

Telomeraz Enziminin Tanı ve Tedavide Kullanım Alanı

Dok.Öğr. Figen GÜZELGÜL
Prof.Dr. Kıymet AKSOY

Telomer Nedir?

Telomerler, lineer kromozomların uçlarında yer alan tekrarlayan DNA dizileridir ve ilk kez 1931'de *Drosophila* ile yapılan bir çalışma sonucunda Muller tarafından gösterilmiştir^{1,2}. Muller tarafından yapılan çalışmada; mutajenik X-ray ışınlarına karşı kromozomun uç kısımlarında yer alan telomerlerin dayanıklı olduğu bulunmuştur³.

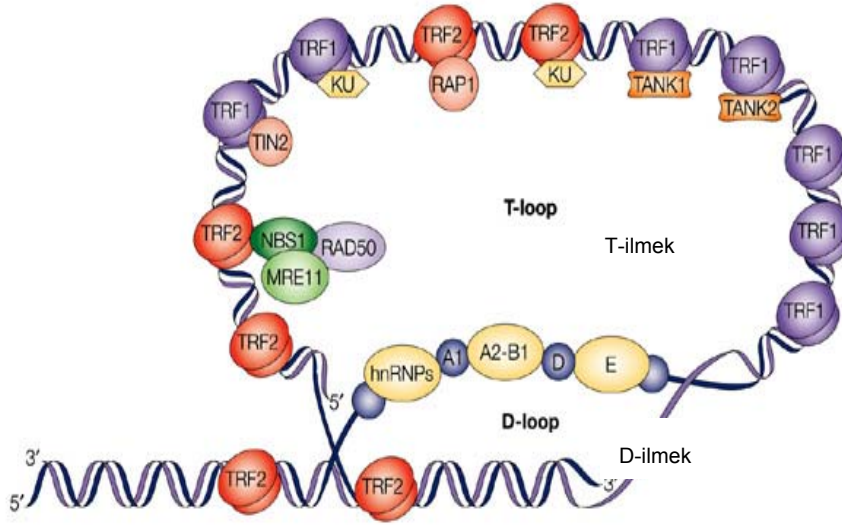
Canlı organizmalarda birbirinden farklı olarak tekrarlayan DNA dizileri bulunmaktadır. Aynı biçimde Telomerik RNA primerleri farklı canlı gruplarında farklı diziler içermektedir (Tablo I). İnsanda telomer tekrar dizileri TTAGGG iken Protozoa grubundan olan Tetrahymena'da ise bu tekrar dizileri TTGGGG şeklindedir^{1,2,4}.

Tablo I. Telomerik RNA primerlerinin farklı canlı gruplarındaki dizileri²

Organizma	Telomerik Diziler	RNA Primer Dizileri	RNA Büyüklükleri (kb)
Tetrahymena	TTGGGG	CAACCCCAA	160
<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAACC	190
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAACC	190
Human	TTAGGG	CUAACCCUAAC	450
Mouse	TTAGGG	CCUAACCCU	450
<i>S. cerevisiae</i>	TG(1-3)	CACCACCCACACAC	1300
<i>K. lactis</i>	TTTGATTAGGTATGT- GGTGTCGGA	UCAAUUUCCGUACACC- AAUACCUAUCAA	1300

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ADANA

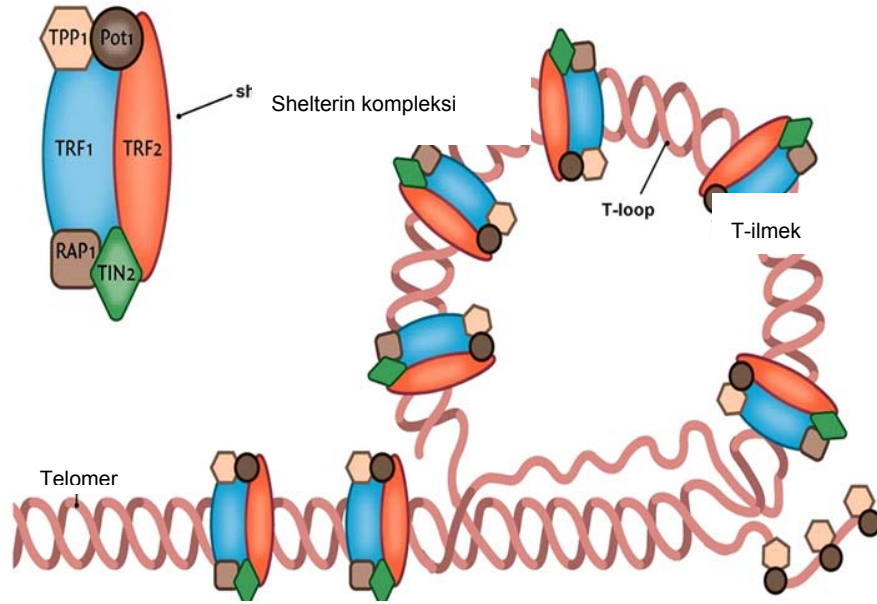
Telomerlerin yapısı; T-ilmek ve D-ilmekten oluşmaktadır⁵. Telomer bağlayıcı proteinler kendi üzerine katlanarak telomerlerin T-ilmek yapısını oluşturur⁶. D-ilmek yapısı ise; tek iplikli sarkan (overhanging) Guanin zengini zincir (G- kuyruğu) çift iplikli telomerin içine girer ve bu yapı da telomer ipliklerinden birinin yerine geçerek ikinci bir ilmek yapısı oluştururlar⁵ (Şekil 1).



