



# Telomeraz Aktivitesini Değerlendirmede Kullanılan Yöntemler ve Dayandıkları Esaslar

[Methods Used in Evaluating Telomerase Activity and the Key Points of the Methods]

Mübeccel Durusoy

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Beytepe, Ankara, Türkiye  
Tel: 90-312-299 20 28  
Faks: 90-312-297 80 48  
e-mail: mdurusoy@hacettepe.edu.tr

Kayıt tarihi 6 Mart 2003; kabul tarihi 7 Nisan 2003  
[Received 6 March 2003; accepted 7 April 2003]

## ÖZET

Son zamanlardaki çalışmalar neoplastik lezyonların gelişimini telomeraz reaktivasyonunun belirlediğini göstermiştir. Eşey hücrelerinde ve bir çok kanser hücresinde telomeraz aktivitesi saptanırken, normal somatik hücrelerin büyük bir kısmında telomeraz aktivitesi açık olarak gözlenememiştir. Telomeraz aktivitesinin yeniden kazanılması ve bu sayede telomer uzunluğunun korunması kanser hücrelerinin ölümsüzlüğünde telomerazın önemli rolü olacağını düşündürmüştür. Bunun sonucunda kanser tanısında telomeraz aktivitesinin belirteci olarak kullanılabilceği gösterilmiş ve bu konuda araştırmalar yoğunlaştırılmıştır. Bu çalışmada, telomeraz aktivitesi tayin yöntemleri ve bu yöntemlerin dayandığı esaslar sergilenmek istenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** telomeraz aktivitesi tayin yöntemleri, kanser belirteci

## ABSTRACT

Recent studies have shown that the progression of neoplastic lesions is characterised by telomeric reactivation. Telomerase activity has been detected in germline cells and in most cancer cells, whereas most normal somatic cells have no clearly detectable telomerase activity (1,2). The reactivation of telomerase activity and the maintenance of telomere length is considered to be important in the immortality of cancer cells. As a result, telomerase activity is considered to be a diagnostic marker of malignancy and therefore a number of methods for determining telomerase activity have been developed by several investigators (3,4,5). In this paper, we aimed to exhibit the assay methods for determination of telomerase activity and the key points that these methods are based on.

**Key Words:** methods of telomerase activity, cancer marker

## I. GİRİŞ

İnsan kromozomlarının sonu 15 kilobaza kadar uzayabilen basit telomerik tekrar dizilerinden (5'-TTAGGG-3') oluşur (6). Telomerik baz dizileri hücresel DNA'yı kararlı halde tutar ve onları yeni kombinasyonlardan (end to end fusion) ve enzimatik yıkımlardan korur (7).

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 sürülmüştür (6). Bu kaybı önlemenin yollarından biri telomeraz enziminin aktivite göstermesidir. Telomeraz bir ribonükleoprotein kompleksidir. Kromozom sonlarına (TTAGGG)<sub>n</sub> den oluşan hegzomerik tekrarları ekleyerek telomer uzunluğunu kararlı halde tutar. Enzim yapısında telomerik dizilere kalıplık yapacak 159 nükleotidlik bir RNA içerir. Önemli komponentlerinden diğer ikisi ise "reverse" transkriptaz ve Protein I'dir ( 8-10).

Başlangıçta kullanılan aktivite tayin yöntemlerinde miktar saptaması hemen hemen imkansız olduğundan sonuçlar telomeraz pozitif ve telomeraz negatif olarak verilmiştir. Daha sonra geliştirilen yöntemlerde bu sorun aşılmaya çalışılmış ve miktar saptamada değişik yollar kullanılmıştır.

## II. KULLANILAN YÖNTEMLER

Telomeraz aktivitesini saptamak amacıyla bir çok yöntem geliştirilmiştir. Bu sayede, daha önce kullanılan geleneksel yöntemin gerektirdiği fazla miktardaki doku ve hücre kullanımı giderilmiştir. Geliştirilen ilk yöntem telomerik tekrarların PCR ile çoğaltılması esasına dayanan TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) yöntemidir. Daha sonra geliştirilen bir çok modifikasyon ile TRAP yönteminin klinik uygulamalarda daha hassas ve güvenilir olması amaçlanmıştır.

