

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Szemészeti Klinika (igazgató: Berta András egyetemi tanár)<sup>1</sup> és a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet (igazgató: Fésüs László egyetemi tanár)<sup>2</sup> közleménye

## Szemészeti tumorok telomerázaktivitása I.

KEMÉNY-BEKE ÁDÁM,<sup>1</sup> FACSKÓ ANDREA,<sup>1</sup> DÓZSA ANIKÓ,<sup>1</sup> SZATMÁRI ISTVÁN,<sup>2</sup> ARADI JÁNOS,<sup>2</sup> BERTA ANDRÁS<sup>1</sup>

**Bevezető:** A telomeráz enzim (celluláris reverz transzkriptáz) a kromoszómavégek védelmét biztosítja. Normális, felnőtt szomatikus sejtekben a telomeráz már nem expresszálódik. Malignus sejtekben a telomeráz reaktiválódhat, ezért a tumorkutatásban az enzim detektálása fontossá vált. A szerzők bemutatják az új, általuk kidolgozott kvantitatív mérési módszer kezdeti eredményeit szemészeti és szemhéjszéli bőrtumorok esetén.

**Anyag és módszer:** Saját műtéti anyagból származó tumorszövet-extraktumok és HL-60 sejtek telomeráz aktivitását a szerzők által kifejlesztett kvantitatív detektálással, a TP-TRAP assay-vel határozták meg. Hisztopatológiai feldolgozást követően 24 tumormintából végeztek (14 intraoculáris, 10 szemhéji és periorbitális lokalizációjú) enzimmérést.

**Eredmények:** A minták közül 12 melanoma malignum chorioideae-ből 7 eset, 5 basalsejtes carcinomából 4 volt telomeráz-pozitív. A 2 retinoblastomás anyagminta közül csak az egyik mutatott pozitívítást. A benignus tumorban a telomeráz reaktiválódását nem tudták verifikálni.

**Következtetés:** A szerzők az új telomeráz enzim assay-t (TP-TRAP) elsőként alkalmazták szemészeti tumorminták eseteiben. A kezdeti eredmények szerint a módszer alkalmasnak tűnik a szemészeti tumorok diagnosztikai és prognosztikai markereinek kifejlesztésére.

**Kulcsszavak:** telomeráz, telomer, szemészeti tumor, TP-TRAP

### TELOMERASE ACTIVITY OF TUMOURS IN THE OCULAR REGION (I)

**Introduction:** The telomerase enzyme (a cellular reverse transcriptase) protects the integrity of the ends of chromosomes. In normal human somatic adult cells the telomerase is repressed. In malignant cells however the enzyme may become reactivated; therefore the determination of the telomerase activity has become essential in tumour research. Preliminary results are presented for telomerase activity in ocular and periocular skin-tumours, measured using a new quantitative method developed by the authors.

**Method:** Tumour tissue samples which had been obtained during surgical interventions carried out in the Department of Ophthalmology were tested. After histological evaluation the enzyme activity was measured in 24 tissue samples (14 intraocular, 10 from the eyelids or periorbital region). Telomerase activity was determined using the new TP-TRAP assay method, which was developed by the present authors.

**Results:** Seven out of 12 uveal melanomas, and 4 out of 7 basal cell carcinomas were telomerase-positive. Telomerase activity was detected in only one of the two retinoblastoma cases. In samples from benign tumours the presence of the active form of the enzyme could not be verified.

**Conclusion:** This is the first time that the new telomerase enzyme assay (TP-TRAP) method has been used to test ocular tumours. The preliminary data suggest that this method is suitable for developing diagnostic and prognostic markers of tumours in the ocular region.

