

**Tomasz Nowak**

**Wysoka aktywność i ekspresja telomerazy  
a amplifikacja genów *TERT* i *TERC*  
w ostrych białaczkach u dzieci**

**Rozprawa doktorska**

**Promotor  
Prof. dr hab. med. Danuta Januszkiewicz-Lewandowska**

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**Poznań 2009**

*Wyrażam podziękowania Pani Profesor Danucie Januszkiewicz-Lewandowskiej  
za inspirację do pracy, opiekę naukową, a przede wszystkim  
za stworzenie niezwykle przyjaznej atmosfery, dzięki której  
pracę badawczą wykonuje się z prawdziwym entuzjazmem.*

*Bardzo dziękuję również pracownikom Zakładu Patologii Molekularnej  
Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk  
za koleżeńską pomoc w realizacji rozprawy doktorskiej.*

# *Spis treści*

<b>Wykaz skrótów</b>	5
<b>Wstęp</b>	
Telomery – budowa i funkcja	6
Telomeraza	7
Replikacja DNA	8
Telomery a starzenie komórki	9
Telomery a nowotwory	12
Telomeraza a starzenie komórek	13
Starzenie komórek a rozwój nowotworu	15
Telomeraza a nowotworzenie	17
Możliwości diagnostyczne wykorzystania telomerazy w chorobach nowotworowych	18
Zapobieganie starzeniu przez transfer genu <i>TERT</i>	21
Czy telomeraza może zapobiegać replikacyjnemu starzeniu i wydłużać życie komórki?	21
Możliwości wykorzystania telomerazy w terapii nowotworów	24
Ostre białaczki u dzieci	26
Badania aktywności i ekspresji telomerazy w ostrych białaczkach	28
Amplifikacja genu <i>TERT</i> w nowotworach	30
<b>Cel pracy</b>	33

<b>Materiał i metody</b>	
Badane grupy	34
Wykrywanie aktywności telomerazy	34
Ilościowa ocena aktywności telomerazy	36
Izolacja genomowego RNA	38
Synteza cDNA-odwrotna transkrypcja	39
Ocena ekspresji genów <i>TERT</i> , <i>TERC</i> i <i>TPI</i> techniką PCR	39
Ilościowa ocena ekspresji genów <i>TERT</i> i <i>TERC</i> techniką łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real time PCR)	41
Amplifikacja genów <i>TERT</i> i <i>TERC</i>	43
Analiza statystyczna	45
<b>Wyniki</b>	
Aktywność telomerazy	46
Ekspresja telomerazy	51
Ilościowa ocena ekspresji telomerazy techniką real time PCR	54
Badanie względnej ekspresji genów <i>TERT</i> i <i>TERC</i>	63
Amplifikacja genów <i>TERT</i> i <i>TERC</i>	73
<b>Dyskusja</b>	77
<b>Podsumowanie</b>	88
<b>Wnioski</b>	89
<b>Piśmiennictwo</b>	90
<b>Streszczenie</b>	116
<b>Summary</b>	118

## *Skróty używane w pracy*

*ACTB* - gen beta aktyny

*ALL* - ostra białaczka limfoblastyczna, ang. acute lymphoblastic leukemia

*AML* - ostra białaczka mieloblastyczna, ang. acute myeloblastic leukemia

*ANLL* - ostra białaczka nielimfoblastyczna, ang. acute nonlymphoblastic leukemia

*BRCA1* - gen raka piersi, ang. breast cancer gene

*CHEK2* - gen kinazy CHEK, ang. checkpoint kinase 2 gene

$C_t$  - wartość progowa, ang. threshold count

*ELISA* - test immunoenzymatyczny, ang. enzyme-linked immunosorbent assay

*FISH* - hybrydyzacja in situ, ang. fluorescence in situ hybridization

*GAPDH* - gen dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej, ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene

*HER1* - gen receptora naskórkowego czynnika wzrostu człowieka, ang. human epidermal receptor gene

*HPV* - wirus brodawczaka ludzkiego, ang. human papilloma virus

*MDC1* - ang. mediator of DNA damage checkpoint 1 gene

*MRD* - choroba resztkowa, ang. minima residual disease

*MRE11* - ang. meiotic recombination 11 homolog gene

*MYC* - myelocytomatosis viral oncogene

*NBS1* - ang. Nijmegen Breakage Syndrome gene

*PBL* - limfocyty krwi obwodowej, ang. peripheral blood lymphocytes

*PCR* - łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. polymerase chain reaction

*RAD50* - ang. recombination/repair protein 50 gene

real time PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, ang. real time polymerase chain reaction

*RTA* - względna aktywność telomerazy, ang. relative telomerase activity

*SP1* - gen czynnika transkrypcyjnego SP1

*TERC* - gen telomerazowego RNA, ang. telomerase RNA component gene

*TERT* - gen odwrotnej transkryptazy telomerazy, ang. telomerase reverse transcriptase gene

*TPI* - gen białka związanego z telomerazą, ang. telomerase associated protein 1 gene

*TRAP* - ang. telomeric repeat amplification protocol

# *Wstęp*

## *Telomery – budowa i funkcja*

Telomery stanowią zakończenia chromosomów złożone z krótkich wielokrotnie powtórzonych konserwatywnych sekwencji (8,59). U człowieka występują 92 telomery po 1 na każdym końcu chromosomu. Sekwencje telomerowe u różnych organizmów są bardzo konserwatywne (tabela 1). Ludzkie telomery złożone są z powtarzającej się sekwencji TTAGGG (144). Natomiast telomery *Tetrahymena* jednokomórkowego organizmu zawierają wielokrotnie powtórzoną sekwencję TTGGGG (73). Również telomery innych organizmów mają zbliżoną sekwencję najczęściej bogatą w nukleotydy T i G (2). U wielu kręgowców powtarzającym się motywem jest sekwencja TTAGGG.

Wielkość telomerów u człowieka waha się od ok. 5 tysięcy par zasad (kbp) do 15 kbp (2,7,9,129,197). U poszczególnych organizmów długość telomerów jest bardzo zróżnicowana i waha się od kilku do kilkudziesięciu tysięcy par zasad (6). Na przykład u myszy wielkość telomerów wynosi od 30 do 80 kbp.

W skład telomeru oprócz sekwencji DNA wchodzi cały szereg białek, które biorą udział w ochronie końców telomerów oraz pośrednio wpływają na długość telomerów (15,24,217). DNA wchodzące w skład telomerów jest dwuniciowe, a tylko jego koniec 3' ma strukturę jednoniciową i jest bogaty w reszty guaninowe. Telomery tworzą strukturę określaną mianem lassa (*lariat – like structure*), która ma działanie ochronne przed rozpoznawaniem enzymów biorących udział w naprawie uszkodzonego DNA (47,70). Na końcach telomerów dwuniciowy DNA tworzy charakterystyczne pętle T (48). W wyniku interakcji jednoniciowego odcinka DNA z fragmentem dwuniciowym powstaje pętla T. Powstałe pętle T nie są rozpoznawane jako uszkodzenia w podwójnej nici DNA. W przypadku skrócenia telomerowego DNA i niewytworzenia pętli T,

zakończenia chromosomów są pozbawione ochrony (62). W niezabezpieczonych chromosomach może dojść do uszkodzeń jedno lub dwuniciowego DNA (97). Nie jest wykluczone, że w przypadku krótkich telomerów dochodzi do ich połączenia, co prowadzi do starzenia i śmierci komórki (19,114). W przypadku, kiedy dwa końce krótkich telomerów tracą strukturę lassa, wówczas łączą się ze sobą, co prowadzi do starzenia replikacyjnego (braku podziałów) (79). Zahamowanie podziałów komórki ma również miejsce wtedy, kiedy dochodzi do zlepiania się końców telomerów, co może zapoczątkować złamania chromosomów, genomową niestabilność, a w końcu apoptozę (27,28,85).

Tabela 1

Sekwencje telomerowe u wybranych gatunków zwierząt i roślin.

<b>ORGANIZM</b>	<b>SEKWENCJE TELOMEROWE (5' – 3')</b>
człowiek, mysz	TTAGGG
<i>Paramecium</i> (pantofelek)	TTGGG(T/G)
<i>Tetrahymena</i> , <i>Stylonychia</i>	TTGGGG, TTTTGGGG
<i>Plasmodium</i> (zarodziec)	TTAGGG(T/C)
<i>Arabidopsis</i> (rzodkiewnik pospolity)	TTTAGGG
<i>Bombyx mori</i> (jedwabnik)	TTAGG
<i>Ascaris lumbricoides</i> (glista ludzka)	TTAGGC
<i>Chlamydomonas</i> (zawłotnia)	TTTTAGGG
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (drożdże piekarnicze)	TTAC(A)(C)G

### ***Telomeraza***

Telomeraza złożona jest z trzech podjednostek odwrotnej transkryptazy (TERT – telomerase reverse transcriptase), telomerazowego RNA (hTR, TERC – telomerase RNA) i z białka związanego z telomerazą (TP1 – telomerase associated protein 1) (59,61). Trzy podjednostki telomerazy kodowane są przez oddzielne geny zlokalizowane na różnych chromosomach. TERT kodowana jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 5p15.33, TERC na chromosomie 3q21-q28 a TP1 na chromosomie 14q11.12 (18,94,193).

Sekwencje kodujące genu *TERT* składają się z 3396 kp, a samo białko z 1132 aminokwasów. Gen *TERC* o długości 451 nukleotydów jest transkrybowany na RNA o tej samej długości. Białko *TPI* złożone jest z 2627 aminokwasów. Struktura TERT określana jest jako „struktura rękawiczki” (*ang. mitten structure*) pozwalająca na owinięcie się dookoła końca chromosomu. TERT jako odwrotna transkryptaza syntetyzuje pojedynczy łańcuch DNA złożony z telomerowych powtórzeń na matrycy RNA (*TERC*) (152). Kompleks telomerazy zawiera zatem polimerazę i własną matrycę. Odwrotna transkryptaza rozpoznaje jednoniciowy bogaty w guaninę starter i dodaje powtórzenia telomerowe do końca 3' na matrycy *TERC* (192).

### ***Replikacja DNA***

Normalny chromosom podczas duplikacji ulega skróceniu (224). Zjawisko to zaobserwował James Watson (230). Podczas replikacji DNA nić DNA jest kopiowana tylko w jednym kierunku - polimeraza DNA przesuwa się od 3' do 5', budując nową nić od 5' do 3'. W procesie replikacji do pojedynczej nici w kilku miejscach przyczepiają się zbudowane z RNA startery, syntetyzowane przez primazę. Jest to odmiana polimerazy RNA zależnej od DNA, biorąca udział w replikacji DNA. Primaza jest aktywowana przez helikazę DNA i po aktywacji syntetyzuje na obu niciach DNA krótkie (11 +/-1 zasad) komplementarne startery RNA wykorzystywane przez polimerazę DNA do rozpoczęcia syntezy nowych nici DNA w procesie replikacji DNA.

Niekodujące, powtarzające się sekwencje telomerowe występują na obydwu niciach DNA (40). Replikacja DNA łańcucha wiodącego i opóźnionego przebiega w odmienny sposób (121). W czasie podziału komórkowego polimeraza DNA nie replikuje końca łańcucha opóźnionego. Replikacja łańcucha wiodącego po przyłączeniu startera przebiega w sposób ciągły. Natomiast do łańcucha opóźnionego, w miarę rozplatania tzw. widełek replikacyjnych, przyłączają się startery; dochodzi do syntezy odcinków DNA zwanych fragmentami Okazaki, które następnie są łączone dzięki działaniu ligazy (126). Końcówka 3' łańcucha opóźnionego pozostaje nie zreplikowana. Jest



to tzw. problem replikacji końca łańcucha DNA (*end replication problem*). Brak replikacji końca łańcucha opóźnionego powoduje skracanie telomerów (151).

Większość komórek człowieka traci sekwencje telomerowe po każdym podziale komórkowym (77). Z tego względu nasuwa się pytanie o związek pomiędzy długością telomerów a starzeniem komórek (78,196). Drugie pytanie to możliwy udział telomerów i telomerazy w immortalizacji komórek (189).

W komórkach somatycznych obserwuje się skracanie telomerów w kolejnych podziałach prowadzących do starzenia komórkowego (58). Przyjmuje się, że skracanie telomerów może mieć związek ze zmianami związanymi z procesem starzenia (25,38,109). Z drugiej jednak strony należy przyjąć, że starzenie komórkowe prowadzące do zahamowania podziałów zapobiega rozwojowi nowotworu (35). Zakłada się, że mechanizm ten mógł wytworzyć się w trakcie ewolucji jako skuteczna obrona przeciwko akumulowaniu mutacji w dzielących się komórkach mogących ostatecznie doprowadzić do rozwoju nowotworu (160). Starzejące się komórki somatyczne wykazujące mutacje posiadają potencjał transformacji nowotworowej, jednak procesy starzenia ostatecznie doprowadzają do śmierci komórki, a nie do jej zezłośliwienia (105,169,182). Wielu autorów uważa, że pojawienie się ekspresji (reakspresji) telomerazy i zwiększona jej aktywność może być krytycznym czynnikiem w procesie nowotworzenia (21,183,210).

### ***Telomery a starzenie komórki***

Jako pierwszy w roku 1973 radziecki uczoney Ołownikow (157) zwrócił uwagę na skracanie telomerów w kolejnych podziałach komórek somatycznych. Większość komórek człowieka traci sekwencje telomerowe po każdym podziale komórkowym (12,77). Z tego względu nasuwa się pytanie o związek pomiędzy długością telomerów a starzeniem komórek (78, 130). Dopiero jednak Hayflick określił limit podziałów prawidłowych komórek w hodowli *in vitro* (82,83,84). Prawidłowe fibroblasty mogą podzielić się kilkadziesiąt razy w warunkach *in vitro*, po czym giną. Liczba podziałów komórek uzależniona jest od ich wieku. Komórki osoby młodej

dzielią się większą liczbę razy w porównaniu z komórkami osoby dorosłej. Limit Hayflicka około 50-60 podziałów komórki jest wyznacznikiem wieku i starzenia się komórki (82). W kolejnych podziałach dochodzi do skracania telomerów i w końcu do programowej śmierci komórki. Hodowane in vitro komórki somatyczne pobrane od małego dziecka dzielą się większą ilość razy niż komórki od osób dorosłych (156). Długość telomerów zmniejsza się z wiekiem dawcy i z liczbą podziałów komórek in vitro (130,202,204). Oryginalna teoria zaproponowana przez radzieckiego uczonego Aleksieja Ołownikowa zakładała, że po każdym podziale komórkowym telomery stają się krótsze aż do czasu, kiedy komórka nie może się dłużej dzielić. W dalszych latach zebrano szereg danych sugerujących, że telomery mogą stanowić biologiczny zegar wyznaczający tempo starzenia komórek (196). Dopiero jednak w 1998 roku uzyskano bezpośredni dowód wskazujący, że skracanie telomerów stanowi molekularny mechanizm – zegar starzenia komórek (58). Fibroblasty, do których wprowadzono gen odwrotnej transkryptazy telomerazy dzieliły się w warunkach in vitro ponad 300 razy nie wykazując cech starzenia ani cech nowotworzenia (23,65,103,139).

Telomerowy mechanizm starzenia zakłada dwa etapy: pierwszy M1 (mortality stage 1) występuje, kiedy na końcach chromosomów występuje jeszcze kilka tysięcy telomerowych powtórzeń. Etap M1 może być indukowany przez sygnał spowodowany uszkodzeniem DNA telomerowego na jednym lub więcej końcach chromosomów (166). W etapie M1 (mortality stage 1) dochodzi do zatrzymania podziałów komórkowych mediowanych poprzez białka kodowane przez geny supresorowe *TP16*, *RB* i *TP53* (63,180,229). W przypadku zablokowania działania wymienionych genów supresyjnych, poprzez mutacje lub białka wirusowe, komórki dzielą się nadal skracając telomery i dochodząc do stadium M2 (mortality stage 2). W stadium M2 telomery stają się na tyle krótkie, że nie zabezpieczają końców chromosomów przed różnymi uszkodzeniami (16,86). Stadium M2 charakteryzuje się niestabilnością genomu objawiającą się degradacją i fuzją końców chromosomów, aberracjami chromosomowymi prowadzącymi ostatecznie do śmierci komórki. W warunkach in vitro wśród obumierających komórek w stadium

M2 można napotkać skupiska dzielących się komórek, w których stwierdza się reaktywację telomerazy pozwalającą na odbudowę telomerów i unieśmiertelnienie komórek, które wykazują cechy charakterystyczne dla komórek nowotworowych (17).

Skracanie telomerów ma istotny wpływ na ekspresję genów, zjawisko to nazywa się efektem pozycji telomeru (telomere position effect)(178). Skracaniu telomerów towarzyszy reaktywacja genów, które wcześniej nie ulegały ekspresji (ang. silenced genes). Zjawisko to można zaobserwować we wszystkich chromosomach lub tylko przy niektórych końcach chromosomów w różnych komórkach. Efekt pozycji telomeru stanowi dobre wytłumaczenie dla modyfikacji ekspresji genów obserwowanych w starzejących się komórkach. Zmiana ekspresji genów w starzejących się komórkach ma wpływ zarówno na funkcjonowanie samych komórek, jak i całych tkanek i narządów. Innym mechanizmem prowadzącym do zatrzymania podziałów komórkowych może być sygnał z uszkodzonego telomerowego DNA (178,179,194). Sygnał ten jest odpowiedzialny za produkcję fosforylowanych wariantów histonu 2A (gamma H2AX) związanych z miejscami uszkodzeń dwóch nici DNA (207,223). Fosforylowane histony gamma H2AX owinięte dookoła miejsc uszkodzeń DNA powodują akumulację czynników naprawczych, będących produktami genów *BRCA1*, *NBS1*, *MDC1*, *MRE11*, *RAD50* (236).

Wyniki wielu badań wskazują na korelację pomiędzy skracaniem telomerów a stopniowym upośledzeniem zdolności proliferacyjnej komórek (222, 228). Wraz z kolejnymi podziałami komórek oprócz skracania telomerów można zaobserwować zmiany w białkach. W fibroblastach dochodzi do zwiększenia syntezy prokolagenazy, aktywatora plazminogenu, stromelizyny z równoczesnym obniżeniem syntezy prokolagenu i tkankowych inhibitorów metaloproteaz. Przyjmuje się, że zmiany te mogą być związane ze starzeniem się komórek skóry. Ciekawym jest, że zmiana ekspresji białek w zaledwie małej części (1-5%) fibroblastów skóry powoduje zmiany struktury całej skóry. Starzenie się tylko małej części komórek skóry jest odpowiedzialne za widoczne zmiany skóry – zmarszczki, wykwity, przebarwienia itp. Podobnie tylko mała ilość starzejących się komórek jest odpowiedzialna za gorsze efekty gojenia ran u starszych osób. Pod

wpływem ekspozycji na promienie słoneczne keratynocyty naskórka stają się „starsze”. Komórki te nie tylko akumulują mutacje indukowane promieniami UV, ale również posiadają mniejszy limit Hayflicka podziałów komórkowych. W pewnym uproszczeniu można powiedzieć, że szkodliwe działanie słońca zwiększa liczbę podziałów komórkowych, skraca telomery, przyspiesza proces starzenia skóry i możliwość wywołania nowotworu (53).

Starzejące się komórki, które nie dzielą się pozostają w dalszym ciągu metabolicznie aktywne. Produkują szereg czynników, które mogą stymulować lub hamować wzrost innych komórek i tkanek. Zmiany występujące w starzejących się komórkach wpływają zarówno na homeostazę, jak i na możliwe procesy karcinogenezy u starszych osób. Istnieje szereg danych wskazujących, że dobrym markerem starzenia komórek są skracające się telomery (38).

Nasuwa się pytanie, czy zahamowanie skracania telomerów może zapobiec starzeniu replikacyjnemu komórek. Prawie wszystkie badania dotyczą korelacji pomiędzy skracaniem telomerów a zdolnościami proliferacyjnymi komórek i wskazują na fakt, że długość telomerów warunkuje zdolność prawidłowych komórek do proliferacji.

### ***Telomery a nowotwory***

Zmniejszenie wielkości telomerów obserwuje się nie tylko wraz z upływem wieku, ale również w komórkach tkanek objętych długotrwałym procesem chorobowym, w tym również nowotworowym.

W ostatnich latach popularna stała się hipoteza zakładająca związek telomerazy i telomerów z procesem starzenia i nowotworzenia (69,80). Hipoteza ta opiera się na licznych obserwacjach wykazujących wysoką aktywność telomerazy w komórkach nowotworowych wobec jej braku w komórkach somatycznych oraz na skracaniu długości telomerów w komórkach somatycznych wobec stałej ich długości w dzielących się komórkach nowotworowych (33,49,50,92). Często telomeraza nazywana jest enzymem unieśmiertelniającym komórki (18). Długość telomerów jest stabilna dzięki dodawaniu powtórzeń heksamerowych (TTAGGG) do

końców chromosomów w dzielących się komórkach. Wysoką aktywność telomerazy stwierdza się w komórkach germinalnych oraz w komórkach podstawnych, endometrium i szpiku kostnego wykazujących wysoki stopień proliferacji (137,224,231). W komórkach somatycznych obserwuje się skracanie telomerów w kolejnych podziałach prowadzących do starzenia komórkowego (58). Przyjmuje się, że skracanie telomerów może mieć związek ze zmianami związanymi z procesem starzenia (36). Z drugiej jednak strony należy przyjąć, że starzenie komórkowe prowadzące do zahamowania podziałów zapobiega rozwojowi nowotworu (67). Zakłada się, że mechanizm ten mógł wytworzyć się w trakcie ewolucji jako skuteczna obrona przeciwko akumulowaniu mutacji w dzielących się komórkach mogących ostatecznie doprowadzić do rozwoju nowotworu (35,161). Starzejące się komórki somatyczne wykazujące mutacje posiadają potencjał transformacji nowotworowej, jednak procesy starzenia ostatecznie doprowadzają do śmierci komórki, a nie do jej zezłóśliwienia (101,180). Komórki nowotworowe w przeciwieństwie do prawidłowych nie skracają telomerów w kolejnych podziałach, co sugeruje, że stabilność telomerów może być wymagana dla rozwoju procesu nowotworowego i uniknięcia starzenia i śmierci komórki (225,226,227). W przeciwieństwie do komórek nowotworowych, które dzielą się w sposób nieograniczony, prawidłowe komórki somatyczne posiadają ograniczoną zdolność do proliferacji. Ominięcie bądź zaburzenie replikacyjnego starzenia komórki stanowi krytyczny element w procesie karcinogenezy. Szereg danych wskazuje na skracanie się telomerów w zmianach przednowotworowych (140,141).

### ***Telomeraza a starzenie komórek***

Proces starzenia związany jest ze stopniowym zmniejszaniem wydolności funkcjonalnej różnych narządów i tkanek. W niektórych tkankach dochodzi do zmniejszenia liczby komórek spełniających określone funkcje. Z wiekiem obniżają się zdolności do regeneracji prawidłowych komórek oraz pojawiają się cechy degeneracji tkanek. Wiadomo, że proces starzenia jest niezwykle złożony. W pewnym uproszczeniu można przyjąć dwie główne teorie starzenia:

pierwsza – zaburzenia programu genetycznego, druga – akumulacja niekorzystnych zmian. Szereg zmian ma wpływ na proces starzenia: starzenie komórkowe i tkankowe, zmiany hormonalne, zaburzenia i zmniejszenie metabolizmu komórkowego, akumulacja mutacji genomowego i mitochondrialnego DNA, zmniejszenie zdolności do naprawy uszkodzeń DNA, niekorzystny wpływ wolnych rodników, zmniejszenie uwodnienia komórek i tkanek. Powszechnie wiadomo również, że organizmy starzeją się po okresie reprodukcji, w którym mogą przekazać swoje geny potomkom. W każdym organizmie istnieje rodzaj równowagi pomiędzy utrzymaniem zdolności reprodukcyjnych a w pełni sprawnych funkcjach komórek somatycznych i tkanek. Obniżanie wraz z wiekiem funkcji fizjologicznych organizmu, wydolności tkanek i narządów związane z „prawidłowym” procesem starzenia komórek chroni organizm przed niekontrolowaną proliferacją potencjalnych komórek nowotworowych. Z pewnością nie można przeceniać roli telomerazy w tym procesie, jednakże jej udział wydaje się być znaczący (71).

Czy jest możliwa zmiana komórki starzejącej się w komórkę młodą?(55,218). Wyniki spektakularnych doświadczeń ze zmianą fenotypu komórek skóry chorych z rybią łuską (ichtiosis) z wprowadzonym genem *TERT* i przeszczepionych myszom nagim (*nude mice* – myszy bezgrasicze pozbawione odporności i nieodrzucające przeszczepów) wskazują, że jest możliwa zmiana „patologicznego” fenotypu komórki w prawidłowy (23,52,60). Jak dotąd brakuje danych jednoznacznie wskazujących na rewersję fenotypu starzejącej się komórki. Nasuwa się pytanie, jakie komórki pobrane od osób w różnym wieku będą zdolne do nieograniczonych podziałów zachowując prawidłowy genotyp i fenotyp. Z uwagi na różne tempo starzenia, wzrostu i proliferacji komórek z różnych tkanek należy wykonać jeszcze wiele badań, ażeby odpowiedzieć na powyższe pytanie.

Zakładając, że starzenie komórek, tkanek, a nawet całego organizmu jest w pewien sposób powiązane z aktywnością telomerazy, powstaje pytanie czy skracanie telomerów występuje we wszystkich komórkach i tkankach w czasie starzenia organizmu. Jaka jest aktywność telomerazy i długość telomerów w różnych tkankach i narządach w przebiegu chorób występujących głównie u

starszych osób (38,153)? Czy telomeraza i telomery mają swój udział w patogenezie licznych chorób wieku podeszłego (176,181,234,235)? Czy obniżenie aktywności telomerazy i skracanie telomerów nie jest przyczyną, a jedynie towarzyszy procesowi starzenia i jest jego skutkiem (176,181)? Najnowsze dane rzucają całkowicie nowe światło na rolę telomerazy.