### 1. TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol)

Bu yöntem 1994'de Kim ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (1). Eğer hücre ve dokulardan elde edilen homojenat telomeraz içeriyorsa, ortama konan özel hazırlanmış primerler telomeraz ile uzatılır. Uzama ürünleri (extension product), PCR amplifikasyonunda kalıp; 150 bp'lik myogenin (sıçan) fragmentleri internal standard olarak kullanılır. Ürünler spektroforetik olarak ayrılır. Radyoaktif işaretli primerler kullanılarak ya da radyoaktif işaretli dCTP'ler PCR ortamına eklenerek telomeraz ürünlerinin görüntülenmesi sağlanır. TRAP sonunda görüntü çözümleyici (Image Analyzer) kullanılır. Elde edilen veri, döngü sayısına karşı grafiklenir. Standarda göre değerlendirilir. Bununla birlikte miktar saptaması çok hassas değildir. Aktiviteyi nicel olarak saptamak zor ve güvenilir olmadığından, sonuçlar telomeraz negatif ve pozitif olarak değerlendirilir. Radyoizotoplar istenmiyorsa jel SYBR green I ile boyanır. Yöntemin uygulanışı Şekil 1'de gösterilmiştir.

Bu yöntemin kusurları,

1. Radyoizotopların kullanılması,

2. Zaman alıcı poliakrilamid jel elektroforeze gereksinim olması,
3. Klinik örneklerden gelen PCR inhibitörlerinin etkilerine açık oluşu,
4. Miktar saptamada karşılaşılan zorluklar,
5. İnternal kontrole gereksinim olması,
6. CX primerde primer-dimer oluşumu olarak sıralanabilir

TRAP'da karşılaşılan zorlukları aşabilmek ve uygulamayı kolaylaştırmak için zaman içinde değişik kitler üretilmiştir. Bunlar TRAP-eze ve TRAP-eze-Elisa kitleridir.

TRAP-eze yöntemi

Oncor firması 1996'da TRAP-eze kitlerini üretmiştir. Bu kitler daha hassas, daha ucuzdur ve daha kısa zamanda uygulanabilir. Bu yöntemde "reverse" primer (RP) TRAP'daki "reverse" primer CX'in modifiye şeklidir (Sekil 1). Primer-dimer oluşumu azaltılmıştır. Kit 36 bp'lik internal standard içerir (11). Şekil 2'de yöntem gösterilmiştir.

TRAP-eze-Elisa yöntemi

1. Telomeraz enzimi biotin işaretli "forward" P1-TS primerinin 3' ucuna telomerik tekrar dizilerini ekler.
2. Uzayan ürünler P2 "reverse" primeri kullanılarak

1. Telomerazlı ortamda non-telomerik oligonükleotid primerin (TS) uzatılması

TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')

2. "Hot start" PCR amplifikasyonu ile homojenat içindeki telomeraz tarafından uzatılan primerlerin çoğaltılması sağlanır ve 6 bazlık DNA ladder'ları elde edilir. "Reverse" primer (CX) sadece telomeraz tarafından eklenen TTAGGG tekrarlarıyla hibrid yapar.

CX (5'-(CCCTTA)<sub>3</sub>CCCTAA-3')

Hot start tüplerin hazırlanması.

↓ (mum) ile

Hücre ya da doku homojenatı

↓

TRAP karışımının hazırlanması

↓

3 evreli PCR amplifikasyonu

(31 döngü)

↓ 94-50-72 °C

Mumun dökülmesi ve yeni tüplere aktarma

↓

Boyanın eklenmesi (loading)

↓

% 10 PAGE

↓

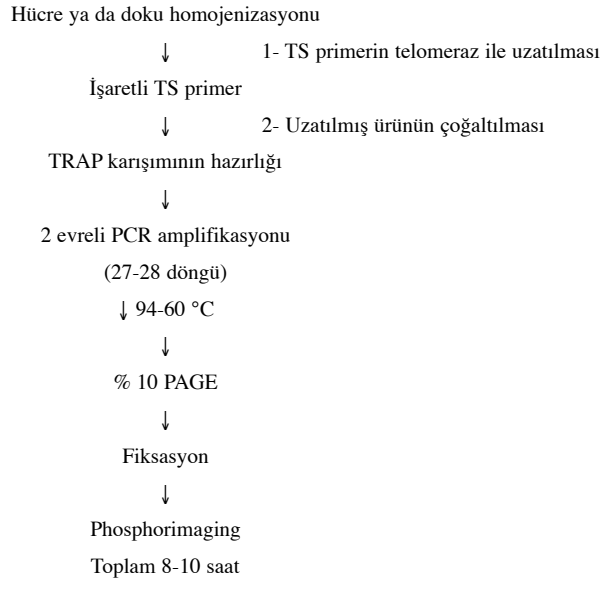
Fiksasyon

↓

Phosphorimaging

( Toplam 20-24 saat alır.)