**Keywords:** telomerase, telomer, ocular tumour, TP-TRAP

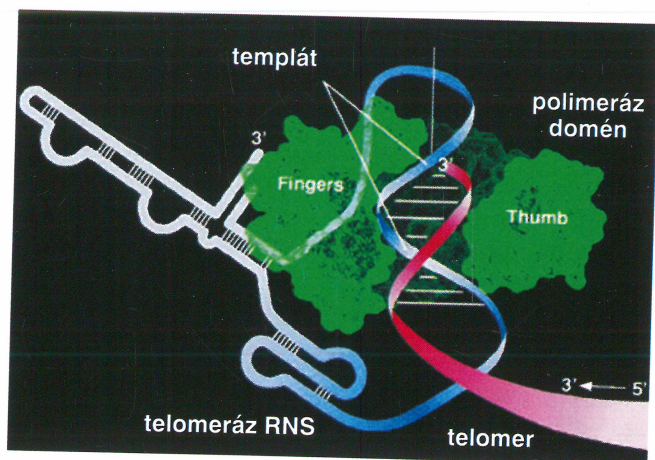
### Bevezetés

A telomeráz enzim egy celluláris reverz transzkriptáz, mely a kromoszómavégek – az úgynevezett telomerek – meghosszabbításában, újraszintézisében vesz részt. A telomeráz ribonukleoprotein: RNS komponense (hTR) belső templátként, mintaként szolgál a szintéziséhez, protein komponense (hTERT) a telomerszekvencia megnyújtását katalizálja (1. ábra).<sup>1,6,8</sup>

Normál szomatikus sejtekben a telomeráz kismértékben vagy egyáltalán nem expresszálódik, ezért e sejtekben a telomerhossz folyamatosan csökken. A telomer/telomeráz hipotézis szerint ezen telomerhossz-csökkenés vezet a sejtek öregedéséhez, pusztulásához (replikatív szenescencia). Immortális sejtekben – beleértve a tumorsejtek nagy részét is – a telomeráz reaktiválódik, ennek következtében a meg rövidült telomerek stabilizálódnak.<sup>15</sup> Mivel a malignus tumorok 85–90%-ában kimutatható a telomeráz, ezért a telomerázaktivitás detektálásának fontos szerepet tulajdonítanak a tumorkutatásban.<sup>2,8,12</sup>

Zajác Magdolna professzornő 70. születésnapja tiszteletére

KEMÉNY-BEKE ÁDÁM: SZEMÉSZETI TUMOROK TELOMERÁZAKTIVITÁSA I.



1. ábra. A telomeráz enzim szerkezete

A telomeráz kvantitatív detektálása azonban meglehetősen bonyolult feladat a sejtekből, szövetekből kinyerhető enzim csekély aktivitása miatt. Végül *Kim és mtsai* 1994-ben kifejlesztettek egy PCR (polymerase chain reaction) alapú telomerázmérési módszert, a TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) assay-t.<sup>10</sup> Ez a szenzitív módszer lehetővé tette a telomerázmérést kisméretű tumork esetében is, például akár 100 sejtből álló szolid daganatokból is.

E módszert alapul véve munkacsoportunk kidolgozott egy módosított, egyszerűbb telomerázmérési protokollt, a TP-TRAP-t (two primer-TRAP).<sup>16,17</sup>

A szemészeti tumork esetében a telomeráz enzim szerepéről kevés irodalmi adat ismert.<sup>7,14</sup> Ezen közlemények az eredeti mérési assay-n alapulnak.<sup>10</sup> Munkánkban a tumorminták telomeráz aktivitásának mérésére az új protokollt használtuk.<sup>16</sup> A munkacsoportunk által módosított, kvantitatív meghatározásra kiválóan alkalmas mérési protokollt elsőként alkalmaztuk szemészeti tumork esetében. Az új diagnosztikai módszer lehetővé teszi a daganat rendkívül kis mérete esetén is (néhány mikrogramm) a telomerázaktivitás detektálását.