Wiadomo, że za proces starzenia odpowiedzialnych jest wiele genów. Telomeraza może stanowić jedynie niewielki przyczynek w badaniach nad starością i nad próbami wydłużenia życia. Biorąc pod uwagę kompleksowość starzenia dalsze badania powinny zmierzać do uchronienia człowieka przed licznymi chorobami wieku podeszłego, tak ażeby ludzie umierali młodo, jak najpóźniej jest to możliwe (wg Ernesta Wydniera „It should be the function of medicine to have people die young as late as possible”).

### ***Starzenie komórek a rozwój nowotworu***

Patogeneza procesu nowotworowego obejmuje zarówno dominujące zmiany szybkiego wzrostu komórek warunkowanego aktywacją onkogenów, jak również recesywne zmiany w genach supresorowych (tumor suppressor genes) odpowiedzialnych za hamowanie wzrostu komórek (76). Istotnym elementem są geny odpowiedzialne za stabilność DNA i chromosomów oraz geny regulujące programową śmierć komórki (45,66). Można spekulować, że już sam proces proliferacji komórek może stanowić ryzyko wystąpienia niestabilności genomu.

Do akumulacji mutacji dochodzi po co najmniej kilkunastu do kilkudziesięciu podziałach. Zakłada się, że komórka, w której wystąpiła mutacja musi ulec ekspansji do miliona, ażeby wystąpiło prawdopodobieństwo pojawienia się kolejnej mutacji. Z uwagi na pojawianie się głównie mutacji recesywnych konieczna jest kolejna klonalna ekspansja w celu wyeliminowania pozostającego allelu typu dzikiego. Zjawisko to określane jest jako utrata heterozygotyczności (loss of heterozygosity). Można przyjąć, że ograniczenie podziałów komórkowych zapobiegałoby przekształcaniu komórki przednowotworowej w nowotworową. Przy braku podziałów komórkowych trudno wyobrazić sobie powstanie komórki nowotworowej. Teoretycznie brak

podziałów byłby najskuteczniejszą strategią zapobiegającą rozwojowi nowotworu. Nasuwa się pytanie, jaka jest, czy jaka byłaby w różnych tkankach bezpieczna liczba podziałów komórkowych bez następstw patologicznych. Rozwój medycyny przedłużający w sposób istotny długość życia (szczepienia, antybiotyki, sterydy, inne leki) sprzyja znacznemu zwiększeniu liczby podziałów komórkowych w różnych narządach i tkankach. Następstwem tego jest nieuchronny rozwój różnych chorób, w tym nowotworowych, głównie u osób starszych.

Niestabilność genomowa prawdopodobnie ma udział w reaktywacji telomerazy i unieśmiertelnieniu komórek. Nasuwa się pytanie, czy w przypadku aktywowania telomerazy w komórkach nowotworowych obserwowane w nich krótkie telomery mają udział w genomowej niestabilności (161).

Przyjmuje się, że replikacyjne starzenie blokuje zdolność do podziału komórek przednowotworowych. Z drugiej jednak strony obserwuje się zwiększoną częstość występowania nowotworów we wrodzonej dyskeratozie spowodowanej mutacjami w telomerazowym RNA (*TERC*), w której spotyka się krótkie telomery (143,185,186,220). Trudno wytłumaczyć jedynie długością telomerów i aktywnością telomerazy starzenie komórki i nowotworzenie. W pierwszym przypadku krótkie chromosomy zapobiegają progresji komórki prawidłowej w nowotworową, w drugim sprzyjają progresji nowotworowej. Zmienna długość telomerów oraz reaktywacja telomerazy z pewnością towarzyszy procesowi nowotworowemu, jednakże jej udział sprawczy ciągle pozostaje problematyczny (49,51,141,183).

Nasuwa się pytanie czy w przypadku reaktywacji telomerazy krótkie telomery mają jakikolwiek udział w genomowej niestabilności komórek nowotworowych. Zakładając, że starzenie replikacyjne komórek powoduje zablokowanie zdolności do podziałów komórek przednowotworowych to jak wytłumaczyć zwiększoną częstość występowania nowotworów we wrodzonej dyskeratozie. W etiopatogenezie tego schorzenia biorą udział mutacje w telomerazowym RNA (*TERC*), co powoduje obniżoną aktywność telomerazy w czasie rozwoju organizmu i komórek macierzystych (stem like), wynikiem tego są krótsze telomery w porównaniu



z osobami zdrowymi (143,220). Jak wytłumaczyć fakt, że krótkie telomery we wrodzonej dyskeratozie mają udział w niestabilności genomu i podatności na nowotworzenie, natomiast u osób zdrowych krótkie telomery z następującą apoptozą komórek zapobiegają rozwojowi komórek przednowotworowych? Nasuwa się pytanie, czy wydłużenie telomerów w przewlekłych schorzeniach, takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego (colitis ulcerosa), w którym telomery stają się bardzo krótkie, albo we wrodzonej dyskeratozie zapobiegałoby rozwojowi nowotworu, czy też doprowadziłoby do przyspieszonej transformacji nowotworowej (187,189).

### ***Telomeraza a nowotworzenie***

Komórki wielu nowotworów wykazują aktywność telomerazy konieczną do utrzymania ciągłej proliferacji (238,245). Unieśmiertelnienie komórek może wystąpić poprzez mutacje w genach odpowiedzialnych za represję ekspresji telomerazy. Z tego względu reaktywacja telomerazy może być wymagana dla utrzymania wzrostu komórek nowotworowych (115,231). Bardzo wiele danych z piśmiennictwa wskazuje jednoznacznie na wysoką aktywność telomerazy praktycznie we wszystkich nowotworach wobec jej braku w komórkach prawidłowych (184,190,211).

W komórkach nowotworowych akumulacja mutacji w protoonkogenach i w genach przeciwnowotworowych (supresji nowotworowej – tumor suppressor genes) prowadzi do zablokowania sygnałów hamujących podziały komórkowe (35,44,188). Młode prawidłowe komórki somatyczne mogą dzielić się wiele razy nie wykazując jakichkolwiek cech nowotworzenia. Wydaje się, że w rozwoju nowotworu komórka najpierw starzeje się, następnie łatwiej niż młoda ulega transformacji nowotworowej (182).

## ***Możliwości diagnostyczne wykorzystania telomerazy w chorobach nowotworowych***

Wyniki ponad 2 tysięcy prac opublikowanych z zakresu badania ekspresji i aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych wskazują, że tylko w 10-15% przypadków stwierdza się brak telomerazy. Część z tych przypadków z pewnością obejmuje wczesne etapy procesu nowotworzenia oraz komórki nowotworowe, które podlegają procesowi apoptozy, jak np. w stadium 4s zwojaka zarodkowego u dzieci (1,29,64,99). Wyniki badań nie wykazujących aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych można wytłumaczyć oprócz mechanizmu alternatywnego wydłużania telomerów (168,213) również technicznymi błędami w czasie przygotowania próbek guza do badania (132). Zamrażanie, odmrażanie próbek, badanie prawidłowych tkanek, które omyłkowo zostały uznane za nowotworowe, występowanie inhibitorów telomerazy, pobieranie nekrotycznych wycinków tkanki do badań to kolejne przyczyny błędów technicznych w czasie przeprowadzania testów oceniających ekspresję i aktywność telomerazy. Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że oprócz nielicznych przypadków występowania alternatywnego mechanizmu wydłużania telomerów dla prawie wszystkich nowotworów telomeraza jest uniwersalnym markerem (14,29,30,31). Aktywność telomerazy wykazano zarówno w nowotworach litych piersi, płuc, krtani, jelita grubego, żołądka, pęcherza moczowego, jak również w schorzeniach limfoproliferacyjnych - białaczkach i chłoniakach (100,167,205,233,237,243,245).

Dla celów diagnostycznych, kiedy zachodzi podejrzenie zmiany złośliwej, istotnym jest stwierdzenie komórek nowotworowych w bioptatach tkankowych cienkoigłowych (175). W przypadku niewielkich ilości komórek uzyskanych z bioptatów, popłuczyn z pęcherza moczowego, wysięku opłucnowego, moczu, płwociny badanie aktywności lub ekspresji telomerazy może stanowić uzupełnienie prowadzonych badań w celu ustalenia rozpoznania (205,215,216,237,244). Nie można wykluczyć, że ilościowe badanie ekspresji i aktywności telomerazy może mieć znaczenie dla stratyfikacji i oceny efektywności leczenia i prognozowania

choroby nowotworowej. Wykorzystanie technik biologii molekularnej, immunohistochemii i hybrydyzacji in situ (FISH – fluorescence in situ hybridization) do wykrywania aktywności i ekspresji telomerazy powinno przyczynić się do ulepszenia metod służących do rozpoznania nowotworu, stanów przednowotworowych, jak również do monitorowania skuteczności leczenia poprzez wykrywanie choroby resztkowej (MRD – minimal residual disease). Badanie MRD okazało się przydatne w monitorowaniu leczenia białaczek, jak również leczenia chirurgicznego raków żołądka i jelita grubego. Poziom aktywności telomerazy może mieć również wartość prognostyczną z uwagi na dane wskazujące, że w przypadku wysokiej aktywności rokowanie jest znacznie gorsze niż w przypadku wykazania niskiej aktywności w komórkach nowotworowych (32,37,39,41).

Przydatność diagnostyczna telomerazy z uwagi na jej występowanie praktycznie we wszystkich komórkach nowotworowych, wydaje się bardzo obiecująca. Należy zwrócić uwagę, że podobnie jak szereg innych markerów i badań laboratoryjnych sama telomeraza nie może być wyłącznie markerem procesu nowotworowego. Jednak ze względu na powszechność jej występowania badanie telomerazy z pewnością zasługuje na szersze wykorzystanie i praktyczne wdrożenie ilościowych badań ekspresji i aktywności telomerazy dla poszerzenia możliwości diagnostycznych chorób nowotworowych i monitorowania przebiegu terapii.

W podstawowych badaniach karcinogenezy udział telomerazy i telomerów może przyczynić się do wyjaśnienia powstawania nowotworu tylko w określonych tkankach i narządach. Wiadomo, że germinalne mutacje określonych genów, jak na przykład *BRCA1*, *NBS1*, *CHEK2*, *HER1* itp. wiążą się z większą podatnością do rozwoju nowotworów. Interesującym wydaje się powiązanie przyczynowo-skutkowe mutacji w genach ryzyka nowotworzenia, aktywacji onkogenów, utraty heterozygotyczności, zaburzeń ekspresji genów przeciwnowotworowych (tumor suppressor genes) z reaktywacją telomerazy w przebiegu procesu nowotworzenia (218,219). Immortalizacja komórek poprzez transfer genu dla telomerazy pobranych z tkanek

narażonych na nowotwory u zdrowych osób mogłaby pozwolić prześledzić mechanizmy prowadzące do transformacji nowotworowej komórek z mutacjami genów ryzyka nowotworzenia.

Nasuwa się pytanie, dlaczego transfer genu dla telomerazy nie prowadzi do powstania nowotworu. Z jednej strony wiadomo, że wysoka aktywność telomerazy w prawidłowych komórkach germinalnych czy w szybko dzielących się komórkach szpiku kostnego lub nabłonka nie ma bezpośredniego związku z procesem karcinogenezy. Z drugiej strony bardzo liczne dowody eksperymentalne wskazują na akumulację różnych zaburzeń w DNA, RNA, białek, regulacji ekspresji genu, które obserwuje się w komórkach stopniowo ulegających transformacji nowotworowej. Zmiany te wpływają pośrednio lub bezpośrednio na funkcję komórek, interakcję z hormonami, czynnikami wzrostu i innymi substancjami biologicznie czynnymi. W tym ujęciu telomeraza jest jedynie jednym z bardzo wielu czynników mogących mieć wpływ lub jedynie towarzyszącym zmianom prowadzącym do transformacji nowotworowej. Tak więc telomeraza nie jest onkogenem i nie powoduje powstania nowotworu.

Problem powiązania procesu starzenia komórki z karcinogenezą nie jest w pełni poznany. Dla transformacji nowotworowej w komórce musi zajść minimum od 4 do 6 mutacji. Po wystąpieniu mutacji dochodzi do ekspansji zmutowanego klonu komórek, w których po kilkunastu lub kilkudziesięciu podziałach może zajść kolejna mutacja. Niektóre z mutacji mogą być recesywne, w takim przypadku po znacznie większej ilości podziałów może dojść do utrwalenia mutacji i eliminacji komórek z dzikim allelem. Przyjmuje się, że komórka musi podzielić się 80-200 razy w celu powstania zmutowanej komórki nowotworowej. Z drugiej strony 80 podziałów stanowi górną granicę liczby podziałów komórki (limit Hyflicka), stąd też część komórek z mutacjami ulega starzeniu replikacyjnemu i apoptozie. Ponadto niektóre geny supresji nowotworowej (tumor suppressor gene) nie tylko regulują przebieg cyklu komórkowego, ale są konieczne dla indukcji starzenia komórki. Mutacja genu *TP53* lub *RB* może być wystarczająca dla rozwoju komórek nowotworowych, które mogą ulegać starzeniu i apoptozie. Prawdopodobnie reaktywacja telomerazy występująca w większości komórek nowotworowych i

przednowotworowych powoduje ich unieśmiertelnienie (39,72,7593,109). Z drugiej strony obserwacje u dzieci ze zwojakiem zarodkowym (neuroblastoma) z przerzutami w stadium 4s, u których usunięcie chirurgiczne pierwotnego ogniska prowadzi czasami do spontanicznego ustąpienia tego nowotworu bardzo mocno sugerują, że nie wszystkie komórki nowotworowe są nieśmiertelne (99). Interesującym jest fakt, że obserwowany w komórkach neuroblastoma w stadium 4s brak aktywności telomerazy i występowanie krótkich telomerów najprawdopodobniej wiąże się ze spontaniczną regresją tego nowotworu (99).

### ***Zapobieganie starzeniu komórek przez transfer genu TERT***

Ekspresję telomerazy udało się reaktywować poprzez transfer genu *TERT* do keratynocytów skóry, fibroblastów, komórek mięśniowych, komórek śródbłonna naczyniowego, komórek siatkówki i komórek nabłonka gruczołu piersiowego (23,171,189,200). We wszystkich przypadkach wykazano, że ekspresja *TERT* zwiększa liczbę podziałów i wydłuża życie komórki. Najistotniejszym było stwierdzenie, że transfer genu *TERT* i reaktywacja telomerazy nie zaburza prawidłowego różnicowania komórek, nie zmienia ich fenotypu ocenianego produkcją prawidłowych białek. Komórki z reaktywowaną telomerazą wykazywały oporność na apoptozę. Wydaje się, że w przyszłości transfer genu odwrotnej transkryptazy może być wykorzystywany do wytwarzania naturalnych tkanek i do terapii genowej przewlekłych chorób związanych z podeszłym wiekiem.

### ***Czy telomeraza może zapobiegać replikacyjnemu starzeniu i wydłużać życie komórki?***

Oryginalne doświadczenia z transfekcją genu dla telomerazy zostały przeprowadzone w warunkach in vitro. Naturalnym rozwojem tej technologii będzie wykonywanie w przyszłości doświadczeń bądź już zabiegów na komórkach pobieranych od chorych. Wszczepienie ex vivo do

komórek chorego genu dla *TERT* hamowałyby starzenie replikacyjne i umożliwiłyby produkcję wiecznie młodych komórek (218). Obecnie można wyobrazić sobie utworzenie takiej konstrukcji genowej, w której sekwencje promotorowe byłyby w stanie włączać i wyłączać gen dla telomerazy pod wpływem podania określonego czynnika (leku) (171). Wykorzystanie własnych komórek pacjenta omija problem odrzucania niezgodnych pod względem antygenów HLA komórek obcych. Teoretycznie wydaje się, że technologia transferu genu *TERT* mogłaby być zastosowana w wydłużaniu życia prawidłowych komórek i tkanek, które ulegają degeneracji bądź niszczeniu w przebiegu różnych chorób. Szczególnie obiecujące wydaje się zastosowanie tej nowej technologii w transplantologii. Nie można wykluczyć, że w przyszłości możliwe będzie odmładzanie in vitro komórek pacjenta a następnie ich autotransplantacja w celu odmładzania tkanek bądź leczenia chorób przebiegających z uszkodzeniem narządów i tkanek (189,195). Ponadto genetyczne unieśmiertelnianie komórek poprzez wprowadzanie genu *TERT* z pewnością będzie wykorzystane w terapii wybranych chorób genetycznych. Jako przykład można podać próby immortalizacji komórek mięśni poprzecznie prążkowanych w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Innym przykładem, w którym terapia telomerazowa może znaleźć praktyczne zastosowanie jest transplantacja skóry u osób z ciężkimi poparzeniami. Nie można wykluczyć również prób odmładzania skóry poprzez wykorzystanie zdolności telomerazy do zwiększania liczby prawidłowych podziałów komórek. Pierwsze kremy z telomerazą zostały już wprowadzone na rynek przez firmę Chanel, co ma znaczenie przede wszystkim marketingowe. Innym możliwym wykorzystaniem telomerazy jest wzmacnianie odporności swoistej i nieswoistej u osób z niedoborami odporności w tym w AIDS oraz u osób starszych z upośledzoną odpornością. Podejmowane są już próby wyprodukowania dużej ilości komórek trzustki produkujących insulinę jako leku dla chorych na cukrzycę młodzieńczą (typu I). Produkcja w warunkach in vitro komórek szpiku kostnego stymulowanych do podziałów poprzez transfer genu *TERT* stanowiłaby przełom w autoprzeszczepach szpiku kostnego. Można sobie wyobrazić również odmładzanie komórek

siatkówki w jej starczym zwyrodnieniu, osteoblastów w osteoporozie, różnych komórek centralnego układu nerwowego, w chorobie Parkinsona, Alzheimer'a i w stwardnieniu rozsianym.

Prawidłowe ludzkie komórki wykazujące stabilną ekspresję transfekowanego genu dla *TERT* stają się długowieczne, co dowodzi, że skracanie telomerów kontroluje starzenie komórkowe. Komórki z wprowadzonym genem dla *TERT* są w stanie dzielić się setki razy, posiadają prawidłowy kariotyp i fenotyp, nie wykazują cech komórek nowotworowych. Początkowe wątpliwości sugerujące, że transfer genu dla *TERT* może zwiększać ryzyko nowotworzenia, nie zostały potwierdzone doświadczalnie. Można z tych doświadczeń wysunąć wniosek, że główną rolą telomerazy jest utrzymywanie stabilności telomerów i udział w prawidłowych podziałach (218).

Jeżeli założymy, że starzenie komórki zapobiega nowotworzeniu wówczas możemy rozpatrywać te dwa procesy jako jedno zjawisko o przeciwstawnych biegunach. Teoretycznie problem nowotworzenia i starzenia wydaje się prosty do rozwiązania – znalezienie czynnika powodującego starzenie oraz śmierć komórek nowotworowych z jednej strony i czynnika zapobiegającego starzeniu komórek prawidłowych z drugiej (53,91). Praktyczne implikacje można sprowadzić do hamowania telomerazy, w wyniku czego dochodziłoby do starzenia i śmierci komórek nowotworowych oraz do reaktywacji telomerazy w komórkach prawidłowych umożliwiających im „wieczną młodość” (142). Eksperymentalne dane dające nadzieje na praktyczne wykorzystanie wyżej wymienionych możliwości zostały uzyskane w warunkach *in vitro* (137). Zastosowanie przeciwciał przeciwko odwrotnej transkryptazie telomerazy (*TERT*) prowadzi do rewersji fenotypu komórek nowotworowych. Z kolei transfer genu *TERT* do prawidłowych fibroblastów umożliwia zwiększenie liczby podziałów komórki – limitu Hayflicka z ok. 70 do ponad 300 bez cech starzenia i bez cech nowotworzenia proliferujących fibroblastów (139). Wydaje się, że w przyszłości będzie możliwe praktyczne wykorzystanie blokowania telomerazy jako środka przeciwnowotworowego i reaktywacji telomerazy jako czynnika leczącego choroby związane ze starzeniem.

Wyniki doświadczenia z transferem genu *TERT*, aczkolwiek bardzo spektakularne, to potwierdzają jedynie, że główną rolą telomerazy jest utrzymanie stabilności telomerów i zapewnienie zdolności do podziału (23,133,134).

### ***Możliwości wykorzystania telomerazy w terapii nowotworów***

Z uwagi na występowanie aktywności telomerazy w większości komórek nowotworowych można założyć, że zablokowanie telomerazy będzie wiązało się z regresją nowotworu. Jedną z doświadczalnych prób leczenia nowotworów jest zahamowanie aktywności telomerazy prowadzące do zmiany nieśmiertelnych komórek nowotworowych w komórki podlegające starzeniu replikacyjnemu i apoptozie (191). W podejmowanych próbach klinicznych po zabiegu chirurgicznym, radioterapii lub chemioterapii podawano przeciwciała przeciwko telomerazie mającej za zadanie zahamowanie proliferacji pozostałych komórek nowotworowych. Tego typu działania w warunkach doświadczalnych hamowały aktywność telomerazy i powodowały programową śmierć komórek nowotworowych. Istotnym problemem standardowej chemioterapii jest używanie leków, które uszkadzają DNA dzielących się komórek prowadząc do ich śmierci. Wiadomo, że chemioterapia niszczy oprócz komórek nowotworowych wszystkie inne dzielące się komórki w organizmie, czego powodem jest występowanie szeregu objawów ubocznych. Z uwagi na aktywność telomerazy głównie w komórkach nowotworowych wykorzystanie swoistych przeciwciał byłoby terapią bardzo selektywną. Oczywiście zastosowanie środków hamujących telomerazę wiąże się również z występowaniem objawów ubocznych nieporównywalnie mniej dotkliwych dla pacjenta niż w przypadku chemioterapii. Innym problemem w terapii nowotworu są nawroty obserwowane po kilku latach po zakończeniu leczenia. Badacze, którzy zastosowali jako pierwsi przeciwciała przeciwko telomerazie uważają, że tego typu terapia może być pomocna w zwalczaniu komórek nowotworowych pozostałych po zakończeniu konwencjonalnego leczenia (191). Komórki nowotworowe poddane działaniu przeciwciał antytelomerazowych po kilku kolejnych podziałach ulegałyby apoptozie.



Wiadomo, że zastosowanie terapii antytelomerazowej wpływałoby również na rozwijające się komórki germinalne, komórki macierzyste szpiku kostnego, skóry, śródbłonna jelitowego. Wszystkie te komórki mają jednak telomery znacznie dłuższe od komórek nowotworowych (20). Z tego względu przyjmuje się, że terapia antytelomerazowa znacznie szybciej powodowałaby starzenie replikacyjne komórek nowotworowych niż prawidłowych komórek organizmu z wysoką aktywnością telomerazy. Z uwagi na mechanizm działania inhibitorów telomerazy poprzez skracanie telomerów w kolejnych podziałach do czasu wywołania apoptozy, efekt działania na komórki nowotworowe byłby znacznie rozciągnięty w czasie w porównaniu do chemioterapii. Z tego względu zastosowanie inhibitorów telomerazy mogłoby być skuteczne we wstępnych fazach nowotworu jako uzupełniająca terapia przeciwdziałająca powstawaniu przerzutów. Pewnym zastrzeżeniem w stosowaniu przeciwciał przeciwtelomerazowych jest możliwość powstawania nieśmiertelnych komórek nowotworowych bez aktywności telomerazy wykorzystujących alternatywny mechanizm protekcji końców chromosomów. Jak dotąd nie zaobserwowano powstawania takich komórek po stosowaniu przeciwciał antytelomerazowych. Należy jednak stwierdzić, że część komórek nowotworowych najprawdopodobniej wykorzystuje alternatywny mechanizm wydłużania końców chromosomów (10,14,31,168,173).

Obok przeciwciał przeciwtelomerazowych dla represji aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych jest wykorzystywana technologia antysensownych oligonukleotydów wiążących się specyficznym z matrycowym RNA telomerazy (*TERC* – *telomerase RNA component*), z matrycowym RNA dla *TERT* i/lub RNA dla białek kompleksu telomerazy. Potencjalnym celem terapii wyłączającej aktywność telomerazy komórek nowotworowych będą z pewnością RNA i geny kodujące białka, mające wpływ na ekspresję poszczególnych składników kompleksu telomerazy. Jako przykład można podać zidentyfikowany gen na chromosomie 3p stanowiący represor telomerazy w raku nerki i raku piersi.

Obiecujące wyniki badań różnych autorów sugerują, że antysensowne inhibitory telomerazy obok swoistych przeciwciał, w powiązaniu z czynnikami hamującymi angiogenezę, mogą stanowić cenne uzupełnienie terapii nowotworów.

### ***Ostre białaczki u dzieci***

Białaczki stanowią niejednorodną grupę złośliwych chorób nowotworowych, wywodzących się z różnych linii rozwojowych układu krwiotwórczego. Rozróżnia się białaczki ostre i przewlekłe. Białaczki ostre należą do grupy chorób charakteryzujących się wyparciem prawidłowego utkania hematopoetycznego szpiku kostnego przez niedojrzałe, nieprawidłowe komórki będące na różnym etapie różnicowania (164). Podział ostrych białaczek opiera się na kryteriach morfologicznych, cytochemicznych oraz immunologicznych. W grupie ostrych białaczek wyróżnia się ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL - acute lymphoblastic leukaemia) (78-86% białaczek wieku dziecięcego) i ostrą białaczkę nielimfoblastyczną (ANLL - acute non-lymphoblastic leukaemia) (13-22% przypadków białaczek wieku dziecięcego). Ostre białaczki stanowią około 30-35% nowotworów dziecięcych i są najczęstszymi chorobami rozrostowymi u dzieci. Występują najczęściej między 2-7 rokiem życia, przeważnie u chłopców (164).

Białaczka często towarzyszy wrodzonym zaburzeniom chromosomalnym : zespołom Downa i Klinefeltera, trisomii chromosomu 13. Wykazano zależność między wystąpieniem T-komórkowej ALL a zakażeniem ludzkim retrowirusem T-limfotropowym. W białaczkach wykazano aktywację szeregu onkogenów oraz zaburzenia ekspresji czynników wzrostu i ich receptorów. W transformacji białaczkowej niewątpliwą rolę odgrywają uwarunkowania genetyczne oraz zaburzenia różnicowania komórek pnia do granulocytów, erytrocytów, limfocytów, monocytów i płytek krwi na różnym etapie hematopoezy. W efekcie dochodzi do rozwoju białaczki komórki, której stopniowo zajmują szpik, wypierając prawidłowe komórki układu hematopoezy.

