

# Kronik Lenfositik ve Akut Myeloblastik Lösemili Hastalarda Telomeraz Enzim Aktivitesi Tayininin Önemi; İlk Sonuçlarımız

## Importance of The Detection of Telomerase Activity in The Patients with Chronic Lymphocytic and Acute Myeloblastic Leukemia; Our First Results

Müjgan ÖZDEMİR<sup>1</sup>, Hasan V. GÜNEŞ<sup>2</sup>, Ayşe BAŞARAN<sup>2</sup>, İrfan DEĞİRMENCİ<sup>2</sup>,  
Mustafa SOLAK<sup>1</sup> Didem COŞAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, AFYON. <sup>2</sup>Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ESKİŞEHİR

**ÖZET:** Ökaryotik lineer kromozomların uçlarında yer alan ve tekrarlayan DNA dizileri ile özel proteinlerden oluşan telomerler, kromozom uçlarını yıkıma karşı korurlar.

Telomer boyu değişimi, telomer proteinleri ve telomeraz enzim kompleksi tarafından kontrol edilir.

Telomeraz aktivitesi, fetal ve ergin testisler, fetal ovarium, tamir gören dokuların çoğalan hücreleri, hematopoietik kök hücreleri, lenfositler, saç folikülleri ve barsak kripta hücrelerinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte en sık olarak malignansilerin %85'inde (örneğin; hematolojik malignansiler) yüksek telomeraz aktivitesi belirlenmiştir. Bu nedenle telomeraz aktivitesinin, kanser teşhisinde önemli bir gösterge olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda lösemik hücrelerde ve normal lenfositlerde telomeraz aktivitesinin tayini ve kıyaslanması amaçlanmıştır. Bu nedenle, sırasıyla Rai ve FAB kriterlerine göre yeni tanı 7 kronik lenfositik lösemi (KLL), 7 akut myeloblastik lösemi (AML) hastası ve 7 sağlıklı kişiden elde edilen toplam 21 periferik kan örneğinde telomeraz aktivitesi, TeloTAAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) kiti kullanılarak tayin edildi. PCR reaksiyonunun doğruluğundan emin olmak için PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütüldü ve gümüş boyama yöntemi ile bantlar görünür hale getirildi. KLL'li hastalarda kontrol grubuna göre düşük, AML'li hastalarda ise kontrol grubuna göre yüksek oranda telomeraz aktivitesi belirlendi. Ancak gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç olarak; lösemilerin prognozu, evrelendirilmesi, hastalığın remisyonu ve tedaviye verdiği yanıtın takibinde telomeraz aktivite tayininin güvenilir bir gösterge olabileceği düşünüldü.

[Anahtar Kelimeler: Telomer, telomeraz aktivitesi, kronik lenfositik lösemi (KLL), akut myeloblastik lösemi (AML), TRAP, ELISA]

**SUMMARY:** Telomeres, which are located at the ends of eukaryotic linear chromosomes and are comprised of repetitive DNA sequences with special proteins, protect ends of chromosomes against degradation.

Telomere length is controlled by telomere proteins and telomerase enzyme complex. Telomerase activity is not detectable in somatic cells except for fetal and adult testes, fetal ovary, proliferative cells from renewal tissues, hematopoietic stem cells, lymphocytes, hair follicles and cryptic cells in the intestine. However high telomerase activity had been detected in %85 of human malignancies (e.g. hematologic malignancies). Thus it has thought that telomerase activity is a important marker in the cancer diagnosis.

In our study it had been aimed determination of telomerase activity and comparison in leukemic cells and lymphocytes. Thus telomerase activity was determined by using TeloTAAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) kit in total 21 peripheral blood samples collected from newly diagnosed patients according to Rai and FAB criteria respectively 7 chronic lymphocytic leukemia (CLL), 7 acute myeloblastic leukemia (AML) patients and 7 healthy persons. To ensure the truth of PCR reaction PCR products were electrophoresed on a polyacrylamide gel and bands were made visible by the method of silver staining. Telomerase activity was low in the CLL patients and high in the AML patients according to control group. But the differences between the groups statistically was not significant.