## Anyg és módszer

### 1. Telomerázt tartalmazó extraktumok készítése

Vizsgálataink előtt számos sejtvonalat teszteltünk és végül a HL-60 (human promyelocytás leukaemia) sejtet választottuk, mivel könnyen tenyészthető és magas a telomerázszintje. Ezekből, illetve a Szemészeti Klinika műtéti anyagából származó tumorszövetekből telomerázt tartalmazó sejt-, illetve szövetextraktumokat készítettünk. Az extraktumok készítéséhez a *Kim és mtsai* által bevezetett detergens lízis módszert alkalmaztuk.<sup>10</sup> A minták proteinkoncentrációját Bio-Rad protein-assay segítségével határoztuk meg. A minták intaktságának ellenőrzésére megmértük ALP (alkalikus foszfatáz) aktivitásukat. Csak azon minták szerepeltek a későbbi vizsgálatokban, amelyek detektálható ALP aktivitással rendelkeztek.

### 2. A telomerázaktivitás detektálása

A telomerázméréshez szükséges oligonukleotidokat laboratóriumunkban szintetizáltuk a Pharmacia Gene Assembler Plus oligonukleotidszintetizáló készüléken. A PCR-reakcióhoz felhasznált primerek tisztítása gélelektroforézissel történt. A telomerázmérésekhez felhasznált oligonukleotidok:

MTS primer: 5'-AGCATCCGTCGAGCAGAGTT-3'

RP primer: 5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG-3'

RPC3 primer:

5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG (CTAACC)3-3'

A telomerázaktivitást az általunk módosított PCR alapú, kvantitatív mérési módszerrel határoztuk meg.<sup>16,17</sup> A mérés egyszerűsített elve a 2. ábrán látható.

E módszer esetén a PCR-reakció nagy részében a reverz primer nem random módon, hanem csak a DNS-fragmentek terminális régiójához kötődik, így a létrejövő PCR-termékek hossza jól reprezentálja a telomeráz enzim által generált repeat-ek hosszát.

A keletkező PCR-terméket 5%-os TCA-val csaptuk ki, a precipitátumot GF/C üvegszűrőn izoláltuk, a csapadék radioaktivitását folyadék-szcintillációs méréssel határoztuk meg.

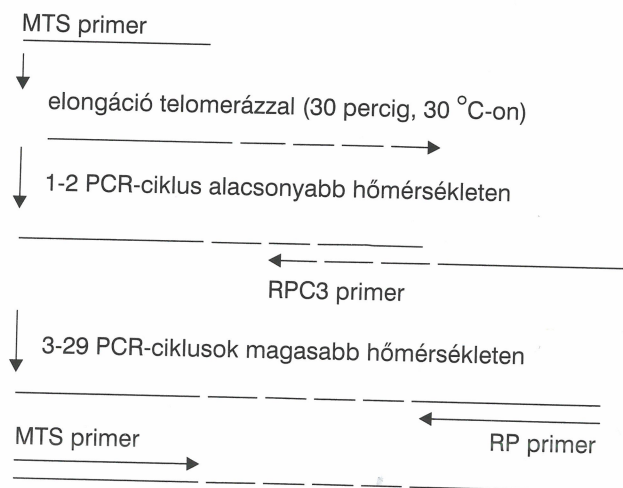
A tumorminták esetében a detektálás érzékenységeinek növelése érdekében a PCR-ciklusszámot a legtöbb esetben megemeltük 27-ről 29-re. A TP-TRAP összefoglaló lépéseit a 2. ábra tartalmazza.

Összesen 24, szemészek által eltávolított, különböző régióból származó tumorminta került feldolgozásra. Tizen-négy intraocularis tumorból valamint tíz szemhéjon és periorbitalisan elhelyezkedő teriméből származó mintát használtunk.