Rozpoznanie ostrych białaczek opiera się na kryteriach morfologicznych zgodnie z klasyfikacją FAB. Wyróżnia się 3 typy limfoblastów: L1, L2 i L3. U dzieci przeważa typ L1 (ok. 80%). Ostre białaczki nielimfoblastyczne klasyfikuje się na 8 podtypów:

M<sub>0</sub> – białaczka skrajnie niskozróżnicowana

M<sub>1</sub> – białaczka bez cech różnicowania

M<sub>2</sub> – białaczka z cechami różnicowania, często obecne pałeczki Auera

M<sub>3</sub> – białaczka promielocytowa

M<sub>4</sub> – białaczka mielomonocytowa, komórki monocytarne stanowią około 20%,  
wyróżnia się podtyp z eozynofilią i bez eozynofilii

M<sub>5</sub> – białaczka monocytowa, komórki monocytarne (monoblasty, monocyty, promonocyty) stanowią ponad 80% komórek szpiku

M<sub>6</sub> – erytroleukemia, 50% komórek szpiku stanowią erytroblasty i min. 30% mieloblasty

M<sub>7</sub> – białaczka megakariocytowa

Dodatkowo wykorzystuje się kryteria cytochemiczne i immunologiczne dla odróżnienia poszczególnych podtypów ostrych białaczek. Określenie powierzchniowego immunofenotypu komórek białaczkowych za pomocą przeciwciał monoklonalnych pozwala na dokładną subklasyfikację ostrych białaczek (201).

Pośród ALL wyróżnia się:

1. białaczki z linii limfocyta B (ALL):

- białaczka progenitorowa (pro B-komórki) - wykazują ekspresję HLA-DR, CD34, CD19, CD22, TdT. Morfologicznie jest to najczęściej postać L1 (wg FAB)
- białaczka prekursorów B-common ALL (cALL) wykazują ekspresję HLA-DR, CD34, CD19, CD10 i zmienną ekspresję CD22. Wyróżnia się cALL z ekspresją CD10+/CD20+. Morfologicznie cALL odpowiada najczęściej L1/L2 wg FAB.

- białaczka prekursorów B (pre B) - wykazuje obecność w cytoplazmie łańcucha ciężkiego IgM- $\mu$ . Komórki posiadają ekspresję. HLA-DR, CD19, CD20, CD22, CD10. Odpowiada typom L1/L2 wg FAB
- białaczka limfoblastyczna B (ALL-B) - posiada fenotyp dojrzałych limfocytów B z ekspresją determinant: HLA-DR, CD19, CD22, CD20, łańcuchów ciężkich immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) oraz jednego z łańcuchów lekkich (kappa lub lambda). Morfologicznie odpowiada typowi L3 wg FAB

## 2. białaczki z linii limfocyta T (ALL):

- prekursorowa (pre T ALL) wykazuje ekspresję determinant odpowiadającą fenotypem 3 etapom różnicowania limfocyta T w grasicy:

t I            wczesny tymocyt (CD2, CD7, CD5)

t II            tymocyt (CD2, CD5, CD7, CD4/CD8)

t III            dojrzały tymocyt (CD2, CD3, CD5, CD7, CD4 lub CD8)

- T ALL z obecnością determinant CD5, CD7, CD2

W rokowaniu ostrych białaczek istotną rolę odgrywają badania cytogenetyczne, które pozwalają na wykazanie specyficznych aberracji chromosomowych. Czynnikiem dobrej prognozy jest hyperploidia, natomiast pseudodiploidia, hypoploidia, translokacje t(8:14); t(9:22); t(4:11), t(11:14), t(1:19), monosomia 20 stanowią niekorzystne czynniki rokownicze (164).

### ***Badanie aktywności i ekspresji telomerazy w ostrych białaczkach***

Badania telomerazy w ostrych białaczkach wskazują jednoznacznie na jej wysoką aktywność zarówno w krwi obwodowej jak i w szpiku kostnym w momencie rozpoznania choroby (46,75,100). Aktywność telomerazy obniża się po zastosowanej terapii i w okresach wolnych od choroby, natomiast podczas wznowy ulega ponownie podwyższeniu (122). Obserwacje różnych autorów dotyczące aktywności telomerazy w ostrych białaczkach są bardzo zbieżne (127,167). Wyniki badań ekspresji telomerazy nie są jednak tak jednoznaczne, jak w przypadku oznaczeń jej

aktywności. Chociaż w większości prac wykazano podwyższoną ekspresję podjednostek kompleksu telomerazy nie zaobserwowano jednoznacznej korelacji pomiędzy wysoką ekspresją telomerazy a jej aktywnością (183). Najbardziej rozbieżne dane dotyczą związku aktywności telomerazy z ekspresją *TERT*. Koyanagi i wsp. stwierdzili ścisłą korelację pomiędzy aktywnością telomerazy a ekspresją *TERT* (117). Obserwowany spadek aktywności telomerazy komórek HL60 poddanych działaniu pochodnych kwasu retinowego korelował ze znaczącym obniżeniem ekspresji *TERT*, wobec nieznacznych zmian w ekspresji genów *TERC* i *TPI* (243). Autorzy wysunuli wniosek o regulacji aktywności telomerazy głównie przez zmienną ekspresję *TERT*. Z kolei Ohyashiki i wsp. stwierdzili, że pomimo wysokiej ekspresji *TERT* aktywność telomerazy w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej była stosunkowo niska i korelowała z niską ekspresją *TERC* (155). Autorzy sugerowali, że aktywność telomerazy zależy od zmiany ekspresji *TERT* w stosunku do *TERC*. Li i wsp. jednoznacznie stwierdzili w komórkach ostrej białaczki mieloblastycznej ścisłą korelację pomiędzy aktywnością telomerazy a ekspresją trzech podjednostek kompleksu telomerazy *TERT*, *TERC* i *TPI* (124). Wysoka aktywność telomerazy i ekspresja *TERT* była stwierdzana zarówno w momencie rozpoznania wstępnego białaczki oraz w nawrocie choroby. Autorzy postulują, że badania aktywności telomerazy i ekspresji *TERT* mogą być wykorzystane do monitorowania leczenia i przewidywania wznowy w ostrej białaczce mieloblastycznej.

Wysoki poziom ekspresji *TERT* w ostrych białaczkach jest stwierdzany przez wielu autorów w momencie diagnozy choroby. Nie ma jednakże zgodności co do znaczenia prognostycznego badania ekspresji *TERT* w ostrych białaczkach. Cogulu i wsp. nie stwierdzili korelacji pomiędzy ekspresją *TERT* a uznanymi czynnikami prognostycznymi ostrych białaczek, z wyjątkiem określonych aberracji chromosomowych (42). W innych badaniach wyżej wymienieni autorzy wykazali ekspresję *TERT* najwyższą w pre-B ALL i stopniowo niższą w B-ALL, T-ALL i AML (43). Na uwagę zasługuje stwierdzenie znaczącej różnicy w ekspresji *TERT* pomiędzy ostrą białaczką limfoblastyczną i nielimfoblastyczną. Ponadto chorzy z ALL z wysoką ekspresją *TERT*

w chwili diagnozy wykazywali w dwuletnich badaniach follow-up wyższe przeżycie całkowite i dłuższe przeżycie wolne od choroby (43). Odmienne wyniki uzyskano w AML, gdzie niższa ekspresja *TERT* w chwili diagnozy wiązała się dłuższym okresem przeżycia wolnego od choroby i wyższym przeżyciem całkowitym. Autorzy uważają, że poziom ekspresji *TERT* w chwili diagnozy w dziecięcej ALL stanowi istotny czynnik prognostyczny. Podobne wyniki w ostrej białaczce mieloblastycznej uzyskali Huh i wsp., twierdząc, że ilościowa analiza ekspresji *TERT* może być przydatnym markerem dla monitorowania leczenia i przewidywania wznowy choroby (98). Z kolei zupełnie odmienne wyniki w ALL obserwowali Li i wsp., którzy stwierdzili, że wysoka ekspresja *TERT* wiąże się z niższym całkowitym przeżyciem i krótszym czasem przeżycia wolnym od choroby (123).

### ***Amplifikacja genu TERT w nowotworach***

W wielu nowotworach obserwuje się ubytki lub nadatki (gain or loss) materiału genetycznego. Czasami obserwowana jest amplifikacja określonych genów lub dłuższych odcinków DNA. Wysoki stopień nadatku (gains) regionu chromosomu 5p stwierdzono w wybranych nowotworach (248). W rdzeniaku (medulloblastoma) zaobserwowano amplifikację regionu chromosomu 5p15, w którym zlokalizowany jest gen dla *TERT* (57). Z uwagi na niepoznany mechanizm reaktywacji telomerazy w komórkach nowotworowych podejmowane były próby oceny ilości kopii genów *TERT* i ich możliwego wpływu na ekspresję telomerazy. Zhang i wsp. wykazali amplifikację genu *TERT* w ponad 30% badanych nowotworów złośliwych obejmujących zarówno pierwotne zmiany oraz wyprowadzone z guzów litych linie komórkowe (248). Amplifikacja *TERT* była obserwowana w formie *double minutes*, sparowanych i sferycznych grudkach (ciałkach) chromatyny bez sekwencji centromerowych. W części przypadków amplifikacja genu *TERT* stwierdzana była w formie nadatków (*gains*) regionu 5p. Dane te sugerują, że gen *TERT* może być zaangażowany w patomechanizmie rozwoju nowotworów człowieka.

Niektóre dane sugerowały selektywną ekspansję telomerazopozytywnych komórek w karcinogenezie, inne zmiany informacji genetycznej prowadzące do reaktywacji telomerazy. Wykazanie amplifikacji *TERT* w wybranych nowotworach i liniach komórkowych bardzo mocno sugeruje udział zmian genetycznych w mechanizmie reaktywacji telomerazy (150,209). Wydaje się prawdopodobnym, że zwiększoną liczbą kopii genu *TERT* wpływa na zwiększenie ekspresji *TERT* w komórkach nowotworowych. W liniach komórkowych ze zwojaka zarodkowego, w których występowała amplifikacja genu *TERT*, stwierdzono kilkunastokrotnie zwiększoną aktywność telomerazy w przeciwieństwie do komórek neuroblastoma bez amplifikacji *TERT* (57, 248). W innych nowotworach, jak na przykład w raku piersi również wykazano asocjacje pomiędzy wysokim stopniem ekspresji a amplifikacją *TERT* (248,249). Dane te sugerują, że amplifikacja *TERT* odgrywa istotną rolę w mechanizmie zwiększonej aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych. Jednakże w nowotworach płuc i szyjki macicy nie wykazano amplifikacji *TERT* pomimo obserwowanej wysokiej aktywności telomerazy (3). Wyjaśnienia tego zjawiska należy upatrywać z jednej strony w regulacji ekspresji *TERT* na różnych poziomach, z drugiej uwarunkowaniami technicznymi w prowadzonych badaniach. Stwierdzono, że barwienie immunohistochemiczne utrwalonych skrawków parafinowych może być zaburzone przez utratę antygeny przez zastosowane odczynniki do utrwalania bądź samego barwienia (199). Przykładem mogą być wyniki badań dotyczących amplifikacji *HER* techniką FISH i oceną poziomu białek *HER* na utrwalonych skrawkach parafinowych. Pomimo stwierdzanej amplifikacji genu *HER* poziom ekspresji nie był podwyższony. Należy dodać, że onkogen *MYC* i estrogeny są zdolne do indukcji ekspresji *TERT* poprzez aktywację transkrypcji (119,248). Korelacja amplifikacji genu *TERT* z obrazem klinicznym nie dała oczekiwanych wyników. Stwierdzono między innymi, że amplifikacja genu *TERT* występuje niezależnie od amplifikacji genu *MYC* i stopnia zróżnicowania komórek raka piersi (248). Trzeba jednak dodać, że ekspresja *MYC* może być powiązana z regulacją ekspresji telomerazy. Ciekawym stwierdzeniem było wykazanie w części przypadków raka piersi amplifikację genu *TERT* skorelowaną ze zwiększoną ekspresją *TP53*. Z

dotychczasowych danych wynika, że amplifikacja genu *TERT* może mieć udział w regulacji aktywności kompleksu telomerazy w niektórych nowotworach (57,150,248).

W innych badaniach Zhanga i wsp. wykazano amplifikację *TERT* w ¼ przypadków ustalonych linii komórkowych wyprowadzonych z raka szyjki macicy (249). Liczba kopii genu *TERT* korelowała z poziomem ekspresji *TERT*. Co ciekawe amplifikację *TERT* i znacznie zwiększoną ekspresję *TERT* obserwowano wyłącznie w przypadkach raka szyjki przebiegającego z infekcją patogennych genotypów wirusa brodawczaka HPV16 (249). Można przypuszczać, że sam wirus HPV16 może być jednym z czynników wpływających na reaktywację telomerazy w zakażonych komórkach śródbłonna śluzówki szyjki macicy.

Również w badaniach pierwotnego raka wątroby stwierdzono w ponad 20% przypadków amplifikację *TERT* (209). Występowanie amplifikacji genu *TERT* było skorelowane z nisko zróżnicowanym rakiem wątroby - 50% wobec 10% amplifikacji *TERT* w raku wysoko zróżnicowanym. Ponadto w przypadkach amplifikacji *TERT* obserwowano większe guzy. Co ciekawe wysokość ekspresji *TERT* mierzona ilością mRNA nie korelowała ze stopniem amplifikacji *TERT*. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników wyciągnęli wniosek, że amplifikacja *TERT* jest charakterystycznym zjawiskiem w raku wątroby oraz, że stopień ekspresji *TERT* nie jest związany z liczbą kopii genów (209).

Wysoki poziom amplifikacji chromosomu 5 obejmujący gen kodujący odwrotną transkryptazę telomerazy (*TERT*) wykazano w guzach mózgu pochodzenia embrionalnego głównie w rdzeniaku (57). Sugerowano związek pomiędzy zwiększoną ekspresją *TERT* mRNA a stopniem agresywności guza. Występowanie amplifikacji *TERT* stwierdzono również w rakach płuc, piersi, szyjki macicy i w zwojaku zarodkowym i ustalonych liniach komórkowych (248).



## *Cel pracy*

Dane z piśmiennictwa dotyczące oceny ekspresji i aktywności telomerazy w nowotworach nie są jednoznaczne. Jak wytłumaczyć brak ekspresji lub aktywności telomerazy tylko w części przypadków analizowanych nowotworów? Trudno jest się zgodzić także z całkowitym brakiem aktywności i ekspresji telomerazy w komórkach prawidłowych. Bardziej prawdopodobne wydaje się, że różnice aktywności i ekspresji telomerazy zarówno w komórkach nowotworowych jak i prawidłowych mają charakter ilościowy a nie jakościowy.

Kontrowersyjnym pozostaje stwierdzenie niektórych autorów, że telomeraza oceniana testami jakościowymi stanowi marker procesu nowotworowego. Nie wiadomo również, czy wysoką aktywność telomerazy można w prosty sposób tłumaczyć amplifikacją genu *TERT*.

Jak dotąd nie wykonano równoczesnych badań amplifikacji genu *TERT* i *TERC* w powiązaniu z aktywnością i ekspresją telomerazy w chorobach limfoproliferacyjnych u dzieci.

Bezpośrednią przesłanką do podjęcia planowanych badań było stwierdzenie w pilotażowych oznaczeniach wysokiej aktywności telomerazy oraz zwiększonej liczby kopii genu *TERT* w komórkach białaczkowych.

**Celem pracy** było wykazanie czy ilościowa ocena ekspresji i aktywność telomerazy w komórkach ostrych białaczek u dzieci może być markerem odróżniającym komórki prawidłowe od białaczkowych. Postawiono również pytanie, czy wysoką ekspresję i aktywność telomerazy w komórkach ostrych białaczek można tłumaczyć amplifikacją genów *TERT* i *TERC*.

### **Cel pracy realizowano poprzez:**

- ocenę jakościową i ilościową aktywności telomerazy
- analizę jakościową i ilościową ekspresji *TERT* i *TERC* techniką real time PCR
- określenie techniką FISH liczby kopii genu *TERT* i *TERC*

# ***Materiał i metody***

## ***Badane grupy***

Materiałem do badań były komórki blastyczne szpiku lub krwi obwodowej chorych z rozpoznaniem ostrych białaczek oraz prawidłowe limfocyty krwi obwodowej. Do badań wykorzystano komórki zbankowane oraz pobrane od pacjentów w chwili rozpoznania białaczki. Grupę badaną stanowiło 38 dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną oraz 24 z ostrą białaczką nielimfoblastyczną hospitalizowanych w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupa kontrolna objęła 20 zdrowych ochotników. Na przeprowadzenie badań zgodę wyraziła Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr uchwały 1399/06 z dnia 07.12.2006)

## ***Wykrywanie aktywności telomerazy***

Aktywność telomerazy badano przy użyciu zestawu TRAPeze Telomerase Detection Kit (Intergen, USA). TRAP - Telomeric Repeat Amplification Protocol opiera się na zmodyfikowanej wersji metody opisanej przez Kima i wsp. (89,110). Metoda obejmuje dwa zasadnicze etapy. W pierwszym telomeraza syntetyzuje powtórzenia telomerowe GGTTAG do końca 3' substratu oligonukleotydowego. W drugim etapie wydłużony przez telomerazę produkt jest amplifikowany w reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów oligonukleotydowych. Uzyskiwane są produkty PCR różniące się długością o 6 par zasad: 50, 56, 62, 68 itd.

Skład zestawu TRAPeze:

- 1x bufor lizujący CHAPS
- 10x bufor reakcyjny TRAP
- 50x mieszanina dNTP
- starter TS
- mieszanina starterów TRAP
- woda *PCR-grade* (wolna od proteaz DN-azy, RN-azy)



ksyleniu w 50% glicerolu/50 mM EDTA. Elektroforezę prowadzono przez 1,5 godziny przy napięciu 400 V. Dokumentację zdjęciową wykonano zestawem KODAK EDAS 300.

### ***Ilościowa ocena aktywności telomerazy***

Ilościową ocenę aktywności telomerazy wykonano przy użyciu zestawu Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS (ROCHE). Zasada testu opiera się na syntezie powtórzeń telomerowych przez telomerazę występującą w badanej próbce. Telomeraza obecna w ekstrakcie komórkowym syntetyzuje - dołącza powtórzenia telomerowe TTAGGG do końca 3' biotynylowanego startera - matrycy P1-TS. Wydłużanie i amplifikacja przebiega analogicznie jak w przypadku wykrywania aktywności telomerazy zestawem TRAPeZe. Produkt startera P1 i matrycy TS, jak również wewnętrzny standard IS są amplifikowane w reakcji PCR z użyciem startera P1 i zakotwiczonego startera P2. Uzyskiwane w pierwszym etapie produkty PCR zawierają liczne powtórzenia 6 nukleotydowe, podczas gdy wewnętrzny standard generuje produkt wielkości 216 pz. W etapie drugim produkty PCR rozdzielone na 2 części poddaje się denaturacji i hybrydyzacji z sondami znakowanymi digoksygeniną. Znakowane sondy są specyficzne dla powtórzeń telomerowych -sonda P3-T i dla wewnętrznego standardu P3-Std. Uzyskane produkty wyznakowane biotyną są immobilizowane w zagłębieniach płytki opłaszczonych streptawidyną. Immobilizowane produkty PCR są następnie wykrywane skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową przeciwciałami przeciwko digoksygeninie w obecności substratu TB.

Skład zestawu Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS:

- bufor lizujący
- mieszanina reakcyjna
- wewnętrzny standard IS
- kontrolna matryca - niska
- kontrolna matryca - wysoka
- woda wolna od nukleaz
- bufor hybrydyzacyjny T
- bufor hybrydyzacyjny IS
- bufor denaturujący
- bufor płuczący 10x
- bufor do rozcieńczania konjugatu

- roztwór substratu TMB
- odczynnik stop
- przeciwciała anti-DIG HRP

Przygotowywanie komórek jest analogicznie jak w teście TRAPeZe. 200 ul zawieszonych do stężenia  $10^6$ /ml komórek odwirowywano, po czym mieszano uzyskany osad w buforze lizującym, inkubowano 30 minut na lodzie i wirowano przez 20 minut w  $4^{\circ}\text{C}$  przy 16000 x g. Do dalszych oznaczeń pobierano 175 ul supernatantu - ekstraktu komórkowego.

Przygotowanie „master mix”	objętość x n próbek
mieszanina reakcyjna	25 ul
wewnętrzny standard	5 ul
woda <i>PCR-grade</i>	18 ul
końcowa objętość	48 ul x n
ekstrakt komórkowy	2 ul x n
końcowa objętość	50 ul - x n

Rozpipetowywano po 48 ul „master mix” do próbek do PCR. Do prób badanych dodawano po 2 ul ekstraktu komórkowego. Do prób kontrolnych dodawano po 2 ul zinaktywowanego w  $85^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut ekstraktu komórkowego. Do prób z kontrolnymi matrycami dodawano 1 ul matrycy o niskiej lub wysokiej aktywności telomerazy. Do próby kontroli czystości PCR dodawano jedynie 2 ul buforu lizującego.

Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze stosując program:

Inkubacja	-30 min w $30^{\circ}\text{C}$ .
30 cykli	- denaturacja 30 sek, $94^{\circ}\text{C}$ - wiązanie starterów - 30 sek, $59^{\circ}\text{C}$ - wydłużanie - 90 sek, $72^{\circ}\text{C}$ - końcowe wydłużanie - 10 min, $72^{\circ}\text{C}$ .

Kolejno denaturowano uzyskane produkty PCR (2,5ul) w obecności 10ul buforu denaturującego przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano do każdej próbki 100 ul buforu hybrydującego T lub 100 ul buforu hybrydującego S. Całość przenoszono do dołków płytki opłaszczanej MTP. Płytkę inkubowano w  $37^{\circ}\text{C}$  przez 2 godziny na wytrząsarce. Supernatant ściągano z każdego zagłębienia płytki i 3-krotnie płukano buforem. Następnie dodawano po 100 ul przeciwciał anti-DIG-HRP. Płytkę zaklejano folią i inkubowano przez 30

minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Supernatant odpipetowywano i 5-krotnie płukano buforem, po czym dodawano do każdego zagłębienia 100 ul roztworu substratu TMB. Płytki zaklejano folią i inkubowano przez 10-20 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce aż do uwidocznienia reakcji barwnej. Dodawano do każdego zagłębienia płytki po 100 ul odczynnika stop, obserwując zmianę koloru niebieskiego na żółty. Pomiaru absorbancji dokonywano na czytniku ELISA przy długości fali 450 nm w odniesieniu do referencyjnej fali o długości 690 nm.

Względną aktywność telomerazy – RTA (Relative telomerase activity) obliczano według wzoru:

$$RTA = \frac{(A_S - A_{SO}) / A_{S,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,O}) / A_{TS8,IS}} \times 100$$

Do wzoru podstawiano oznaczoną wartość absorbancji:

$A_S$	badanej próbki
$A_{SO}$	inaktywowanej w 85°C badanej próbki
$A_{S,IS}$	wewnętrznego standardu badanej próbki
$A_{TS8}$	kontrolnej matrycy TS8
$A_{TS8,O}$	buforu lizującego
$A_{TS8,IS}$	wewnętrznego standardu kontrolnej matrycy TS8

### ***Izolacja genomowego RNA***

Izolację genomowego RNA wykonywano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Krew obwodową lub szpik kostny w ilości 1-3 ml poddawano lizie poprzez dodanie 10ml 0,8%  $NH_4CL$ . Po 10 minutach inkubacji odwirowywano przy 1500 obrotach przez 6 minut, następnie przepłukiwano buforowanym roztworem 0,9% NaCl (PBS) w ilości 10 ml, zawieszano w 10 ml PBS do stężenia  $5 \times 10^5$  komórek/ml i ponownie wirowano przy 1500 obrotach przez 6 minut. Do osadu komórek dodawano 350ul buforu RLT z beta-merkaptotonolem (10ul ME na

1ml buforu RLT). Po zamieszaniu dodawano 350ul 70% etanolu. Całość 700ul po wymieszaniu nakładano na kolumnę RNeasy umieszczoną w 2 ml próbówce i wirowano 15 sekund przy 8000 x g. Przesącz odrzucono, do kolumny dodano 700 ul buforu RW1, ponownie wirowano 15 sekund przy 8000 x g. Kolumnę umieszczono w nowej 2 ml próbówce, dodawano 500 ul buforu RPE i wirowano 2 minuty przy 8000 x g. Następnie przenoszono kolumnę do nowej próbówki i wmywano RNA 50 ul wody wolnej od RN-az, stosując wirowanie 8000 x g przez 1 minutę.

### ***Synteza cDNA - odwrotna transkrypcja***

3,5ul uzyskanego roztworu RNA poddawano odwrotnej transkrypcji używając 200 jednostek odwrotnej transkryptazy (M-MLV RT; Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Promega) w roztworze o składzie: 5ul buforu (M-MLV 5x Reaction Buffer), 1,25 ul 10mM dATP, dCTP, DTP, dTTP, 25 jednostek inhibitora rybonukleazy (RNasin Plus RNase Inhibitor, Promega) oraz wody wolnej od nukleaz do końcowej objętości 25 ul. Do powyższej mieszaniny dodawano 1,5 ul roztworu random primers o stężeniu 500ug/ml (Promega). Reakcję prowadzono w temperaturze 42° Celsjusza przez 60 minut. Do reakcji RT-PCR używano 1,5 ul uzyskanego roztworu cDNA.