Şekil 1. Telomerlerin T-ilmek ve D-ilmek yapıları⁷

Telomer bağlayıcı proteinler; çift zincirli (örn; insanda TRF1, TRF 2 ve Tin2 “telomerlerin negatif düzenleyicileri”) ve tek zincirli (örn; insanda POT1 ve TPP1 “telomerlerin pozitif düzenleyicileri”) olarak iki gruba ayrılır². TRF 1 proteinleri, çift zincirli DNA’da telomerik tekrarlara bağlanır ve telomeraz enzimini baskılayarak telomerin uzamasını engeller. TRF1, memeli telomerlerindeki TTAGGG dizilerini spesifik olarak tanıdığı için "TTAGGG tekrarına bağlanan faktör" olarak da isimlendirilir. TRF2 ise amino terminalinde TRF1’e oranla daha fazla sayıda bazik aminoasit içerir ve kromozomların uç uca füzyonunu önleyerek telomerlerin yapısını

korumaktadır. Telomerlerin "TTAGGG" dizi tekrarları ve telomer bağlayıcı proteinlerden oluşan kısmına 'telesom' denilmektedir⁸. T-ilmek yapısıyla birlikte telomerler ve onlarla ilişkili proteinler ve yapılar DNA hasarından kromozom sonlarını korurlar⁹. T-ilmek yapısının oluşturulmasında ve stabilitesinde rol alan 6 adet telomer spesifik protein "Shelterin" kompleksi bulunur, bu proteinlerden TRF1, TRF2 ve POT1 direkt TTAGGG tekrarlarına tutunur, birbirlerine TIN2, TPP1 ve Rap1 proteinleri ile bağlanırlar⁶ (Şekil 2).



Şekil 2. Telomerde "shelterin" kompleksi¹⁰

1961 yılında telomerlerin; telomer bağlayıcı protein ve telomere özgü DNA dizilerini kullanarak replikasyon sırasında genetik materyali korumada görev aldıkları bulunmuştur². Hayflick insan fibroblastları ile yaptığı çalışmada "Telomer kaybını" gözlemiştir⁹. "Telomer kaybı"nın ortadan kalkması için iki mekanizma bulunmaktadır; bunlardan ilki, bir revers transkriptaz enzimi olan

aktif telomeraz RNA primeri kullanarak de novo olarak telomerik tekrar dizileri sentezlerler, ikinci mekanizma ise; ALT (alternatif uzatılan telomerler) yolağı sonucu meydana gelir. Bu yolak tam aydınlatılmamış olmakla birlikte telomerik tekrarlar kendi aralarında homolog rekombinasyonlar sonucu meydana gelmektedir². "Telomer kaybı" hipotezine göre, her bölünme sonunda kromozomların uçlarında yer alan telomerler belli miktarlarda azalarak yaşlanmaya neden olmakta ve telomerazlar DNA'nın son kısmının tamamlanmasında rol oynamaktadır. Bu uç kısım, kromozomları rekombinasyon, yıkım, gen ekspresyonu ve füzyon gibi dış etkilere karşı korur. Ayrıca kromozomun bütünlüğünü korumayı sağlayan telomerler; tümör oluşumunda, yaşlanmada ve hücre bölünmesinde görev alırlar^{1,9}. Ayrıca telomerler; yakınında bulunan genlerin ifadelerini baskılamada görev alır ancak bu mekanizma tam olarak aydınlatılmamıştır². Telomerler DNA replikasyonunun düzgünlüğü konusunda sentromer bölgeleri ile aynı derecede önemlidir. İnterfaz çekirdeğinin üç boyutlu yapısının kurulmasında da etkili olduğu düşünülmektedir. Hücre içinde telomer çekirdekleri zara yakın konumda olup sentromerlerle 180° açı oluştururlar. Telomerler homolog kromozomlarla homolog olmayan kromozomlar arasında geçiş sağlarlar¹¹.

Telomerler organizmalarda az miktarda bulunup total DNA'nın yaklaşık %0.003'ü telomerik DNA oluşturur. Bunların işlevlerinin ve sentezlenmelerinin anlaşılması ancak yakın zamanlarda başarılabilmiştir. Bu alandaki çalışmalar daha sonraları kısa ve doğrusal DNA'ları olan silli protozoalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Günümüzde telomerlerin yapı, işlev ve sentez mekanizmaları; protozoalarda, küf mantarlarında, bitki ve hayvan hücrelerinde incelenmeye devam etmektedir. Bugüne kadar çalışılan tüm organizmalarda kromozom uçlarının G ve T'den oluşan kısa, basit ve tekrar eden zincirler olduğu bilinmektedir. Tekrar edilen bu zincirlerin sayısı kazanılan ve kaybedilen zincirlerle belirlenir¹¹.