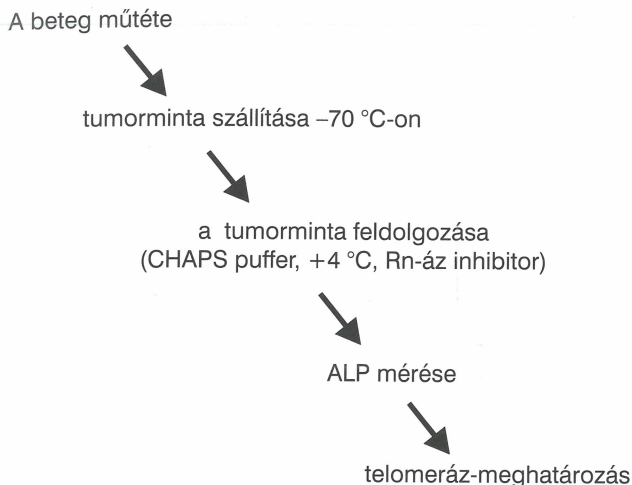
A végleges diagnózist a kórszöveti feldolgozás után állapítottuk meg. A vizsgálat menetének algoritmusát a 3. ábrán tüntettük fel.

Tekintettel a minták alacsony számára, statisztikai analízist nem végeztünk.

Néhány kontroll vizsgálat esetén a radioaktív jelölést elhagytuk és a PCR-termékeket 10%-os poliakrilamid gélen választottuk el (futtatás 2 órán át, 300 V-n). A szétvá-



2. ábra. A TP-TRAP assay alapelve



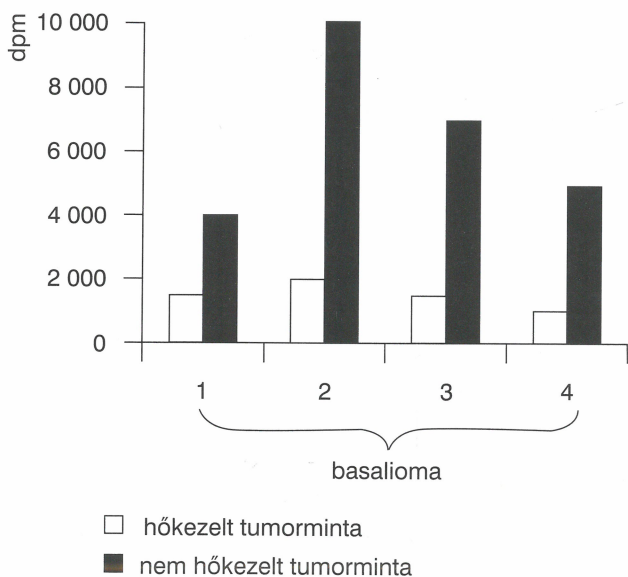
3. ábra. A műtéttől a telomeráz-meghatározásig

lasztott fragmenteket SYBR green I. DNS-festékkel tettük láthatóvá.

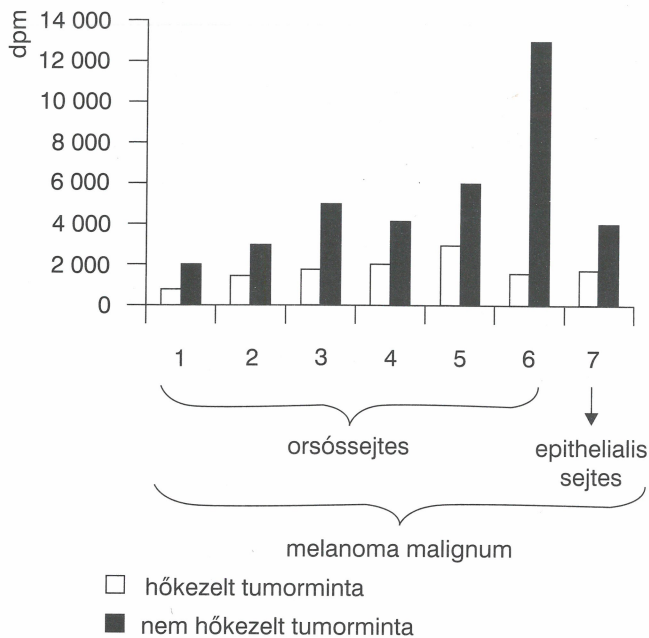
**Eredmények**

Összesen 24 tumormintát vizsgáltunk meg, ebből 4 minta ALP-negatív volt, ezért ezeket kizártuk a vizsgálatból. A mintákban mért radioaktivitást az azonos, hőkezelt tumormintában mért radioaktivitással vetettük össze. Amennyiben ez az arány meghaladta a 2,0-et, a mintában lévő telomerázaktivitást pozitívnak vettük.