### ***Ocena ekspresji genów TERT, TERC i TP1 techniką PCR***

W celu oceny ekspresji badanych genów wykonywano standardową reakcję PCR stosując jako matrycę cDNA oraz specyficzne startery oligonukleotydowe dla genów *TERT*, *TERC*, *TP1* i *GAPDH*. Sekwencje starterów podano w tabeli 2. Reakcję PCR prowadzono stosując wstępną inkubację w 94°C przez 5 minut, a następnie 40 cykli : denaturacji w 94°C przez 1 minutę, przyłączania starterów w 62°C przez 1 minutę (dla *TERT* i *TP1*) lub w 54°C przez 1 minutę (dla *TERC* i *GAPDH*), wydłużania w 72°C przez 2 minuty. Reakcję kończono inkubując próby w 72°C

przez 7 minut – tzw. wydłużanie końcowe. Do reakcji PCR używano następujących ilości odczynników na 1 próbę: 2 ul cDNA (po odwrotnej transkrypcji), po 0,5 ul specyficznych starterów o końcowym stężeniu 500 nm, 2,5 ul 10mM dATP, dCTP, DTP, dTTP, 2,5 ul 10x buforu do PCR, 1ul (1u) Red Taq-polymerase (Sigma) i 17 ul H<sub>2</sub>O. Produkty PCR analizowano w obrazie elektroforetycznym na 1.5% żelu agarozowym. Dokumentację zdjęciową wykonano zestawem KODAK EDAS 300.

Wielkość produktów PCR wynosiła odpowiednio dla *TERT* - 95pz, *TERC* – 111 pz, *TPI* – 263 pz, *GAPDH* – 145 pz.

Tabela 2

Sekwencja starterów używanych w pracy

Starter	Sekwencja
<i>TERT for</i>	5'-TGA CAC CTC ACC TCA CCC AC - 3'
<i>TERT bac</i>	5'- CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC - 3'
<i>TPI for</i>	5'-TCA AGC CAA ACC TGA ATC TGA G - 3'
<i>TPI bac</i>	5'- CCC GAG TGA ATC TTT CTA CGC - 3'
<i>TERC for</i>	5'- GAA GGG CGT AGG CGC CGT GCT TTT GC - 3'
<i>TERC bac</i>	5'- GTT TGC TCT AGA ATG AAC GGT GGA AGG - 3'
<i>GAPDH for</i>	5'- CCA TGG AGA AGG CTG GGG - 3'
<i>GAPDH bac</i>	5'- CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC - 3'
<i>ACTB for</i>	5'- CTT CCT GGG CAT GGA GTC C - 3'
<i>ACTB bac</i>	5'- ATC TTG ATC TTC ATT GTG CTG - 3'



## ***Ilościowa ocena ekspresji genów TERT i TERC techniką łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)***

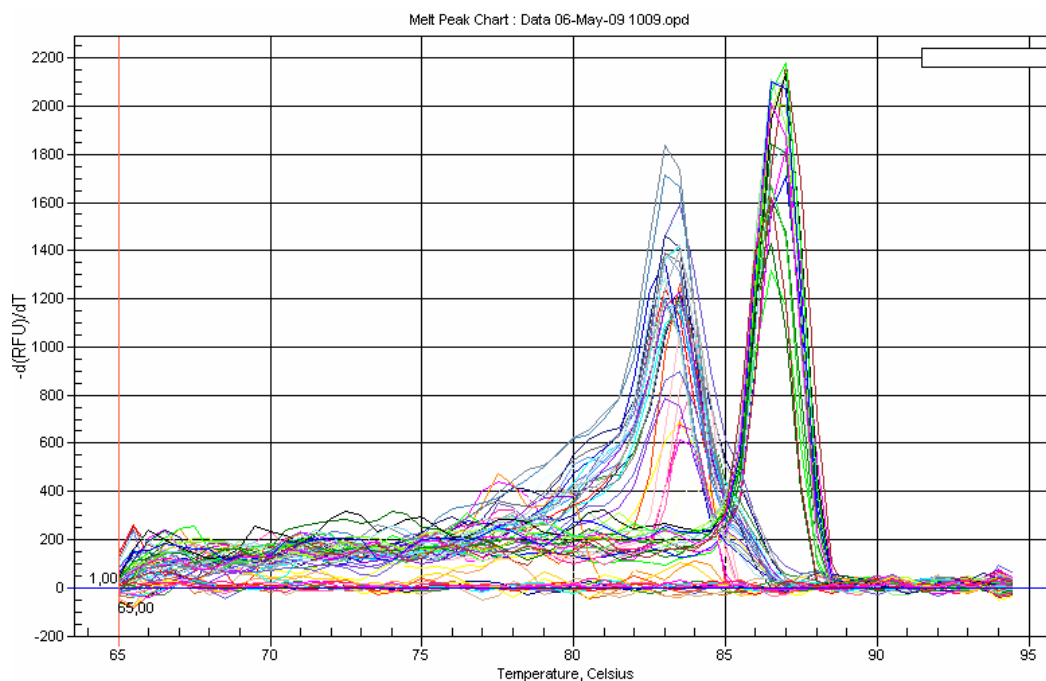
Technika PCR w czasie rzeczywistym umożliwia ilościowe oznaczanie produktu powstającego w reakcji PCR. Specyficzność reakcji real-time PCR zależy zarówno od chemicznej reakcji powielania, jak i od instrumentu stosowanego do monitorowania sygnału fluorescencyjnego. Badania ilości amplifikowanego fragmentu DNA techniką real-time PCR można podzielić na specyficzne i niespecyficzne. Specyficzne bazują na wykorzystaniu odpowiednich sond do badanego fragmentu DNA. W drugiej grupie technik wykorzystuje się fluorochromy emitujące światło o określonej długości po związaniu się z dwuniciowym DNA, takie jak bromek etydyny, jodek propidyny, czy SYBR Green I. Największą popularność uzyskała technika z użyciem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I z uwagi na stosunkowo niską toksyczność i znacznie wyższą czułość w porównaniu z bromkiem etydyny lub jodkiem propidyny. W roztworze w stanie wolnym barwnik SYBR Green I wykazuje stosunkowo niską fluorescencję. Związanie barwnika SYBR Green I z dwuniciowym DNA prowadzi do ponad 1000-krotnego wzrostu fluorescencji. Kompleks SYBR Green I – DNA absorbuje światło zewnętrzne o długości 497 nm, a emituje światło o długości do 250-560 nm. Intensywność sygnału fluorescencji zwiększa się wprost proporcjonalnie do wzrostu produktu PCR w kolejnych cyklach amplifikacji. Monitorowanie zmian w stężeniu produktu następuje poprzez pomiar fluorescencji proporcjonalnej do ilości produktu (kompleksu SYBR Green I – DNA) w mieszaninie. W porównaniu z innymi metodami ilościowego określania DNA w reakcji real-time PCR technika z wykorzystaniem barwnika SYBR Green I jest stosunkowo prosta i tania. Dużą zaletą tej metody jest możliwość jej zastosowania praktycznie w każdym przypadku ilościowego określania DNA amplifikowanego w reakcji PCR. Ograniczeniem tej metody jest to, iż SYBR Green I rozpoznaje sekwencje niespecyficzne wiążąc się do każdej dwuniciowej cząsteczki DNA, łącznie z niespecyficznymi produktami reakcji PCR i dimerami utworzonymi przez startery, gdy są one częściowo do siebie

komplementarne. W celu ograniczenia tego mankamentu, przeprowadza się analizę krzywej topnienia, która pozwala wyeliminować komponenty niespecyficzne. Analizę krzywej przeprowadza się podczas zmiany temperatury topnienia poprzez ciągły pomiar fluorescencji. Podnoszenie temperatury, a następnie schłodzenie, powoduje przyłączenie barwnika SYBR Green I do dwuniciowych fragmentów DNA. Wraz ze wzrostem temperatury DNA denaturuje, barwnik się odłącza, a tym samym fluorescencja spada. W momencie osiągnięcia temperatury topnienia produktu następuje bardzo gwałtowna denaturacja i ostry spadek fluorescencji. Na krzywej uwidacznia się jeden ostry pik w przypadku jednego specyficznego produktu PCR. W przypadku różnych produktów uzyskujemy więcej niż jeden pik. Określenie krzywej topnienia pozwala na wykrycie różnych produktów amplifikacji, różniących się długością i procentową zawartością par G + C (rycina 1).

Do reakcji real time PCR używano następujących ilości odczynników na 1 próbę: 2 ul cDNA (po odwrotnej transkrypcji), po 0,5 ul specyficznych starterów o końcowym stężeniu 500 nm, 12,5 ul IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 8,5 ul H<sub>2</sub>O. Sekwencje starterów stosowanych w reakcji real time PCR podano w tabeli 2. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej na 1 próbę wynosiła 25 ul. Warunki reakcji PCR: 5 minutowa wstępna denaturacja w 95<sup>0</sup>C, następnie 40 cykli z 20-sekundowym czasem denaturacji w 95<sup>0</sup>C i 1 minutowym czasem przyłączania i wydłużania starterów (anealing) w temperaturze 56<sup>0</sup>C. Po 40 cyklach analizowana jest krzywa topnienia produktów PCR. Badania ekspresji genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* wykonywano w trzech równoległych oznaczeniach dla każdej próby.

## Rycina 1

Wykres temperatury topnienia w reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktów amplifikacji genów *TERT* i *TERC* (pierwszy pik) oraz *ACTB* (drugi pik).



### ***Amplifikacja genów TERT i TERC***

Ocenę amplifikacji genu *TERT* i *TERC* przeprowadzono przy użyciu techniki FISH do jąder interfazalnych komórek białaczkowych ALL i ANLL oraz prawidłowych limfocytów krwi obwodowej. W badaniach zastosowano dostępne handlowo (QBiogene) znakowane fluorochromem sondy dla *TERT* i *TERC*. Przeprowadzono analizę amplifikacji *TERT* i *TERC* w 7 przypadkach ALL, 4 przypadkach ANLL i 3 zdrowych dawców. Każdorazowo oceniano od 50 do 100 jąder interfazalnych. Jako kontrole stosowano handlowo dostępne (QBiogene) sondy referencyjne dla chromosomu 3 (3 alpha satellite reference probe) i dla chromosomu 5q31 (sonda D5S89). Komórki jądrzaste wyizolowane z pełnej krwi obwodowej inkubowano w roztworze hipotonicznym (0,4% KCl) (Sigma) w temperaturze 37°C przez 20 minut, następnie poprzez

wirowanie przy 1500 rpm (10minut) materiał (jądra komórkowe) jest oddzielany od supernatantu, który zostaje usunięty. Do zawiesiny dodawany jest trzykrotnie zimny utrwalacz, tj. metanol i kwas octowy (PoCh, Gliwice) w proporcjach 3:1, przy czym po każdym dodaniu utrwalacza materiał jest inkubowany przez 20 minut w temperaturze 4°C. Po każdej inkubacji wirowanie przez 10 minut w temperaturze 4°C umożliwia oddzielenie osadu od utrwalacza. Utrwalony materiał rozkładany jest na odtłuszczone, zimne szkiełka podstawowe i suszony. Następnie przygotowane szkiełka z materiałem badawczym są denaturowane w mieszaninie 70% formamidu (Merck) z roztworem 2xSSC (Merck) w temperaturze 70°C przez 1 minutę i 45 sekund dla nowo wykonanych preparatów, do 2 minut dla starszych preparatów. Następnie preparaty są płukane w 2xSSC i 70% etanolu w celu usunięcia resztek formamidu i inkubowane w szeregu alkoholowym o składzie procentowym - 70-85-96% (PoCh, Gliwice) po 2 minuty w każdym alkoholu w celu odwodnienia. Tak utrwalone preparaty są suszone w temperaturze pokojowej. Sondy komercyjne wyznakowane fluorochromem denaturowane są zgodnie ze wskazówkami producenta, zwykle w temperaturze 72-75°C lub w 96°C. Potem sonda jest schłodzona w lodzie przez około 30 sekund i następnie nałożona na preparat mikroskopowy. Na pole naniesienia sondy nakładane jest szkiełko nakrywkowe, a jego brzegi są uszczelniane fixogumą (Marabuwerke GmbH & Co. KG przez Intimex), aby roztwór sondy nie wyparował w trakcie hybrydyzacji. Hybrydyzacja następuje w łaźni wodnej w 37°C przez całą noc. Po inkubacji usuwana jest fixoguma i szkiełko nakrywkowe, a szkiełko mikroskopowe z materiałem i związaną z nim sondą jest inkubowane w mieszaninie 2xSSC (Merck) i Tween 20 (Sigma) w 65°C przez 5 minut, a następnie inkubowane przez 5 minut w 2xSSC (inkubacje mają na celu usunięcie niezwiązanej sondy). Na koniec preparaty są przeciągnięte przez szereg alkoholowy o stężeniach: 70-85-96%, po 2 minuty w każdym. Kolejno na preparaty nakrapiana jest mieszanina barwiąca jądra komórkowe na niebiesko o składzie: DAPI (Sigma), glicerol (Merck) oraz DABCO (Merck).

Analiza cytogenetyczna odbywa się przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axiophot (Zeiss) i odpowiednich filtrów dla DAPI (358 nm - 463 nm), rodaminy (495 nm- 517 nm) i fluoresceiny (551 nm- 573 nm ).

### *Analiza statystyczna*

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu testu nieparametrycznego Manna-Whitney'a.

Całość badań doświadczalnych została przeprowadzona w Zakładzie Patologii Molekularnej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.

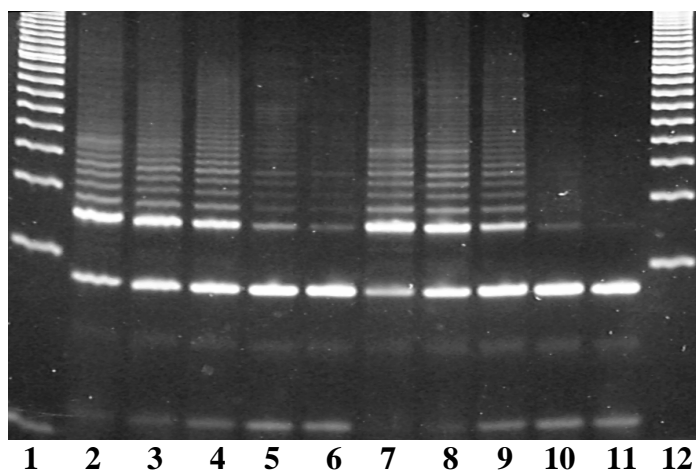
# Wyniki

## *Aktywność telomerazy*

W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę aktywności telomerazy przy pomocy zestawu TRAPeze (Intergen). Zgodnie z zaleceniami producenta aktywność telomerazy była oceniana w ekstraktach uzyskanych z 2 mln komórek. Ilość ekstraktu do badania testem TRAPeze odpowiadała 10 tysiącom komórek. W obrazie elektroforetycznym na żelu poliakrylamidowym uzyskiwano dodatnie wyniki dla komórek ALL i ANLL, jak również dla prawidłowych limfocytów krwi obwodowej (rycina 2). Sygnały uzyskiwane w przypadku ekstraktu z prawidłowych limfocytów były znacznie słabsze od sygnałów generowanych przez ekstrakty z komórek białaczkowych.

### Rycina 2

Aktywność telomerazy w komórkach białaczkowych i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej. 1,12- PCR low ladder, 20bp (Sigma); 2, 3, 4 – komórki ALL; 5, 6, 10 – PBL; 7, 8, 9 – komórki ANLL; 11-negatywna kontrola.



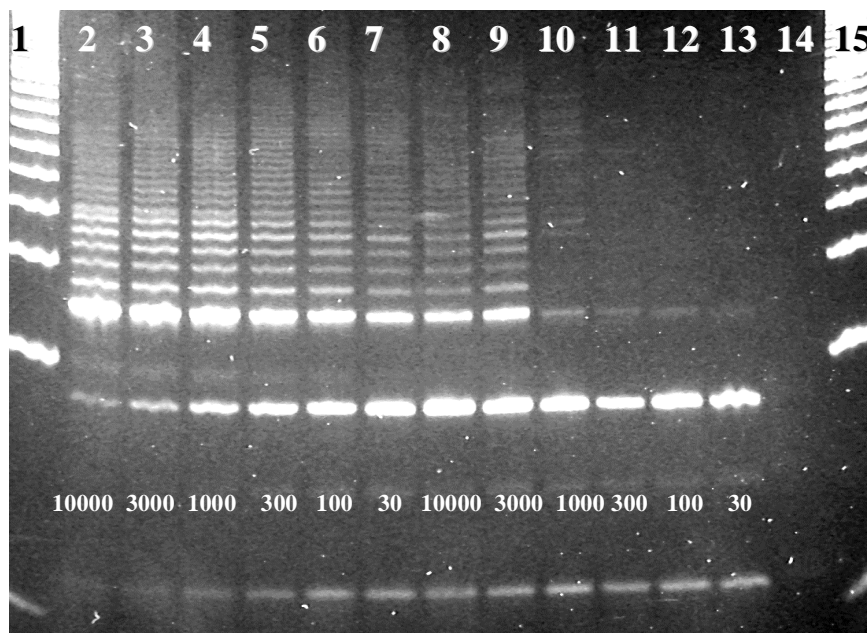
Do dalszych doświadczeń rozcieńczano uzyskiwane ekstrakty tak, żeby oceniane ilości odpowiadały malejącej ilości komórek: 3000, 1000, 300, 100, 30 i 10. Tak przygotowane ekstrakty oceniane testem TRAPeże dawały wyniki dodatnie dla ALL i ANLL do rozcieńczenia odpowiadającego 30 komórkom (rycina 3). Ekstrakty z prawidłowych limfocytów dawały wynik dodatni jeszcze w przypadku 1000 komórek (bardzo słabe sygnały produktów PCR na żelu poliakrylamidowym). Ekstrakty limfocytów w rozcieńczeniach odpowiadających 300 i mniej komórkom dawały zawsze wyniki negatywne. Reprezentatywny wynik z różnymi rozcieńczeniami ekstraktów prawidłowych limfocytów krwi obwodowej i komórek białaczkowych przedstawiono na rycinie 3.

### Rycina 3

Zależność aktywności telomerazy od liczby komórek.

1,15- PCR low ladder, 20bp (Sigma), 2 - 7 -ostrą białaczka limfoblastyczna,

8 - 13 -prawidłowe limfocyty krwi obwodowej, 14 –kontrola negatywna



Wyniki te uzasadniały przeprowadzenie doświadczeń przy pomocy półilościowego testu Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (ROCHE). Aktywność telomerazy oceniano testem Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (ROCHE) w ekstraktach komórek ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i ostrej białaczki nieлимfoblastycznej (ANLL) oraz prawidłowych limfocytów krwi obwodowej zgodnie z wskazówkami producenta szczegółowo opisanymi w rozdziale Metody. Wyniki badania względnej aktywności telomerazy (RTA – relative telomerase activity) u 38 chorych z ALL, 24 z ANLL i u 20 zdrowych dawców przedstawiono w tabeli 3.

Uzyskiwane wartości względnej aktywności telomerazy (RTA) były bardzo zróżnicowane zarówno w przypadku komórek ALL jak i ANLL. Względna aktywność telomerazy w komórkach ALL wahała się od 29,4 do 376,3, a w komórkach ANLL od 42,3 do 426,7. W prawidłowych limfocytach krwi obwodowej w wielu przypadkach względna aktywność telomerazy posiadała wartości ujemne, a rozrzut wyników wahał się od -4,6 do 9,3.



Tabela 3

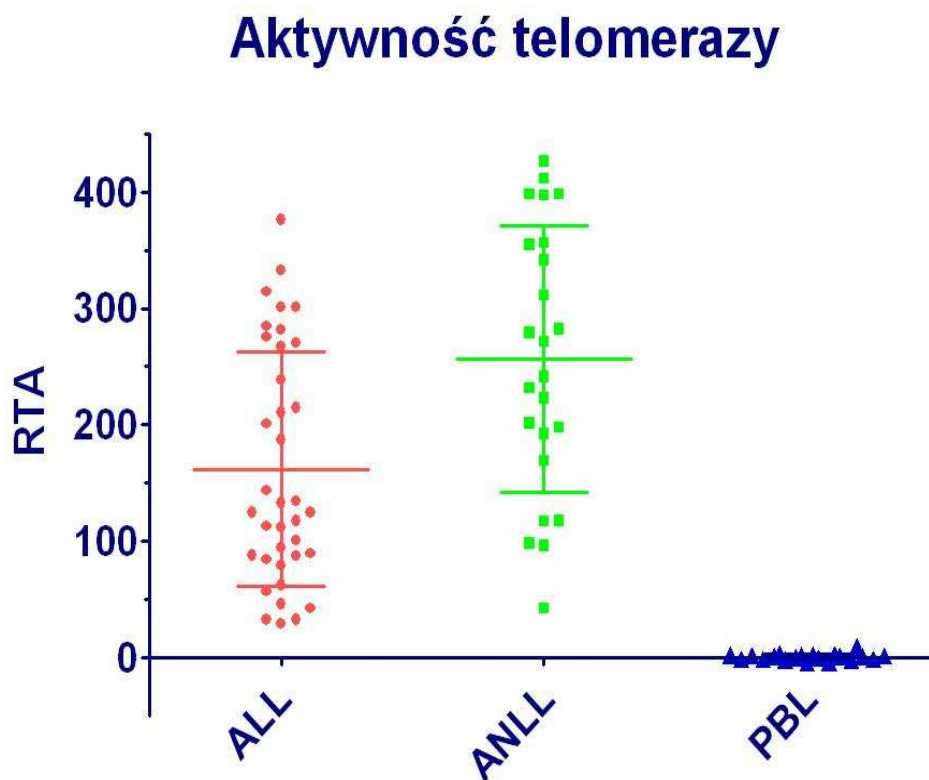
Względna aktywność telomerazy w komórkach ALL, ANLL i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (PBL). Wartości przedstawione jako względna aktywność telomerazy - RTA (Relative telomerase activity).

Lp	ALL	ANLL	PBL
1	124.6	354.8	1.2
2	132.8	282.2	-0.4
3	87.9	411.5	-2.5
4	267.3	117.8	1.7
5	100.9	42.3	0.8
6	42.2	95.9	-4.1
7	376.3	426.7	0.7
8	210.5	98.2	1.2
9	284.9	117.1	2.4
10	214.6	192.3	-2.5
11	32.7	241.2	1.9
12	187.4	222.8	-0.6
13	143.6	279.1	-1.7
14	89.5	398.6	9.3
15	94.7	201.6	-4.6
16	238.4	231.6	-1.6
17	56.4	197.5	2.9
18	111.6	397.1	0.4
19	301.2	356.4	-1.6
20	45.6	271.4	1.9
21	62.3	169.3	
22	124.8	398.3	
23	281.7	311.6	
24	314.5	341.5	
25	275.4		
26	84.5		
27	32.7		
28	78.9		
29	112.8		
30	201.3		
31	29.4		
32	134.2		
33	117.7		
34	87.5		
35	270.1		
37	301.3		
38	332.9		

Szczegółowe wyniki względnej aktywności telomerazy w badanych grupach w formie graficznej przedstawiono na rycinie 4. Najwyższe wartości średniej RTA stwierdzono w komórkach ANLL, niższe w komórkach ALL a najniższe w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej.

Rycina 4

Wyniki względnej aktywności telomerazy (RTA) w poszczególnych przypadkach z uwzględnieniem średniej i odchylenia standardowego.



W tabeli 4 przedstawiono dane oznaczeń RTA opracowane w postaci mediany, średniej i odchylenia standardowego oraz wartości minimalnych i maksymalnych w poszczególnych grupach.

Tabela 4

Wyniki względnej aktywności telomerazy w komórkach ALL, ANLL i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (PBL) przedstawione w postaci mediany, średniej i odchylenia standardowego oraz wartości minimalnych i maksymalnych.

	Mediana	średnia i odchylenie standardowe	wartość minimalna	wartości maksymalna
ALL	124.8	161.76±100.63	29.4	376.3
ANLL	256.3	256.53±114.2	42.3	426.7
PBL	0.55	0.24±3.02	-4.6	9.3

Przeprowadzona analiza wyników RTA testem nieparametrycznym Manna-Whitney'a wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy komórkami białaczkowymi ALL i ANLL a limfocytami krwi obwodowej zdrowych dawców (  $p < 0.0001$ , wartość testu  $U=0.1$ ; zarówno dla ALL i ANLL). Stwierdzono również istotną statystycznie różnicę pomiędzy RTA komórek ALL i ANLL ( $p=0.0023$ ; wartość testu  $U=4.0$ ).

### ***Ekspresja telomerazy***

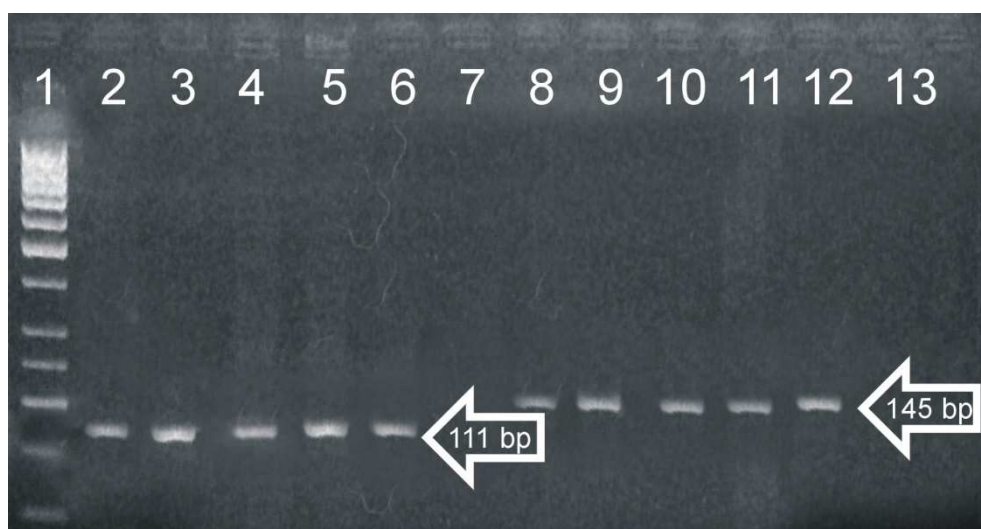
Ekspresja trzech podjednostek telomerazy odwrotnej transkryptazy telomerazy (*TERT*), matrycowego RNA do syntezy powtórzeń telomerowych (*TERC*) i białka stowarzyszonego z telomerazą *TPI* oceniano techniką PCR przy użyciu starterów oligonukleotydowych specyficznych dla sekwencji genów kodujących trzy podjednostki telomerazy. Wielkość produktów PCR w rozdziale elektroforetycznym na żelu agarozowym wynosiła dla *TERT* 95pz,

*TERC* 111pz, dla *TPI* 263pz (ryciny 5-6). Ekspresję *TERT* stwierdzono we wszystkich przypadkach ALL i ANLL wobec jej braku w większości przypadków PBL (rycina 6). Ekspresję *TPI* i *TERC* wykazano zarówno w komórkach białaczkowych jak i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (ryciny 5-6).