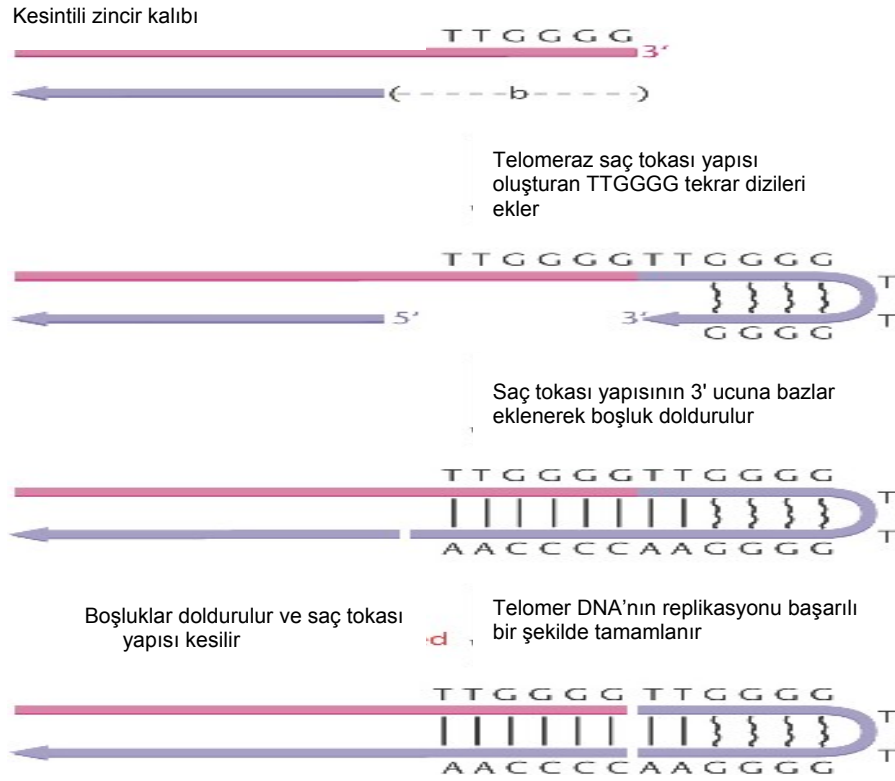
2. Telomeraz Enzimi

Telomeraz enzimi (telomer terminal transferaz, telomer deoksinükleotidil transferaz), kromozomal uçlardaki “TTAGGG” tekrarlarının sentezinden sorumlu olan ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimerazdır. İlk defa Tetrahymena’da Greider ve Blackburn tarafından tanımlanan telomeraz enzimi, daha sonra Morin tarafından insan HeLa hücrelerinde gösterilmiştir. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde bulunmamaktadır. Fakat, immortal kanser hücrelerinde yeniden aktive olmaktadır⁸. Telomerazlar; germ hücreleri, embriyonik kök hücreler, tek hücreli ökaryotlar ve kanser hücrelerinde bulunmaktadır⁴.

2.1. Telomeraz Enziminin Bileşenleri

Telomeraz enzimi bir ribonükleoprotein olup, üç alt üniteden oluşmaktadır. Bunlardan insan telomerazı RNA(hTER); de novo telomer sentezi için kalıp oluşturur⁹. Telomeraz RNA’sı telomer DNA tekrarının komplementer dizisini kullanarak telomer DNA’sının tek zincirini sentezler. hTER, telomerik DNA dizisine komplementer olan 8-30 bazlık kısa bir segmenti, zincirin 3’ ucunun uzatılmasında kalıp olarak kullanır¹¹. İnsan telomeraz RNA komplementer dizisi 3’ -AUCCAAUC-5’ ‘dir¹². İnsan telomerazı revers transkriptazı (hTERT); protein yapıda olup reverse transkriptaz domain içeren telomerik DNA sentezi sırasında fosfodiester bağlarını sentezler¹³. TP 1 ise, insan telomeraz protein komponentinden meydana gelmektedir⁹ (Şekil 3).

tarafından tamir edilemez. Dolayısıyla her sentezin sonunda kromozom, teorik olarak RNA primerinin boyu kadar kısalmaktadır. Telomeraz adı verilen ve ters transkriptaz işlevi gören bu enzim tarafından her replikasyon sonrası telomerin ksalmasını engellemek için tekrarlayan diziler kromozomların uçlarına eklenir. İlave edilen diziler "saç tokası" gibi kıvrılır ve karşı karşıya gelen guanozinler arasında hidrojen bağları oluşur. RNA primeri uzaklaştığında, DNA polimeraz l'in boşluğu doldurması için substrat olarak iş görececek olan serbest 3'-OH ucu oluşturulur. Daha sonra saç tokası yapısı kırılır ve replikasyon döngüsü sonucu DNA kaybı engellenmiş olur⁹ (Şekil 4).



Şekil 4. DNA replikasyonu esnasında telomeraz enziminin işlevi⁴

2.3. Telomeraz Enziminin İşlevleri

Blackburn ve Greider enziminin nasıl çalıştığını ortaya koymuşlardır. Enzim yapısında katalitik etki için gerekli olan kısa RNA parçası bulunduran çok özgün yapıda bir ribonükleoproteindir. Enzim kalıp olarak 159 baz içeren RNA bileşenindeki 5'-AAC(T)CCC-3' dizisinin eşleniğini oluşturmak üzere yönlendirilir^{9,14}.

Telomer dizilerinin uzatılması dışında telomerazların başka bir işlevi de, intrinsik nükleaz aktivitesi göstermesidir. Telomer sentezinden önce kromozomların iplikçiklerinin 3' uçlarından nükleotitlerin uzaklaştırılmasında görev alırlar. Bazı çalışmalarda telomerazın nükleaz aktivitesiyle aslında telomerler üzerindeki işlevlerini gerçekleştirmede daha etkin olduğu savunulmuştur. Ancak uyumsuz nükleotitlerin uzaklaştırılmasında telomerazların görev aldığı deneysel olarak henüz ispatlanmamıştır².

2.4. Telomeraz Enziminin Düzenlenmesi

Telomeraz enziminin düzenlenmesi birçok mekanizma tarafından gerçekleşmektedir. Bunlar hTERT ve hTER'lerin maturasyonu, transkripsiyonları, modifikasyonları ve mRNA splicing mekanizmaları tarafından kontrol edilmektedir. Özellikle hTERT geninin transkripsiyonel düzenlemeler ile telomeraz enziminin aktivitesini etkilediğine dair veriler bulunmaktadır. Çoğu somatik insan hücrelerinde telomeraz aktivite eksikliği hTERT geninin transkripsiyonunun baskılanması nedeniyle olduğu ileri sürülmektedir². Ayrıca hTERT eksikliği ile, 5. kromozomun bir parçasının kaybıyla ilişkili olan Cri du Cat sendromu buna örnek oluşturmaktadır¹⁵.