Tizenkét melanoma malignum chorioideae-t vizsgáltunk meg. A szövettani feldolgozás során a 12 mintából 10 orsósejtesnek, 2 epithelialis sejtnek adódott. Az igazolt melanoma malignum eseteiben a telomerázaktivitás 7 esetben volt pozitív. A basalsejtes carcinomából 5 minta feldolgozására került sor. Ezek közül 4 volt telomeráz-pozitív.



5. ábra. Radioaktivitás basalioma eseteiben



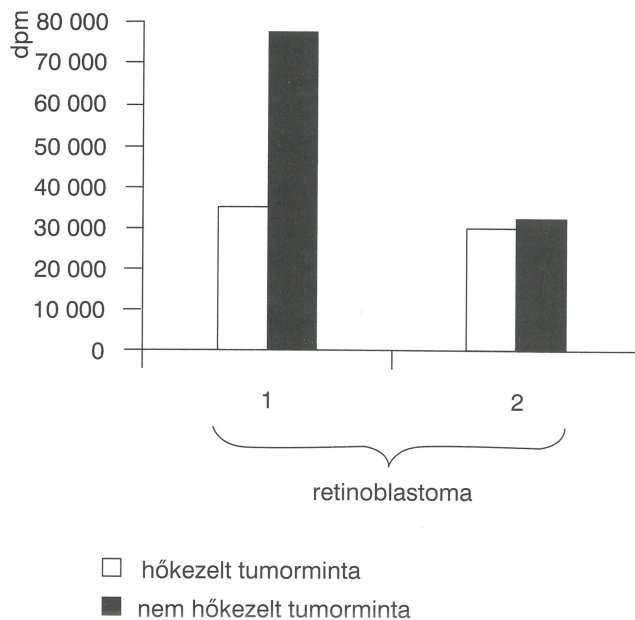
4. ábra. Radioaktivitás melanoma malignum eseteiben

A fentiekén kívül egy benignus elváltozást, keratosis seborrhoicát is feldolgoztunk: ebben a mintában telomeráz enzimét nem tudtuk detektálni.

Vizsgálatainkban szerepelt 2 retinoblastomás anyagminta is. Az egyik mintában nem találtunk telomerázaktivitást. A másikban azonban mind a hőkezelt, mind a nem hőkezelt minta esetében magas radioaktivitáserőteket kaptunk.

A pozitív enzimaktivitás számadatait a 4., 5., 6. ábra grafikonjai szemlélteti.

Annak érdekében, hogy megtudjuk, mi okozta néhány esetben a kiugróan magas dpm (desintegration per minute) értékeket, a mintákat gélelektroforézissel is megfuttattuk.



6. ábra. Radioaktivitás retinoblastoma eseteiben

CHAPS-puffer esetén nem kaptunk enzimaktivitásra utaló jelet. HL-60-extraktum esetén DNS-létrát detektáltunk, melynek fokai – felfelé haladva – egyre több telomert tartalmazó szekvencia képét mutatták. A retinoblastoma-minta esetén tehát volt telomerjel, míg a hőkezelt mintánál ezt nem láttuk, de a gél felső részén a degradált hosszabb DNS-szakaszoknak megfelelő sávok pozitív aktivitást jelelhetnek. Két melanoma malignum chorioideae-ből származó mintát is megfuttattunk. A folyadék-szcintillációval telomeráz-pozitivitást mutató minta gélelektroforézissel is pozitív jelet adott.

A folyadék-szcintillációval negativitást mutató minta gélelektroforézissel sem mutatott aktivitást.

