مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱۷/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۲

بیان ژن TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما

سپیده دشتی[۱]، سعیده عشوری[۱]، دکتر مجید خیرالهی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تومورهای مغزی مرگ و میر بالایی را سبب می‌شوند. علاوه بر این، در درجه‌های توموری پیشرفته، قدرت تهاجم بالایی داشته، پیش آگهی بدتری دارند. تلومرها، توالی‌های تکراری و طویل DNA در دو انتهای کروموزوم‌های خطی هستند که از انتهای کروموزوم در مقابل نوترکیبی، اتصال و تخریب DNA محافظت نموده، از پیری سلولی جلوگیری می‌نمایند. در مهره‌داران، تلومرها از تکرارهای پشت سر هم شش نوکلوتیدی TTAGGG تشکیل شده‌اند. تلومرها با وجود ساختار هتروکروماتینی خود، به صورت نوعی RNA غیر کد کننده‌ی موسوم به TERRA (Telomeric repeat-containing RNA) رونویسی می‌شوند و این RNA، به عنوان مهارکننده‌ی طبیعی تلومراز عمل می‌نماید. با توجه به این امر که آستروسیتوما از شایع‌ترین تومورهای دستگاه عصبی مرکزی است و پیش‌آگهی بالینی بدی دارد، هدف از این مطالعه، سنجش میزان بیان TERRA در تومورهای مغزی آستروسیتوما و نمونه‌های شاهد غیر توموری بود. به علاوه، بیان رونوشت TERRA در درجات توموری مختلف آستروسیتوما سنجیده شد.

روش‌ها: mRNA از ۲۶ نمونه‌ی تومور آستروسیتوما و ۴ نمونه‌ی شاهد غیرتوموری استخراج شد. DNA مکمل (cDNA) سنتز شد و سطح بیان TERRA با روش Real-time reverse transcription polymerase chain reaction با استفاده از کیت SYBR Green در درجات مختلف توموری به همراه نمونه‌های طبیعی ارزیابی شد.

یافته‌ها: بر اساس مقایسه‌ی بیان نسبی ژن TERRA بین درجات توموری مختلف در آستروسایتوما، میانگین ΔCt در درجات بالای توموری (III و IV) نسبت به درجه‌ی پایین (II) کاهش نشان داد و این امر حاکی از کاهش بیان TERRA در درجه‌های بالای آستروسایتوما به میزان ۴/۳۷۷ برابر نسبت به درجه‌ی پایین بود (P = ۰/۰۳۶). افزون بر این، اندازه‌گیری بیان TERRA در آستروسایتوما به میزان ۴/۹۶۹ برابر، کاهش بیان در مقایسه با نمونه‌های شاهد غیرتوموری نشان داد (P = ۰/۰۲۹).

نتیجه‌گیری: مطابق این بررسی و سایر مطالعات انجام شده در این مورد، احتمال می‌رود، TERRA بتواند به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی مطرح شود.

واژگان کلیدی: بیان ژن، ژن TERRA، تلومر، آستروسیتوما

ارجاع: دشتی سپیده، عشوری سعیده، خیرالهی مجید. **بیان ژن TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۷): ۲۳۴۲-۲۳۳۳

مقدمه

تلومرها، توالی‌های تکراری و طویل DNA در دو انتهای کروموزوم‌های خطی هستند، از انتهای کروموزوم در مقابل نوترکیبی، اتصال و تخریب

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیشگیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیشگیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیرالهی

Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

DNA محافظت نموده، از پیری سلولی جلوگیری می‌کنند. به طور کلی، وظیفه‌ی آن‌ها حفظ پایداری کروموزومی می‌باشد (۲-۱). در مهره‌داران، تلومرها از تکرارهای پشت سر هم شش نوکلوتیدی TTAGGG تشکیل شده‌اند (۳-۲).

در طی هر چرخه‌ی تقسیم سلولی، به علت ناپایداری DNA پلی‌مراز در همانندسازی انتهای 5´ در DNA خطی، حدود ۱۰۰-۵۰ جفت باز از انتهای تلومرها از دست می‌رود (۵-۴). یکی از راه‌های ممکن جهت پیش‌گیری از دست رفتن تلومرها، فعال‌سازی مکانیسم‌های نگه دارنده‌ی طول تلومر (Telomere maintenance mechanism یا TMM) می‌باشد که موجب نامیرایی سلولی می‌شود و به عنوان یکی از ویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی توصیف شده است (۷-۶).