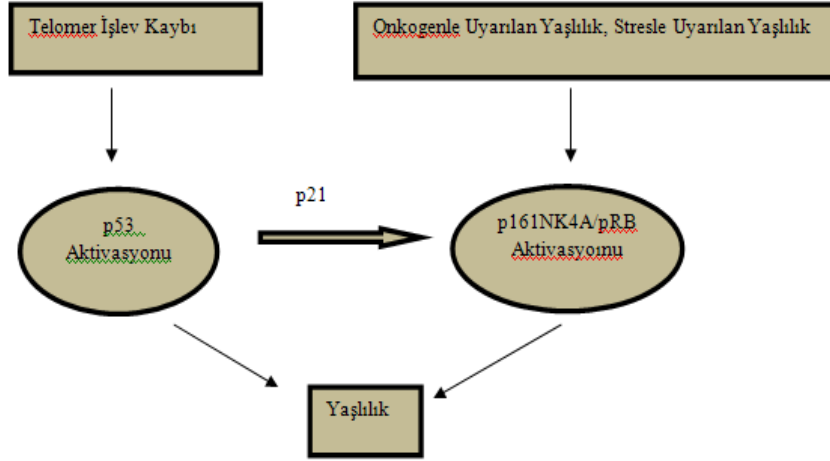
2.5. Telomeraz Enzimi ve Yaşlanma

Replikatif senesens; geri dönüşümsüz olarak hücre döngüsünün durması, apoptozise karşı direnç ile gen ekspresyon ve işlevlerinde değişikliklerin ortaya çıkması ile karakterize edilir¹⁶.

Olovnikov tarafından yapılan bir çalışmada, Telomer kısalmasının ileride ölüme yol açabileceği, somatik hücrelerde çoğalmayı sınırlandırarak hücre yaşlanmasına neden olabileceği bildirilmiştir¹¹.

Hücre yaşlanırken morfolojik olarak hacmi artar ve sitoplazması donuklaşır. Ayrıca, gen ekspresyonunda, nükleer yapılarda, proteinlerin işlenmesinde bozulmalar izlenirken bu hücreler metabolik olarak canlıdır. Yaygın ve geleneksel olarak yaşlılıkla ilişkili β -galaktozidaz ve p16INK4A tümör supresör yaşlılık belirteçleri olarak kullanılmaktadır. Telomerler hücre replikasyonda anahtar rol oynamaktadır ve telomerlerin kaybı hücrenin replikasyon yeteneğini kaybetmesine yol açmaktadır⁹.

İnsan hücrelerinde replikasyonu sınırlayan iki yolak bulunmaktadır. Bunlardan birincisi telomer bağımlı (p53 bağımlı), diğeri ise p16INK4A ve pRB tümör supresörlerine bağlı (kısmen tanımlanmış ve stres sinyalleri ile uyarılan) yolaklardır. Genel olarak, bu mekanizmalar onkogenler tarafından indüklenerek yaşlılık esnasında aktive olabilirler. p53/p21 ve p16INK4A/pRB genleri stres kaynaklı erken yaşlılığı tetikleyebilir ve sonrasında da bozulmuş telomer işlevi yaşlılığı indükleyebilir⁹ (Şekil 5).



Şekil 5. Yaşlılığın iki önemli yolağı p53/p21 ve p16INK4A/pRB⁹

Normal dokulardaki telomerin uzatılmasından sorumlu sistemler bölünme sırasında etkinliklerini sürdürmezler. Bu nedenle telomerler hücre bölünmesi sırasında kısalırlar. Telomer uzunluğu hücrelerin replikatif yaşama süresini belirler. Telomerler kritik uzunluğa kadar kısaldıklarında yaşlanma programı aktive olur. Bundan sonra hücre bölünmesi durur. Fakat yaşamaya ve işlev görmeye devam ederler. Eşey hücrelerinde telomerlerin bakımı aktif olarak yapılmaktadır. Bunun sebebi, bir sonraki nesle kromozom transferi yapılma zorunluluğudur. Bu durum telomer replikasyonunda görevli olan telomeraz enziminin aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Telomer uzunluğu ile yaş arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacı ile farklı yaşlardaki insanlara ait hücrelerde, insan fibroblastlarının ön kültürlerinde ve bazı kanser hücrelerinde çalışmalar yapılmıştır, telomer uzunluğunun artan hücre bölünme hızı ve yaşıyla azaldığı anlaşılmıştır¹¹.

Harley yaşlanmanın ve ölümün iki evrede meydana geldiğini açıklamıştır. "Mortalite 1 (M1)" evresi, replikatif hayat uzunluğunu temsil eder. M1 evresinde telomerlerin kısalması ile kromozom uzunlukları kritik boydadır ve boy uzunluğuna "Hayflict Limiti (Proliferasyon Limiti)" denilir. Proliferasyon limiti hücre döngüsünü durdurur ve yaşlılık programını başlatır¹¹. M1 evresi p53 ve p110Rb gibi tümör baskılayıcı proteinlerle kontrol edilir. Bu noktadaki telomer boyu korunabilirse hücre yaşlı olarak hayatını sürdürür. TP53 geninin devreye girmesi ile Cyclin Dependent Kinase (CDK) oluşumu engellenir ve hücrenin G0 ya da G1'den S fazına geçişi durdurulur. Böylece hücre bölünemez ve senesense girer^{1,15}. TP53 geninin mutant formu p53 ve p110Rb ürünlerini inaktive eder, telomerik erozyonların tanınmamasına ve hücrelerin M2 evresine geçmesine neden olur^{8,15}. Böylece bu proteinler, G1 evresinde görev yapamayacağından hücre siklusu, G2'den S fazına atlar ve hücre bölünmesi devam eder. M2 evresi "kriz noktası" olarak da adlandırılmakta olup bu evrede, somatik hücrede telomeraz enzim aktivitesi yok denecek kadar azaldığından, telomer boyu giderek kısalır yaygın hücre ölümü meydana gelir^{1,9}. Bu basamakta birçok hücre, kısalır ve işlevlerini kaybeder. Telomerler tarafından oluşturulan kromozomal anormallikler sonucunda

hücreler apoptozise girerler. Fakat yine de canlı kalabilen hücreler vardır. Canlı kalabilen hücreler, telomeraz aktivitesini yeniden kazanmış, ölümsüz hücrelerdir⁹.

