al. Sensitivity and specificity of nmp- 22, telomerase, and bta in the detection of human bladder cancer. Urology, 1998.; 52: 398-402.
- Kavalier E, Landman, J, Chang Y, et al. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. Cancer 1998; 708- 714.
- Kallakury BVS, Brien TP, Lowry CV, et al. Telomerase activity in human benign prostate tissue and prostatic adenocarcinomas. Diagnostic Molecular Pathology 1997; 6: 192-198.
- Brien TP, Kallakury BVS, Lowry CV, et al. Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. Cancer Research 1997; 57: 2760-2764.
- Murakami J, Nagai N, Ohama K, Tahara, H. et al. Telomerase activity in ovarian tumors. Cancer, 1997; 80: 1085-1092.
- Mu XC, Brien TP, Ross JS, Lowry CV, et al. Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. Cancer (Cancer Cytopathol) 1997; 87: 93-99.
- Özdemir M, Güneş HV, Başaran A, et al. KLL ve AML'li hastalarda telomeraz enzim aktivitesinin tayini. Kocatepe Tıp Dergisi 2004; 5: 25-28.
- Başaran A. Telomerlerin yapısı ve fonksiyonları. Sendrom Dergisi Sayı: 2002; 14: 112-115.

15. Başaran A. Hücre yařlanma ve hücre lmszlđnde telomerez enzim kompleksi. *Sendrom Dergisi* 2002; 14: 90-96.
16. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-73.
17. Abdel-Salam İ, Khaled MH, Gaballah HE, et al: Telomerase activity in bilharzial bladder cancer: prognostic implications. *Urologic Oncology* 2001; 6: 149-153.
18. Arai Y, Yajima T, Yagihashi A, et al. Limitations of urinary telomerase activity measurement in urothelial cancer. *Clinica Chimica Acta* 2000; 296: 35-44.
19. Hirose M, Abe-Hashimoto J, Ogura K, et al. A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization projection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997; 337-344.
20. Greider CW. Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation shortening and stabilization. *Current Opinion in Genetics and Development* 1994 ; 4: 203-211.
21. Holt SE, Wright WE, Shay JW. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *European Journal of Cancer* 1997; 33: 761-66.
22. Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L. Molecular biology of aging. *Cell* 1999; 96: 291-302.
23. Bitiřik , Yavuz S, Yasaseve, V, et al. Telomerase activity in patients with chronic myeloid leukemia and lymphoma research *Communicatrans in Molecular Pathology and Pharmacology.* 2000; 107: NOS 1&2.
24. Wright WE, Shay JW. Telomere positional effects and the regulaton of cellular senescence. *Tig* 1992; 6: 193-197.
25. Bryan T.M, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current Opinion in Genetics & Development* 1999; 11:318-324.
26. Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Current Opinion in Genetics & Development* 1999; 9: 97-103.
27. Yoshida K, Sugino Y, Tahara H, et al. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 1997; 79: 362-369.
28. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al . Spesific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer . *Science* 1994; 266: 2011-2015.
29. Ohyashiki K, Yahata N, Ohyashiki J.H, et al. A combination of semiquantative telomerase assay and in-cell telomerase activity measurement using exfoliated urethelial cells for the detection of urothelial neoplasia. *Cancer* 1998 ; 2554-2560.
30. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse AJ, et al. Comparasion of screen methods in the detection of bladder cancer. *The Journal of Urology* 1999; 161: 388-394.
31. Erdem E, Dikmen G, Atsu N, et al. Telomerase activity in diagnosis of bladder cancer. *Scan J Urol Neprol* 2003; 37(3): 205-209.
32. Sanchini MA, Bravaccini S, Medri L, et al. Urine Telomerase: an important marker in the diagnosis of bladder cancer. *Neoplasia* 2004; 6(3):234-239.
33. Fedriga R, Gunelli R, Nanni O, et al. Telomerase activity detected by quantitative assay in bladder carcinoma and exfoliated cells in urine. *Neoplasia* 2001; 3(5):446-450.
34. Wu WI, Liu LT, Huang CH, et al. Telomerase activity in human bladder tumors and bladder washing specimens. *Kaohsiung J Med Sci* 2001; 17(12):602-609.
35. Cheng CW, Chueh SC, Chern HD, et al. Diagnosis of bladder cancer using telomerase activity in voided urine. *J Formos Med Assoc.* 2000; 99(12):920-925.
36. Lancelin F, Anidjar M, Villette Jm, et al. Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesions. *BJU Int.* 2000; 85(4):526-531.
37. Abd El Gawad IA, Moussa HS, Nasr MI, et al. Comparative study of nmp-22, telomerase, and bta in the detection of bladder cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* 2005; 17(3):193-202.
38. Okumura A, Mizuno I, Nagakawao, et al. Telomerase activity is correlated with lower grade and lower stage bladder carcinomas. *Int J Urol* 2004; 11(12):1082-1086.