تا کنون، دو نوع مکانیسم نگه‌داری طول تلومر شناسایی شده است که شامل تلومراز و Recombination-based alternative lengthening of telomeres (ALT) می‌باشد. فعال‌سازی تلومراز (Tel-TMM)، مکانیسم اصلی نگه‌دارنده‌ی طول تلومر در ۸۵ درصد از سرطان‌های انسانی است (۸). فعالیت تلومراز در ۱۰ تا ۱۵ درصد از سرطان‌های انسانی دیده نشده است و در زیرمجموعه‌ای از این تومورها، از مکانیسم‌های جایگزین برای نگهداری طول تلومر (Alternative lengthening of telomeres یا ALT) استفاده می‌شود، که مبتنی بر نوترکیبی همولوگ می‌باشد (۱۰-۹). برخی از سلول‌های توموری نیز از ترکیبی از این نوع مکانیسم‌های نگه‌دارنده‌ی طول تلومر استفاده می‌کنند (۱۱).

فنوتیپ ALT به ندرت در بدخیمی‌های اپی‌تلیالی مشاهده می‌شود و در زیر مجموعه‌هایی از سارکوما و آستروسیتوما به نسبت معمول است (۱۳-۱۲). البته، باید توجه نمود که شیوع ALT، به‌طور کامل در همه‌ی انواع سرطان‌ها ارزیابی نشده است. به طور کلی، در اکثر موارد بررسی شده، مکانیسم نگهداری طول تلومر ALT در تومورهای خوش‌خیم و بافت‌های طبیعی مشاهده نشده است (۱۶-۱۴، ۱۱).

در طی مطالعات اخیر مشخص شده است که با وجود ساختار هتروکروماتینی تلومر، تلومرهای یوکاریوتی رونویسی می‌شود و به رونوشت آن‌ها، Telomeric repeat containing RNA (TERRA) می‌گویند (۲۰-۱۷). در واقع، TERRA یک Long noncoding RNA می‌باشد که در جانوران و قارچ‌ها شناسایی شده است و تمام اجزای هتروکروماتین تلومری را تشکیل می‌دهد (۲۰، ۱۸). رونویسی از روی TERRA در اغلب، و یا در تمام، انتهاهای کروموزومی انجام می‌شود و این فرایند، با فاکتورهای نظارت RNA (RNA surveillance factors) تنظیم می‌شود. این رونویسی در پاسخ به تغییر طول تلومر انجام می‌پذیرد (۲۰). TERRA از نواحی زیر تلومری تا انتهای کروموزوم رونویسی شده، جهت رونویسی در آن، از سمت سانترومر به سمت تلومر می‌باشد (۱۹-۱۷). سنتز TERRA در پستانداران و مخمر توسط RNA پلی‌مراز II انجام می‌گیرد (۲۱، ۱۹-۱۸). به نظر می‌رسد، کاهش بیان TERRA با فعالیت تلومراز مرتبط بوده، می‌تواند نشانگر عملکرد مهاری TERRA بر روی تلومراز باشد (۲۲، ۲۰، ۱۸).

در تومورهایی که از تلومراز به‌عنوان مکانیسم نگه‌دارنده‌ی طول تلومر استفاده می‌شود، نظیر مراحل

پیشرفته‌ی سرطان حنجره، سرطان کولون و تومورهای گره‌های لنفاوی، بیان TERRA در مقایسه با بافت طبیعی کاهش می‌یابد (۲۳). غلظت‌های بالای رونوشت TERRA در تومورهایی با طول تلومر بلند، که فاقد فعالیت تلومرازی هستند، مشاهده شده است (۳). این نتایج، بیانگر این موضوع است که افزایش سطح TERRA می‌تواند به عنوان نشانگری برای ALT TMM محسوب شود (۲۴). بنابراین، جداسازی بیماران بر اساس نوع مکانیسم نگهداری طول تلومر، به منظور انتخاب بهترین روش درمانی مورد نیاز خواهد بود و می‌تواند به پزشکان در تشخیص نوع تومور کمک نماید (۲۵-۲۴). برای مثال، در آینده‌ی نزدیک، مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های تلومراز و ALT-TMM می‌توانند، به عنوان یک عامل درمانی اختصاصی اهمیت پیدا نمایند (۲۶).