İnsanlarda yaşlanma ile beyin ve miyokard dokularında telomer kısaltmalarının oluşmadığı bildirilmiştir¹⁶⁻¹⁸.

Yaşlanmada telomer hipotezi beş veri ile desteklenir:

1. Genç bireylerle karşılaştırıldığında yaşlı bireylerin somatik doku telomerleri daha kısadır.
2. Somatik hücrelerdeki telomerler üreme hücrelerindekiinden daha kısadır.
3. Erken yaşlanma sendromu olan progeryalı çocukların telomerleri aynı yaştaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha kısadır.
4. Genç bireylerin normal hücreleri hücre kültüründe büyüdükçe telomerleri giderek kısalmaktadır.
5. Telomerlerin deneysel olarak uzatılması kültüre edilmiş hücrelerin çoğalma kapasitesini artırır⁹.

Yaşlanmanın önüne geçmek için Simian virüs 40 (SV 40), insan papiloma virüs (HPV) ve adenovirüs gibi DNA tümör virüsleri ile transformasyon yapılabilmektedir. Pek çok ölümsüz hücrede p53 ve p110Rb gen ürünlerinin bulunmamasından dolayı bu transformasyon ile hedef genler (p53 ve p110Rb) kontrol altına alınarak hücrelerin ömürleri uzatılabilir¹¹.

Telomeraz Enziminin Tanı ve Tedavideki Yeri

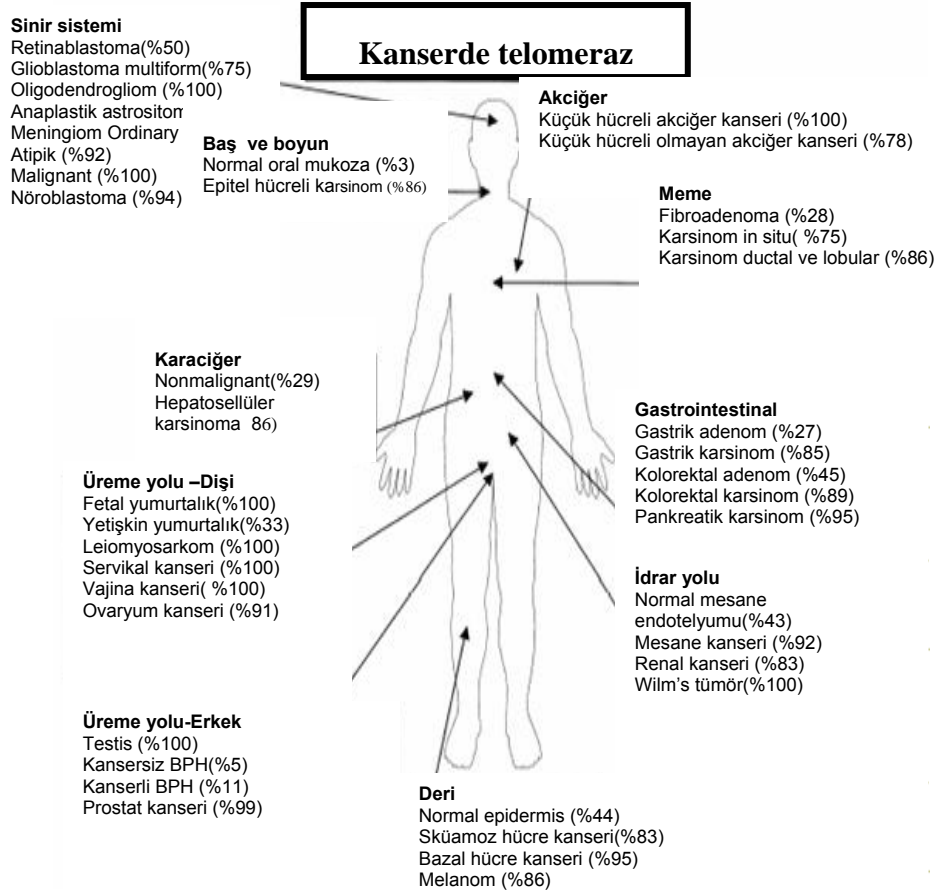
Telomeraz enziminin son yıllarda diskeratozis kongenita, idiyopatik pulmoner fibrozis ve kemik iliği yetmezliği sendromlarında, telomerazın komponenti olan hTERT ve hTER genlerindeki heterozigot mutasyonları tanımlanmıştır. Kısa telomerlerle karakterize olan bu hastalıklarda, telomerik kısalık hastalığının erken başlaması ve ciddiyeti ile korelasyon göstermektedir⁶.

Ayrıca çeşitli kanser türlerinde yapılan araştırmalar neticesinde, kanserli dokularda telomeraz enzim aktivitesinin normal dokulardaki enzim aktivitesine oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Telomeraz enzimi ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişkiyi netleştirmek için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. İlk yapılan çalışmalarda; T ve B lenfositlerde enzim düzeyleri düşük bulunmuştur. Ancak daha detaylı yapılan incelemelerde timus ve bademciklerde enzim aktivitesinin varlığı gösterilmiştir. Ancak yaş ilerledikçe telomer kaybıyla beraber bağışıklık sisteminin de zayıfladığı belirlenmiştir¹⁹.