### Megbeszélés

Az elmúlt években számos metodikát dolgoztak ki a telomerázaktivitás kimutatására, illetve kvantitatív meghatározására.<sup>9,10,16,17</sup> Minden mérési eljárás azon alapszik, hogy a telomeráz enzim meghosszabbít egy oligonukleotid primert a telomerszekvenciák beépítésével. Az így keletkezett elsődleges produktum közvetlenül detektálható (konvencionális módszer) vagy PCR (polimeráz láncreakció) -amplifikálást követően válik mérhetővé. A telomerázaktivitás kvantitatívan a primerek meghosszabbításából származó, beépült telomerszakaszok összmenyiségével jellemezhető. A telomerázaktivitás tehát függ az enzim processzivitásától, vagyis attól, hogy átlagosan hány darab telomerikus ismétlődéssel hosszabbodnak meg a primerek, valamint függ az enzim átvételi arányától, azaz adott idő alatt mennyi primert hosszabbít meg az enzim.<sup>8</sup>

A telomeráz enzim kutatásában nagy áttörést jelentett a PCR alapú telomerázmérési módszer, az úgynevezett TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) assay kifejlesztése.<sup>10</sup> Ezen módszer nagyságrendekkel megemelte a telomerázaktivitás mérésének érzékenységét.

A PCR alapú telomerázmérési eljárásból kiindulva egy egyszerűsített protokollt dolgoztunk ki. A *Kim és mtsai* által bevezetett TRAP assay-nek kifejlesztettük egy módosított változatát, amelynél a telomeráz-produktumok hossza nem változott a PCR-amplifikálás során. Ez a módosított protokoll alkalmasnak bizonyult a telomeráz processzivitásának meghatározására is.<sup>16,17</sup>

A módszert eddig még a szemészeti tumorok telomerázaktivitásának kimutatására nem alkalmazták. Saját vizsgálatainkban ezzel az új TP-TRAP eljárással sikerült a telomeráz enzimet kimutatni az intraocularis, valamint a szem környéki tumorból származó mintákból.

Az irodalmi adatok alapján a szemészeti tumor kutatásban a telomeráz enzim szerepét uvealis melanoma malignumok és retinoblastoma eseteiben vizsgálták.<sup>7,14</sup>

A jelen tanulmány vizsgálati eredményei az irodalmi adatokkal nem teljesen korrelálnak. *Heine és mtsai* minden vizsgált melanoma esetében pozitív telomerázaktivitást detektáltak.<sup>7</sup> *Rohrbach* tanulmányában a melanoma malignumból származó tumorminták 90%-ában talált telomerázreaktivitást.<sup>14</sup> Saját vizsgálatainkban az igazolt melanoma malignumok 58,3%-a bizonyult telomeráz-pozitívnak. Valószínűleg a metodikák különbözősége magyarázza az eltérést. A retinoblastomák vizsgálata során mind

a hőkezelt, mind a nem hőkezelt minták értékelése során magas dpm-értékeket kaptunk, de pozitívnak csak az egyik minta bizonyult. A *Gupta és mtsai* által végzett vizsgálatok szerint a telomerázaktivitás hiányában, illetve a még meglevő hosszú telomerláncok esetében is a retinoblastoma<sup>5</sup> növekedésre képes. Valószínűnek tartjuk, hogy a vizsgált retinoblastomás mintáinkban is ez a jelenség magyarázza a két teljesen különböző aktivitási értéket.

Az általunk vizsgált különböző tumortípusok eltérő arányban mutattak aktivitást. A nem hőkezelt tumorminták radioaktivitása a hőkezeltékhez képest legnagyobb arányban a basaliomák eseteiben volt emelkedett. Ennek oka a telomeráz enzim reaktivációjának különböző mértéke lehet. A kapott eredményekre irodalmi vonatkozás nem ismert. A mai modern molekuláris biológiai módszerek továbbfejlesztésével már a telomerázt expresszáló géneket is tudják részben azonosítani, illetve klónozni.<sup>18</sup>

Ettől a módszerek további finomítása, a szenzitivitás fokozódása várható a közeljövőben.