As a result, it was thought that determination of telomerase activity could be significant marker for prognoze, remission and therapy of leukemia.

[Key words: Telomere, telomerase activity, chronic lymphocytic leukemia (CLL), 7 acute myeloblastic leukemia (AML), TRAP, ELISA]

## GİRİŞ

Ökaryotik canlıların lineer kromozomlarının uçlarında bulunan ve tekrarlayan DNA dizileri (örneğin; insanda ve farede TTAGGG) ile proteinlerden mey-

dana gelen telomerler (1,2), kromozomların bütünlüğünü korur, kromozom uçlarında ekzonükleaz enzimlerinin etkileri sonucu ortaya çıkabilecek kromozom yıkımını ve uç uca kaynaşmaları engellerler (2,3). İnsanda, normal somatik hücrelerin telomer boyu, her hücre bölünmesinde kısılır (4,5). Bu kısalma, telomer proteinleri ve telomeraz enzimi tarafından kontrol edilir (1,6).

Telomeraz enzimi, protein ve RNA'dan oluşan bir ribonükleoprotein kompleksi olup, kendine ait RNA'sını kalıp olarak kullanarak, telomer DNA'sının uzamasını sağlar (6,7).

Telomeraz aktivitesi, fetal ve ergin testislerde, fetal ovaryumda, tamir gören dokuların çoğalan hücrelerinde, hematopoietik kök hücrelerde, lenfositlerde, saç foliküllerinde, barsak kripta hücrelerinde ve birçok kanser çeşidinde gösterilmiştir (3,8). Telomeraz aktivitesine sahip bu tip hücrelerde, hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kaybı telafi edilerek, hücrenin bölünmeye devam etmesi sağlanır (4,9). Bu şekilde korunan sabit telomer uzunluğunun, hücre yaşlanmayı engellediği ve kromozom dayanıklılığını sağladığı kabul edilmektedir (2).

Bilindiği gibi, karsinogenezin nedeni kontrolsüz hücre bölünmesidir (10,11). Bu bölünmenin gerçekleşebilmesi için telomer boyunun belirli bir uzunlukta olması gerekir. Bunun için bu tip hücrelerde telomeraz aktivitesinde artış veya reaktivasyon görülür (5,12).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, birçok kanser çeşidinin taranması, telomeraz aktivitesi ile malignensi arasında çok güçlü bir ilişkinin bulunduğunu göstermiştir (7,13).

Yapılan bu çalışmalarda, telomeraz aktivitesi, hematolojik malignensilerin %67-100'ünde, primer akciğer karsinomalarının %80'inde, hepatosellüler karsinomaların %85'inde, gastrik karsinomaların %85'inde, prostat karsinomalarının %78-84'ünde, beyin tümörlerinin %66-94'ünde, meme karsinomalarının %93'ünde ve endometrial karsinomaların %95'inde belirlenmiştir (14,15).

Bütün bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, telomeraz aktivitesinin, çeşitli insan kanserlerinin erken teşhisi ve hastalığın seyrinde prognostik bir marker olabileceğini düşündürmektedir (4,8). Ayrıca yapılan birçok çalışmada telomeraz aktivitesi inhibisyonunun umut vaat eden bir tedavi şekli olabileceği de ileri sürülmektedir (16,17).

Biz de, bu çalışmamızda, kronik lenfositik lösemili (KLL) ve akut myeloblastik lösemili (AML) hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde telomeraz aktivitesini belirlemeyi ve lösemiye moleküler açıdan ele alan bilgilere katkıda bulunmayı amaçladık.

## MATERYAL - METOD

Çalışmamızda Hematoloji Bilim Dalı'ndan temin edilen herhangi bir tedavi almamış, sırasıyla Rai ve FAB kriterlerine göre tanısı konulmuş olan 7 kronik lenfositik lösemi (KLL), 7 akut myeloblastik lösemi (AML) hastası ve 7 sağlıklı kişiden alınan kan örnekleri 2ml'lik EDTA'lı tüplerde toplandı.