آستروسیتوما از تومورهای سیستم عصبی مرکزی است که به صورت اولیه از آن منشأ گرفته، نئوپلاسم سلول‌هایی می‌باشد که اغلب از آستروسیت نامیرا منشأ گرفته است. سازمان بهداشت جهانی، چهار درجه‌ی هیستولوژیک برای آستروسیتوما پایه‌گذاری نمود تا به همه، سردرگمی‌های مربوط به تشخیص این نوع از تومورهای مغزی خاتمه دهد. درجه‌های پایین آستروسیتوما (I و II) کمتر از درجه‌های بالا متداول بوده، کمتر از ۶ درصد موارد آن را شامل می‌شود. در حالی که بالاترین درجه، که گلیوبلاستومای چند شکل (درجه‌ی IV) نامیده می‌شود، متداول‌ترین بدخیمی سیستم عصبی مرکزی اولیه می‌باشد. گلیوبلاستومای چند شکل، یکی از مهاجم‌ترین انواع نئوپلاسم با میانگین بقای یک سال پس از تشخیص است. با وجود پیشرفت‌های تحقیقی مهمی که در چند دهه‌ی اخیر رخ داده است، بروز میزان بقای بیماران در این مدت تغییر نکرده است و تعداد کمی از بیماران با آستروسیتوما و گلیوبلاستوما بیش از ۲ سال پس از تشخیص، زنده می‌مانند (۲۸-۲۷).

با توجه به نقش حیاتی تحقیقات مختلف در یافتن یک نشانگر تشخیصی مناسب در آستروسایتوما، سطح بیان TERRA در نمونه‌های بافت توموری آستروسایتوما با استفاده از تکنیک Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)، اندازه‌گیری شد. به علاوه، سطح بیان TERRA بین درجه‌های مختلف آستروسایتوما سنجش شد و با نمونه‌های شاهد غیرتوموری از بافت مغز مقایسه گردید.

روش‌ها

۲۶ بیمار مبتلا به تومور مغزی از نوع آستروسایتوما مورد جراحی قرار گرفتند. همچنین، اتوپسی از مغز ۴ جسد انسان، جهت جمع‌آوری نمونه‌های بافتی شاهد غیرتوموری انجام گرفت (۲۴). نمونه‌های بافتی از بیمارستان الزهرای (س) شهر اصفهان در فاصله‌ی زمانی بین سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۲ جمع‌آوری شد. بافت توموری، بلافاصله پس از برش، در اتاق عمل در نیتروژن مایع فریز شد. این نمونه‌ها، بر اساس طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO یا World Health Organization)، درجه‌بندی شد (۲۹). این مطالعه، مطابق دستورالعمل‌های کمیته‌ی اخلاق محلی و با دریافت رضایت کتبی از بیماران، در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

استخراج RNA با استفاده از ماده‌ی Trizol مطابق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده

(Invitrogen, Carlsbad, CA)، از نمونه‌های بافتی انجام شد. خلوص RNA استخراج شده، به وسیله‌ی اندازه‌گیری‌های فوتومتریک با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. نسبت طول موج‌های خوانده شده در ۲۸۰–۲۶۰ نانومتر، بین ۲/۲–۱/۷ قرار گرفت. افزون بر این، کیفیت RNA به وسیله‌ی الکتروفورز در ژل آگارز بررسی شد. نسبت شدت سیگنال ۱۸S/۲۸S rRNA محاسبه شد و اعداد بین ۱/۵ و ۲/۵ مورد پذیرش قرار گرفت.

به منظور حذف DNA ژنومی از نمونه‌های RNA، تیمار با آنزیم DNase I انجام شد. DNA مکمل (cDNA) به وسیله‌ی کیت سنتز cDNA مارک RevertAid™ H Minus First Strand (Fermentas, Vilnius, Lithuania)، از دو میکروگرم RNA توسط پرایمرهای Random hexanucleotide سنتز شد. تمامی مراحل مطابق پروتکل کارخانه سازنده‌ی کیت انجام گرفت.

پس از سنتز cDNA، سطح بیان Total TERRA به وسیله‌ی Real-time PCR توسط دستگاه StepOnePlus™system و با استفاده از مستر میکس SYBR Green اندازه‌گیری شد. تکثیر Total TERRA به‌وسیله پرایمرهای اختصاصی تلومر انجام گرفت. پرایمرها از مطالعات گذشته به دست آمد (۳۱–۳۰، ۳).