3.1. Telomeraz Enzimi ve Kanser

Kim ve arkadaşları tarafından 24 farklı kanser türünde yapılan incelemelerde hücrelerin telomer uzunlukları ve telomeraz aktivitelerinin normal olgulara göre anlamlı değişiklikler gösterdiği saptanmıştır^{8,11,20,21} (Şekil 6). İyi huylu tümörlerde telomeraz aktivitesi yoktur ve telomer kısaltıkça erken evrelerine geri dönmektedirler. Daha saldırgan seyreden metastatik tümörlerde ise yüksek telomeraz aktivitesi gösterilmiştir¹¹. Bugüne kadar incelenen farklı tip tümörlerin % 85'inden fazlasında telomeraz aktivitesinin tespit edilmesi, ölümsüz hücrelerde telomerazın tekrar aktive olduğunu göstermektedir^{8,11,20,22}.



Şekil 6. Kanser ve Telomeraz²⁰

Günümüzde çok sayıda tümör hücrelerindeki telomeraz ekspresyon hızıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bu sonuçlar telomerazın kanser belirleyicisi olduğunu göstermektedir. Shay ve Wright'in 1996 yılında yaptıkları bir çalışma da habis tümörlerin % 85'inin telomeraz aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Habis dokularda saptanan bu bulgu, telomerazın kanser tanısında önemli bir

gösterge olduğunu düşündürmektedir²³.

Beyin tümörlerinin telomerazla ilişkisini araştıran Nakatani ve arkadaşları, normal beyin dokusunda telomeraz aktivitesi saptayamazken habis tümörlerde % 81, metastatik tümörlerde % 100 aktivite olduğunu gözlemişlerdir. Telomeraz aktivitesi pozitif olan hastaların takibinde, telomeraz aktivitesi negatif olanlara göre daha kötü, yaşam sürelerinin ise daha kısa olduğunu gösteren bulguların ışığı altında, telomeraz aktivitesinin beyin tümörlerinin tanı ve takibinde kullanılabileceği kanıtlanmıştır²⁴.

Bednarek ve arkadaşları meme kanserli olguların % 95'inde, fibroadenomların ise %20'sinde telomeraz aktivitesi bulmuşlardır. Enzim aktivitesi ile tümörün boyutu, evresi, lenf nodu metastazı ve östrojen-progesteron reseptör miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptayamadıklarından, prognoz tayininde güvenilir olmadığını ileri sürmüşlerdir²⁵.

Daha önceki çalışmalarda gastrointestinal sistemde telomeraz aktivitesinin bulunmadığı rapor edilmiş olmasına rağmen, Bachor ve arkadaşları, en fazla özofagus, bunu takiben ince ve kalın bağırsak ve en düşük olarak da midede yani tüm gastrointestinal sistemde telomeraz aktivitesi saptamışlar ve enzim aktivitesindeki farklılığı yenilenen epitelin rejenerasyon zamanından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Kolorektal adenokarsinomada telomeraz aktivitesi ilk defa Chadeneau ve arkadaşları tarafından incelenmiş; kolorektal kanserli olguların %93'ünde telomeraz aktivitesi saptanırken, benign patolojilerde (adenomatöz polip, Crohn, divertiküler hastalık) aktivite saptanamamıştır^{26,27}.

Yoshida ve arkadaşları, mesane kanserli doku örneklerinin %86'sında telomeraz aktivitesini pozitif bulurken, tümör evresiyle telomeraz aktivitesi arasında korelasyon saptayamamışlardır²⁸. Bayramoğlu yaptığı çalışmada, sağlıklı kişilere oranla, mesane kanserli hastalarda telomeraz aktivitesinin yüksek olduğunu belirlemiştir. Dolayısı ile telomeraz aktivitesinin diğer bir çok kanserde olduğu gibi mesane kanserinin tanısında da kullanılabilir bir belirteç olabileceğini ileri sürmüştür¹².

Endometrium kanseri, ABD'li kadınlarda sık görülen bir kanser tipi olup, özellikle menapoz sonrası dönemde zirveye çıkmaktadır. Kyo ve arkadaşları endometriumdaki telomeraz aktivitesi ile hücrelerin çoğalma kapasitesinin ilişkili olduğunu ve hTERT ekspresyonunun menstrüel döngü fazlarında karakteristik olarak değiştiğini saptamışlardır²⁹. Bu nedenle telomeraz aktivitesinin, post menopozal kadınlardaki endometrial kanserin erken dönemde tanısında kullanılabileceğini düşünmüşlerdir. Ayrıca Akbay ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri bir çalışmada da meme kanseri ve telomer kısalması arasında ilişki olduğu gösterilmiştir³⁰.

Kinugawa ve arkadaşları, 38 yaş altında olup düzenli adet gören kadınların normal over dokularında telomeraz aktivitesinin belirgin şekilde daha yüksek olduğunu ve artan yaşla birlikte aktivitenin azaldığını saptamışlardır³¹.

3.2. Tedavide Telomeraz Enziminin Yeri

Telomeraz inhibisyonu; hTER veya hTERT'nin transkripsiyonu engellenerek, hTER veya hTERT mRNA'sı parçalanarak, hTERT'nin sentezi ve sentez sonrası modifikasyonu engellenerek, enzimin aktif bölgesi bloke edilerek, hTER ile hTERT'nin birleşmesi önlenerek, enzim kompleksinin çekirdeğe transfer olması veya substratı olan telomerlere tutunması engellenerek sağlanabilmektedir. Bugüne kadar üretilen telomeraz inhibitörleri Tablo II'de verilmiştir. Ayrıca, telomeraz inhibitörlerinin kan dolaşımında daha uzun süre kalabilecek şekilde kapsüle edilmesi, yıkıma uğramadan tümörün bulunduğu alana ulaşması ve yüksek oranda malign hücreler tarafından alınması hedeflenmektedir³².

Tablo II. Telomeraz inhibitörleri³²

1. Telomeraz katalitik alt birimini (hTERT) hedef alanlar
“Dominant” negatif hTERT
hTERT transkripsiyon inhibitörleri
Revers transkriptaz inhibitörleri
“Hammerhead” ribozimler
2. Telomerazın RNA komponentini hedef alan inhibitörler
“Hammerhead” ribozimler
Peptid nükleik asitler (PNA)
Antisense oligonükleotidler
2,5-oligoadenilat antisense oligonükleotidler
2'-ucu modifiye edilmiş RNA analogları
N3'→P5' fosforamidatlar, N3'→P5' tiyofosforamidat oligonükleotidler
3. Telomeraza yönelik immün tedavi
4. Telomeraza yönelik gen tedavisi

Telomeraz; kendi RNA'sını kullanarak sentezlediği telomerik dizileri kromozomların ucuna ekleyerek, RNA kalıbının fiziksel blokajıyla inhibe edilebilir. İnsan telomerazının RNA dizisine komplementer dizi içeren "Peptid nükleik asit" (PNA), negatif yüklü deoksiriboz-fosfat birimi yerine nötral N-(2-aminoetil) glisin üniti içeren modifiye nükleotidler ilave edilerek inhibe edilebilirler. Nükleazlarla veya proteazlarla degradasyona dirençli olan "PNA"lar, invitro şartlarda etkili inhibisyon yapmakta ve kanserli hastaların

tedavisinde umut vaad etmektedir. Telomeraz inhibisyonunda diğer bir hedef, telomerazın nükleotid bağlayıcı kısmının bloke edilmesidir. Dideoksiguanin (ddG) ve Azidotimidin (AZT) gibi ajanlar, tercihen bu bölgeyi inhibe etmektedir. Henüz spesifik inhibitörleri bulunmamış olmakla beraber, telomerazın DNA ile bağlantısını sağlayan kısmın bloke edilmesi de tedavide yeni bir umut kaynağı olabilir. Telomeraz inhibitörleri, rezistan kanser hücrelerinin yeniden çoğalmasını önlemek için diğer terapilerle birlikte veya onları takiben kullanılabilir. Tümöre spesifik olan ilk tedavi rejimi olmakla birlikte, özellikle telomeraz aktivitesi gösteren hücrelerde (hematopoetik hücreler, germ hücreleri, aktive T ve B lenfositler, proliferatif hücreler) yan etkileri görülebilir⁸.

Ayrıca, tüm ileri evre kanserlerde hTERT eksprese edilirken normal hücrelerde hTERT ekspresyonunun olmaması, hTERT geninin proksimal promotorunun üniversal bir gen tedavi sistemi kurmak amacıyla kullanılabileceğini düşündürmektedir³².

4. Telomeraz Enziminin Ölçüm Yöntemleri

Telomeraz aktivitesi ölçümünde vücut sıvıları (idrar örnekleri, plevra/bronkoalveoler lavaj sıvıları, asit sıvısı, pelvik/periton yıkama sıvıları) kullanılabilmekte ve bu da telomerazın belirteç olarak kullanım değerini artırmaktadır⁸.

Telomeraz aktivitesini saptamak amacıyla bir çok yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen ilk yöntem telomerik tekrarların PCR ile çoğaltılması esasına dayanan TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) yöntemidir. Bu yöntem 1994'de Kim ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Fakat bu yöntemde miktar saptaması çok hassas değildir. Aktiviteyi nicel olarak saptamak zor ve güvenilir olmadığından, sonuçlar kalitatif olarak negatif veya pozitif olarak değerlendirilmektedir. TRAP'da karşılaşılan zorlukları aşabilmek ve uygulamayı kolaylaştırmak için TRAP-eze ve TRAP-eze-Elisa kitleri geliştirilmiştir³³.

Hirose ve arkadaşları TMA/HPA yöntemini önermişlerdir. Bu yöntemin

uygulaması kolay ve hızlıdır; ayrıca klinik örneklerden gelebilecek TRAP inhibitörlerinden çok az etkilenmektedir. Telomeraz ürününün transkripsiyon yoluyla amplifikasyonu hızlı olduğundan ve bir tek kalıptan bir saat içinde milyarlarca RNA amplikonu oluşturulabildiğinden çoğaltmada su banyosu kullanılabilir. Bu yöntem RNA'larla hibridize olmuş ve olmamış problemlerin farklı hidroliz olmalarına ve telomeraz tarafından uzatılacak primere promotor eklenmesi esasına dayanır³⁴.

Yajima ve arkadaşları hTER'in ifade edilme düzeyini saptamak için RT-PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Bu sistemde spesifik PCR ürününün değerlendirilmesinde DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanılır³⁵.

Fletcher ve arkadaşları primerin parçalanmamış çekirdek içerisinde uzatılmasını sağlayan bir sistemi geliştirmişlerdir. İnsan T-lösemik hücrelerinden izotonik olarak izole edilen çekirdeklerdeki telomeraz aktivitesi çok düşük bir düzeydedir. Ancak dört kadar TTAGGG telomerik tekrar dizisini ekleyebilir. Telomeraz aktivitesinin doğal ortamında araştırılması, enzimin işlevine yeni bir ışık tutabileceği gibi yeni telomeraz inhibitörlerinin değerlendirilmesi için de kullanışlı bir sistem olduğu düşünülmüştür³⁶.