Toplanan kan örneklerinden Ficoll-Histopaque yöntemi (18) ile mononükleer hücreler izole edildi. Elde edilen hücreler, çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

Örneklerin toplanması tamamlandıktan sonra TeloTAAGGG Telomerase PCR ELİSA<sup>PLUS</sup> (Roche) kiti kullanılarak hücre ekstraksiyonu, PCR ve hibridizasyon-ELİSA işlemleri yapıldı. Hücre ekstraksiyonunu hazırlamak için her bir örnekten steril tüplere  $2 \times 10^5$  hücre alındı ve hücreler lizis solüsyonu ile patlatıldı. Hücre ekstraktları 30 dak. 25°C primer uzaması, 5 sn. 94°C telomeraz inaktivasyonu ve 30 sn. 94°C denatürasyon, 30 sn. 50°C annealing, 90 sn. 72°C polimerizasyon (30 döngü), 10 dak. 72°C son uzamadan oluşan PCR işlemine tabi tutuldu. Elde edilen PCR ürünlerine hibridizasyon-ELİSA işlemleri yapıldı ve ELİSA okuyucuda A450<sub>nm</sub>-A690<sub>nm</sub>'de okutularak örneklerdeki telomeraz aktivitesi tayin edildi. Yine poliakrilamid jelde yürütülen PCR ürünleri, gümüş boyama yöntemi ile boyanarak telomeraz enzim aktivitesini gösteren merdiven band görüntüsü (50 bp'lik artan bandlar) yönünden incelendi (Şekil -1). Elde edilen tüm sonuçlar, student t testi ile değerlendirildi.

## BULGULAR

Yaptığımız bu çalışmada, 7 sağlıklı kişi (kontrol grubu), 7 KLL'li hasta [6 geç evreli (evre III-IV) ve 1 intermediate evreli (evre II)] ve 7 AML'li hasta (1 M1, 2 M2, 2 M3 ve 2 M4 alt gruplarında olan) dan elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde telomeraz aktivite düzeylerinin incelenmesi sonunda; KLL'li hastaların telomeraz aktivitesinin ( $0,0213 \pm 0,004$ ), kontrol grubuna göre ( $0,1744 \pm 0,098$ ) daha düşük olmakla birlikte, istatistiksel açıdan anlamlı fark göstermediği belirlendi ( $p > 0,05$ ). Yine AML'li hastaların telomeraz aktivitesinin ( $0,53 \pm 0,215$ ), kontrol grubuna göre ( $0,1744 \pm 0,098$ ) yüksek olmasına rağmen, istatistiksel açıdan anlamlı fark göstermediği belirlendi ( $p > 0,05$ ) (Tablo-1).

**Tablo-1:** Kontrol grubu, KLL ve AML hastalarının telomeraz aktivitesi

Grup	n	Telomeraz Aktivitesi
Kontrol	7	$0,1744 \pm 0,098$
KLL	7	$0,0213 \pm 0,004$
AML	7	$0,53 \pm 0,215$

$p > 0,05$  n.s.

## TARTIŞMA

Telomeraz aktivitesi pek çok normal somatik hücrede tayin edilemezken, hematolojik malignansileri de kapsayan çeşitli kanser türlerinde tayin edilebilmektedir. Bu nedenle telomeraz aktivitesinin karsinogenez sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (19,20).

Yapılan bazı çalışmalarda, yetişkin sağlıklı kişilerden alınan periferik kan ve kemik iliği mononükleer hücrelerinde telomeraz aktivitesi belirlenmiştir (20,21,22). Ayrıca normal insan T ve B lenfositlerinde çok düşük seviyelerde telomeraz aktivitesinin bulunduğu, ancak bu hücrelerin in vitro olarak mitojenlerle uyarıldıklarında, telomeraz aktivitesinin arttığı belirtilmektedir (22). Biz de çalışmamızda literatürlerle uyumlu olarak yetişkin sağlıklı kişilerden alınan periferik kan lenfositlerinde telomeraz aktivitesi belirledik. Bu durum, nonspesifik mitojenlere ya da antijenlere maruz kalınca, lenfoblastlara dönüşen dinlenme halindeki lenfositlerin, çoğalabilmesinden kaynaklanmaktadır (22,23).

Hematopoietik kök hücrelerinin ve antijenik bir uyarı ile çoğalan lenfositlerin, her hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kısalmasını engellemek için telomeraz aktivitesine sahip oldukları düşünülmektedir (22).

Hematopoietik kök hücrelerde ve lenfositlerde telomeraz aktivitesine rağmen, bu hücrelerde yaşlanmayla birlikte telomerlerin kısaldığı belirtilmektedir (22). Telomeraz aktivitesi bu normal hücrelerde muhtemelen bu dokunun rejeneratif potansiyelini sağlamak için korunmaktadır. Bununla birlikte organizma, bir antikanser mekanizma olarak, hematopoietik hücrelerin çoğalma kapasitelerini sınırlamaya ihtiyaç duymaktadır. Çünkü bu hücrelerde telomeraz aktivitesi telomer kısalmasını yavaşlatabilmekte, fakat önleyememektedir (22).

KLL'li hastalarda telomeraz aktivitesini ölçmeye yönelik yapılan çalışmalarda, erken evre KLL'li hastalarda ortalama telomeraz aktivitesinin normal seviyede hatta kontrol grubundan daha düşük olduğu bulunmuştur. Ancak telomeraz aktivitesinin hastalığın geç evrelerinde 2-4 kat arttığı gösterilmiştir (20,22,24)

Bunlara karşılık Counter ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, geç evre KLL'li hastalardaki ortalama telomeraz aktivitesinin, kontrol grubundaki ortalama aktiviteden düşük, fakat bu değerlerin birbirine yakın olduğu bildirilmiştir (25). Bu çalışmada ayrıca hem erken hem de geç evreli KLL hastalarının bazılarında, telomeraz aktivitesinin hiç belirlenmediği de belirtilmiştir (25).

Biz de çalışmamızda Counter ve arkadaşlarının çalışmasıyla (25) uyumlu olarak geç evre KLL'li hastalarda telomeraz aktivitesinin kontrol gruba göre istatistiksel olarak önemsiz olmakla birlikte bir miktar düşük olduğunu belirledik. Bu durum, Counter ve arka-

daşları (25) tarafından ileri sürülen "Reaktivasyon Modeli" ile bağımlı olarak açıklanabilir. Bu modele göre; başlangıçta progenitor lösemik hücre telomeraz aktivitesine sahip olmayıp, KLL'nin ilerlemesi esnasında lösemik hücrelerin bir kısmında telomeraz reaktivasyonu gerçekleştiğinden toplamda telomeraz aktivitesi düşük bulunabilmektedir. Çalışmamızda KLL'li hastalardaki telomeraz aktivitesinin düşük olmasının nedeni, KLL'deki lösemik lenfositlerin çok yavaş çoğalmalarından ve çoğalan bu hücrelerin bir kısmında gerçekleşen telomeraz reaktivasyonuna bağlı olabileceği düşünülebilir.

Bunlara karşılık, AML'li hastalarda telomeraz aktivitesini belirlemek için yapılan bazı çalışmalarda, AML'li hastalarda telomeraz aktivitesinin kontrollerden 10-50 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (20,22). Ayrıca AML'li hastalarda yüksek telomeraz aktivitesinin kötü prognoz ve tedaviye dirençle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (22,26).