پرایمرهای Tel1b 5′-CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTG-3′ و Tel2b 5′-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA-3′ برای تکثیر TERRA مورد استفاده قرار گرفت (۳۰، ۳). پرایمرهای 36B4u 5′-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3′ و 36B4d 5′-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3′ برای تکثیر ژن 36B4 به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (۳۱، ۳).

واکنش Real-time PCR به صورت سه گانه (Triplicates) طراحی شد. مقادیر نسبی (Relative quantities یا RQ) با توجه به سطح بیان 36B4 تعیین شد. سطوح بیان با استفاده از روش Ct مقایسه‌ای ارزیابی شد. مخلوط تکثیر در حجم ۲۰ µl تهیه شد و در آن ۱۰ µl از مسترمیکس SYBR Green/nonROXqPCR (SA Biosciences, CN, PA)، ۰/۴ µl از جفت پرایمر ۱۰ µM اختصاصی ژن (پرایمرهای Forward و Reverse)، ۲ µl از cDNA الگو (۲۵۰ ng/µl) و ۷/۶ µl از آب مقطر دو بار تقطیر (ddH_2O) مخلوط گردید. مرحله‌ی آغازین چرخه‌ی دمایی، به منظور فعال‌سازی آنزیم شروع داغ Taq DNA polymerase در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه تنظیم شد و سپس، ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، به منظور ذوب، اتصال و فاز گسترش PCR تنظیم گردید.

تمام اندازه‌گیری‌ها به صورت سه گانه (Triplicates) انجام شد. به منظور محاسبه بیان نسبی از نرم‌افزار REST 2008 (Relative expression software tool) نسخه‌ی ۲.۰.۷ استفاده شد. سطح نسبی TERRA mRNA با سطح بیان ژن 36B4 نرمالایز شد و روش Ct مقایسه‌ای (ΔCt) به کار گرفته شد. آنالیزهای آماری، به منظور مقایسه‌ی بیان نسبی ژن‌ها در نمونه‌های توموری آستروسایتوما و نمونه‌های شاهد غیر توموری با استفاده از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹

(version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) صورت گرفت و از روش Independent two-tailed t-test جهت مقایسه‌ی بیان TERRA بین آستروسایتوما و نمونه‌های شاهد غیرتوموری استفاده شد.

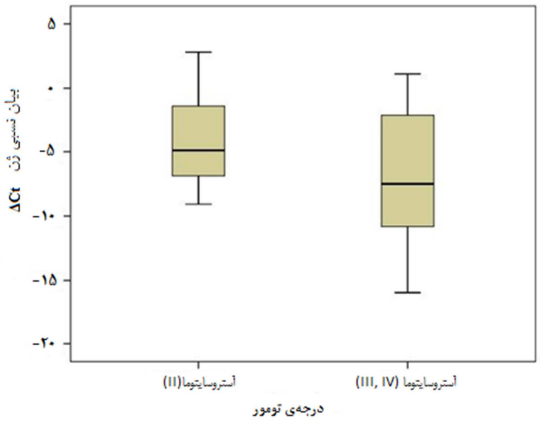
یافته‌ها

۲۶ نمونه‌ی تومور مغزی آستروسایتوما مربوط به ۱۸ زن و ۸ مرد مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سنی افراد، ۱۹/۱۴ ± ۴۶/۰۰ با محدوده‌ی ۸۲–۵ سال بود. ۴ نمونه‌ی شاهد غیرتوموری هم از اتوپسی مغز ۴ جسد انسان تهیه شد و به منظور مقایسه با نمونه‌های توموری مورد استفاده قرار گرفت. از نظر آسیب شناختی، ۶ نمونه در درجه‌ی II، ۲ نمونه در درجه‌ی III و ۱۸ نمونه در درجه‌ی IV توموری بودند.