Analogicznie do badań aktywności telomerazy wykonano doświadczenia stosując rozcieńczenia cDNA używanego do reakcji PCR. Dodatkowo wyniki reakcji PCR w komórkach białaczkowych, wskazujące na ekspresję *TERT*, wykazano rozcieńczając DNA od 1:125 do 1:625. Powyższe wyniki uzasadniały przeprowadzenie dalszych doświadczeń mających na celu bardziej precyzyjną ilościową ocenę ekspresji podjednostek *TERT* i *TERC* telomerazy w komórkach prawidłowych i białaczkowych przy użyciu reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR).

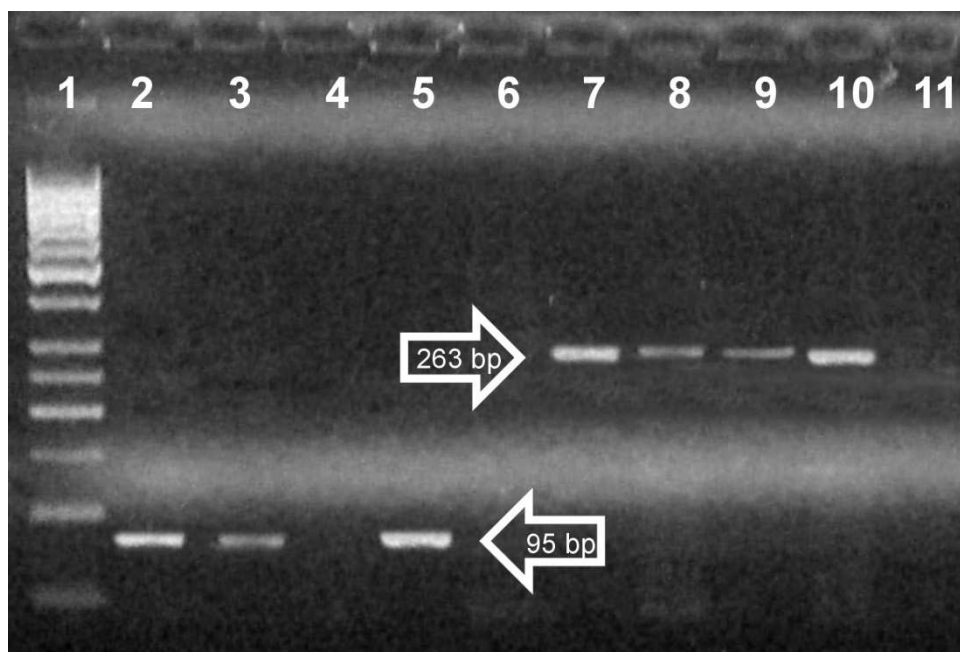
#### Rycina 5

Ekspresja *TERC* i *GAPDH* w komórkach białaczkowych i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (PBL). 1-100 bp DNA ladder (Rapidozym), 2-7 startery dla *TERC* (wielkość produktu 111bp), 8-13 startery dla *GAPDH* (wielkość produktu 145bp); 2, 3, 8, 9- ALL; 4, 5, 10, 11- ANLL; 6,12- PBL; 7,13-ujemna kontrola



## Rycina 6

Ekspresja *TERT* i *TPI* w komórkach białaczkowych i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (PBL). 1-100 bp DNA ladder (Rapidozym), 2-6 startery dla *TERT* (wielkość produktu 95bp), 7-11 startery dla *TPI* (wielkość produktu 263bp); 2, 7 - ALL; 3, 8- ANLL; 4, 9- PBL; 5, 10- komórki linii ostrej białaczki mieloidalnej K562; 6,11 - ujemna kontrola



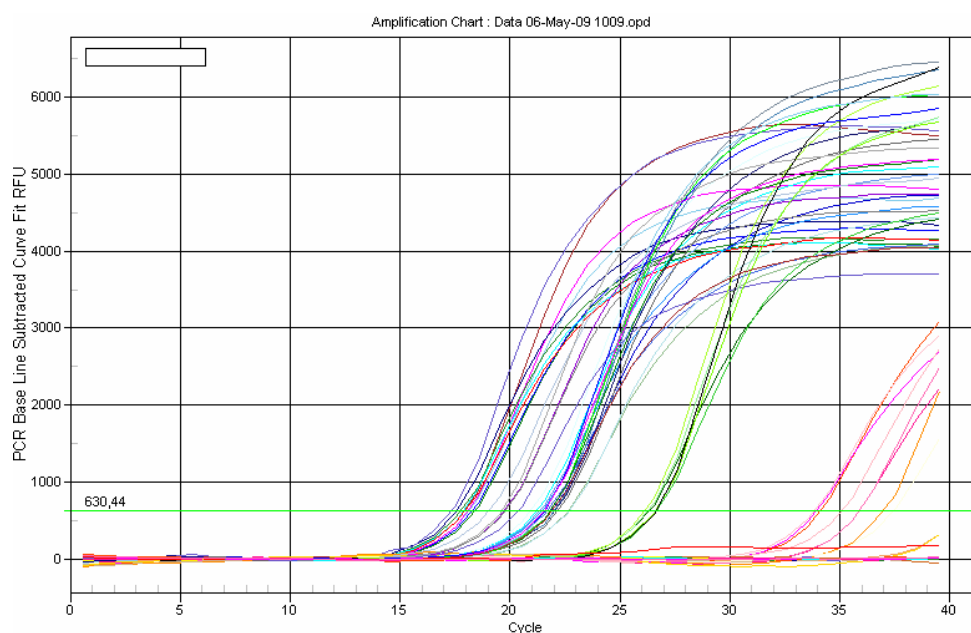
### ***Ilościowa ocena ekspresji telomerazy techniką real time PCR***

Dla oceny ilościowej ekspresji *TERC* i *TERT* posłużono się techniką PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR) z wykorzystaniem barwnika SYBR Green I. Do pomiaru ilości powstającego produktu PCR przyjęto wartość progową  $C_t$  (threshold count). W reakcji PCR w czasie rzeczywistym wartości progowe  $C_t$  były obliczane dla *TERT*, *TERC* i genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny (*ACTB*) jako średnie z trzech oznaczeń  $C_t$ . Przykładowe wyniki obrazujące amplifikację sekwencji badanych genów techniką PCR w czasie rzeczywistym w komórkach białaczkowych i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej przedstawiono na rycinie 7. Miarą amplifikacji są

krzywe przedstawiające intensywność sygnału fluorescencji zwiększającego się wprost proporcjonalnie do ilości produktu PCR w kolejnych cyklach.

### Rycina 7

Krzywe amplifikacji sekwencji genów *TERT* i *TERC* w komórkach białaczkowych (pierwsza grupa krzywych od lewej), genu *ACTB* (środkowa grupa krzywych) oraz genów *TERT* i *TERC* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (ostatnia grupa krzywych).



Wartości  $C_t$  *TERT* dla komórek ALL wahały się od 17,07 do 31,79, co wskazuje na duże zróżnicowanie ekspresji genu *TERT*. Nieco mniejszy zakres wartości  $C_t$  obserwowano w przypadku *TERC* u 38 chorych z ALL. Wartość  $C_t$  minimalna wyniosła 17,24, maksymalna 27,21. Wartości  $C_t$  dla *ACTB* w komórkach ALL mieściły się w przedziale od 19,05 do 32,76 (tabela 5).

Tabela 5

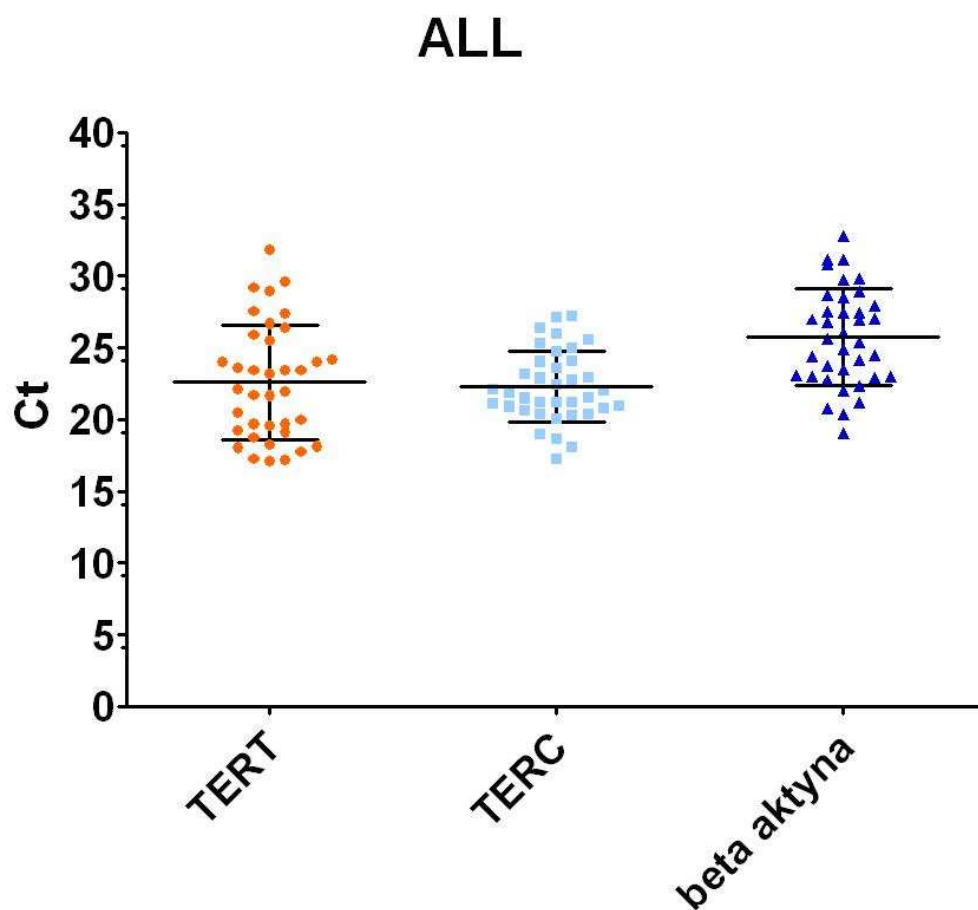
Wyniki ekspresji genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* u poszczególnych pacjentów z ALL przedstawione jako średnie wartości  $C_t$  z 3 powtórzeń dla badanych genów i *ACTB*.

Lp	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>ACTB</i>
1	22,08	19,01	23,09
2	23,21	22,92	25,67
3	26,67	21,20	22,38
4	19,68	20,61	22,94
5	23,42	21,25	24,17
6	29,18	23,59	26,93
7	17,23	18,08	20,40
8	25,87	26,39	27,94
9	17,07	22,05	27,51
10	19,69	20,94	28,90
11	24,19	25,33	26,08
12	19,11	20,81	25,37
13	24,01	25,02	28,55
14	23,45	24,08	31,17
15	26,39	25,99	27,43
16	18,03	20,27	27,04
17	29,62	27,14	30,80
18	28,93	21,51	32,76
19	18,72	21,22	29,87
20	24,01	20,34	27,00
21	25,50	24,72	27,45
22	21,72	23,15	26,83
23	19,21	21,88	23,54
24	17,19	20,36	21,19
25	19,56	18,64	20,81
26	27,58	25,59	22,06
27	21,66	20,92	31,13
28	23,43	20,05	23,79
29	23,61	22,42	24,54
30	18,23	21,12	28,67
31	31,79	27,21	29,71
32	20,49	22,78	23,02
33	21,94	24,05	24,87
34	27,40	22,11	23,03
35	18,11	21,49	24,43
37	28,10	20,90	31,20
38	17,73	17,24	19,05
	19,95	22,90	22,80

Ekspresję *TERT*, *TERC* i *ACTB* w komórkach ALL jako wartości średnie  $C_t$  i odchylenia standardowe zobrazowano na rycinie 8.

Rycina 8

Ekspresja genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w komórkach pacjentów z ALL. Wartości  $C_t$  przedstawione jako średnie z 3 powtórzeń dla badanych genów.





Wyniki ekspresji *TERT*, *TERC* i *ACTB* u badanych chorych z ANLL przedstawiono w tabeli 6. Podobnie jak w ALL również w ANLL wartości  $C_t$  dla *TERT* wahały się w szerokim zakresie od 16,53 do 34, natomiast  $C_t$  dla *TERC* od 16,26 do 24,29. Wyniki  $C_t$  dla *ACTB* mieściły się w granicach od 18,4 do 28,12.

Tabela 6

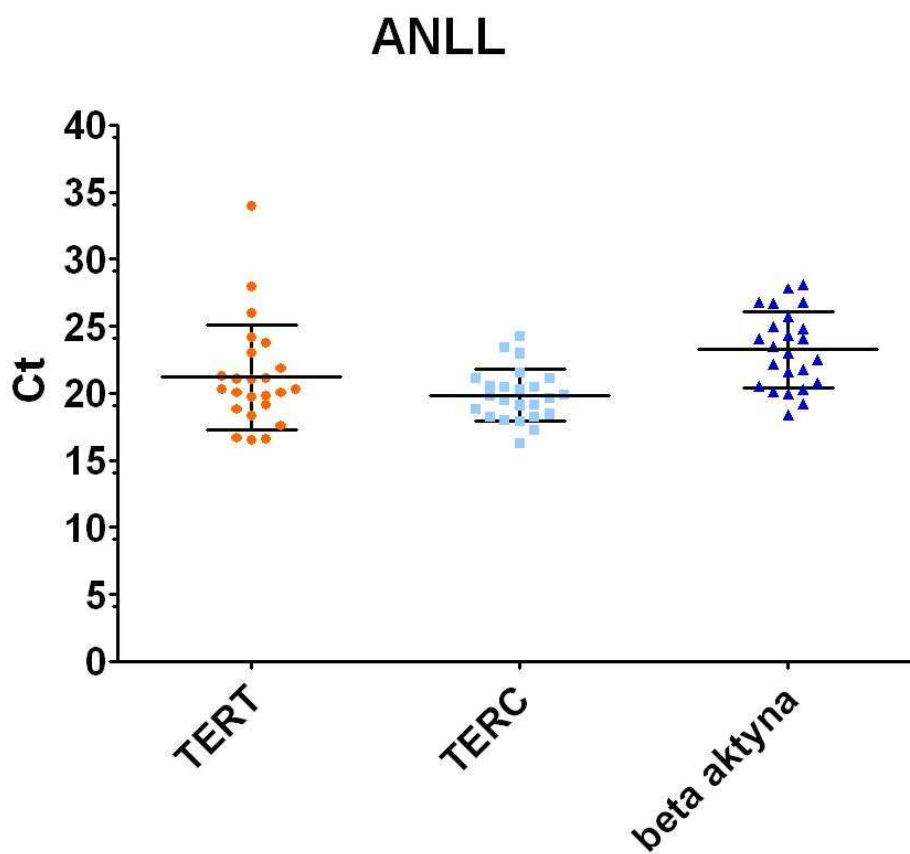
Wyniki ekspresji genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* u poszczególnych pacjentów z ANLL przedstawione jako średnie wartości  $C_t$  z 3 powtórzeń dla badanych genów i *ACTB*.

Lp	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>ACTB</i>
1	19,72	19,13	21,61
2	20,27	20,32	24,04
3	16,53	18,45	20,31
4	26,00	19,67	24,09
5	34,00	21,13	25,76
6	27,94	20,56	27,82
7	16,58	23,41	20,00
8	21,04	17,90	26,71
9	23,00	18,23	22,17
10	23,77	18,02	24,80
11	20,04	21,09	26,75
12	21,09	19,79	23,01
13	21,08	20,45	28,12
14	17,56	18,83	18,40
15	21,27	22,97	26,78
16	24,17	16,26	20,56
17	20,27	19,10	22,53
18	16,68	19,87	24,34
19	18,29	18,27	23,51
20	21,90	20,50	21,77
21	20,09	17,22	25,02
22	18,83	19,47	20,80
23	19,12	24,29	20,11
24	19,82	21,52	19,26

Graficzne przedstawienie ekspresji trzech badanych genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w ANLL obrazuje rycina 9.

Rycina 9

Ekspresja genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w komórkach pacjentów z ANLL. Wartości  $C_t$  przedstawione jako średnie z 3 powtórzeń dla badanych genów i *ACTB*.



Wyniki ekspresji *TERT*, *TERC* i *ACTB* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej u 20 badanych osób przedstawiono w tabeli 7. Wartości  $C_t$  dla *TERT* wahały się w zakresie od 30,06 do 36,97, natomiast  $C_t$  dla *TERC* od 24,5 do 36,17. Wyniki  $C_t$  dla *ACTB* mieściły się w granicach od 24,37 do 30,9.

Tabela 7

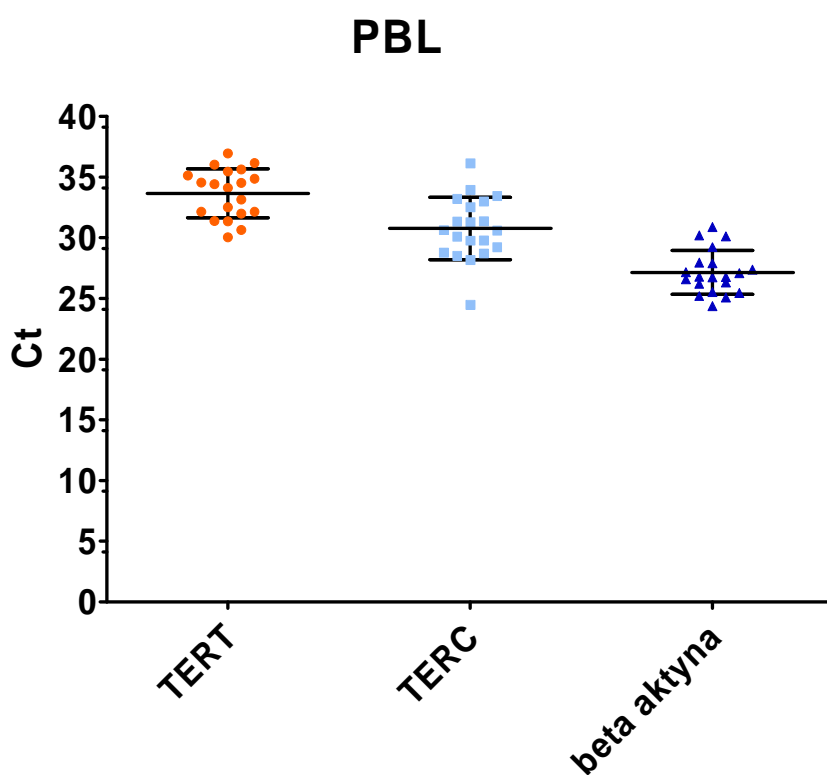
Ekspresja genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej. Wartości  $C_T$  przedstawione jako średnie z 3 powtórzeń dla badanych genów i *ACTB*.

Lp	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>ACTB</i>
1	34.56	33.03	27.18
2	36.17	28.19	25.09
3	35.63	32.56	26.76
4	30.06	36.17	30.13
5	33.16	28.54	27.11
6	34.54	30.12	30.9
7	32.51	33.48	26.58
8	31.37	30.67	27.89
9	32.15	29.25	25.21
10	36.97	31.3	26.34
11	32.15	28.82	27.38
12	35.47	28.74	26.21
13	36.03	33.23	30.21
14	30.65	29.81	25.54
15	35.14	33.98	26.79
16	34.42	31.37	27.96
17	31.38	30.64	24.37
18	34.87	29.79	29.24
19	34.12	31.4	26.75
20	31.99	24.5	25.46

Graficzne przedstawienie ekspresji trzech badanych genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej obrazuje rycina 10.

Rycina 10

Ekspresja *TERT*, *TERC* i *ACTB* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (PBL). Wartości  $C_t$  przedstawione jako średnie z 3 powtórzeń dla badanych genów i *ACTB*.



Wyniki ekspresji *TERT*, *TERC* i *ACTB* w grupie 38 pacjentów z ALL, 24 chorych z ANLL oraz 20 zdrowych dawców przedstawione jako mediany, średnie, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne oznaczeń  $C_t$  obrazują odpowiednio tabele 8, 9 i 10.

Tabela 8

Wyniki ekspresji genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w grupie 38 pacjentów z ALL przedstawione jako mediany, średnie, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne oznaczeń  $C_t$ .

	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>ACTB</i>
Mediana	22,64	21,30	25,88
średnia i odchylenie standardowe	22,73±4,05	22,24±2,45	25,90±3,44
wartość minimalna	17,07	17,24	19,05
wartość maksymalna	31,79	27,21	32,76

Tabela 9

Wyniki ekspresji genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w grupie 24 pacjentów z ANLL przedstawione jako mediany, średnie, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne oznaczeń  $C_t$ .

	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>ACTB</i>
Mediana	20,27	19,73	23,26
średnia i odchylenie standardowe	21,21±3,93	19,85±1,93	23,26±2,83
wartość minimalna	16,53	16,26	18,40
wartość maksymalna	34,00	24,29	28,12

Tabela 10

Wyniki ekspresji genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej 20 zdrowych osób przedstawione jako mediany, średnie, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne oznaczeń  $C_t$ .

	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>ACTB</i>
Mediana	34.37	30.66	26.78
średnia i odchylenie standardowe	33.67±2.02	30.78±2.57	27.16±1.80
wartość minimalna	30.06	24.5	24.37
wartość maksymalna	36.97	24.37	30.9

Przeprowadzona analiza statystyczna testem Manna-Whitney'a wartości  $C_t$  ekspresji bezwzględnej genów *TERT*, *TERC* wykazała istotne różnice pomiędzy komórkami białaczkowymi (ALL i ANLL) a prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej. Ponadto wykazano istotną różnicę ekspresji bezwzględnej *TERC* pomiędzy komórkami ALL a ANLL (tabela 11). Bezwzględna ekspresja *ACTB* różniła się pomiędzy komórkami ANLL a ALL oraz prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej.

Tabela 11

Analiza statystyczna testem Manna-Whitney'a wartości  $C_t$  ekspresji bezwzględnej genów *TERT*, *TERC* i *ACTB* w komórkach białaczkowych i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (dane przedstawione jako wartości p – poziomu istotności i U- wartości testu).

Porównywane grupy	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>ACTB</i>
ALL/PBL	p<0,0001* U=4,0	p<0,0001* U=8,0	p=0,18 U=298,0
ANLL/PBL	p<0,0001* U=9,0	p<0,0001* U=8,0	p<0,0001* U=8,0
ALL/ANLL	p=0,15 U=355,0	p=0,0002* U=194,0	p=0,0034* U=253,0

\*różnice istotne statystycznie

### ***Badanie względnej ekspresji TERT i TERC***

Oprócz oceny bezwzględnej ekspresji badanych genów dokonano analizy względnej ekspresji *TERT* i *TERC* poprzez odniesienie do ekspresji genu referencyjnego – *ACTB*. Obliczano względną ekspresję genów *TERT* i *TERC* metodą  $\Delta C_T$ . W celu obliczenia różnicy  $\Delta C_t$  odejmowano wartość  $C_T$  *ACTB* od wartości  $C_T$  genów *TERT* lub *TERC*.  $\Delta C_t = C_t (ACTB) - C_t (TERT)$  lub  $\Delta C_t = C_t (ACTB) - C_t (TERC)$ . Przyjmując, że w fazie eksponentyjnej amplifikacji ilość produktu PCR podwaja się w każdym cyklu, wielkość ekspresji genu badanego (*TERT* lub *TERC*) w odniesieniu do genu referencyjnego (*ACTB*) oblicza się według wzoru:

$2^{-\Delta C_t}$  tzn.  $2^{[C_t (ACTB) - C_t (TERT \text{ lub } TERC)]}$ . Tak obliczona względna ekspresja badanych genów oznacza ile razy ekspresja genu *TERT* lub *TERC* jest wyższa lub niższa od ekspresji *ACTB*. Wyniki względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* w komórkach ALL, ANLL oraz w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej przedstawiono w tabelach 12 – 14.

Tabela 12

Wyniki względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* w komórkach ALL normalizowane względem genu referencyjnego - *ACTB*.

LP	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
1	2,01	16,91
2	5,50	6,73
3	0,05	2,27
4	9,58	5,03
5	1,68	7,57
6	0,21	10,13
7	9,00	4,99
8	4,20	2,93
9	1389,16	44,02
10	592,22	249,00
11	3,71	1,68
12	76,64	23,59
13	23,26	11,55
14	210,84	136,24
15	2,06	2,71
16	515,56	109,14
17	2,27	12,64
18	14,22	2435,50
19	2272,40	401,71
20	7,94	101,13
21	3,86	6,63
22	34,54	12,82
23	20,11	3,16
24	16,00	1,78
25	2,38	4,50
26	0,02	0,09
27	709,18	1184,45
28	1,28	13,36
29	1,91	4,35
30	1389,16	187,40
31	0,24	5,66
32	5,78	1,18
33	7,62	1,77
34	0,05	1,89
35	79,89	7,67
36	8,57	1260,69
37	2,50	3,51
38	7,21	0,93



Tabela 13

Wyniki względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* normalizowane względem genu referencyjnego - *ACTB* w komórkach ANLL.

LP	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
1	3,71	5,58
2	13,64	13,18
3	13,74	3,63
4	0,27	21,41
5	0,00	24,76
6	0,92	153,28
7	10,70	0,09
8	50,91	448,82
9	0,56	15,35
10	2,04	109,90
11	104,69	50,56
12	3,78	9,32
13	131,60	203,66
14	1,79	0,74
15	45,57	14,03
16	0,08	19,70
17	4,79	10,78
18	202,25	22,16
19	37,27	37,79
20	0,91	2,41
21	30,48	222,86
22	3,92	2,51
23	1,99	0,06
24	0,68	0,21

Tabela 14

Wyniki względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* normalizowane względem genu referencyjnego - *ACTB* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej.

LP	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
1	-7,38	-5,85
2	-11,08	-3,1
3	-8,87	-5,8
4	0,07	-6,04
5	-6,05	-1,43
6	-3,64	0,78
7	-5,93	-6,9
8	-3,48	-2,78
9	-6,94	-4,04
10	-10,63	-4,96
11	-4,77	-1,44
12	-9,26	-2,53
13	-5,82	-3,02
14	-5,11	-4,27
15	-8,35	-7,19
16	-6,46	-3,41
17	-7,01	-6,27
18	-5,63	-0,55
19	-7,37	-4,65
20	-6,53	0,96

W tabeli 15 zestawiono w poszczególnych grupach wyniki względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* normalizowanej wobec ekspresji genu referencyjnego *ACTB* w postaci średniej, odchylenia standardowego, wartości minimalnych i maksymalnych oraz mediany.

Tabela 15

Wyniki względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* normalizowanej wobec ekspresji genu referencyjnego *ACTB* w postaci średniej, odchylenia standardowego, wartości minimalnych i maksymalnych oraz mediany.

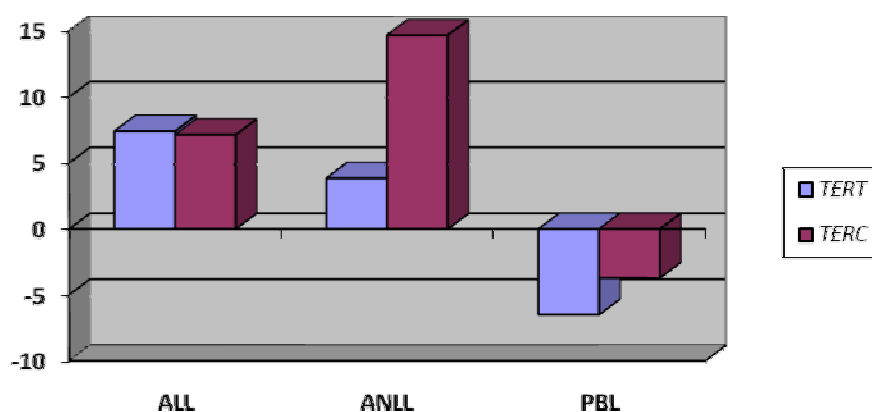
	ALL		ANLL		PBL	
	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
średnia	195,6	165,46	27,76	58,03	-6,51	-3,62
odchylenie standardowe	486,27	470,39	50,32	105,11	2,55	2,42
wartość minimalna	0,02	0,09	0,0	0,06	-11,08	-7,19
wartość maksymalna	2272,4	2435,5	202,25	448,82	0,07	0,96
mediana	7,42	7,15	3,85	14,69	-6,5	-3,72

Stwierdzono bardzo duży zakres uzyskanych wyników względnej ekspresji *TERT* i *TERC* w komórkach zarówno ALL jak i ANLL. Minimalna wartość względnej ekspresji *TERT* w komórkach ALL wynosiła 0,02, w ANLL 0,00 wobec wartości maksymalnych wynoszących odpowiednio 2272,4 i 202,25. Natomiast minimalna wartość względnej ekspresji *TERC* w komórkach ALL wynosiła 0,09, w ANLL 0,06 wobec wartości maksymalnych wynoszących odpowiednio 2435,5 i 448,82. W przypadku prawidłowych limfocytów krwi obwodowej zakres uzyskanych wyników względnej ekspresji *TERT* i *TERC* w porównaniu do komórek białaczkowych był zdecydowanie niższy. Ujemne wartości względnej ekspresji *TERT* i *TERC* w

PBL świadczą o bardzo niskiej ekspresji tych genów. Graficzne zobrazowanie względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* normalizowanej wobec ekspresji genu referencyjnego *ACTB* w badanych grupach przedstawia rycina 11.

Rycina 11

Względna ekspresja genów *TERT* i *TERC* normalizowana wobec ekspresji genu referencyjnego *ACTB* przedstawiona jako mediana w komórkach ALL, ANLL i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej.



Analiza statystyczna względnej ekspresji *TERT* i *TERC* wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy komórkami białaczkowymi ALL i ANLL a prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych różnic względnej ekspresji *TERT* i *TERC* pomiędzy komórkami ostrej białaczki limfoblastycznej a nieлимfoblastycznej. Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16

Analiza statystyczna względnej ekspresji *TERT* i *TERC* w komórkach ALL, ANLL i w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (PBL) (dane przedstawione jako wartości p – poziomu istotności i U- wartości testu).

	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
All/PBL	p<0,0001* U=3,0	p<0,0001* U=3,0
ANLL/PBL	p<0,0001* U=1,0	p<0,0001* U=8,0
ALL/ANLL	p=0,35 U=390,5	p=0,56 U=415,5

\*różnice istotne statystycznie

Dodatkowo ekspresję genów *TERT* i *TERC* normalizowano także w stosunku do ekspresji badanych genów w tkance referencyjnej, którą stanowiły prawidłowe limfocyty krwi obwodowej (tabele 17-18). Tak normalizowaną względną ekspresję ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) genów *TERT* i *TERC* obliczano metodą Pfaffl'a według wzoru przedstawionego poniżej:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{2^{\Delta Ct} \text{ komórki białaczkowe}}{2^{\Delta Ct} \text{ PBL}}$$

Dla komórek białaczkowych lub prawidłowych limfocytów krwi obwodowej (PBL):

$$2^{\Delta Ct} = 2^{[Ct(CTB) - Ct(TERT \text{ lub } TERC)]}$$

Wyniki tak normalizowanej względnej ekspresji *TERT* i *TERC* w komórkach ALL i ANLL przedstawiono odpowiednio w tabelach 17 i 18. Kolejne tabele 19 i 20 obrazują uzyskane wyniki w postaci mediany, średniej, odchylenia standardowego, wartości minimalnej oraz maksymalnej.

Tabela 17

Wyniki względnej ekspresji ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) *TERT* i *TERC* w komórkach ALL normalizowane względem genu referencyjnego - *ACTB* oraz komórek referencyjnych (PBL).

LP	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
1	362,04	249,00
2	989,12	99,04
3	9,19	33,36
4	1722,16	74,03
5	302,33	111,43
6	37,79	149,09
7	1618,00	73,52
8	754,83	43,11
9	249728,34	648,07
10	106463,55	3666,02
11	666,29	24,76
12	13777,25	347,29
13	4182,07	170,07
14	37902,36	2005,85
15	369,65	39,95
16	92681,90	1606,83
17	407,31	186,11
18	2556,58	35857,82
19	408506,64	5914,33
20	1428,22	1488,87
21	694,58	97,68
22	6208,38	188,71
23	3615,55	46,53
24	2876,30	26,17
25	427,57	66,26
26	3,92	1,27
27	127487,83	17438,64
28	230,72	196,72
29	342,51	64,00
30	249728,34	2759,13
31	42,52	83,29
32	1038,29	17,39
33	1370,04	25,99
34	8,69	27,86
35	14362,31	112,99
36	1541,37	18561,17
37	448,82	51,63
38	1296,13	13,74

Tabela 18

Wyniki względnej ekspresji ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) *TERT* i *TERC* normalizowane względem genu

referencyjnego-*ACTB* oraz względem komórek referencyjnych (PBL) w komórkach ANLL.

LP	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
1	666,29	82,14
2	2452,44	194,01
3	2469,49	53,45
4	47,84	315,17
5	0,59	364,56
6	165,42	2256,70
7	1924,14	1,39
8	9152,82	6608,01
9	101,13	225,97
10	367,09	1618,00
11	18820,27	744,43
12	680,29	137,19
13	23657,34	2998,45
14	321,80	10,93
15	8192,00	206,50
16	14,72	290,02
17	861,08	158,68
18	36358,37	326,29
19	6700,25	556,41
20	164,28	35,51
21	5480,15	3281,18
22	704,28	37,01
23	357,05	0,81
24	121,94	3,07

Tabela 19

Wyniki względnej ekspresji ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) *TERT* i *TERC* normalizowane względem genu i komórek referencyjnych (PBL) w komórkach ALL przedstawione jako mediany, średnie, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne.

	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
mediana	1333,1	105,24
średnia odchylenie standardowe	35162,88 ±87415,0	2436,0 ±6925,50
wartość minimalna	3,92	1,27
wartość maksymalna	408507,0	35858,0

Tabela 20

Wyniki względnej ekspresji ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) *TERT* i *TERC* normalizowane względem genu i komórek referencyjnych (PBL) w komórkach ANLL przedstawione jako mediany, średnie, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne.

	<i>TERT</i>	<i>TERC</i>
mediana	692,29	216,24
średnia odchylenie standardowe	4990,88 ±9046,3	854,41 ±1547,6
wartość minimalna	0,59	0,81
wartość maksymalna	36358,0	6608,0



Analiza statystyczna uzyskanych wartości względnej ekspresji ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) genów *TERT* i *TERC* normalizowanej względem genu referencyjnego *ACTB* i komórek referencyjnych (PBL) nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy komórkami ostrej białaczki limfoblastycznej a ostrej białaczki nieлимfoblastycznej.

### ***Amplifikacja genów TERT i TERC***

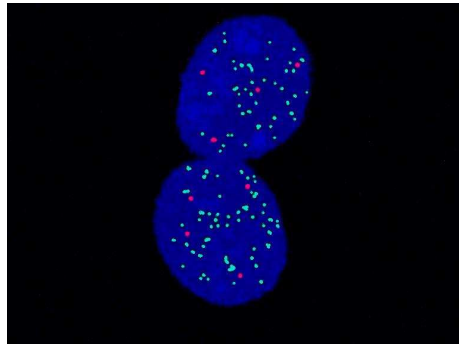
Istotne różnice w aktywności telomerazy i ekspresji *TERT* i *TERC* pomiędzy prawidłowym limfocytami krwi obwodowej a komórkami białaczkowymi ALL i ANLL skłoniły do doświadczeń mających na celu wykazanie możliwej amplifikacji genów dla *TERT* i *TERC*. Przykładowe wyniki FISH w obrazie mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiono na rycinie 12A dla *TERT* i rycinie 12B dla *TERC*.

Analiza FISH wykazała amplifikację genów *TERT* i *TERC* w komórkach białaczkowych. W ocenie ilościowej obserwowano bardzo zróżnicowaną liczbę kopii *TERT* i *TERC* w komórkach białaczkowych. W komórkach (jądrach) białaczkowych ALL liczba sygnałów sondy dla *TERT* wahała się od 2 do 17, w komórkach ANLL od 2 do 60, sygnały od kontrolnej sondy dla chromosomu 5q31 (sonda D5S89) wahały się od 2 do 5. W przypadku zastosowania sondy *TERC* liczba sygnałów w komórkach ALL wahała się od 2 do 12, a w komórkach ANLL od 2 do 28, a dla sondy referencyjnej dla chromosomu 3 (3 alpha satellite reference probe) wahały się od 2 do 3 (ryciny 13 i 14 odpowiednio z użyciem sond *TERT* i *TERC*).

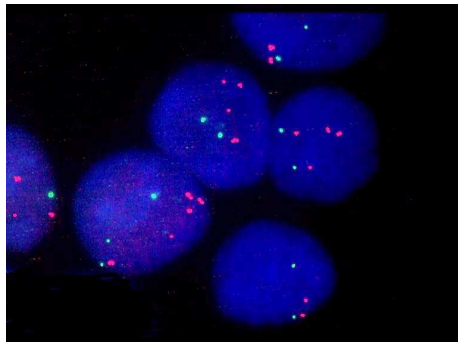
Rycina 12

Wynik badania FISH z zastosowaniem sondy dla (A) genu *TERT* (kolor zielony) i genu referencyjnego (kolor czerwony) oraz dla (B) genu *TERC* (kolor czerwony) i genu referencyjnego (kolor zielony) w komórkach ANLL.

A

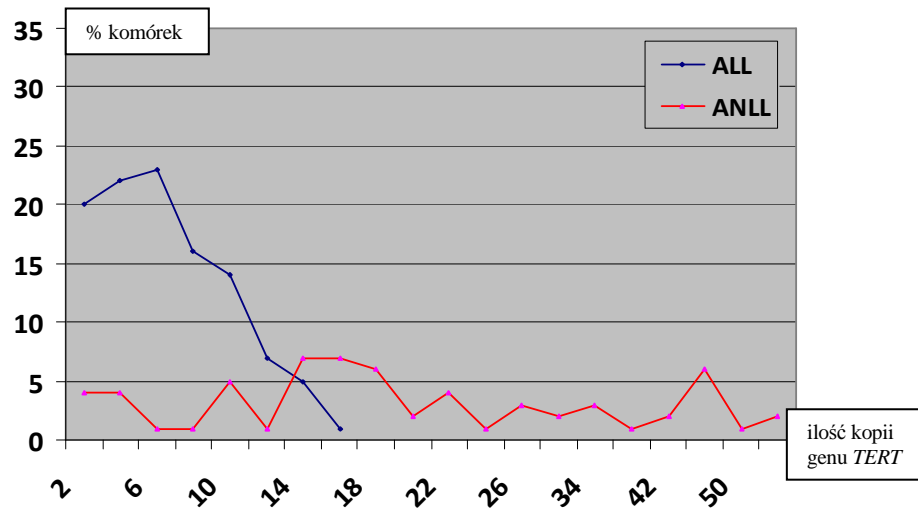


B



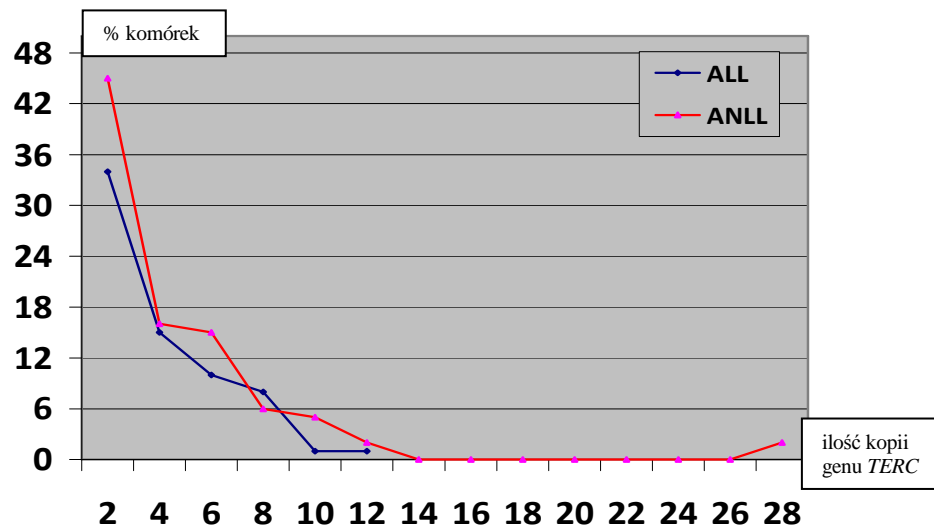
Rycina 13

Amplifikacja genu *TERT* w komórkach białaczkowych analizowana techniką FISH.



Rycina 14

Amplifikacja genu *TERC* w komórkach białaczkowych analizowana techniką FISH.



W przeciwieństwie do komórek białaczkowych w większości prawidłowych limfocytów obserwowano po 2 sygnały sondy dla *TERT* i 2 sygnały sondy referencyjnej. Podobne wyniki uzyskano w przypadku sondy dla *TERC*.

Należy podkreślić, że amplifikację *TERT* i *TERC* obserwowano w komórkach białaczkowych ALL i ANLL, w których stwierdzano wysoką aktywność odwrotnej transkryptazy telomerazy oraz wysoką ekspresję genów *TERT* i *TERC*. Jednakże wysoką ekspresję i aktywność telomerazy wykazano również w komórkach przypadku braku amplifikacji badanych genów.

## *Dyskusja*

Aktywność telomerazy została wykazana w większości komórek guzów litych i komórek białaczkowych (4,5,34). Przyjmuje się, że ponad 80% różnych nowotworów wykazuje wysoką aktywność telomerazy wobec jej braku lub niskiej aktywności w komórkach prawidłowych (81,90). Podobnie ekspresję trzech składowych telomerazy wykazuje większość komórek nowotworowych (13,88,96,108). Jednak wiele prac poświęconych badaniu telomerazy dotyczy oceny samej aktywności telomerazy lub tylko ekspresji *TERT* i *TERC*.

W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę kompleksowej analizy aktywności telomerazy w połączeniu z ekspresją trzech składowych telomerazy. Badania te miały na celu wykazanie czy ilościowa ocena aktywności i ekspresji telomerazy w komórkach ostrych białaczek u dzieci może być markerem pozwalającym na odróżnienie komórek prawidłowych od nowotworowych. Ponadto oceniono techniką FISH poziom amplifikacji genu *TERT* i *TERC* w komórkach białaczkowych i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej. Badania te miały odpowiedzieć na pytanie czy wysoką ekspresję i aktywność telomerazy w komórkach ostrych białaczek u dzieci można tłumaczyć amplifikacją genów *TERT* i *TERC*.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano aktywność telomerazy zarówno w komórkach białaczkowych ALL i ANLL. W niektórych przypadkach stwierdzono również aktywność telomerazy w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej (rycina 2).

Stosując rozcieńczenia lizatu komórkowego stwierdzono różnice w poziomie aktywności telomerazy pomiędzy komórkami białaczkowymi i prawidłowymi. W obrazie elektroforetycznym aktywność telomerazy w komórkach białaczkowych oceniana zestawem TRAPeZe dawała wynik dodatni przy zastosowaniu lizatu z 10000 i z kolejnych rozcieńczeń aż do 30 komórek (rycina 3). W przypadku prawidłowych limfocytów uzyskiwano wynik dodatni przy zastosowaniu lizatu z 10000 do 3000 komórek. Lizaty z 300 prawidłowych limfocytów dawały zawsze wynik ujemny

(rycina 3). W niektórych doświadczeniach aktywność telomerazy nie była wykrywana również w przypadku lizatów uzyskanych z 1000 i 3000 prawidłowych limfocytów krwi obwodowej. Dodatni wynik aktywności telomerazy w lizatach uzyskanych z 10000 prawidłowych limfocytów krwi obwodowej można wytłumaczyć występowaniem u zdrowych dawców niewielkiej liczby zaktywowanych limfocytów. Wykazana zależność aktywności telomerazy od liczby komórek tłumaczy pozornie sprzeczne wyniki uzyskiwane przez innych autorów. Niektóre prace sugerują, że również prawidłowe limfocyty krwi obwodowej wykazują aktywność telomerazy (26,72,91,149,241). W świetle uzyskanych danych można wytłumaczyć pozornie sprzeczne wyniki różną ilością zaktywowanych limfocytów w krwi zdrowych dawców oraz różną liczbą komórek, z których przygotowywano lizaty do oceny aktywności telomerazy. W zależności od liczby zaktywowanych limfocytów w krwi zdrowych dawców wynik badania zestawem TRAP-eze może być dodatni lub ujemny. Nie bez znaczenia są również stosowane warunki techniczne, które mogą wpływać na ostateczny wynik badania (89,110).

W przeprowadzonych badaniach we wszystkich komórkach białaczkowych stwierdzono aktywność telomerazy. Dane literaturowe wskazujące na brak aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych można wytłumaczyć albo faktycznym brakiem aktywności telomerazy albo występowaniem martwych komórek, w przypadku guzów litych, których produkty mogą hamować reakcję PCR. Nie można wykluczyć, że nie wszystkie komórki nowotworowe wykazują aktywność telomerazy (56,87,95,104,165,243). W celu potwierdzenia tego przypuszczenia należałoby ocenić aktywność telomerazy na poziomie pojedynczej komórki.

Z uwagi na reaktywację telomerazy w większości nowotworów wielu autorów sugerowało udział telomerazy w rozwoju procesu nowotworowego (72,102,106,111,118). Pierwsze prace wskazywały na istotny udział telomerazy w karcinogenezie (163,172,245). Wydawało się, że reaktywacja telomerazy wiąże się bezpośrednio z rozwojem nowotworów (158,210). Wyniki późniejszych badań wykonane w wielu nowotworach złośliwych oraz stanach przednowotworowych nakazują zachować daleko idącą ostrożność w przyczynowo-skutkowym

powiązaniu aktywności telomerazy z ontogenezą (128,131,165,212). Na przykład w raku piersi w ponad 95% przypadków można wykazać aktywność telomerazy wobec jej całkowitego braku w prawidłowej tkance gruczołu piersiowego (37,41,90). Z kolei niezłośliwe gruczolakowłókniaki w 60% wykazują również aktywność telomerazy (119,163). W raku tarczycy stwierdzono aktywność telomerazy wobec jej braku w prawidłowej tkance tarczycy (81,104). Z kolei w ponad ¼ przypadków powiększenia gruczołu tarczowego związanego z procesem zapalnym a nie nowotworowym również wykazano aktywność telomerazy (81). W ponad 90% raka prostaty stwierdza się aktywność telomerazy, w przeroście stercza w około 50%, natomiast w prawidłowej tkance prostaty w 36% można również wykazać aktywność telomerazy (72,125). Na tej podstawie autorzy sugerują, że aktywność telomerazy może być wczesnym molekularnym markerem zmian nowotworowych w gruczole krokowym, w czasie, kiedy histologicznie rak jest jeszcze niewykrywalny (125,177). W innych badaniach wykazano aktywność telomerazy w ponad 90% przypadków raka prostaty, w około 40% łagodnego przerostu i całkowity jej brak w prawidłowej tkance prostaty (101). Autorzy tych badań uważają również, że aktywność telomerazy może być pierwszym markerem wskazującym na rozwój raka prostaty. Podobnie autorzy japońscy przeprowadzając badania na materiale uzyskanym z biopsji cienkoigłowej prostaty uzyskali wyniki zbliżone do wyżej opisanych (125). Stwierdzili oni, że aktywność telomerazy stanowi przydatny diagnostycznie marker raka prostaty. Nasuwają się jednak wątpliwości, czy sama aktywność telomerazy może różnicować raka prostaty od niezłośliwego przerostu i od tkanki prawidłowej. Trudno ocenić, czy stwierdzana aktywność telomerazy zależy od niewielkiej liczby komórek nowotworowych mogących występować w niezłośliwym przeroście prostaty. W badaniach pierwotnego raka wątroby, raka płuc, raka trzustki czy nerki autorzy uznali aktywność telomerazy za precyzyjny wykładnik wczesnego rozpoznania choroby (147,203,240,242). Na podstawie własnych badań stwierdzaną aktywność telomerazy należy tłumaczyć różną ilością zaktywowanych prawidłowych komórek w badanym materiale (100).

Podsumowując można stwierdzić, że aktywność telomerazy wykazano praktycznie we wszystkich badanych nowotworach. Niewielka ilość przypadków, w których wynik był negatywny mogła być spowodowana błędami technicznymi przy wykonywaniu samego testu, obecnością czynników mogących blokować reakcję PCR, warunkami wykonywania doświadczenia, sposobem pobrania, przechowywania i transportu materiału do badania. Trudno bowiem wytłumaczyć fakt, że tylko kilka do kilkunastu procent przypadków określonego nowotworu nie wykazuje aktywności telomerazy. Gdyby tak było rzeczywiście, wówczas należałoby przyjąć podział wszystkich nowotworów o tym samym typie histopatologicznym na telomerazo dodatni i telomerazo ujemny. Jest to możliwe, aczkolwiek wydaje się mało prawdopodobne.

W późniejszych pracach poświęconych przydatności badania aktywności telomerazy w diagnostyce chorób nowotworowych wysuwane wnioski są dużo bardziej ostrożne. Wykazanie aktywności telomerazy nie tylko w komórkach nowotworowych, ale również w komórkach aktywowanych czynnikami zapalnymi, mitogenami i innymi substancjami biologicznie czynnymi sugeruje bardzo mocno związek aktywności telomerazy z proliferacją komórek (11,95,107,111,168,212,221,251). Wyniki własnych doświadczeń z użyciem limfocytów krwi obwodowej aktywowanych fitohemaglutyniną wskazują, że stymulowane limfocyty posiadają aktywność telomerazy.

Na podstawie danych literaturowych i badań własnych można wyciągnąć wniosek, że aktywność telomerazy jest raczej związana ze wzrostem i proliferacją komórek zarówno prawidłowych jak i nowotworowych. W takim ujęciu niestwierdzenie aktywności telomerazy w nielicznych przypadkach nowotworów można dodatkowo wytłumaczyć brakiem proliferacji komórek nowotworowych.

Od czasu wykrycia aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych czynione były próby wykazania przydatności badania telomerazy w diagnostyce chorób nowotworowych. Ukazało się wiele prac, których autorzy wręcz twierdzili, że aktywność telomerazy może służyć jako marker procesu nowotworowego (72,102,106,111,118). Wykazywanie różnic w aktywności



telomerazy pomiędzy tkanką prawidłową a nowotworową skłoniło wielu autorów do wysuwania jednak zbyt daleko idących wniosków dotyczących przydatności diagnostycznej telomerazy.

Aktywność telomerazy w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i nieлимfoblastycznej (ANLL) była badana przez szereg autorów. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów również komórki białaczkowe prawie zawsze wykazywały aktywność telomerazy (5,26,75,98,100,117,127). Bardzo rzadko stwierdzany brak aktywności telomerazy w komórkach białaczkowych można wytłumaczyć czynnikami wyżej opisanymi, jak również stosowanym leczeniem (sterydy lub chemioterapeutyki) (166,243).