Şekil 1. TRAP yönteminin uygulanışı



Şekil 2. TRAP-eze yönteminin uygulanışı

PCR sisteminde amplifiye edilir.

3. PCR ürünleri denatüre edilir ve telomerik tekrar dizileri ile hibridize olabilen digoksisenin (DIG) işaretli spesifik prob ile hibridize edilir. Bu son ürünler streptoavidin kaplı mikrotiter plaklarına biotin işaretli primer aracılığıyla bağlanır.
4. Plaklara bağlı PCR ürünleri antiDIG-peroksidaz ile kompleks oluşturur.
5. Son olarak peroksidaz substratı 3,3',5,5'-tetrametil benzidin (TMB) peroksidaz enzimi tarafından renkli oksidasyon ürünlerine dönüştürülür. Reaksiyon durdurucu çözelti eklenerek renk oluşumu durdurulur. Örneklerin absorbansları 450 nm ve 620 nm'de mikrotiter plak okuyucuda okunur.

#### 1.a. Floresan-TRAP yöntemi

Aldous ve Grabill (12) telomeraz aktivitesini saptamak için floresan bir yöntem (F-TRAP) kullanmışlardır. Radyoizotopların kullanımını elimine etmek için floresans işaretli primerler kullanılmıştır.

#### 1.b. "Stretch-PCR" yöntemi (Stretch-PCR assay)

1996'da Tatematsu ve arkadaşları TRAP'ı biraz daha geliştirmişlerdir (13). PCR'a dayanan yöntemlerde iki sorun her zaman görülebilir.

1. "Forward" ve "reverse" primerler birbirleriyle etkili biçimde hibridize olarak türlü kombinasyonlar oluşturabilirler çünkü bunlar tekrar eden diziler için hazırlanmıştır. Amplifikasyon sırasında uzama ürünleri yerine bunlar çoğaltılabilir. Burada telomeraz tarafından uzatılmış primer kalıp gibi kullanılmamıştır.
2. "Reverse" primerler telomerazla uzatılmış tekrarlanan dizilerden herhangi biriyle hibrid yapabilir. Sonuçta kısalmış PCR ürünleri ortaya çıkabilir.

Bu sorunların üstesinden gelmek için bu yöntemde özel olarak dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır.

1. "Forward" ve "reverse" primerler 3' uçlarında eşleş-

meyen (mismatch) bir baz çifti içerirler. Bu durum primer-dimer oluşsa bile uzamayı engeller. Telomeraz enzimi sadece dimer oluşturmayan "forward" primeri uzatır.

2. Bu primerlerin 5' uçlarına telomer dizileriyle ilişkisi olmayan ekstra "tag" dizileri ( M13-U, M13-R) eklenir ve böylece amplifikasyonda PCR ürünleri her zaman orijinal boylarını korur. Yöntemin uygulanışı Şekil 3'de gösterilmiştir.

#### 1.c. PicoGreen yöntemi

Gelmini ve arkadaşları 1998'de hızlı, miktara bağlı ve nonizotopik bir assay yöntemi geliştirmişlerdir (14). Telomeraz ürününün çoğaltılmasında "stretch-PCR" yöntemi uygulanır. Burada PCR ürünlerine PAGE gibi zaman alıcı işlemler uygulanmaz. Bunun yerine PCR ürünleri PicoGreen ile muamele edilir. Yöntem floresan bir boya olan PicoGreen'in seçici olarak çift zincirli DNA'ya bağlanması esasına dayanır. Spektrofluorometre ile floresans okunur. DNA konsantrasyonu kontrol DNA ile hazırlanan standart eğrisinden hesaplanır. Telomeraz aktivitesini belirleyen DNA miktarı ise saptanan DNA miktarından negatif kontrolde saptanan DNA'nın çıkarılması ile hesaplanır. RNaz ile muamele edilmiş hücre ya da doku homojenatı negatif kontrol olarak kullanılır. Sonuçlar protein miktarı saptanmış her örnek için ng DNA/µg protein olarak verilir.

#### 1.d. In situ PCR yöntemi

Ohyashiki ve arkadaşları (15) tümör hücrelerinde telomeraz enziminin varlığını TRAP yönteminin modifikasyonu olan *in situ* PCR yöntemi ile göstermişlerdir. Böylece hücre düzeyinde telomeraz aktivitesinin araştırılmasına olanak sağlanmıştır.

#### 2. TMA/HPA Yöntemi (Transcription-Mediated Amplification and Hybridization Protection Assay )

Hirose ve arkadaşları (16) TMA/HPA yöntemini önermişlerdir. Bu yöntemin uygulaması kolay ve hızlıdır; ayrıca klinik örneklerden gelebilecek TRAP inhibitörlerinden çok az etkilenir. Telomeraz ürününün transkripsiyon yoluyla amplifikasyonu hızlı olduğundan ve bir tek kalıptan bir saat içinde milyarlarca RNA ampliconu oluşturulabildiğinden çoğaltmada su banyosu kullanılabilir. Bu yöntem RNA'larla hibridize olmuş ve olmamış problemlerin farklı hidroliz olmaları ve telomeraz tarafından uzatılacak primere promotor eklenmiş olması esasına dayanır.

Promotor primerle telomerik tekrarların birleşme noktasına komplementer olan akrinyum ester-işaretli problemler hazırlanır ve kullanılır. Amplicon ve problemler 65 °C'de 20 dak. inkübe edilir ve hidroliz tamponu eklenerek tekrar 10 dak. inkübe edilir ve soğutulur. Luminometre ile kemiluminesans ölçülür. Yöntemin uygulanışı Şekil 4'de gösterilmiştir.

#### 3. "Reverse" Transkripsiyon-PCR Yöntemi (Reverse Transcription-PCR Assay or Taq Man Fluorogenic Detection System)

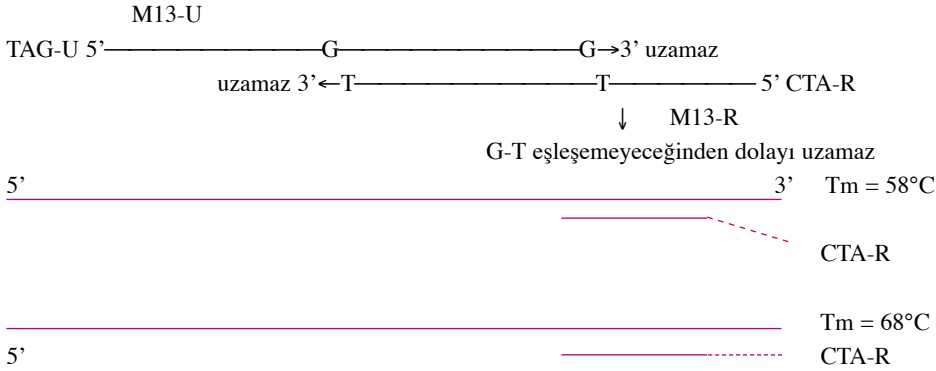
Telomeraz kompleksinin aşağıdaki komponentleri klonlandıktan sonra, bu komponentlerin mRNA düzeylerinin saptanması enzim aktivite çalışmalarında yeni bir yaklaşım olmuştur.

Telomeraz RNA komponenti TERC (hTR), telomeraz

“Forward” TAG-U 5’-GTAAAACGACGGCCAGTTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTG-3’

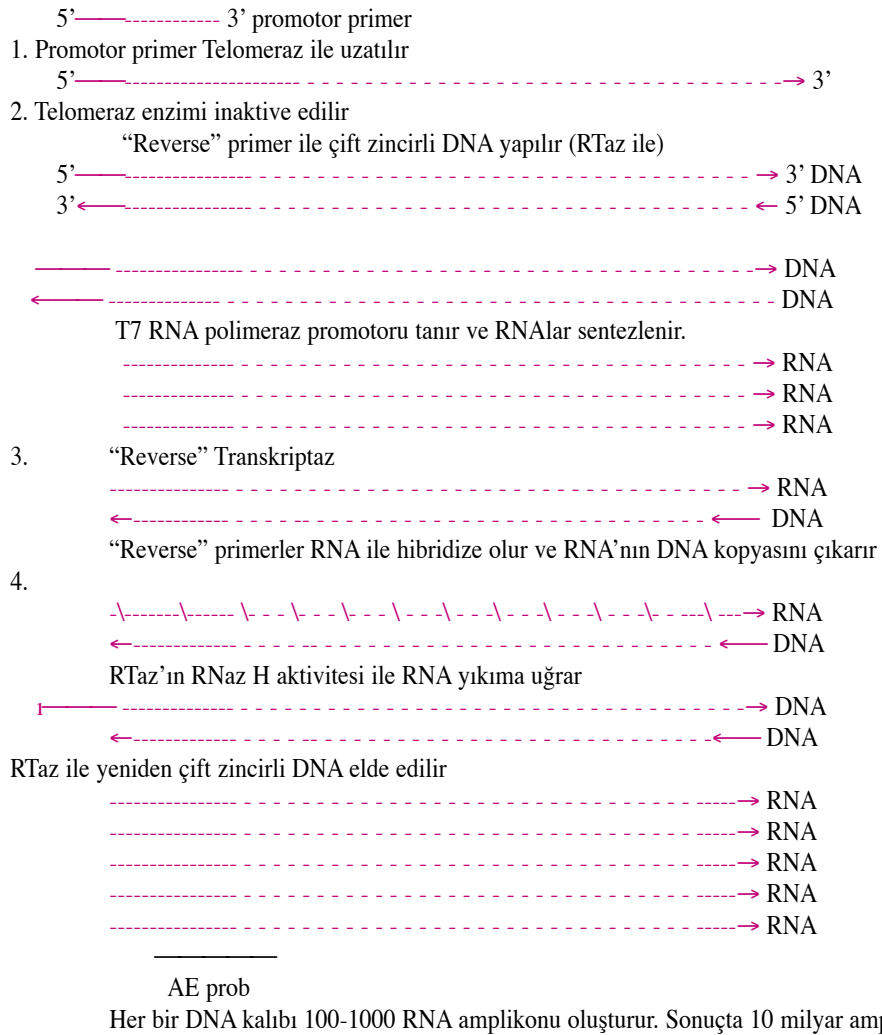
“Reverse” CTA-R 5’-CAGGAAACAGCTATGACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT-3’

Bu yöntemde telomeraz ürünleri temizlenir (Fenol-kloroform ile temizlenir ve etanol ile çöktürülür) ve böylece dokudan gelen PCR inhibitörleri yok edilir. Görüntülemeye jel yöntemi kullanılır.



“Reverse” primer (CTA-R) tekrarlanan dizilerin içinden başlamaz, bu durumda T<sub>m</sub> 68°C’in altına düşer, oysa PCR koşulları 68°C’ye göre ayarlanmıştır.

Şekil 3. “Stretch-PCR” yönteminin uygulanışı



Şekil 4. TMA/HPA yönteminin uygulanışı

“reverse” transkriptaz TERT (TCS1, EST2), telomeraz protein I komponenti TEP1 (TP1).

Yajima ve arkadaşları (17) hTR’ın ifade edilme düzeyini saptamak için RT-PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Bu sistemde spesifik PCR ürününün değerlendirilmesinde DNA polimerazın 5’→3’ ekzonükleaz aktivitesinden yararlanılır. Taq Man analiz yöntemi PCR’ı nicel yapar. Bu yöntemde hTR için iki primer (“forward” ve “reverse”) ve bir de hibridizasyon probu yer alır. Taq polimeraz PCR’ın uzama evresinde, uzama özelliği olmayan ve iki ucundan işaretli florojenik hibridizasyon problemlerini keser ve buraya primeri yerleştirir. Bu sırada serbest floresans veren haberciler çıkarılmış olur ve bunlar da anında okunur. Bu işlem için birleştirilmiş PCR ve floresans dedektör kullanılır. Floresansdaki artış sürekli olarak optik monitörden izlenir. Bu yöntemde PCR sonrası hiçbir işlem yapılmaz. Prob 5’ ucundan FAM ya da JOE adları verilen haberci floresan boyalarla, 3’ ucundan ise floresans söndürücü bir boya ile işaretlenir. Prob bütün iken hiçbir sinyal vermez çünkü 3’ ucundaki boya 5’ ucundaki etkiyi yok eder. Prob, Amply Taq DNA tarafından 5’→3’ doğrultusunda kesilerek yerine “forward” primer girer ve primer uzatılır. FAM 517 nm’de, JOE 554 nm’de okunur. Sonuçların hesaplanmasında standart eğriden yararlanılır. Amplifikasyon üç farklı basamakta gerçekleştirilir ( Evre I: 30 dak. 48 °C, “reverse” trans-

kriptaz aktivitesi ; Evre II: 10 dak. 95 °C, RT inaktivasyonu ve Amply Taq Gold aktivasyonu ; Evre III: 15 sn. 95 °C ve; 1 dak. 60 °C, 40 PCR döngüsü)

#### 4. Primerlerin Parçalanmamış İnsan T-Lösemik Hücre Çekirdekleri İçinde Uzatılması

Fletcher ve arkadaşları 1999’da primerin parçalanmamış çekirdek içerisinde uzatıldığı bir sistem kullanmışlardır (18). İnsan T-lösemik hücrelerinden izotonik olarak izole edilen çekirdeklerdeki telomeraz aktivitesi çok düşük bir düzey gösterir. Ancak dört kadar TTAGGG telomerik tekrar dizisi ekleyebilir. Telomeraz aktivitesinin doğal ortamında araştırılması, enzim fonksiyonuna yeni bir ışık tutabileceği gibi yeni telomeraz inhibitörlerinin değerlendirilmesi için kullanışlı bir sistem oluşturur.

### III. SONUÇ

Tanı açısından telomeraz aktivitesinin kliniklerde 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 edilmelidir. Yapılan çalışmalar, hTERT ve telomeraz aktivitesi arasında güçlü bir korelasyonun varlığını göstermiştir.

### Kaynaklar

1. Kim NW, Piatyszek MA, Powse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015.
2. Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, Dmitrovsky E (1999). Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst* 91(15): 1321-1326.
3. Meeker AK, Coffey DS (1997). Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62: 1323-1331.
4. Mu XC, Brien TP, Ross JS, Lowry CV, McKenna BJ (1999). Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer* 87(2): 93-99.
5. Yasui W, Yokozaki H, Shimamoto F, Tahara H, Tahara E (1999). Molecular-pathological diagnosis of gastrointestinal tissues and its contribution to cancer histopathology. *Pathol Int* 49(9): 763-774.
6. Dahse R, Fiedler W, Ernst G (1997). Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem* 43: 708-714.
7. Rhyu M (1995). Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 87: 884-894.
8. Feng J, Funk WD, Wang S, Weinrich S, Avilion A, Chiu C, et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269: 1236-1241.
9. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Program AE, et al. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275: 973-977.
10. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997). Telomerase catalytic subunit homolog from fission yeast and human. *Science* 277: 955-959.
11. Holt SE, Norton JC, Wright WE, Shay JW (1996). Comparison of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAPeze telomerase detection kit. *Methods in Cell Science* 18: 237-248.
12. Aldous WK, Grabill NR (1997). A fluorescent method for detection of telomerase activity. *Diagnostic Molecular Pathology* 6(2): 102-110.
13. Tatematsu K, Nakayama J, Danbara M, Shionoya S, Sato H, Omine M, Ishikawa F (1996). A novel quantitative ‘stretch PCR assay’ that detects a dramatic increase in telomerase activity during the progression of myeloid leukemias. *Oncogene* 13: 2265-2274.
14. Gelmini S, Caldini A, Becherini L, Capaccioli S, Pazzagli M, Orlando C (1998). Rapid, quantitative non-isotopic assay for telomerase activity in human tumors. *Clinical Chemistry* 44 (10): 2133-2138.
15. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki J, Toyama K, Elbihara Y, Kato H, Wright WE, Shay JW (1997). Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res* 57: 2100-2103.
16. Hirose M, Hashimoto JA, Tahara H, Ide T, Yoshimura T (1998). New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *Clinical Chemistry* 44(12): 2446-2452.
17. Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Kobayashi D, Furuya D, Hirata K, Watanabe N (1998). Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clinical Chemistry* 44(12): 2441-2445.
18. Fletcher TM, Trevino A, Woyrnarowski JM (1999). Enzymatic activity of endogenous telomerase associated with intact nuclei from human leukemia CEM cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265(1) 51-56.