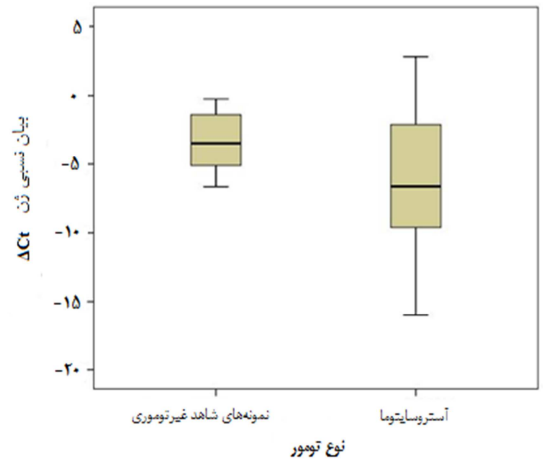
مقایسه‌ی بیان نسبی ژن TERRA بین درجات توموری مختلف در آستروسایتوما انجام شد. میانگین ΔCt در درجات بالای توموری (III و IV) در آستروسایتوما نسبت به درجه‌ی پایین (II) کاهش نشان داد و این امر، حاکی از کاهش بیان TERRA در درجه‌های بالای آستروسایتوما به میزان ۴/۳۷۷ برابر بود (P = ۰/۰۳۶) (شکل ۱).

افزون بر این، اندازه‌گیری بیان TERRA در آستروسایتوما به میزان ۴/۹۶۹ برابر کاهش بیان در مقایسه با نمونه‌های شاهد غیرتوموری نشان داد (P = ۰/۰۲۹) (شکل ۲).

همچنین، بیان TERRA بین درجات مختلف آستروسایتوما با نمونه‌های شاهد غیرتوموری مقایسه گردید و مشخص شد که بیان این ژن در درجه‌ی پایین (II) از آستروسایتوما نسبت به نمونه‌های شاهد غیرتوموری به میزان ۱/۹۹۰ برابر کاهش بیان نشان می‌دهد (P > ۰/۰۵۰). در حالی که، مقایسه‌ی بیان TERRA در درجات بالای آستروسایتوما (III و IV) نسبت به نمونه‌های شاهد غیرتوموری، به میزان ۸/۲۷۱ برابر کاهش بیان نشان داد (P = ۰/۰۱۶).



شکل ۱. مقایسه‌ی بیان نسبی ژن TERRA در درجه‌ی توموری پایین (II) و درجات توموری بالای (III و IV) آستروسایتوما



شکل ۲. مقایسه‌ی بیان نسبی ژن TERRA در آستروسایتوما و نمونه‌های شاهد غیرتوموری

بحث

ارزیابی بیان ژن TERRA سنجشی به نسبت نوین، جهت تعیین نوع مکانیسم نگه‌دارنده‌ی طول تلومر بوده، نوع تومور را بر اساس فعال‌سازی آنزیم تلومراز

(Tel-TMM) یا به کارگیری مکانیسم نوترکیبی همولوگ (ALT TMM) مشخص می‌نماید (۲۴). سطح بیان TERRA به وسیله‌ی روش‌های مبتنی بر PCR اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه، سطح بیان TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما به وسیله‌ی سنجش PCR تکرارهای اختصاصی تلومری انجام شد. تکثیر تکرارهای اختصاصی تلومری مبتنی بر PCR در مطالعات دیگر گذشته هم مورد استفاده قرار گرفته است (۳۱-۳۰).

در گذشته، مطالعات زیادی روی بیان ژن TERRA در تومورهای مغزی انجام نشده است. با این حال، توجه به این که بیان TERRA منعکس کننده‌ی نوع مکانیسم نگه‌دارنده‌ی تومور می‌باشد (۲۴) و تنظیم وضعیت تلومری نقشی به مراتب بزرگ‌تر از آن چه در گذشته تصور می‌شد، در سبب شناسی بیماری بازی می‌کند (۳۲)، ما را به پژوهش در این زمینه ترغیب نمود.

ما دریافتیم که کاهش بیان Total TERRA، به طور چشم‌گیری با افزایش درجه‌ی توموری در آستروسایتوما مرتبط می‌باشد. به عبارت دیگر، بیان TERRA با درجه‌ی توموری در آستروسایتوما رابطه‌ی معکوس دارد (۲۳، ۱۹). در واقع، چنین به نظر می‌رسد که بیان ژن TERRA با افزایش فعالیت آنزیم تلومراز رابطه‌ی معکوس نشان می‌دهد. اگر چه، کاهش بیان TERRA نسبت به بافت طبیعی در درجات پایین آستروسایتوما آغاز می‌گردد، اما درجات بالاتر آستروسایتوما، کاهش بیان به مراتب بیشتری را نشان می‌دهد. در ترکیب این نتایج با یافته‌های مطالعات گذشته، چنین به نظر می‌رسد که کاهش فعالیت تلومراز با افزایش بیان ژن TERRA همراه است (۳۳، ۳) و افزایش سطوح TERRA می‌تواند نشانگری برای مکانیسم نگه‌دارنده‌ی طول تلومر بر اساس نوترکیبی همولوگ ALT TMM باشد (۲۴).