W przeprowadzonych w pracy badaniach we wszystkich przypadkach ALL i ANLL stwierdzono aktywność telomerazy. Wyniki pozytywne uzyskano stosując handlowo dostępny zestaw do jakościowej oceny aktywności telomerazy TRAPeze (Intergen), jak również wykorzystując test ilościowy *TeloTAGGG* Telomerase PCR ELISA PLUS (Roche Diagnostics). W teście ilościowym wyliczając zgodnie z zaleceniami producenta względną aktywność telomerazy stwierdzono stosunkowo duży zakres uzyskanych wyników (tabela 3 i rycina 4). Duże różnice względnej aktywności telomerazy w komórkach ALL (od 29,4 do 376,3) można tłumaczyć znacznym zróżnicowaniem komórek ALL pod względem aktywności telomerazy, wynikającym z różnej ekspresji genu *TERT*. Podobne różnice w uzyskiwanych wynikach RTA obserwowano w przypadku komórek ANLL (od 42,3 do 426,7) (tabela 3). Wyniki badań aktywności telomerazy testem jakościowym TRAP z użyciem różnych ilości komórek wykazały, że nawet ekstrakt z 30 komórek białaczkowych daje wynik dodatni wobec ujemnych wyników z ekstraktem 1000 prawidłowych limfocytów krwi obwodowej. Dane te wskazują na wielokrotnie wyższą aktywność telomerazy w komórkach białaczkowych w porównaniu z prawidłowymi limfocytami. Wyniki te bardzo dobrze korespondują z danymi uzyskiwanymi przy pomocy testu ilościowego *TeloTAGGG* Telomerase PCR ELISA PLUS (Roche Diagnostics). W przeciwieństwie do komórek białaczkowych względna aktywność telomerazy w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej wahała się od -4,6 do 9,3 z medianą w wysokości 0,24. Dodatkowo wyniki względnej aktywności

telomerazy prawidłowych limfocytów sugerują, że pewna bardzo niewielka liczba zaktywowanych prawidłowych limfocytów krwi obwodowej wykazuje aktywność telomerazy. Analiza statystyczna wykazała statystycznie istotne różnice w aktywności telomerazy (RTA) pomiędzy komórkami białaczkowymi ALL i ANLL a prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej (tabela 4).

Na podstawie uzyskanych wyników można sugerować, że aktywność telomerazy może być markerem komórek białaczkowych pod warunkiem wykonania oceny ilościowej. Oczywiście należy zdać sobie sprawę z tego, że aktywność telomerazy może być jedynie drugorzędym pomocniczym markerem rozróżniającym komórki prawidłowe od białaczkowych. Przydatność kliniczna oceny ilościowej aktywności telomerazy w diagnostyce białaczek wydaje się niewielka. Nie można jednak wykluczyć, że w przyszłości ilościowa ocena telomerazy może stać się dodatkowym elementem potwierdzającym rozpoznanie białaczki.

Ekspresja trzech podjednostek telomerazy była oceniana w komórkach białaczkowych (ALL i ANLL) i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej techniką PCR z użyciem cDNA i specyficznych starterów oligonukleotydowych dla *TERT*, *TERC* i *TPI*. Produkty PCR były rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym. Sygnał uzyskiwany na żelu agarozowym był najsilniejszy w przypadku komórek białaczkowych z ALL i ANLL (ryciny 5-6). We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach, komórki ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i nielimfoblastycznej (ANLL) wykazywały ekspresję trzech podjednostek telomerazy (ryciny 5-6). Niestymulowane limfocyty krwi obwodowej zdrowych dawców w większości przypadków dawały wynik dodatni ekspresji podjednostki *TERC* (rycina 5) i *TPI* (rycina 6). W prawidłowych limfocytach krwi obwodowej nie stwierdzono ekspresji *TERT* (rycina 6). Reakcja kontrolna PCR przeprowadzona na cDNA uzyskanym z badanych komórek białaczkowych i prawidłowych limfocytów krwi obwodowej z zastosowaniem specyficznych starterów oligonukleotydowych dla dehydrogenazy gliceroaldehydowej (*GADPH*) zawsze dawała silny sygnał.

Jakościowa ocena ekspresji trzech podjednostek telomerazy nie pozwoliła porównać wyników uzyskanych z komórek nowotworowych i prawidłowych. Uzasadniało to

przeprowadzenie doświadczeń techniką PCR w czasie rzeczywistym pozwalającą na ilościową ocenę ekspresji genów *TERT* i *TERC* zarówno w komórkach białaczkowych i prawidłowych limfocytach krwi obwodowej. W pracy zastosowano technikę PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I. Najprostszym miernikiem ilości powstającego produktu PCR w czasie rzeczywistym jest wartość progowa  $C_t$ . Odzwierciedla ona bezwzględną ekspresję badanego genu. Wielkości  $C_t$  dla badanych genów komórek białaczkowych zarówno ALL jak i ANLL mieściły się w bardzo szerokim zakresie wartości (tabele 5-6; ryciny 8-9). Zdecydowanie mniejszy rozrzut wyników  $C_t$  uzyskano w przypadku prawidłowych limfocytów krwi obwodowej (tabela 7, rycina 10). Przeprowadzona analiza statystyczna bezwzględnej ekspresji *TERT* i *TERC* wykazała istotne różnice pomiędzy komórkami białaczkowymi (ALL i ANLL) a prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej (tabela 11). Bardzo wysokie wartości  $C_t$  dla genów *TERT* i *TERC* w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej wskazują na niezwykle niską ekspresję tych genów.

Oznaczanie bezwzględnej ekspresji genów może być jednak obarczone błędem wynikającym z różnej ilości cDNA (różnej ilości wyjściowej RNA, różnej liczby kopii genów w ul RNA uzyskiwanych z tej samej liczby komórek). Ponadto reakcja PCR w czasie rzeczywistym może przebiegać odmiennie dla różnych genów, nawet w przypadku równej wyjściowej ilości RNA lub liczby kopii genów. Z powyższych względów bardziej optymalną metodą ilościowej oceny ekspresji genów jest badanie względnej ekspresji. Względną ekspresję można analizować albo w stosunku do ekspresji genu referencyjnego (np. *ACTB*) albo w stosunku do komórek referencyjnych (np. prawidłowych limfocytów krwi obwodowej). W ten sposób wyliczona względna ekspresja badanych genów oznacza ile razy ekspresja *TERT* lub *TERC* jest wyższa lub niższa od ekspresji *ACTB* lub od ekspresji badanych genów w tkance prawidłowej (referencyjnej). W uzyskanych wynikach wartości mediany dla względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* w komórkach białaczkowych były od kilku (*TERT*) do kilkunastu (*TERC*) razy większe od ekspresji *ACTB* (tabela 15, rycina 11). W przypadku prawidłowych limfocytów krwi obwodowej względna

ekspresja genów *TERT* i *TERC* była kilkakrotnie niższa od ekspresji *ACTB* (wartości ujemne, tabela 14). Względna ekspresja genów *TERT* i *TERC* była nawet ponad 2000 razy wyższa w komórkach białaczkowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi (tabela 12-13). Wykonana analiza statystyczna wykazała istotne różnice we względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* pomiędzy komórkami ALL i ANLL a prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej (tabela 16). Na tej podstawie można wysunąć wniosek o istotnie wyższej ekspresji telomerazy w komórkach białaczkowych w porównaniu z prawidłowymi limfocytami.

Możliwa jest również ocena względnej ekspresji badanego genu poprzez równoczesne odniesienie zarówno do genu referencyjnego jak i tkanki referencyjnej. Do takiej oceny względnej ekspresji genów posłużono się metodą Plaffl'a opisaną dokładnie w wynikach. Obliczona w ten sposób względna ekspresja genów *TERT* i *TERC* w komórkach ALL i ANLL charakteryzowała się bardzo dużym zakresem uzyskiwanych wartości (tabele 17-18). Tak duży rozrzut wyników można wytłumaczyć z jednej strony ujemnymi wartościami względnej ekspresji *TERT* i *TERC* w odniesieniu do genu referencyjnego w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej, a z drugiej strony wysokimi wartościami względnej ekspresji *TERT* i *TERC* w odniesieniu do genu referencyjnego w komórkach białaczkowych. Przy tak dużych różnicach między komórkami białaczkowymi a prawidłowymi oraz pomiędzy badanymi genami a genem referencyjnym względna ekspresja obliczana metodą Plaffl'a osiąga bardzo wysokie wartości (tabele 19-20). Wydaje się, że metoda Plaffl'a posiada ograniczoną przydatność w przypadku, gdy względną ekspresję odnosimy do genów praktycznie nie ulegających ekspresji w prawidłowych komórkach, takich jak *TERT* i *TERC*. W takiej sytuacji ocena względnej ekspresji badanego genu poprzez odniesienie do genu referencyjnego (metoda  $2^{-\Delta Ct}$ ), pozwala znacznie lepiej porównać ekspresję genów pomiędzy komórkami białaczkowymi a prawidłowymi. Daje też lepsze możliwości zobrazowania względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* oraz pozwala na jednoznaczne określenie ile razy ekspresja genu *TERT* lub *TERC* jest wyższa w komórkach białaczkowych w porównaniu do komórek prawidłowych.

Wysoka ekspresja genów *TERT* i *TERC* została wykazana w wielu nowotworach (13,54,88,96,120,135,154). Wydaje się, że reaktywacja aktywności telomerazy i ekspresji jej podjednostek jest cechą charakterystyczną nowotworzenia (46,115). W komórkach prawidłowych nie stwierdza się ekspresji i aktywności telomerazy. W procesie karcinogenezy aktywacja telomerazy jest regulowana na wielu poziomach. Najważniejszym wydaje się transkrypcja genów *TERT* i *TERC*, których ekspresja może być modyfikowana przez różne czynniki. Do najważniejszych czynników zwiększających ekspresję telomerazy należy zaliczyć onkogen *MYC-C*, czynnik transkrypcyjny Sp1, białko E6 ludzkiego wirusa brodawczaka (HPV 16)(108,148,232). Drugą grupę stanowią czynniki obniżające ekspresję telomerazy, do których można zaliczyć białka kodowane przez geny supresyjne *TP53*, *RB*, *E2F*, *WT1* oraz inne białka o działaniu antyproliferacyjnym i wpływającym na różnicowanie komórek, takie jak interferon gamma czy transformujący czynnik wzrostu beta (95,113,). Dokładne mechanizmy regulujące ekspresję kompleksu telomerazy są bardzo złożone i nie do końca poznane. Ogólnie przyjmuje się, że w komórkach nowotworowych dochodzi do reaktywacji telomerazy. Należy przyjąć, że wyżej opisane uwagi i zastrzeżenia dotyczące aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych można również odnieść do jej ekspresji. Wysokiej ekspresji telomerazy w komórkach nowotworowych można było oczekiwać na podstawie wielu wcześniejszych prac wykazujących aktywność telomerazy.

Zastanawiające jest duże zróżnicowanie wyników ekspresji telomerazy w badanych komórkach białaczkowych. Można to wyjaśnić różnicami w wielkości ekspresji telomerazy w komórkach białaczkowych u tego samego pacjenta jak i poszczególnych chorych. Pomimo, ogólnie przyjętego poglądu o klonalności komórek białaczkowych stwierdza się zróżnicowanie w ekspresji antygenów i receptorów powierzchniowych, białek cytoplazmatycznych oraz markerów cytogenetycznych i molekularnych. Analogicznie można zatem tłumaczyć duży zakres wyników ekspresji telomerazy zróżnicowaną liczbą komórek białaczkowych z wysoką ekspresją telomerazy. Duże zróżnicowanie ekspresji genu *TERT* stwierdzono w komórkach raka piersi (13,88). Niektórzy

autorzy sugerują, że wzrost ekspresji telomerazy towarzyszy progresji procesu nowotworowego (88,115,148). Ekspresja telomerazy może być czynnikiem selekcyjnym dając przewagę komórkom nowotworowym z wysoką ekspresją genu *TERT*. Niektórzy autorzy proponowali ilościową ocenę ekspresji genu *TERT* w diagnostyce raka piersi, jelita grubego, płuc i nerek, pozwalającą nie tylko na odróżnienie komórek nowotworowych od prawidłowych, ale również na określenie stopnia złośliwości nowotworu w powiązaniu z klasyfikacją histopatologiczną (148,154,174,208).

W podsumowaniu można stwierdzić, że komórki białaczkowe zarówno ALL jak i ANLL charakteryzują się istotnie wyższą ekspresją genów *TERT* i *TERC*, zarówno bezwzględną jak i względną.

Jednym z celów pracy była odpowiedź na pytanie, czy wysoką ekspresję i aktywność telomerazy w komórkach ostrych białaczek można tłumaczyć amplifikacją genów *TERT* i *TERC*. W piśmiennictwie ukazało się kilka prac sugerujących związek amplifikacji genu *TERT* z ekspresją *TERT*. Zhang i wsp. wykazali amplifikację genu *TERT* w ¼ badanych przypadków raka szyjki macicy (248,249). Zwiększona liczba kopii genu *TERT* korelowała znacząco z wysokim poziomem ekspresji *TERT*. Co więcej korelacja taka była obserwowana wyłącznie w rakach szyjki macicy, którym towarzyszyła infekcja HPV-16 (249). Autorzy uznali, że amplifikacja genu *TERT* jest pośrednio lub bezpośrednio związana z infekcją HPV i stanowi bardzo ważny czynnik zwiększający ekspresję *TERT* i aktywację telomerazy w raku szyjki macicy. Inni autorzy w badaniach guzów embrionalnych ośrodkowego układu nerwowego stwierdzili amplifikację genu *TERT* w 42% analizowanych guzów (57). Wykazali korelację pomiędzy amplifikacją *TERT* a zwiększonym poziomem ekspresji *TERT*. W przypadku medulloepithelioma amplifikację *TERT* obserwowano tylko w guzach nawrotowych wobec jej braku w zmianach pierwotnych. Autorzy wysunęli wniosek, że zwiększona ekspresja *TERT* spowodowana amplifikacją genu jest charakterystyczna dla guzów o wyższej złośliwości. W badaniach Takuma i wsp. wykazano amplifikację *TERT* w ponad 20% przypadków raka pierwotnego wątroby (209). Amplifikację *TERT* obserwowano znacznie częściej w niskozróżnicowanych postaciach raka. Amplifikacji

*TERT* nie obserwowano w prawidłowej tkance wątrobowej. Autorzy nie stwierdzili korelacji pomiędzy amplifikacją genu *TERT* a stopniem jego ekspresji. Na podstawie uzyskanych wyników wysnuli wniosek, że amplifikacja *TERT* jest specyficzna dla nowotworów i ma znaczący udział w rozwoju raka pierwotnego wątroby. Jednakże wysoka ekspresja *TERT* według autorów bardzo rzadko jest spowodowana zwiększoną liczbą kopii genu *TERT*.

Przesłanki te skłoniły do przeprowadzenia analizy amplifikacji genów *TERT* i *TERC* w komórkach białaczkowych w powiązaniu z oceną ekspresji i aktywności telomerazy. Wysoką ekspresję i aktywność telomerazy stwierdzano w komórkach białaczkowych zarówno z amplifikacją *TERT* i *TERC* jak i z prawidłową liczbą kopii tych genów. Natomiast amplifikację genów *TERT* i *TERC* obserwowano w komórkach białaczkowych ALL i ANLL z wysoką aktywnością odwrotnej transkryptazy telomerazy oraz wysoką ekspresją *TERT* i *TERC*. Dane te nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie związku pomiędzy amplifikacją genów *TERT* i *TERC* a ekspresją i aktywnością telomerazy. Nie można jednak wykluczyć wpływu amplifikacji badanych genów na poziom ekspresji i aktywności telomerazy w komórkach białaczkowych.

## *Podsumowanie*

1. Komórki białaczkowe ALL i ANLL wykazują istotnie wyższą aktywność telomerazy w porównaniu z limfocytami krwi obwodowej zdrowych dawców.
2. W komórkach ostrej białaczki nielimfoblastycznej stwierdza się istotnie wyższą względną aktywność telomerazy aniżeli w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej.
3. Zarówno bezwzględna jak i względna ekspresja genów *TERT* i *TERC* jest istotnie wyższa w komórkach białaczkowych w porównaniu z prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej.
4. Brak statystycznie istotnych różnic wielkości względnej ekspresji genów *TERT* i *TERC* pomiędzy komórkami ALL i ANLL.
5. Wysokiej ekspresji i aktywności telomerazy w komórkach białaczkowych nie zawsze towarzyszy amplifikacja genów *TERT* i *TERC*.



## ***Wnioski***

1. Ilościowa ocena aktywności telomerazy może odróżniać komórki prawidłowe od białaczkowych.
2. Ekspresja genów *TERT* i *TERC* oceniana techniką PCR w czasie rzeczywistym jest markerem komórek białaczkowych ALL i ANLL.
3. Amplifikacja genów *TERT* i *TERC* może być odpowiedzialna za wysoką ekspresję i aktywność telomerazy w komórkach białaczkowych.

## *Piśmiennictwo*

1. Aisner DL, Wright WE, Shay JW. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002, 12, 80–85
2. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 4611–4627
3. Anedchenko E, Oparina N, Dmitriev A, Krasnov G, Pavlova L, Alexandrova N, Kisseljov F, Senchenko V, Activation of the hTERT expression in squamous cell cervical carcinoma is not associated with gene amplification. *Oncol Rep.* 2008, 20,469-74
4. Arai T, Yasuda Y, Takaya T, Ito Y, Hayakawa K, Toshima S, Shibuya C, Yoshimi N, Kashiki Y. Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol. Rep.* 1998, 5, 405-408
5. Avilio AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 1996, 56, 645-650
6. Baird DM, Coleman J, Rosser ZH, Royle NJ. High levels of sequence polymorphism and linkage disequilibrium at the telomere of 12q: implications for telomere biology and human evolution. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 66, 235–250
7. Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature Genet.* 2003, 33, 203–207
8. Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect in human cells. *Science* 2001, 292, 2075–2077
9. Bechter OE, Shay JW, Wright WE. The frequency of homologous recombination in human ALT cells. *Cell Cycle* 2004, 5, 49–51

10. Bechter O, Zou Y, Walker W, Wright WE, Shay JW. Telomeric recombination in MSH6 deficient human colon cancer cells following telomerase inhibition. *Cancer Res.* 2004, 64, 3444–3451
11. Bechter OE, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Homologous recombination in human telomerase positive and ALT cells occurs with the same frequency. *EMBO Rep.* 2003, 4, 1138–1143
12. Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Lobat C, Bean K, Aviv A. Telomere length as an indicator of biologic aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 2001, 37, 381–385
13. Bieche I, Nogues C, Paradis V, Olivi M, Bedossa P, Lidereau R, Vidaud M. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clinical Cancer Research* 2000, 6, 452–459
14. Biessmann H, Mason JM. Telomere maintenance without telomerase. *Chromosoma* 1997, 106, 63–69.
15. Blackburn EH. The telomere and telomerase: nucleid acid-protein complexes acting in a telomere homeostasis system. A review, *Biochemistry (Mosc.)* 1997, 62, 1196–1201
16. Blackburn E, Bhattacharyya A, Gilley D, Kirk K, Krauskopf A, McEachern M, Prescott J, Ware T. The telomere and telomerase: how do they interact? *Ciba Found. Symp.* 1997, 211, 2–13
17. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001, 106, 661–673
18. Blackburn EH. Telomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 1992, 61, 113–129
19. Blasco M. Telomere epigenetics: a higher-order control of telomere length in mammalian cells. *Carcinogenesis* 2004, 25, 1083–1087.
20. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW, Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997, 91, 25–34

21. Blasco MA. Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *Eur. J. Cell Biol.* 2003, 82, 441–446
22. Bnen TP. Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 1997, 57, 2760-2764
23. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chui CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998, 279, 349–352
24. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature Genet.* 1997, 17, 231–235
25. Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 842–846
26. Brousset P, al Saati T, Chaouche N, Zenou RC, Schlaifer D, Chittal S, Delsol G. Telomerase activity in reactive and neoplastic lymphoid tissues: infrequent detection of activity in Hodgkin's disease. *Blood* 1997, 89, 26-31
27. Brown BA, Li Y, Brown JC, Hardin CC, Roberts JF, Pelsue SC, Shultz LD. Isolation and characterization of a monoclonal anti-quadruplex DNA antibody from autoimmune 'viable motheaten' mice. *Biochemistry* 1998, 37, 16325-16337
28. Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1999, 11, 318–324
29. Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel RR. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum. Mol. Genet.* 1997, 6, 921–926
30. Bryan T M, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 1995, 14, 4240–4248

31. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Hat. Med.* 1997, 3, 1271-1274
32. Burger AM, Double JA, Newell DR. Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur. J. Cancer* 1997, 33, 638-644
33. Busutil RA, Rubio M, Dolle MET, Campisi J, Vijg J. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* 2003, 2, 287–294
34. Califano J, Ahrendt SA, Meininger G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res.* 1996, 56, 5720-5722
35. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 2001, 11, 27–31
36. Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 339–349
37. Carey LA, Hedican CA, Henderson GS, Umbricht CB, Dome JS, Varon D, Sukumar S. Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4,435-440
38. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003, 361, 393–395
39. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995, 55, 2533–2536
40. Chan SWL, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 2002, 21, 553–563

41. Clark GM, Osborne CK, Levitt D, Wu F, Kim NW. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997, 89, 1874-1881
42. Cogulu O, Kosova B, Karaca E, Gunduz C, Ozkinay F, Aksoylar S, Gulen H, Kantar M, Oniz H, Karapinar D, Cetingul N, Erbay A, Vergin C, Ozkinay C. Evaluation of telomerase mRNA (hTERT) in childhood acute leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2004,45, 2477-80.
43. Cogulu O, Kosova B, Gunduz C, Karaca E, Aksoylar S, Erbay A, Karapinar D, Vergin C, Vural F, Tombuloglu M, Cetingul N, Ozkinay F. The evaluation of hTERT mRNA expression in acute leukemia children and 2 years follow-up of 40 cases. *Int. J. Hematol.* 2008, 87, 276-83.
44. Coursen JD, Bennett WP, Gollahon L, Shay JW and Harris CC. Genomic instability and telomerase activity in human bronchial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus-16 E6 and E7 genes. *Exp. Cell Res.* 1997, 235, 245–253
45. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003, 426, 194–198
46. de Kok JB, Ruers TJM, van Muijen GNP, van Bokhoven A, Willems HL, Swinkels DW. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clinical Chemistry* 2000, 46, 3, 313-318
47. de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 2002, 21, 532–540
48. de Lange T. T-loops and the origin of telomeres. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 323–329
49. der-Sarkissian H, Bacchetti S, Cazes L, Londono-Vallejo JA. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* 2004, 23, 1221–1228
50. Dunham MA, Neumann AA, Fasching, C.L. and Reddel, R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genet.* 2000, 26, 447–450

51. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1997, 3, 1931–1941
52. Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP, Rheinwald JG. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16 (INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 1436–1447
53. Dimri GP, Lee X, Basile G, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995, 92, 9363–9367
54. Divella R, Tommasi S, Lacalamita R, Daniele A, Abbate I, Garrisi VM, Savino E, Coviello M, Rubini V, Simone G, Paradiso A, Quaranta M. Circulating hTERT DNA in early breast cancer. *Anticancer Res.* 2009, 29, 2845-9
55. Drayton S, Peters G. Immortalization and transformation revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002, 12, 98–104
56. Duggan BD, Wan M, Yu MC, Roman LD, Muderspach LI, Delgadillo E, Li WZ, Martin SE, Dubeau L. Detection of cancer cells: comparison of a telomerase assay and cytologic examination. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998, 90, 238-242
57. Fan X, Wang Y, Kratz J, Brat DJ, Robitaille Y, Moghrabi A, Perlman EJ, Dang CV, Burger PC, Eberhart ChG. hTERT gene amplification and increased mRNA expression in central nervous system embryonal tumors. *Am. J. Pathol.* 2003, 162, 6, 1763-1769
58. Faragher RGA, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human ageing? *BioEssays* 1998, 20, 985–991
59. Fan SR, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* 2004, 359, 109–121

60. Farwell DG, Shera KA, Koop JI, Bonnet GA, Matthews CP, Reuther GW, Coltrera MD, McDougall JK, Klingelhutz AJ. Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *Am. J. Pathol.* 2000, 156, 1537–1547
61. Feng J, Funk WD, Wang SS, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995, 269, 1236–1241
62. Ferreira MG, Miller KM, Cooper JP. Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol. Cell* 2004, 13, 7–18
63. Ford LP, Zou Y, Pongracz K, Gryaznov SM, Shay JW, Wright WE. Telomere maintenance by telomerase can inhibit the ALT pathway in human cells. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 32198–32203
64. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on and turn it off again. *Differentiation* 2002, 69, 188–197
65. Forsyth NR, Evans AP, Shay JW, Wright WE. Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell* 2003, 2, 235–243
66. Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* 2004, 7, 2554–2563
67. Goytisolo FA, Blasco MA. Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Oncogene* 2002, 21, 584–591
68. Graakjaer J, Bischoff C, Korsholm L, Holstebro S, Vach W, Bohr VA, Christensen K, Kolvraa S. The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans is determined by inherited, telomere-near factors and is maintained throughout life. *Mech. Ageing Dev.* 2003, 124, 629–640
69. Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002, 41, 29–40



70. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999, 97, 503–514
71. Greider CW. Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* 1990, 12, 363–369
72. Greider CW. Telomerase, activity, cell proliferation, and cancer. *PNAS* 1998, 95, 90-92
73. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985, 43, 405–413
74. Gomez DE, Tejera AM, Olivero OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 246, 107-110
75. Gurkan E, Tandriverdi K, Basiamisli F. Telomerase activity in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2005, 10, 1131-1139
76. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks W, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999, 499, 464–468
77. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* 1991, 256, 271–282
78. Harley CB, Fletcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging. *Nature* 1990, 345, 458–460
79. Harrington L. Those damaged telomeres! *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004, 14, 22–28
80. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990, 346, 866–868
81. Haugen BR, Nawaz S, Markham N, Hashizumi T, Shroyer AL, Werness B, Shroyer KR. Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 1997, 7, 337-342
82. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1965, 37, 614-636
83. Hayflick L. Cell aging. In Eisdorfer C. (ed.) *Annual Review of Gerontology and Geriatrics*, Springer Publishing Co. New York, 1980, 1, 26–67

84. Hayflick L, Moorhead PS. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961, 25, 585–621
85. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 2001, 107, 67–77
86. Herbig U, Jobling WA, Chen PBC, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a signaling pathway involving ATM, p53 and p21CIP1 but not p16INK4a. *Mol. Cell* 2004, 13, 501–513
87. Herrera E, Samper E, Martin-Caballero J, Flores JM, Lee HW, Blasco MA. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J.* 1999, 18, 2950–2960
88. Hines WC, Fajardo AM, Joste NE, Bisoffi M, Griffith K. Quantitative and spatial measurements of telomerase reverse transcriptase expression within normal and malignant human breast tissues. *Mol Cancer Res.* 2005, 3, 9, 503-509
89. Hirose M, Abe-Hashimoto J, Ogura K, Tahara H, Ide T, Yoshimura T. A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997, 123, 337-344
90. Hiyama E. Telomerase activity to human breast tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88, 116-122
91. Holt SE, Shay JW. The role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J. Cell. Physiol.* 1999, 180, 10–18
92. Hodes R. Molecular targeting of cancer: telomeres as targets. *PNAS* 2001, 98, 14, 7649-7651
93. Holt SE, Wright WE, Shay JW. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 1996, 16, 1932–1939

94. Horikawa L, Oshimura M, Barrett JC. Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Mol. Carcinog.* 1998, 22,65-72
95. Hu BT, Lee SC, Marin E, Ryan DH, Insel RA. Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *J. Immunol.* 1997, 159,1068-1071
96. Hu LH, Chen FH, Li,YR, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2004, 10, 23, 3514-3517
97. Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW, Wright WE. Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 19719–19722
98. Huh HJ, Huh JW, Yoo ES, Seong CM, Lee M, Hong KS, Chung WS. hTERT mRNA levels by real-time RT-PCR in acute myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* 2005,79, 267-73.
99. Isobe K, Yashiro T, Omura S, Kaneko M, Kaneko S, Kamma H, Tatsuno I, Takekoshi, K, Kawakami Y, Nakai T. Expression of the human telomerase reverse transcriptase in pheochromocytoma and neuroblastoma tissues. *Endocrine Journal.* 2004, 51, 1, 47-52.
100. Januszkiewicz D, Wysocki J, Lewandowski K, Pernak M, Nowicka K, Rembowska J, Nowak J. Lack of correlation between telomere length and telomerase activity and expression in leukemic cells. *Int. J. Mol. Med.* 2003, 12: 935-938
101. Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H, Nassif N, Meisner L, Newton MA, Waldman FM, Reznikoff CA. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 1999, 59, 957–964
102. Jian LL, Lian-Ying G, Gui-Nian Z. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2006, 12, 3, 465-467

103. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nature Genet.* 1999, 21, 111–114
104. Jones CJ, Kipling D, Morris M, Hepburn P, Skinner J, Bounacer A, Wyllie FS, Ivan M, Bartek J, Wynford-Thomas D, Bond JA. Evidence for a telomere-independent ‘clock’ limiting RAS oncogene-driven proliferation of human thyroid epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 2000, 20, 5690–5699
105. Kapahi P, Boulton ME, Kirkwood TB. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 495–500
106. Kavalier E, Landman J, Chang Y, Droller MJ, Liu BC. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 1998, 82, 708-714
107. Keys B, Serra V, Saretzki G, von Zglinicki T. Telomere shortening in human fibroblasts is not dependent on the size of the telomeric-3'-overhang. *Aging Cell* 2004, 3, 103–109
108. Kim HR, Cristensen R, Park NH, Sapp P, Kang MK, Park NH. Elevated expression of hTERT is associated with dysplastic cell transformation during human oral carcinogenesis in situ. *Clinical Cancer Research* 2001, 7, 3079-3086
109. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994, 266, 2011–2015
110. Kim NW, Wu F. Advances to quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* 1997, 25. 2595-2597
111. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998, 396, 84–88

112. Kitada T, Seki S, Kawakita N, Kuroki T, Monna T. Telomere shortening in chronic liver diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 211, 33–39
113. Kleinschmidt-DeMasters BK, Hashizumi TL, Sze CI, Lillehei KO, Shroyer AL, Shroyer KR. Telomerase expression shows differences across multiple regions of oligodendroglioma versus high grade astrocytomas but shows correlation with Mib-1 labelling. *Clin. Pathol.* 1998, 51, 284-293
114. Koering CE, Pollice A, Zibella MP, Bauwens S, Puisieux A, Brunori M, Brun C, Martins L, Sabatier L, Pulitzer JF, Gilson E. Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep.* 2002, 3, 1055–1061
115. Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat. Genet.* 1998, 19, 182-186
116. Kondo Y, Kondo S, Tanaka Y, Haqqi T, Barna BP, Cowell JK. Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 1998, 16, 2243-2248
117. Koyanagi Y, Kobayashi D, Yajima T, Asanuma K, Kimura T, Sato T, Kida T, Yagihashi A, Kameshima H, Watanabe N. Telomerase activity is down regulated via decreases in hTERT mRNA but not TEP1 mRNA or hTERC during the differentiation of leukemic cells. *Anticancer Res.* 2000, 20,773-8.
118. Kyo S. Application of telomerase assay for the screening of cervical lesions. *Cancer Res.* 1997, 57, 1863-1867
119. Landberg G, Nielsen NH, Nilsson P, Emdin SO, Cajander J, Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 1997, 57, 549-554

120. Leelawat K, Leelawat S, Ratanachu-Ek T, Trubwongchareon S, Wannaprasert J, Tripongkaruna S, Chantawibul S, Tepaksorn P. Circulating hTERT mRNA as a tumor marker in cholangiocarcinoma patients. *World J. Gastroenterol.* 2006, 14, 12, 4195-4198
121. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 1992, 225, 951–960
122. Li S, Ferguson MJ, Hawkins CJ, Smith C, Elwood NJ. Human telomerase reverse transcriptase protects hematopoietic progenitor TF-1 cells from death and quiescence induced by cytokine withdrawal. *Leukemia* 2006, 20, 1270-1278
123. Li X, Wang X, Li X, Liu B, Zhang Y, Liao Q. Studies of hTERT gene expression in acute leukemia children. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2003, 34, 486-8.
124. Li Y, Wu J, Wang L, Chen F, Hu L. Detection of telomerase activity and the expression of telomerase subunits in the patients with acute myelogenous leukaemia. *J Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 2004, 24, 48-51.
125. Lin Y, Uemura H, Fujinami K, Hosaka M, Iwasaki Y, Kitamura H, Harada M, Kubota Y. Detection of telomerase activity in prostate needle-biopsy samples. *Prostate* 1998, 36, 121-128
126. Lingner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* 1995, 269, 1533–1534
127. Liu L, Sun B, Liang Y. Analysis of telomerase activity and telomere length in acute myelogenous leukemia. *Zhonghua Yue Ye Xue Za Zhi* 2001, 22, 11, 592-594
128. Liu K, Schoonmaker MM, Levine LB, June CH, Hodes RJ, Weng N. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *PNAS* 1999, 96, 5, 5147-5152
129. Londono-Vallejo JA, derSarkissian H, Cazes L, Thomas G. Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3164–3171

130. Lindsey J, McGill N, Lindsey L, Green D, Cooke H. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat. Res.* 1991, 256, 45–48
131. Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis and cancer. *Science* 2002, 297, 565–569
132. Lundblad V. Taking the measure. *Nature* 2003, 423, 26, 926-927
133. Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003, 114, 241–253
134. Martens UM, Chavez A, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res.* 2000, 256, 291–299
135. Mavrogiannou E, Strati A, Stathopoulou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Lianidou ES. Real-time RT-PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase splice variants in tumor cell lines and non-small cell lung cancer. *Clin. Chem.* 2007, 53, 1, 53-61
136. McKenzie KE, Umbricht ChB, Sukumar S. Applications of telomerase research in the fight against cancer. *Mol. Med. Today* 1999, 5, 114-122
137. Meeker AK, Coffey DS. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem and cancer cells. A review. *Biochemistry (Mosc.)* 1997, 62, 1323-1331
138. Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azdo-3'-deoxythymidine. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4, 693-696
139. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genet.* 1999, 2, 115–118

140. Meeker AK, De Marzo AM. Recent advances in telomere biology: implications for human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2004, 16, 32–38
141. Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 317–326
142. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. hEST2 the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated to tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997, 90, 785-795
143. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenital. *Nature* 1999, 402, 551–555
144. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1988, 85, 6622–6626
145. Murakami J. Telomerase activity in ovarian tumors. *Cancer* 1997, 80, 1085-1092
146. Naka K, Tachibana A, Ikeda K, Motoyama N. Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 2030–2037
147. Nakashio R, Kitamoto M, Tahara H, Nakanishi T, Ide T, Kajiyama G. Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 1997, 74, 141-147.
148. Nawaz S, Hashizumi TL, Markham NE, Shroyer AL, Shroyer KR. Telomerase expression in human breast cancer with and without lymph node metastases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997, 107, 542-547
149. Norton JC, Holt SE, Wright WE, Shay JW. Enhanced detection of human telomerase activity. *DNA Cell Biol.* 1998, 17, 217-219



150. Nowak T, Januszkiewicz D, Zawada M, Pernak M, Lewandowski K, Rembowska J, Nowicka K, Mańkowski P, Nowak J. Amplification of hTERT and hTERC genes in leukemic cells with high expression and activity of telomerase. *J. Oncol. Reports* 2006, 16, 301-305
151. Nugent CI, Bosco G, Ross LO, Evans SK, Salinger AP, Moore JK, Haber JE, Lundblad V. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr. Biol.* 1998, 8, 657-660
152. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* 1998, 12, 1073-1085.
153. Obana N, Takagi S, Kinouchi Y, Tokita Y, Sekikawa A, Takahashi S, Hiwatashi N, Oikawa S, Shimosegawa T. Telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells in coronary disease patients with metabolic disorders. *Intern. Med.* 2002, 42, 150–153
154. Ohuchida K, Mizumoto K, Ogura Y, Ishikawa N, Nagai E, Yamaguchi K, Tanaka M. Quantitative assesment of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA levels in pancreatic juice samples for the diagnosis of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 2285-2292
155. Ohyashiki JH, Hisatomi H, Nagao K, Honda S, Takaku T, Zhang Y, Sashida G, Ohyashiki K. Quantitative relationship between functionally active telomerase and major telomerase components (hTERT and hTR) in acute leukaemia cells. *Br. J. Cancer* 2005, 92, 1942-7.
156. Okuda K, Bardequez A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, Skurnick J, Awad G, Aviv A. Telomere length in the newborn. *Pediat. Res.* 2002, 52, 377–381
157. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theoret. Biol.* 1973, 41, 181–190

158. Ouellette MM, McDaniel LD, Wright WE, Shay JW, Schultz A. The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 2000, 9, 403–411
159. Ouellette MM, Liao M, Herbert BS, Johnson M, Holt SE, Liss HS, Shay W, Wright WE. Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 10072–10076
160. Oulton R, Harrington L. Telomeres, telomerase, and cancer: life on the edge of genomic stability. *Current Opinion in Oncology* 2000, 12, 74-81
161. O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, Finley JC, Shen WT, Emerson S, Emond MJ, Gollahon KA, Moskovitz AH, Crispin DA, Potter JD, Rabinovitch PS. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nature Genet.* 2002, 32, 280–284
162. Pitts AE, Corey DR. Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 11549-11554
163. Poremb C. Telomerase activity in human proliferative breast lesions. *Int. J. Oncol.* 1998, 12, 641-648
164. Radwańska U. Białaczki u dzieci. 1998, Volumed, Wrocław
165. Ramirez RD, Morales CP, Herbert S, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* 2001, 15, 398–403
166. Ramirez RD, Herbert BS, Vaughan MB, Zou Y, Gandia K, Morales CP, Wright WE, Shay JW. Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of CDK4 in normal human epithelial cells. *Oncogene* 2003, 2, 433–444
167. Rasoul NA, Elhalawani N, Nafae MH, Elkaffash DM, Mourad ZI. Telomerase activity in Philadelphia positive chronic myeloid leukaemia. *Egypt. J. Immunol.* 2004, 11, 1, 1-8

168. Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase and cancer. *Cancer Lett.* 2003, 194, 155–162
169. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998, 16, 1113–1123
170. Rubin H. Cell aging in vivo and in vitro. *Mech. Ageing Dev.* 1997, 98, 1–35
171. Rubio MA, Kim SH, Campisi J. Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 32, 28609-28617
172. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW and DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature Genet.* 2001, 28, 155–159.
173. Saeboe-Larssen S, Fossberg E, Gaudernack G. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. *BMC Molecular Biology* 2006, 7, 26-50
174. Saretzki G, Petersen S, Petersen I, Kolble K, Zglinicki T. hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Letters* 2002, 176, 81-91
175. Saygan-Karamursel B, Dikmen G, Dogan P, Aksu T, Guven S, Ayhan A. Quantitative telomerase activity in malignant, benign and normal gynecological tissues. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2005, 26, 1, 83-86
176. Samani NJ, Boulby R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001, 358, 472–473
177. Schrader M, Muller M, Heicappell R, Straub B, Miller K. Quantification of human telomerase RNA (hTR) and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in testicular tissue of infertile patients. *Asian J. Androl.* 2001, 3, 263-270

178. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature Cell Biol.* 2004, 6, 168–170
179. Serrano M, Blasco M. Putting the stress on senescence. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13, 748–753
180. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997, 88, 593–602
181. Serrano LS, Andres V. Telomeres and cardiovascular disease. *Circul. Research*, 2004, 94, 575-593
182. Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence and cancer. *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 160–168
183. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, 2001, 10, 7, 677-685
184. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004, 23, 2919–2933
185. Shay JW, Wright WE. Telomeres in dyskeratosis congenital. *Nature Genet.* 2004, 36, 437–438
186. Shay JW, Wright WE. Mutant dyskerin ends relationship with telomerase. *Science* 1999, 286, 2284–2285
187. Shay JW. Telomerase in cancer: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cancer J. Sci. Am.* 1998, 4 (suppl. 1), S26–S34
188. Shay JW. Toward identifying a cellular determinant of telomerase repression. *J. Natl Cancer Inst.* 1999, 91, 4–6
189. Shay JW, Wright WE. The use of telomerized cells for tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 22–23

190. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 1997, 33, 787–791
191. Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002, 2, 257–265
192. Shay JW. Telomerase therapeutics: telomeres recognized as a DNA damage signal. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 3521–3525
193. Shay JW, Wright WE. Implications of mapping the human telomerase genes (hTERT) as the most distal gene on chromosome 5p. *Neoplasia* 2000, 2, 195–196
194. Shay JW, Wright WE. Are telomeres double-strand DNA breaks that are hidden from DNA damage responses? *Mol. Cell* 2004, 14, 420–421
195. Shay JW, Wright WE. Use of telomerase to create bioengineered tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1057, 1, 479
196. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000, 102, 407–410
197. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am. J. Hum. Genet.* 1994, 55, 876–882
198. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998, 282, 1484–1487
199. Soder AI, Going JJ, Kaye SB, Keith WN. Tumour specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization. *Oncogene* 1998, 16, 979–983
200. Steinert S, Shay JW, Wright WE. Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 273, 1095–1098.
201. Stetler-Stevenson M, Medeiros LJ, Jaffe ES. Immunophenotypic methods and findings in the diagnosis of lymphoproliferative diseases. in *Surgical Pathology of the Lymph*

Nodes and Related Organs 1995 (2nd edn) (Jaffe ES ed.), pp. 22-57, W. B. Saunders Co.

202. Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nature Genet.* 2003, 33, 492–496
203. Suchara N, Mizumoto K, Tanaka M, Niiyama H, Yokohata K, Tominaga Y, Shimura H, Muta T, Hamasaki N. Telomerase activity in pancreatic juice differentiates ductal carcinoma from adenoma and pancreatitis. *Clin. Cancer Res.* 1997, 3, 2479-2483
204. Suda T, Fujiyama A, Takimoto M, Igarashi M, Kuroiwa T, Waguri N, Kawai H, Mita Y, Aoyagi Y. Interchromosomal telomere length variation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 291, 210–214
205. Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku J, Tahara H, Buley I, Manek S, Wells C, Goodison S, Ide T, Suzuki T, Tahara E, Tarin D. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including one needle aspirates. *Int. J. Cancer* 1996, 69, 301-306
206. Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S, Hurley LH. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 2113-2116
207. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* 2003, 13, 1549–1556
208. Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, Inoue M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res.* 1998, 58, 1558-1561
209. Takuma Y, Nouse K, Kobayashi Y, Nakamura S, Tanaka H, Matsumoto E, Fujikawa T, Suzuki M, Hanafusa T, Shiratori Y. Telomerase reverse transcriptase gene amplification in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004, 19, 1300-4

210. Tang R, Cheng AJ, Wang JY, Wang TC. Close correlation between telomerase expression and adenomatous polyp progression in multistep colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 1998, 58, 4052–4054
211. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Chaffins M, Piatyszek MA, Shay JW. Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *Invest. Dermatol.* 1996, 106, 759-765
212. Theelen W, Reijans M, Simons G, Ramaekers FC, Speel EJ, Hopman AH. A new multiparameter assay to assess HPV 16/18, viral load and physical status together with gain of telomerase genes in HPV-related cancers. *Int. J. Cancer.* 2010, 126, 959-75
213. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 1998, 58, 4168-4172
214. Ulaner GA, Giudice LC. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol. Hum. Reprod.* 1997, 3, 769-773
215. Umbricht CB, Sherman ME, Dome J, Carey LA, Marks J, Kim N, Sukumar S. Telomerase activity in ductal carcinoma-in-situ and invasive breast cancer. *Oncogene* 1999, 18, 3407-3414
216. Umbricht CB, Saji M, Westra WH, Udelsman R, Zeiger MA, Sukumar S. Telomerase activity: a marker to distinguish follicular thyroid adenoma from carcinoma. *Cancer Res.* 1997, 57, 2144-2147
217. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998, 92, 401–413
218. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* 1998, 8, 279–282

219. Vogelstein B., Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993, 9, 138–141
220. Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenital. *Nature*, 2001, 413, 432–435
221. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27, 339–344
222. von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* 1995, 220, 186–193
223. Watson JD. Origin of concatemeric T4 DNA. *Nature* 1972, 239, 197–201
224. Weng NP, Palmer LD, Levine BL, Lane HC, June CH, Hodes RJ. Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging. *Immunol. Rev.* 1997, 160, 43-54
225. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* 2002, 16, 935–942
226. Wei S, Wei W, Sedivy JM. Expression of catalytically activate telomerase does not prevent premature sensescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Research* 1999, 59, 1539-1543
227. Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature Med.* 2000, 6, 849–851



228. Wright WE, Shay JW. Telomere shortening and replicative aging. W Hisama FM, Weissman SM, Martin GM (eds). *Chromosomal Instability and Aging: Basic Science and Clinical Implication*. Marcel Dekker, Inc., New York 2003, 51–72
229. Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol.* 1992, 27, 383–389
230. Wright WE, Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 682–688
231. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 1996, 18, 173–179
232. Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek MA, Shay JW. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *EMBO J.* 1996, 15, 1734–1741
233. Wong KK, DePinho RA. Walking the telomere plank into cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 1184–1186
234. Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet* 2003, 362, 983–988
235. Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, Haughton MF, Wallis C, Wynford-Thomas D, Faragher RG, Kipling D. Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nature Genet.* 2000, 24, 16–17
236. Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, Swan GE, Benowitz NL, Luo S, Spitz, MR. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 1211–1218
237. Yahata N, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Ando K, Hirano T, Tsuchida T, Kato H, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *Natl. Cancer Inst.* 1998, 90, 684–690
238. Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, Bosman FT, Benhattar J. Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *J. Pathol.* 1999, 189, 207–212

239. Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, Bronstein A, Chiu CP and Herron GS. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 26141–26148
240. Yang CT, Lee MH, Lan RS, Cben JK. Telomerase activity in pleural effusions: diagnostic significance. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16, 567-573
241. Yashima K. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. *J. Clin. Pathol.* 1997, 50,110-117
242. Yidong F, Zhaoxu L, Xiaolei F, Zheng G, Nan G, Yong J, Peng S, Fenglan L, Magnus B, Astrid G, Peter E, Dawei X. Differential expression of full-length telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between normal and malignant renal tissues. *Hum. Cancer Biol.* 2005, 11, 12, 4331-4337
243. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 1999, 59, 4175-4179
244. Yoshida K, Sugino T, Tahara H, Woodman A, Bolodeoku J, Nargund V, Fellows G, Goodison S, Tahara E, Tarin D. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 1997, 79, 362-369
245. Yoshida K. Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Eur. J. Cancer* 1997, 75, 548-553
246. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart Jr CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006, 7, 85-96
247. Zhang W, Kapusta LR, Slingerland JM, Klotz LH. Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium. *Cancer Res.* 1998, 58, 619-621

248. Zhang A, Zheng Ch, Lindvall Ch, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, Yan Z, Yang X, Henriksson M, Blennow E, Nordenskjold M, Zetterberg A, Bjorkholm M, Gruber A, Dawei X. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Research* 2000, 60, 6230-6235
249. Zhang A, Zheng C, Hou M, Lindvall C, Wallin KL, Angström T, Yang X, Hellström AC, Blennow E, Björkholm M, Zetterberg A, Gruber A, Xu D. Amplification of the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in cervical carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2002, 34, 269-75
250. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic. *Genes Dev.* 1998, 12, 2997–3007
251. Zou Y, Sfeir A, Shay JW, Wright WE. Groups of short telomeres determine replicative senescence. *Mol. Biol. Cell* 2004, 15, 3709–3718

## *Streszczenie*

Telomeraza zapobiega skracaniu telomerów poprzez odbudowę sekwencji telomerowych. Odwrotna transkryptaza telomerazy (*TERT*) syntetyzuje pojedynczy łańcuch DNA złożony z telomerowych powtórzeń na matrycy RNA (*TERC*). Prawidłowe komórki somatyczne posiadają znikomą aktywność telomerazy w przeciwieństwie do komórek zarodkowych i nowotworowych. Dane dotyczące ekspresji i aktywności telomerazy w nowotworach nie są jednoznaczne. Trudno wytłumaczyć całkowity brak ekspresji lub aktywności telomerazy w komórkach prawidłowych oraz tylko w części przypadków nowotworów. Wydaje się, że różnice aktywności i ekspresji telomerazy w komórkach nowotworowych jak i prawidłowych mają charakter ilościowy a nie jakościowy. Nie wiadomo, czy wysoką aktywność telomerazy można w prosty sposób tłumaczyć amplifikacją genów kompleksu telomerazy. Jak dotąd nie wykonano równoczesnych badań amplifikacji genu *TERT* i *TERC* w powiązaniu z aktywnością i ekspresją telomerazy w chorobach limfoproliferacyjnych u dzieci.

Celem pracy było wykazanie czy ilościowa ocena ekspresji i aktywności telomerazy w komórkach ostrych białaczek u dzieci może być markerem odróżniającym komórki prawidłowe od białaczkowych. Postawiono również pytanie, czy wysoką ekspresję i aktywność telomerazy w komórkach ostrych białaczek można tłumaczyć amplifikacją genów *TERT* i *TERC*.

Cel pracy realizowano poprzez ocenę jakościową i ilościową aktywności i ekspresji telomerazy oraz określenie techniką FISH liczby kopii genu *TERT* i *TERC*. Badania przeprowadzono u 38 dzieci z ALL, 24 z ANLL oraz u 20 zdrowych dawców. Stwierdzono znamienne wyższą aktywność telomerazy w komórkach białaczkowych ALL i ANLL w porównaniu z limfocytami krwi obwodowej zdrowych dawców. Wykazano, że poziom aktywności telomerazy zależy od liczby badanych komórek białaczkowych i prawidłowych. Bezwzględna ekspresja *TERT* i *TERC* w komórkach białaczkowych ALL i ANLL była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej. Względna ekspresja *TERT* i

*TERC* normalizowana w stosunku do ekspresji *ACTB* była znamienne wyższa w komórkach ALL i ANLL w porównaniu z limfocytami krwi obwodowej zdrowych dawców. Nie wykazano istotnych różnic względnej ekspresji *TERT* i *TERC* pomiędzy komórkami ALL i ANLL. Wysoką ekspresję i aktywność telomerazy stwierdzano w komórkach białaczkowych zarówno z amplifikacją *TERT* i *TERC* jak i z prawidłową liczbą kopii tych genów.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że ilościowa ocena aktywności telomerazy zestawem Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS (ROCHE) może odróżniać komórki prawidłowe od białaczkowych. Ponadto udowodniono, że ekspresja *TERT* i *TERC* oceniana techniką PCR w czasie rzeczywistym jest markerem komórek białaczkowych ALL i ANLL. Nie można tłumaczyć wysokiej ekspresji i aktywności telomerazy w komórkach białaczkowych wyłącznie amplifikacją genów *TERT* i *TERC*.

## *Summary*

Telomerase prevents telomere shortening through the restoration of telomeric sequences. Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) synthesized a single chain of DNA composed of telomeric repeats on the telomerase RNA template (*TERC*). Somatic cells have little activity of telomerase, in contrast to germinal and cancer cells. Data on the expression and telomerase activity in cancer are not conclusive. It is difficult to explain the total lack of expression or activity of telomerase in normal cells and only in some cancer cases. It seems that the differences in activity and expression of telomerase in cancer cells as well as normal cells are quantitative rather than qualitative. It is not known whether the high activity of telomerase can be easily explained by gene amplification of telomerase complex. So far, no studies analyzing activity and expression of telomerase in conjunction with *TERT* and *TERC* gene amplification, have been performed in lymphoproliferative diseases in children. The aim of this study was to demonstrate whether quantitative assessment of expression and telomerase activity in cells of acute leukemia in children may be a marker distinguishing normal from leukemic cells. The question was also whether high expression and activity of telomerase in acute leukemia cells can be explained by *TERT* and *TERC* gene amplification.

Aim of the study was to accomplish by qualitative and quantitative evaluation of telomerase activity and expression, as well as by FISH technique to determine the number of *TERT* and *TERC* gene copies. The study was conducted in 38 children with ALL, 24 with ANLL and in 20 healthy donors. Significantly higher telomerase activity in leukemic cells of ALL and ANLL compared to PBL of healthy donors has been found. It was demonstrated that the level of telomerase activity depends on the number of leukemia and normal cells tested.

The absolute expression of *TERT* and *TERC* in ALL and ANLL leukemic cells was statistically significantly higher compared to normal peripheral blood lymphocytes. Relative expression of *TERT* and *TERC* normalized against *ACTB* expression was significantly higher in

ALL and ANLL cells compared to healthy individuals. There were no significant differences in the relative expression of *TERT* and *TERC* between ALL and ANLL cells. High expression and telomerase activity observed in leukemic cells was found either in those with *TERT* and *TERC* amplification as well as in the cells with normal number of copies of these genes.

On the basis of obtained results it can be concluded that quantitative assessment of telomerase activity by Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS (ROCHE) can distinguish normal from leukemic cells. In addition, it was evidenced that the expression of *TERT* and *TERC* evaluated by real time PCR is a marker of leukemic both ALL and ANLL. The high expression and activity of telomerase in leukemic cells cannot be explained only by *TERT* and *TERC* gene amplification.