

Detekcija telomerazne mRNA v plazmi bolnic s karcinomom dojke

V Stegel, J Žgajnar, S Novaković

Onkološki inštitut Ljubljana

Uvod: Pravočasno odkrivanje tumorskih celic v cirkulatornih sistemih bi lahko prispevalo k uspešnejšemu zdravljenju bolnic s karcinomom dojke. Klasični tumorski označevalci, ki so sedaj v uporabi (CA 15-3, MCA, CEA), nam tega zaradi svoje premajhne specifičnosti ne omogočajo. Uporaba PCR in sorodnih metod, s katerimi lahko pomnožimo izredno majhne količine za tumorske celice značilne DNA in cDNA, postavlja molekularne označevalce v ospredje dokazovanja in odkrivanja prisotnosti tumorskih celic. Eden od obetavnih molekularnih označevalcev za tumorske celice je telomeraza, ki deluje kot reverzna transkriptaza pri podvojevanju telomernih regij na koncih kromosomov. Na ta način telomeraza stabilizira kromosome. V normalnih diferenciranih celicah je gen za telomerazo neaktiven, kar pomeni, da se konci kromosomov ne obnavljajo in so ob vsaki delitvi celice krajši za nekaj baznih parov. Po določenem številu delitev je popolna podvojitev kromosomov onemogočena (zaradi prekratkih koncev kromosomov), kar celico preusmeri v proliferativno senescenco (celica se ne deli več) ali v apoptozo. Potencialno nesmrtno celice (med katere prištevamo tudi tumorske celice) normalno izražajo telomerazni gen in tvorijo telomerazo. Na ta način preprečijo krajšanje kromosomov in omogočajo neskončno število celičnih delitev. Telomeraza je protein sestavljen iz vsaj dveh aktivnih podenot: RNA podenote (TR), ki služi kot matrica za dodajanje ponavljajočih se nukleotidov v telomerah in katalitske podenote (TERT), ki deluje kot reverzna transkriptaza. Ker sta za delovanje encima pomembni obe podenoti, smo v naših študijah ugotavljali prisotnost mRNA za TR in TERT. Namen je bil dokazati prisotnost telomeraznih mRNA v plazmi bolnic s karcinomom, ter oceniti uporabno vrednost teh molekularnih označevalcev za zgodnje odkrivanje tumorskih celic in prognozo bolezni.

Materiali in metode:

Bolniki: V študijo je bilo vključenih 25 bolnic s karcinomom dojke in 7 zdravih oseb.

Zbiranje vzorcev: Deset ml krvi v epruvetah z EDTA smo centrifugirali pri 880xg 10 min. Supernatant smo ponovno centrifugirali na 880xg za 10 min. Iz tako dobljene plazme smo izolirali celotno RNA s Trizol LS reagentom.

RT-PCR: V prvem delu smo celotno RNA prepisali v cDNA. Nato pa smo s PCR pomnožili fragmente GAPDH (308bp)-kontrola, hTR (111bp) in hTERT

(95bp). PCR produkte smo analizirali z agarozno ali poliakrilamidno gelsko elektroforezo.

Rezultati: V plazmi zdravih oseb je bil kontrolni GAPDH pozitiven pri vseh, hTR pri treh, hTERT pa v nobenem primeru. Med 25 bolniki s karcinomom dojke je bilo 23 hTR pozitivnih, 12 je hTERT pozitivnih. Dva bolnika, ki sta bila negativna za hTR in hTERT sta negativna tudi za GAPDH, ki je bil sicer pozitiven pri vseh ostalih bolnikih.

Zaključek: Rezultati naše študije kažejo, da hTR ni uporaben kot tumorski marker, ker je prisoten pri vseh bolnikih s karcinomom dojke in pri 40% zdravih testiranih oseb. hTERT pa bi lahko bil uporaben za detekcijo specifične RNA, ki izvira iz tumorskih celic. Nekateri prekurzorji limfocitov imajo aktivno telomerozo, zato lahko detekcija njihove RNA vodi do lažno pozitivnih rezultatov. Zato bi bilo ustrezneje hTERT kvantitativno določati.