همان طور که پیش‌تر اشاره شد، تاکنون دو نوع مکانیسم نگه‌داری طول تلومر شناسایی شده است که شامل تلومراز ALT می‌باشد. در نئوپلازی‌ها، نوع مکانیسم‌های نگه‌داری طول تلومر می‌تواند به پیش‌بینی بیماری کمک نماید و احتمال می‌رود که در آینده باعث یافتن درمان مستقیم شود. بر اساس این دو نوع مکانیسم نگه‌داری طول تلومر، ۴ گروه توموری در انسان تعریف می‌شود (۱۱). تومورهایی که فقط از تلومراز به عنوان نگه‌دارنده‌ی طول تلومر بهره می‌برند (Tel TMM)، تومورهایی که فقط از ALT استفاده می‌کنند (ALT TMM)، تومورهایی که از هیچ کدام از این سیستم‌های نگه‌دارنده‌ی طول تلومر استفاده نمی‌کنند (Non-determined یا NDTMM) و تومورهایی که از هر دو سیستم ALT و تلومراز استفاده می‌نمایند (Tel/ALT TMM). بر اساس این گروه‌بندی چهارگانه می‌توان نوع تومور را تشخیص داد (۲۴).

از آن جایی که هر روزه مهار کننده‌های TMM گسترش می‌یابند، انکولوژیست‌ها نیاز خواهند داشت تا نوع TMM توسط پاتولوژیست‌ها تعیین شود؛ نوع درمان انتخابی، بر اساس تشخیص نوع TMM متفاوت خواهد بود (۲۴). در آستروسایتوما، آنالیزهای بسیار جزئی در مورد TMM انجام شده و مشاهده شده است که در آن، هر ۴ گروه TMM حضور دارند (۲۴). درجه‌ی I آستروسایتوما، که در کودکان شایع است، به جز چند استثنا، از هیچ کدام از سیستم‌های Tel TMM و ALT TMM استفاده نمی‌کنند

(۳۵-۳۴، ۲۵). در درجات II و III از آستروسایتوما، به طور عمده از ALT TMM استفاده می‌شود (۱۲). در فرم شدید آستروسایتوما، یعنی درجه‌ی IV یا گلیوبلاستوما، ALT TMM نادر است (۲۵-۱۵ درصد)، Tel TMM بالای ۴۰ و NDTMM در حدود ۴۰ درصد قابل مشاهده می‌باشد (۱۲-۱۱، ۳۶). در برخی از موارد آستروسایتوما، Tel/ALT TMM وجود دارد؛ اما نادرتر از موارد دیگر است و در نزدیک به ۵ درصد موارد دیده می‌شود (۱۱). آستروسایتوماهای با درجه‌ی پایین واجد بعضی از نشانگرهای ALT TMM هستند ولی همه‌ی نشانگرهای آن را دارا نمی‌باشند که می‌تواند بیانگر این موضوع باشد، که آمادگی برای داشتن ALT TMM در تومورهای NDTMM، از قبل در رده‌ی سلولی مستعد به استفاده از ALT TMM وجود داشته است (۳۴).

روش‌هایی که Tel TMM و ALT TMM را تشخیص می‌دهند، به طور معمول در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، همیشه کاربردی نیستند (۳۸-۳۷، ۱۳). به تازگی اثبات شده است که استفاده از دو روش مورد نیاز است؛ یک روش، اطلاعات مربوط به Tel TMM و دیگری، اطلاعاتی مربوط به وضعیت ALT TMM را مشخص می‌نماید تا بتوان گروه‌های چهارگانه‌ی TMM را از هم متمایز نمود. در مطالعه‌ای Sampl و همکاران، یک گروه متشکل از ۲۸ نمونه‌ی گلیوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت و پژوهشگران دریافتند که حداقل استفاده از دو روش برای شناسایی نوع TMM ضروری است و ترکیبی از انواع سنجش‌های مختلف، می‌تواند با میزان بقا ارتباط نشان دهد. مطابق مطالعه‌ی آنان، بیان TERRA همراه با سنجش فعالیت تلومراز در آستروسایتوما می‌تواند در تشخیص میزان بقا موثر واقع شود (۳). از این رو، ما میزان بیان TERRA در آستروسایتوما را در مطالعه‌ی خود بررسی و با بیان این ژن در نمونه‌های بافتی طبیعی مقایسه نمودیم. نتایج حاصل از این پژوهش، یافته‌های مطالعات گذشته را تأیید نمود. افزون بر این، این یافته‌ها می‌تواند در طی مطالعات آینده، جهت پیش‌بینی نوع TMM به کار گرفته شود.