Tanı açısından telomeraz aktivitesinin klinikte kullanılabilmesi için çok büyük sayılarda örneklerle çalışılmalı ve kesin miktar veren yöntemler geliştirilmelidir. Eğer TRAP yöntemi kullanılacaksa PicoGreen ile "stretch-PCR" yönteminin uygulanması, RT-PCR yöntemi kullanılacaksa hTERT'in ifade edilme düzeyinin saptanması tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalar, hTERT ve telomeraz aktivitesi arasında güçlü bir korelasyonun varlığını göstermiştir³³.

Kaynaklar

1. Atlı K, Bozcuk AN. Telomer ve hücre yaşlanma. *Tur J Geriat.* 2002; 5 (3): 111-114,
2. Eskioçak U. Investigation of telomerase activity in diagnosis of endometrial and cervical cancer. ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, *Yüksek Lisans Tezi.* 2007.

3. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/telomeres-of-human-chromosomes-21041>. Erişim tarihi: 21.10.2010.
4. Öner C. DNA Replikasyonu ve Rekombinasyonu. Genetik. 2. Baskı. Ankara:Palme Yayıncılık Tic.Ltd.Şti.. 2003; 337-338.
5. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Telomer>. Erişim tarihi: 04.12.2010.
6. Dikmen G, Mender İ, Doğan P. Telomer disfonksiyonu sonucu görülen hastalıklar. *Hacettepe Tıp Der.* 2008; 39:163-167
7. Neumann AA, Reddel RR. Telomere maintenance and cancer ? look, no telomerase. *Nature Reviews Cancer* 2. 2002; 879-884.
8. Dikmen G, Doğan P. Kanser ve telomeraz. *Türk Klin Tıp Bilim.* 2003; 23.
9. Geyikli İ, Bayıl S, Çiçek H. Yaşlanma ve Telomeraz. *Türk Klin Biyok Der.* 2007; 5(3): 111-115.
10. <http://www.bioscience.org/2010/v15/af/3604/figures.htm>. Erişim tarihi: 14.11.2010
11. Yıldız MG, Aras S, Duman DC. Telomerlerin yaşlanma ve kanserle ilişkisi. *Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Der.* 2009; 66 (4): 187-195.
12. Bayramoğlu A. Mesane kanserli hastaların idrar örneklerinde telomeraz enzim aktivitesi. *FÜ Sağlık Bil. Der.* 2006; 20 (6): 423 – 426.
13. <http://sci.ege.edu.tr/~genbio/telomer.htm> Erişim tarihi: 27.09.2010
14. http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Topics/Euk_replication.html Erişim tarihi: 21.09.2010.
15. Yassa M. Anti-Ageing. *Cöbid 1.* 2009; 21:2.
16. Ergün MA. Replikatif yaşlanma, hücrel senesens ve apoptozis: sonuçları ve hastalıklardaki önemi. *Türk Klin J Med Sci.* 2008; 28:S21-S26.
17. Bree RT, Steson-Cox C, Grealy M, et al. Cellular longevity; role of apoptosis and replicative senesens. *Biogerontology.* 2002; 3:195-206.
18. Suzuki M, Boothman DA. Strees-induced premature senesence (SIPS) influence of SIPS on radiotherapy. *J Radiat Res.* 2008; 49:105-112.
19. Andrews NP, Fujii H, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase and immunological diseases of aging. *Gerontology.* 2010;56:390–403.
20. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Spesific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266:2011-5.
21. Kim NW. Clinical implication of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(5):781-6.
22. Morin GB. Is telomerase a universal cancer target? *J Nat Can Ins.* 1995; 87(12):859-861.
23. Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol.* 1996; 8(1): 66-71.
24. Nakatani K, Yoshimi N, Mori H, et al. The significant role of telomerase activity in human brain tumors. *Cancer.* 1997; 80(3): 471-6.
25. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, et al. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer. *Clin Canc Resear.* 1997; 3(1): 11-6.

26. Bachor C, Bachor OA, Boukamp P. Telomerase is active in normal gastrointestinal mucosa and not up-regulated in precancerous lesions. *Cancer Res Clin Oncol.* 1999;125:453-60.
27. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, et al. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55:2533-6.
28. Yoshida K, Sugino T, 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; 79:362-9.
29. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Canc Resear.* 1997; 57: 610-4.
30. Akbay E, Contreras, CM, Perera SA, et al. Differential roles of telomere attrition in type I and II endometrial carcinogenesis. *Am J Pathol.* 2008;173: 536-44.
31. Kinugawa C, Murakami T, Okamura K, et al. Telomerase activity in normal ovaries and premature ovarian failure. *Tohoku J Exp Med* 2000; 190:231-8.
32. Dikmen GZ, Dikmen E, Doğan P. Kanserde telomeraza yönelik tedavi stratejileri. *Hacettepe Tıp Der.* 2006; 37:49-55.
33. Durusoy M. Telomeraza aktivitesini değerlendirmede kullanılan yöntemler ve dayandıkları esaslar. *Turk J Biochem* 2003; 28(1); 25-29.
34. Hirose M, Hashimoto JA, Tahara H, et al. New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *Clin Chem.* 1998; 44(12): 2446-2452.
35. Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, et al. Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clin Chem.* 1998; 44(12): 2441-2445.
36. Fletcher TM, Trevino A, Woynarowski JM. Enzymatic activity of endogenous telomerase associated with intact nuclei from human leukemia CEM cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265(1) 51-56.

Yazışma Adresi:

Dok. Öğr. Figen GÜZELGÜL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tel: 0322 338 60 60/ 3466-3467

Fax: 0322 338 69 43