Biz de çalışmamızda AML'li hastalarda telomeraz aktivitesinin kontrole göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak bu yüksekliğin önemli olmadığını belirledik. Çalışmamızda AML'li hastalarda telomeraz aktivitesinin kontrol ve KLL'li hastalara göre önemsiz de olsa yüksek olmasının nedeni, AML'li hastalarda lösemik hücrelerin tam olarak olgunlaşmamış olması ve bu olgunlaşmamış hücrelerin aşırı çoğalabilme yeteneklerinden dolayı, telomeraz enzimlerinin aktive olmasına bağlı olabileceği düşünülebilir (27).

Sonuç olarak; lösemilerin prognozu, evrelendirilmesi, hastalığın remisyonu ve tedaviye verdiği yanıtın takibinde telomeraz aktivite tayininin güvenilir bir gösterge olabileceği düşünüldü.

## KAYNAKLAR

1. Kanoh J, Ishikawa F. Composition and conservation of the telomeric complex. *Cell Mol Life Sci* 60(11):2295-302, 2003
2. Heist EK, Huq F, Hajjar R. Telomerase and the aging heart. *Sci Aging Knowledge Environ* 14(19):11, 2003
3. Ferreira MG, Miller KM, Cooper JP. Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol Cell* 13(1):7-18, 2004
4. Testorelli C. Telomerase and cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 22(2):165-9, 2003
5. Bibby MC. An introduction to telomeres and telomerase. *Mol Biotechnol* 24(3):295-301, 2003
6. Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet* 362(9388):983-8, 2003.
7. Mokbel K. The evolving role of telomerase inhibitors in the treatment of cancer. *Curr Med Res Opin* 19(6):470-2, 2003.
8. Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* May 194 (2):221-33, 2003

9. Incles CM, Schultes CM, Neidle S. Telomerase inhibitors in cancer therapy: current status and future directions. *Curr Opin Investig Drugs* (6):675-85, 2003.
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. Fourth Edition, Garland Science, New York, 1313-32, 2002.
11. Harrington L, Mcphail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB et.al. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275: 973-7, 1997.
12. Blasco MA, Hahn WC. Evolving views of telomerase and cancer. *Trends Cell Biol* 13 (6):289-94, 2003
13. Gu J, Fang B. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy. *Cancer Biol Ther* Jul-2(4 Suppl 1):64-70, 2003.
14. Beltz LA. The 'other' telomerase inhibitors: non-G-quadruplex interactive agent, non-antisense, non-reverse transcriptase telomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2(5):589-603, 2002.
15. Mu XC, Brien TP, Ross JS, Lowry CV, Mckenna BJ. Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 87:93-9, 1999.
16. Nguyen B, Elmore LW, Holt SE. Telomerase as a target for cancer immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2(2):131-6, 2003.
17. Mego M. Telomerase inhibitors in anticancer therapy: gossypol as a potential telomerase inhibitor. *Bratisl Lek Listy* 103(10):378-81, 2002.
18. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 21 (Suppl 97):77, 1968.
19. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3):407-25, 2002.
20. Engelhardt M, Mackenzie K, Drullinsky P, Silver RT, Moore MA. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res* 60 (3):610-7, 2000.
21. Trentin L, Ballon G, Ometto L, Perin A, Basso U, Chieco-Bianchi L, Semenzato G, De Rossi A. Telomerase activity in chronic lymphoproliferative disorders of B-cell lineage. *Br J Haematol* 106(3):662-8, 1999.
22. Koutroumba P, Polychronopoulou S, Haidas S. Structure and function of telomeres/telomerase and their role in preleukaemia and haematologic malignancies. *Haema* 6(1):35-47, 2003.
23. Çavuşoğlu, H. (trans. ed.). *Renkli Fizyoloji Atlası*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1997.
24. Trentin L, Ballon G, Ometto L, Perin A, Basso U, Chieco-Bianchi L, Semenzato G, De Rossi A. Telomerase activity in chronic lymphoproliferative disorders of B-cell lineage. *Br J Haematol* Sep;106(3):662-8, 1999.
25. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85(9):2315-20, 1995.
26. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 21(4):680-7, 2002.
27. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Iwama H, Hayashi S, Toyama K, Shay JW. Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clinical Cancer Research* 3:619-25, 1997.