A nem tumoros szemészeti szövetminták telomerázaktivitását csak az utóbbi időben vizsgálták.<sup>3,13</sup> Az enzimet cornealis endothelsejtekből és pterygiumból detektálták. A cornealis endothelsejteken nem mutatott aktivitást az enzim.<sup>3</sup> A pterygium eseteiben a szerzők felvetik a reaktiválódott telomeráz patogenetikai szerepét is a kórkép kialakulásában.<sup>13</sup>

*Lavelle és mtsai* összefoglaló tanulmányukban az eddigi ismeretek összegzéseként felvetik annak lehetőségét, hogy a telomer/telomeráz támadáspont (target) a 3. évezred tumorterápiájának alapköve lehet. A különböző stratégiai lépések lehetnének: a telomeráz direkt inhibíciója, a telomerek közötti interferencia és egyéb telomerekkel való interakció.

Mind a saját eredmények, mind az irodalmi adatok alapján úgy véljük, hogy az új telomeráz enzim assay (TP-TRAP) vizsgálat a jövőben fontos diagnosztikus és prognosztikai markerré válhat a szemészeti tumorok eseteiben.

### Irodalom

1. *Cerni C.*: Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res* 462 (1), 31-47 (2000).
2. *Dhaene K., Van Marck E., Parwaresch R.*: Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 437(1), 1-16 (2000).
3. *Egan C.A., Savre-Train I., Shay J.W., Wilson S.E., Bourne W.M.*: Analysis of telomerase lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(3), 648-653 (1998).
4. *Greider C.W., Blackburn E.H.*: The telomer terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898 (1987).
5. *Gupta J., Han L.P., Wang P., Gallie B.L., Bacchetti S.*: Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* 88(16), 1152-1157 (1996).
6. *Harrington L.A., Greider C.W.*: Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* 353, 451-454 (1991).
7. *Heine B., Coupland S.E., Kneiff S., Demel G., Bornfeld N., Hummel M., Stein H.*: Telomerase expression in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 84, 217-223 (2000).
8. *Holt S.E., Shay J.W.*: Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 180, 10-18 (1999).

9. Kazmer S., Pan K.M., Vassilev L.: Quantification of telomerase activity by direct scintillation counting. *J Biochem Biophys Methods* 12, 113-117 (1999).
10. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L.C., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015 (1994).
11. Lavelle F., Riou J.F., Laoui A., Mailliet P.: Telomerase: a therapeutic target for the third millennium. *Crit Rev Oncol Hematol* 34(2), 111-126 (2000).
12. Mera S.L.: The role of telomeres in ageing and cancer. *Br J Biomed Sci* 55(3) 221-225 (1998).
13. Park T.K., Jim K.H.: Telomerase activity in pterygeal and normal conjunctival epithelium. *Korean J Ophthalmol* 14(2), 85-89 (2000).
14. Rohrbach J.M., Riedinger C., Wild M., Partsch M.: Telomeraseaktivität in uvealen Melanomen. *Ophthalmologie* 97(5), 359-363 (2000).
15. Shay J.W.: Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection? *Mol Med Today* 1(8), 378-384 (1995).
16. Szatmari I., Tőkés S., Dunn C.B., Bardos T.J., Aradi J.: Modified telomeric repeat amplification protocol: a quantitative radioactive assay for telomerase without using electrophoresis. *Anal Biochem* 282(1), 80-88 (2000).
17. Szatmari I., Aradi J.: Telomeric repeat amplification, without shortening or lengthening of the telomerase products: a method to analyze the processivity of telomerase enzyme. *Nucleic Acids Research* 29, e3 (2001).
18. Zhao J.Q., Glasspool R.M., Hoare S.F., Bilsland A., Szatmari I., Keith W.N.: Activation of telomerase RNA gene promoter activity by NF-Y, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3. *Neoplasia* 6, 531-539 (2000).

A szerző levelezési címe: Dr. Kemény-Beke Ádám  
Debreceni Egyetem, OEC, Szemészeti Kkliniká  
4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.