توانایی تعیین نوع TMM با استفاده از نمونه‌های خون، راهکاری جذاب در آنالیزهای بالینی است و به منظور تشخیص اولیه‌ی تومور، مفید می‌باشد (۲۴). ورود این یافته‌های تشخیصی به حوزه‌ی کارآزمایی بالینی بسیار ضروری می‌باشد. در ضمن، استفاده از ترکیبی از این روش‌ها برای پیش‌بینی وضعیت بالینی بیمار می‌تواند، باعث افزایش حساسیت و اختصاصیت نتایج شود (۲۴). به دنبال یافتن مکانیسم نگه‌داری طول تلومر در تومور می‌توان به یک راهکار درمانی مؤثر و مفید دست یافت (۱۱). تحقیقات بر روی TERRA، در ابتدای مسیر خود قرار دارد و دست‌کاری آن به منظور یافتن یک راهکار درمانی مناسب در بیماری‌های مرتبط با تلومر، مرکز توجه تحقیقات TERRA در آینده قرار گرفته است.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، که بودجه‌ی انجام این تحقیق را تأمین نمود.

References

1. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. Nature 1991; 350(6319): 569-73.
2. Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: normal length of human telomeres. Ann Anat 2010; 192(5): 284-91.
3. Sampl S, Pramhas S, Stern C, Preusser M, Marosi C, Holzmann K. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. Transl Oncol 2012; 5(1): 56-65.
4. Chen HJ, Liang CL, Lu K, Lin JW, Cho CL. Implication of telomerase activity and alternations of telomere length in the histologic characteristics of intracranial meningiomas. Cancer 2000; 89(10): 2092-8.
5. Cabuy E, de Ridder L. Telomerase activity and expression of telomerase reverse transcriptase correlated with cell proliferation in meningiomas and malignant brain tumors in vivo. Virchows Arch 2001; 439(2): 176-84.
6. Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. Curr Opin Genet Dev 1999; 9(1): 97-103.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1): 57-70.
8. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer 1997; 33(5): 787-91.
9. Neumann AA, Reddel RR. Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. Nat Rev Cancer 2002; 2(11): 879-84.
10. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. Oncogene 2002; 21(4): 598-610.
11. Hakin-Smith V, Jellinek DA, Levy D, Carroll T, Teo M, Timperley WR, et al. Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. Lancet 2003; 361(9360): 836-8.
12. Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. Clin Cancer Res 2005; 11(1): 217-25.
13. Henson JD, Reddel RR. Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. FEBS Lett 2010; 584(17): 3800-11.
14. Costa A, Daidone MG, Daprai L, Villa R, Cantu S, Pilotti S, et al. Telomere maintenance mechanisms in liposarcomas: association with histologic subtypes and disease progression. Cancer Res 2006; 66(17): 8918-24.
15. Cairney CJ, Hoare SF, Daidone MG, Zaffaroni N, Keith WN. High level of telomerase RNA gene expression is associated with chromatin modification, the ALT phenotype and poor prognosis in liposarcoma. Br J Cancer 2008; 98(8): 1467-74.
16. Ohali A, Avigad S, Ash S, Goshen Y, Luria D, Feinmesser M, et al. Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. Cancer 2006; 107(6): 1391-9.
17. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. Science 2007; 318(5851): 798-801.
18. Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. FEBS Lett 2010; 584(17): 3812-8.
19. Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell 2008; 32(4): 465-77.
20. Luke B, Lingner J. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. EMBO J 2009; 28(17): 2503-10.
21. Schoeftner S, Blasco MA. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. Semin Cell Dev Biol 2010; 21(2): 186-93.
22. Ng LJ, Cropley JE, Pickett HA, Reddel RR, Suter CM. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. Nucleic Acids Res 2009; 37(4): 1152-9.

23. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. Nat Cell Biol 2008; 10(2): 228-36.
24. Hung NA, Hsia H, Royds JA, Slatter TL. Telomere maintenance mechanisms: prognostic and therapeutic implications for the pathologist and oncologist. Open Journal of Pathology 2013; 3(1): 10-20.
25. Heaphy CM, Subhawong AP, Hong SM, Goggins MG, Montgomery EA, Gabrielson E, et al. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. Am J Pathol 2011; 179(4): 1608-15.
26. Basu N, Skinner HG, Litzelman K, Vanderboom R, Baichoo E, Boardman LA. Telomeres and telomere dynamics: relevance to cancers of the GI tract. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2013; 7(8): 733-48.
27. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol 2005; 64(6): 479-89.
28. Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. Mayo Clin Proc 2007; 82(10): 1271-86.
29. Scheithauer BW, Fuller GN, VandenBerg SR. The 2007 WHO classification of tumors of the nervous system: controversies in surgical neuropathology. Brain Pathol 2008; 18(3): 307-16.
30. O'Callaghan N, Dhillon V, Thomas P, Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. Biotechniques 2008; 44(6): 807-9.
31. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res 2002; 30(10): e47.
32. Armanios M. Syndromes of telomere shortening. Annu Rev Genomics Hum Genet 2009; 10: 45-61.
33. Kheirollahi M, Mehrazin M, Kamalian N, Mohammadi-asl J, Mehdipour P. Telomerase activity in human brain tumors: astrocytoma and meningioma. Cell Mol Neurobiol 2013; 33(4): 569-74.
34. Slatter T, Gifford-Garner J, Wiles A, Tan X, Chen YJ, MacFarlane M, et al. Pilocytic astrocytomas have telomere-associated promyelocytic leukemia bodies without alternatively lengthened telomeres. Am J Pathol 2010; 177(6): 2694-700.
35. Tabori U, Vukovic B, Zielenska M, Hawkins C, Braude I, Rutka J, et al. The role of telomere maintenance in the spontaneous growth arrest of pediatric low-grade gliomas. Neoplasia 2006; 8(2): 136-42.
36. Royds JA, Al NS, Wiles AK, Chen YJ, Ahn A, Shaw A, et al. The CDKN2A G500 allele is more frequent in GBM patients with no defined telomere maintenance mechanism tumors and is associated with poorer survival. PLoS One 2011; 6(10): e26737.
37. Durant ST. Telomerase-independent paths to immortality in predictable cancer subtypes. J Cancer 2012; 3: 67-82.
38. Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. Clin Chim Acta 2006; 371(1-2): 25-31.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 05.11.2014
Vol. 32, No. 317, 2nd Week, March 2015
Accepted: 11.02.2015

Expression of TERRA in Different Grades of Astrocytoma

Sepideh Dashti MSc[1], Saeideh Ashouri MSc[1], Majid Kheirollahi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Brain tumors include burden of mortality from cancers. High grades of brain tumors are more aggressive and have poor prognosis. Introduction telomeres are the ends of linear chromosomes that serve as a protective cap to avoid permanent proliferation arrest, termed replicative senescence. In vertebrates, telomeres consist of tandem repeats of TTAGGG hexanucleotide sequences. In spite of heterochromatin structure of telomeres, they are transcribed into a non-coding RNA called telomeric repeat-containing RNA or TERRA which acts as a natural inhibitor of telomerase activity. Considering astrocytoma, as one of the most common tumors of the central nervous system (CNS), and a very poor prognosis tumor, the aim of this study was to evaluate the TERRA expression level in astrocytoma tumors and nontumoral controls. Furthermore, expression levels of TERRA were compared between different grades of astrocytoma.

Methods: The mRNA of 26 brain tumor samples and 4 samples as nontumoral controls were extracted and cDNA was synthesized. Then, real-time reverse transcription polymerase chain reaction (SYBR Green kit) for quantitation of total TERRA levels was developed.

Findings: We demonstrated the correlation between total TERRA levels of expression with different grades of astrocytoma. High grades (III and IV) of astrocytoma tumors had lower mean of ΔCt than low grades (II) and down-regulation for TERRA mRNA was 4.377-fold (P = 0.036). Additionally, measurement of TERRA expression in astrocytoma showed 4.969-fold less compared to levels of TERRA expression in nontumoral controls (P = 0.029).

Conclusion: According to our study, TERRA may be prognostic marker in astrocytoma tumors.

Keywords: Expression, TERRA, Telomere, Astrocytoma

Citation: Dashti S, Ashouri S, Kheirollahi M. **Expression of TERRA in Different Grades of Astrocytoma.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2333-42

1- Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Majid Kheirollahi PhD, Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir