

Ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy w raku podstawnocomórkowym i kolczystocomórkowym skóry

Expression of human telomerase RNA component (hTR) in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of skin

SABINA GAŁKA¹, URSZULA MAZUREK¹, LIGIA BRZEZIŃSKA-WCISŁO², EWA PIERZCHAŁA³, TADEUSZ WILCZOK¹

¹Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna, kierownik Katedry i Zakładu dr hab. med. Urszula Mazurek

²Katedra i Klinika Dermatologii, Śląska Akademia Medyczna, kierownik Katedry i Kliniki prof. dr hab. med. Ligia Brzezińska-Wcisło

³Zakład Medycyny Estetycznej, Śląska Akademia Medyczna, kierownik Zakładu dr med. Ewa Pierzchała

Abstract

hTR subunit of telomerase is known to be responsible for cell immortalization. The aim of the study was to examine transcriptional activity of the hTR gene by QRT-PCR in BCC (basal cell carcinoma) and SCC (squamous cell carcinoma) and to estimate the correlation between hTR expression and malignancy grade of the disease. Molecular analysis was carried out on biopsy specimens collected from patients with BCC (n=9) and SCC (n=9). Levels of hTR mRNA was measured by real-time QRT-PCR technique in total RNA extracted from the studied material. hTR mRNA was present in all 18 cases. Mean copy number of hTR mRNA in 1 µg of total RNA was 1.58×10^4 in BCC samples and 6.01×10^4 in SCC samples. Expression of hTR encoding gene was significantly higher in SCC as compared to BCC (t-test with separate estimation of variance, $p=0.001$). Quantitative analysis performed in this study indicates that the transcriptional activity of hTR gene is elevated in SCC as compared to BCC (approximately 3.8 times). Thus, we suggest that expression of the hTR subunit of telomerase may be involved in the progression of malignant transformation in the course of the disease.

Key words: hTR, telomerase, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, real time QRT-PCR.

Streszczenie

Celem naszych badań było wyznaczenie aktywności transkrypcyjnej genu hTR – podjednostki telomerazy odpowiedzialnej za immortalizację komórek, techniką QRT-PCR w raku podstawnocomórkowym (BCC) i raku kolczystocomórkowym (SCC) oraz ocena korelacji ekspresji hTR ze stopniem złośliwości choroby. Ocenie molekularnej poddano wycinki uzyskane od pacjentów, u których rozpoznano BCC (n=9) i SCC (n=9). Z uzyskanych wycinków wyizolowano RNA, który stanowił matrycę w reakcji real time QRT-PCR, w czasie której oznaczono liczbę kopii mRNA hTR. Wykazano obecność mRNA podjednostki hTR genu telomerazy we wszystkich 18 wycinkach. W komórkach raka BCC wykazano średnio $1,58 \times 10^4$ a w SCC $6,01 \times 10^4$ kopii mRNA hTR/1 µg RNA. Ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy była statystycznie wyższa w SCC w porównaniu z BCC (test t z oddzielną estymacją wariancji, $p=0,001$). Ocena ilościowa, za pomocą real time QRT-PCR, wskazuje na podwyższoną aktywność transkrypcyjną podjednostki hTR (o ok. 3,8 raza) w raku SCC w porównaniu z rakiem BCC skóry, a zatem możemy podejrzewać, że ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy może być czynnikiem biorącym udział w powstawaniu bardziej złośliwego charakteru nowotworu.

Adres do korespondencji: mgr Sabina Gałka, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Narcyzów 1, 41-206 Sosnowiec, tel. +48 32 291 43 93; faks +4832 291 74 66; e-mail: sabinaga@op.pl

Słowa kluczowe: hTR, telomeraza, rak podstawnocomórkowy, rak kolczystocomórkowy, real time QRT-PCR.

(*PDiA 2005; XXII, 6: 288–292*)

Wprowadzenie

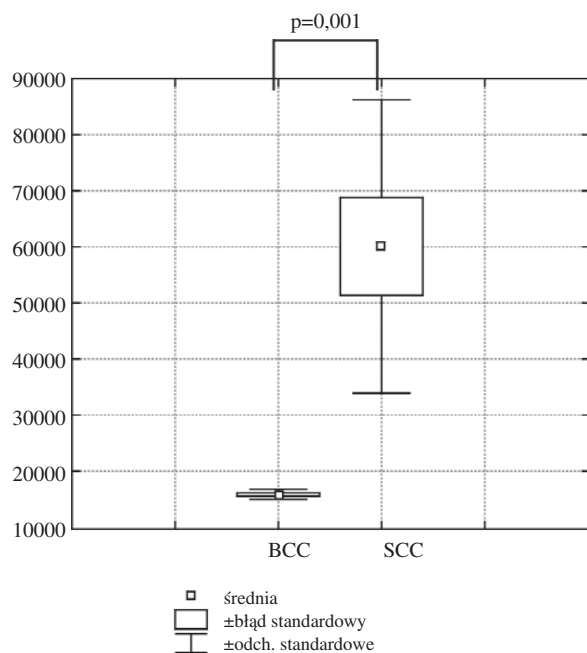
Rak skóry jest u ludzi rasy białej jednym z najczęściej występujących nowotworów. Stanowi ok. 98% wszystkich nowotworów złośliwych skóry i ok. 1/3 wszystkich nowotworów złośliwych. Do najczęstszych raków skóry należy rak podstawnocomórkowy (*carcinoma basocellulare*, BCC) i rak kolczystocomórkowy (*carcinoma spinocellulare*, SCC). BCC jest nowotworem skóry o stosunkowo niewielkiej i tylko miejscowej złośliwości, niedającym przerzutów, rozprzestrzeniającym się kosztem otaczających go tkanek. Natomiast SCC jest bardziej niebezpieczny ze względu na znacznie większą złośliwość, skłonność do naciekania oraz możliwość pojawiania się przerzutów. Poszukiwanie różnic molekularnych pomiędzy tymi nowotworami może wskazać na czynniki biorące udział w powstawaniu większej złośliwości choroby. Telomeraza jest enzymem syntetyzującym telomery DNA,

przez co odgrywa istotną rolę w starzeniu się komórki, jej nieśmiertelności i nieograniczonym namnażaniu się (immortalizacji). Składową telomerazy jest podjednostka hTR, będąca matrycą dla syntezy brakujących fragmentów telomerów [1], może ona również wpływać na ekspresję [2] i aktywność telomerazy [3]. Autorzy licznych badań wskazują, że podjednostka hTR genu telomerazy może być użyta jako marker chorób nowotworowych, m.in. w raku endometrium [4], białaczce [5], nowotworach tkanki nerwowej [6]. W czerniaku skóry (*melanoma malignum*, MM) gen ten może być wykorzystany jako marker złośliwości i przerzutowania [7] oraz może mieć zastosowanie w terapii nowotworowej czerniaka [8] i raka trzustki [3]. Jednak badania ekspresji hTR w raku żołądka i okrężnicy [9], w raku płuc [10] i endometrium [11] oraz w różnych nowotworach skóry [12, 13] nie potwierdzają korelacji ekspresji tego genu z chorobą.

Tab. 1. Charakterystyka kliniczna i molekularna pacjentów z rakiem podstawnocomórkowym i kolczystocomórkowym

Numer pacjenta	Rozpoznanie kliniczne	Płeć	Wiek (lata)	Średnica guza (cm)	Liczba kopii mRNA hTR/1 µg RNA
1	BCC	M	85	3	16 932
2	BCC	M	85	3	15 240
3	BCC	M	85	1,6	15 700
4	BCC	M	85	1,6	14 927
5	BCC	K	75	1	15 640
6	BCC	K	75	1	16 100
7	BCC	K	72	0,3	16 048
8	BCC	K	72	0,3	14 550
9	BCC	M	79	1,5	17 351
10	SCC	M	85	2	14 552
11	SCC	M	85	2	83 200
12	SCC	M	72	2,5	98 727
13	SCC	M	72	2,5	48 431
14	SCC	M	77	2,5	69 200
15	SCC	K	77	2,5	65 800
16	SCC	K	58	0,5	29 000
17	SCC	K	58	0,5	59 220
18	SCC	K	73	1	72 540

BCC – rak podstawnocomórkowy, SCC – rak kolczystocomórkowy, M – mężczyzna, K – kobieta



Ryc. 1. Rozkład liczby kopii mRNA podjednostki hTR/1 µg całkowitego RNA w raku podstawnocomórkowym i kolczystocomórkowym

W związku z powyższymi, sprzecznymi doniesieniami na temat korelacji ekspresji hTR z procesem nowotworowym przeprowadziliśmy analizy oparte na ilościowej ocenie ekspresji podjednostki hTR genu telomerazy w 2 najczęściej występujących rakach skóry, a różniących się stopniem złośliwości: w raku podstawnocomórkowym i kolczystocomórkowym.

Celem naszych badań było oznaczenie stopnia aktywności transkrypcyjnej genu hTR – podjednostki telomerazy odpowiedzialnej za immortalizację komórek techniką *real time* QRT-PCR w BCC i SCC oraz porównanie ekspresji genu hTR w tych 2 guzach skóry.

Material i metody

Ocenie molekularnej poddano wycinki tkanek nowotworowych uzyskane od 18 pacjentów (10 mężczyzn, 8 kobiet), średnia wieku 76 lat, którzy zostali poddani zabiegowi chirurgicznego usunięcia guzów skóry. Materiał do badań porcjowano na 2 części: pierwsza część przeznaczona była do badania patomorfologicznego, drugi jej fragment przechowywano w temp. -80°C do momentu analizy molekularnej. W próbkach, w których rozpoznano raka podstawnocomórkowego (n=9) i raka kolczystocomórkowego (n=9), oceniano ekspresję mRNA podjednostki hTR genu telomerazy (tab. 1.).

Izolacja RNA przeprowadzona została za pomocą metody chloroformowo-fenolowej, opisaną przez Chom-

czyńskiego i Sacchi [14]. Ekstrakty RNA oczyszczano poprzez trawienie DNA-zą I na kolumnach RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niemcy) w celu uniknięcia zanieczyszczeń genomowym DNA. Otrzymany RNA stanowił matrycę w reakcji *real time* QRT-PCR dla oznaczenia liczby kopii mRNA podjednostki hTR genu telomerazy. Amplifikacja prowadzona była jednostopniowo w obecności termostabilnej polimerazy Tth, primerów (hTR-24 5' AGG CGC CGT GCT TTT GCT CC 3', hTR-146 5' GGC CAG CTG ACA TTT TTT GTT T 3') i sondy hybrydacyjnej (S-hTR 5' FAM CCT GCC GCC TTC CACCGT TCA TTC TAMRA 3') z zastosowaniem detektora sekwencji ABI PRISM™ 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [15].

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą testu F Snedecora dla określenia wariacji porównywanych prób oraz test t z oddzielną estymacją wariacji dla prób niezależnych, przyjmując poziom istotności $p < 0,05$.

Badania przeprowadzone zostały zgodnie z wymogami *Deklaracji helsińskiej*.

Wyniki

W wyniku reakcji *real time* QRT-PCR wykazano obecność mRNA podjednostki hTR genu telomerazy we wszystkich 18 wycinkach pobranych z raka podstawnocomórkowego i kolczystocomórkowego. Według komercyjnie dostępnego zestawu stężeń β-aktyny (od 1×10^3 do 2×10^4 kopii mRNA β-aktyny) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wykreślono krzywą standardową i na jej podstawie obliczono liczbę kopii mRNA podjednostki hTR genu telomerazy w badanych próbkach. Następnie uzyskane liczby kopii mRNA zostały przeliczone na 1 µg całkowitego RNA. W komórkach BCC ekspresja mRNA hTR była niższa (od 14 550 do 17 351 kopii mRNA hTR/1 µg RNA) w porównaniu z komórkami SCC (14 552 do 98 727 kopii mRNA hTR/1 µg RNA) (tab. 1.). Średnia ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy była o ok. 3,8 raza większa w raku kolczystocomórkowym w porównaniu z rakiem podstawnocomórkowym. Ze względu na to, że wariacje porównywanych prób były statystycznie różne (test F Snedecora), porównania średnich dokonano testem t z oddzielną estymacją wariacji, który wykazał, że ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy była statystycznie wyższa w SCC w porównaniu z BCC ($p=0,001$) (ryc. 1.).

Omówienie wyników

W naszych badaniach wykazano ekspresję hTR we wszystkich pobranych wycinkach z raka podstawnocomórkowego i raka kolczystocomórkowego. Jednak oce-

na ilościowa za pomocą *real time* QRT-PCR wskazała na podwyższoną ekspresję hTR w raku o większej złośliwości (SCC) w porównaniu z rakiem o mniejszej złośliwości (BCC), a zatem możemy podejrzewać, że ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy może korelować ze złośliwością choroby. Dane literaturowe potwierdzają nasze wyniki, świadczące o tym, że podwyższona aktywność transkrypcyjna podjednostki hTR może korelować z bardziej złośliwym typem nowotworu skóry. Wiele innych prac wskazuje, że podjednostka hTR obecna jest zarówno w tkankach nowotworowych, jak i prawidłowych, ale poziom jej ekspresji koreluje z przerzutami i wielkością guza w raku żołądka [16] oraz ze stopniem zaawansowania raka krtani [17]. Badania w raku piersi wykazały, że wysoka ekspresja podjednostki hTR wiązała się z gorszą prognozą co do przeżycia [18]. Stwierdzono również, że słaba ekspresja ww. jednostki obserwowana była w łagodnych wzrostach tkanek gruczołu sutkowego, średnia w atypowym rozroście, silna w ciężkim atypowym rozroście, natomiast największą ekspresję stwierdzano w raku sutka, a zatem ekspresja hTR genu telomerazy korelowała ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej [19]. W nowotworach tkanki nerwowej zaobserwowano silną ekspresję podjednostki hTR w zaawansowanych guzach typu neuroblastoma, co wiąże się ze złą prognozą kliniczną, a we wczesnym okresie procesu nowotworowego słabą ekspresję (dobra/bardzo dobra prognoza kliniczna). W związku z tym autorzy wysunęli wniosek, że podjednostka hTR może być dobrym wskaźnikiem agresywności nowotworów tkanki nerwowej [6]. Inne badania wskazują, że podjednostka hTR genu telomerazy może być użyta jako nowy marker diagnostyczny złośliwości czerniaka. Autorzy japońscy wykazali, że ekspresja podjednostki hTR genu telomerazy występowała częściej w czerniaku niż w znamieniu barwnikowym i w normalnej skórze. Co więcej, intensywność ekspresji hTR była statystycznie silniejsza w przerzutujących czerniakach niż w czerniakach niedających przerzutów, co może być wykorzystane w prognozowaniu przerzutowania [7]. Wykazano również, że poziom telomerazowego RNA w tkance czerniaka koreluje z klinicznym stopniem zaawansowania choroby i może pomagać w diagnozie tkanki z linii cięcia operacyjnego [20].

Jednak wyniki badań innych autorów nie potwierdzają korelacji ekspresji podjednostki hTR z chorobą. Okazało się, że ekspresja hTR genu telomerazy występuje zarówno w rakach żołądka i okrężnicy, jak i w normalnej błonie śluzowej i w limfocytach krwi obwodowej [9], w raku płuc i w przyległej do niej prawidłowej tkance [10] oraz w normalnych i nowotworowych wycinkach pobranych z endometrium [11]. Również ana-

lizy przeprowadzone przez Hu i wsp. [13] wykazały ekspresję hTR zarówno w prawidłowej skórze, w nieprzerzutowym i złośliwym raku, oraz w rogowaceniu słonecznym i w stanach zapalnych skóry. Wyniki te potwierdzają również badania Wu i wsp., które wykazały ekspresję hTR z podobną częstotliwością zarówno w prawidłowej skórze, jak i w różnych jej schorzeniach (znamię wywodzące się z komórek znamionowych, rogowacenie łojotokowe, guz wywodzący się z gruczołów potowych ekrynowych, choroba Bowena, rogowacenie słoneczne, BCC, MM, mięsak wywodzący się z komórek jasnokórkowych, SCC, rak wywodzący się z gruczołów potowych ekrynowych, złośliwy guz wywodzący się z histiocytozów, złośliwy guz wywodzący się z mięśnia przywłośnego) [12]. Wyniki te wskazują, że ekspresja hTR genu telomerazy nie jest związana ze złośliwymi zmianami skórnymi. Jednak powyższe doniesienia, niepotwierdzające korelacji ekspresji podjednostki hTR z rozwojem choroby nowotworowej żołądka, okrężnicy, płuc, endometrium i skóry opierały się jedynie na badaniu częstości występowania mRNA podjednostki hTR w badanych grupach. Analizy te nie uwzględniały jednak różnic w poziomie aktywności transkrypcyjnej podjednostki hTR. Analiza jakościowa wydaje się być niewystarczająca przy określeniu korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną podjednostki hTR a zaawansowaniem choroby. Nasze badania, przeprowadzone na podstawie analizy ilościowej *real time* QRT-PCR wykazały korelację ekspresji hTR z bardziej złośliwym typem nowotworu skóry, a więc wydaje się, że ocena molekularna podjednostki hTR powinna być wykonana na podstawie analizy ilościowej, a nie tylko jakościowej.

Udział podjednostki hTR w procesie nowotworzenia nie został do końca wyjaśniony. Podjednostka hTR jest składową telomerazy, enzymu, który syntetyzuje DNA telomerów. W trakcie każdego podziału komórek somatycznych zachodzi systematyczne skracanie terminalnych fragmentów chromosomów, czyli utrata DNA telomerów, co prowadzi do blokady podziałów i śmierci komórek. Telomeraza jest enzymem o aktywności odwrotnej transkryptazy specyficznie wydłużającej koniec 3' DNA, a więc utrzymuje ona stałą długość telomerów i zapewnia przekazanie komórce potomnej pełnej informacji genetycznej. Aktywność telomerazową stwierdzono w komórkach nowotworowych, co wiąże się z nieśmiertelnością tych komórek i ich zdolnością do nieograniczonych podziałów [21]. Z danych literaturowych wynika, że podjednostka hTR może regulować zarówno ekspresję [2], jak i aktywność telomerazy [3], a zatem hTR wydaje się być jednym z genów biorących udział w transformacji nowotworowej. Korelacja pomiędzy podwyższoną ekspresją hTR a bar-

dziej złośliwym rakiem SCC nasuwa przypuszczenie, że poziom ekspresji tego genu poprzez silniejszą stymulację telomerazy może wpływać na powstanie bardziej złośliwego raka skóry.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować mgr Longinie Świątkowskiej z Katedry i Zakładu Analizy Instrumentalnej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach za nieocenioną pomoc w statystycznym opracowaniu wyników.

Piśmiennictwo

1. Counter CM: The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res* 1996; 366: 45-63.
2. Natarajan S, Chen Z, Wancewicz EV, et al.: Telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and telomerase RNA (hTR) as targets for downregulation of telomerase activity. *Oligonucleotides* 2004; 14: 263-73.
3. Hayashidani Y, Hiyama E, Murakami Y, et al.: Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozymes targeting human telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in pancreatic carcinoma cells. *Hiroshima J Med Sci* 2005; 54: 21-7.
4. Błasiak J, Kadłubek M, Kubryn I, et al.: Expression of human telomerase subunit genes in endometrial cancer. *Pol J Gynecol Investig* 2001; 3: 153-6.
5. Nowak J, Januszkiewicz-Lewandowska D, Pernak M, et al.: Wysoka aktywność i ekspresja telomerazy jako marker nowotworowy w ostrych białaczkach u dzieci. *Pediatr Prakt* 2002; 10: 33-6.
6. Maitra A, Yashima K, Rathi A, et al.: The RNA component of telomerase as a marker of biologic potential and clinical outcome in childhood neuroblastic tumors. *Cancer* 1999; 85: 741-9.
7. Wei Q, Fen S. Significance of human telomerase RNA expression in situ in malignant melanoma. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1999; 24: 107-9.
8. Glukhov AI, Zimnik OV, Gordeev SA, et al. Inhibition of telomerase activity of melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 368-71.
9. Nowak J, Januszkiewicz D, Lewandowski K, et al.: Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 75-80.
10. Chen W, Xiong X, Zhou H, et al.: Expression of telomerase activity, telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 290-2.
11. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, et al.: Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer* 1999; 80: 60-3.
12. Wu A, Ichihashi M, Ueda M: Correlation of the expression of human telomerase subunits with telomerase activity in normal skin and skin tumors. *Cancer* 1999; 86: 2038-44.
13. Hu S, Chan HL, Chen MC, et al.: Telomerase expression in benign and malignant skin neoplasms: comparison of three major subunits. *J Formos Med Assoc* 2002; 101: 593-7.
14. Chomczyński P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
15. Witek A, Mazurek U, Paul M i wsp.: Ilościowa ocena ekspresji genów telomerazy TERT, HTP1 i TR w prawidłowym endometrium. *Gin Pol* 2001; 72, 12a: 1543-8.
16. Yoo J, Park SY, Kang SJ, et al.: Expression of telomerase activity, human telomerase RNA, and telomerase reverse transcriptase in gastric adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2003; 16: 700-7.
17. Du BD, Wang P, Liu G, et al.: Telomerase activity and expression of its RNA component in laryngeal cancer. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2000; 14: 390-2.
18. Poremba C, Heine B, Diallo R, et al.: Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *J Pathol* 2002; 198: 181-9.
19. Song M, Mi X, Li B, et al.: Expression of telomerase genes in cancer development in atypical hyperplasia of the mammary duct. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 1221-5.
20. Ramirez RD, D'Atri S, Pagani E, et al.: Progressive increase in telomerase activity from benign melanocytic conditions to malignant melanoma. *Neoplasia* 1999; 1: 42-9.
21. Jaruga E. Udział telomerów w regulacji podziałów komórkowych i starzeniu. *Kosmos* 1999; 48: 255-64.